

کیفیت اسپرم تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) پس از نگهداری در سرما با دی‌متیل سولفوکساید (DMSO)

*مریم احمدی فحبی^۱، عباس علی زمینی^۲، شهروز برادران نویری^۳،
مسعود فرخ‌روز^۴ و علی‌رضا مبرهن‌فرد^۵

^۱دانش‌آموخته کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، آستادیار گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان،
^۲کارشناس ارشد بیولوژی دریا، بخش ژنتیک، انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت، ^۳دکترای شیلات و عضو هیأت علمی
دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، ^۴دکترای شیلات و عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج

چکیده

حداکثر زمان توانایی باروری اسپرم در دمای معمولی محیط، ۵ تا ۶ ساعت بعد از استحصال آن از مولد نر است. در حالی که با روش انجماد و با استفاده از رقیق‌کننده‌ها و مواد محافظ سرمای مناسب، می‌توان اسپرم را به مدت چندین سال در ازت مایع نگهداری نمود. در انجماد اسپرم ماهیان خاویاری از مواد محافظ در سرمای متنوعی استفاده می‌شود ولی از میان آنها DMSO کاربرد بیشتری دارد. هدف از این پژوهش، بررسی اثر حفاظتی DMSO در غلظت‌های مختلف (۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ درصد) و بررسی درصد و زمان تحرک اسپرم‌ها پس از انجمادزدایی می‌باشد. در این تحقیق اسپرم ۵ مولد نر از تاس ماهی ایرانی (قره‌برون) انتخاب و با استفاده از محلول رقیق‌کننده حاوی تریس، ساکاروز، زرده تخم‌مرغ و دی‌متیل سولفوکساید به نسبت یک به یک رقیق شد. سپس اسپرم رقیق شده در لوله‌های نازک پلاستیکی (پایوت) با حجم ۰/۵ میلی‌لیتر ذخیره و با استفاده از بخار ازت (دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) در سه مرحله منجمد و در کانتینرهای ازت مایع ذخیره شد. پس از ۷ و ۷۲ روز نگهداری در ازت مایع، با استفاده از آب ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه انجمادزدایی انجام شد. سپس درصد و زمان تحرک اسپرم‌ها با استفاده از میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج به‌دست آمده، درصد تحرک اسپرم‌ها پس از انجمادزدایی در غلظت‌های ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ درصد پس از ۷ روز نگهداری در ازت مایع به ترتیب معادل ۸/۵۰±۰/۶۱، ۱۲/۵۴±۲/۵۷، ۱۹±۵/۶۶ و ۱۶/۳۰±۶/۱۵ درصد به‌دست آمد و مدت زمان تحرک اسپرم این ماهی پس از انجمادزدایی در غلظت‌های ذکر شده پس از ۷ روز نگهداری به ترتیب در حد ۲۸/۸۷±۲۸/۳۰، ۳۶/۵۴±۳۶/۳۰، ۲۷±۵۰/۵۱ و ۲۱۸±۶۳/۸۵ ثانیه محاسبه گردید. همچنین درصد تحرک اسپرم‌ها پس از انجمادزدایی در غلظت‌های ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ درصد پس از ۷۲ روز نگهداری در ازت مایع به ترتیب معادل ۸/۵۰±۳۹/۵۰، ۱۹۴/۵۰±۴۳/۶۳، ۱۵۴/۰۰±۳۷/۳۴ و ۲۲۱/۷۰±۴۷/۳۱ ثانیه محاسبه گردید. اگرچه اختلاف معنی‌دار آماری بین غلظت‌های انتخاب شده، از لحاظ درصد و زمان تحرک اسپرم‌ها پس از انجمادزدایی وجود نداشت اما DMSO به میزان ۱۲ و ۱۵ درصد دارای درصد و زمان تحرک بیشتری بوده است. همچنین نتایج به‌دست آمده بیانگر این مطلب است که افزایش غلظت DMSO از ۸ درصد تا ۱۵ درصد در نگهداری درازمدت اسپرم تاس ماهی ایرانی تغییری در درصد سلول‌های متحرک و مدت زمان تحرک رو به جلوی آنها ندارد.

واژه‌های کلیدی: اسپرم، تاس ماهی ایرانی، درصد تحرک، زمان تحرک، نگهداری در سرما، DMSO

مقدمه

بررسی آمار صید ماهیان خاویاری در سواحل ایران نشان می‌دهد که در سال‌های اخیر تنها وضعیت ذخایر تاس‌ماهی ایرانی بهتر از ذخایر سایر تاس‌ماهیان بوده و ۴ گونه دیگر با کاهش فوق‌العاده‌ای مواجه شده است (۶) و (۴). از طرف دیگر در طول فصل تکثیر، به‌طور عمده تعداد مولدین نر صید شده بیشتر از تعدادی است که برای پوشش دادن لقاح تخمک‌های استحصالی از مولدین صید شده لازم است و در نتیجه پتانسیل اسپرم‌دهی تعدادی از مولدین نر از دست می‌رود. از سوی دیگر گاهی با وجود مولدین نر مناسب، مولد ماده مناسب در مراکز تکثیر وجود نداشته و بدین ترتیب امکان استفاده از اسپرم مولدین موجود نیز کاهش می‌یابد (۳). در چنین مواقعی می‌توان با کمک تکنیک انجماد، تخمک‌ها را با اسپرم انجمادزایی شده بارور کرد و یا اسپرم‌های مازاد را منجمد و در آینده مورد استفاده قرار داد. نگهداری اسپرم در شرایط انجماد (Cryopreservation) شاخه‌ای از علم Cryobiology است که در آن به حفظ و نگهداری مواد بیولوژیک در دماهای پایین (معمولاً ازت مایع با دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) پرداخته می‌شود (۸).

تا به امروز اسپرم بیش از ۲۰۰ گونه از ماهیان با لقاح خارجی مورد انجماد قرار گرفته و هر ساله بر این تعداد اضافه می‌شود (۹). در مورد انجماد و نگهداری طولانی مدت اسپرم ماهیان خاویاری مطالعات زیادی صورت نگرفته اما این مطالعات در سال‌های اخیر رشد فزاینده‌ای یافته است (۲۵). Kopeika و همکاران (۲۰۰۰) توانستند از اسپرم منجمد تاس‌ماهی آتلانتیک (*Acipenser sturio*) پس از ۲۲ روز نگهداری در ازت مایع، میزان لقاح معادل ۶۴ درصد به‌دست آورند. Tsvetkova و همکاران (۱۹۹۶) نیز با انجماد اسپرم تاس‌ماهی سبیری (*Acipenser baeri*) و استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) و انجام آزمایش لقاح بر روی تخمک‌ها به ترتیب ۲۳ درصد و ۵۴ درصد لقاح در تخمک‌های گونه‌های مورد نظر به‌دست آوردند. روش‌های مختلف به‌کار رفته در مورد محلول‌های

رقیق‌کننده، مراحل سرمادهی، نسبت رقت و نتایج به‌دست آمده در مورد ۶ گونه از ماهیان خاویاری توسط Billard و همکاران (۲۰۰۴) مرور شده است. مطالعاتی در زمینه انجماد اسپرم و نگهداری کوتاه مدت اسپرم ماهیان خاویاری دریای خزر توسط Cherepanov و Kopeika (۱۹۹۹) نیز انجام شده است. در این تحقیق ۹۰-۴۰ درصد اسپرم‌های منجمد شده دارای تحرک بودند. مطالعاتی نیز در سال‌های اخیر بر روی نگهداری اسپرم تاس‌ماهی مکزیک (*Acipenser oxyrinchus*) و تاس‌ماهی پوزه کوتاه (*Acipenser brevirostrum*) و تاس‌ماهی چین (*Acipenser sinensis*) صورت گرفته است (۲۶).

در ایران مطالعات اولیه در ارتباط با نگهداری طولانی مدت اسپرم تاس‌ماهیان، با فشردن بیضه‌های مولدین و نگهداری اسپرم‌های زنده در یخچال معمولی آغاز گردید (۱). متأسفانه پیگیری نتایج به‌دست آمده از این مطالعات در سال‌های بعد ادامه نیافت تا اینکه با بررسی رقیق‌کننده ارائه شده برای ماهیان خاویاری توسط Billard و مقایسه آن با رقیق‌کننده‌های کپورماهیان و آزادماهیان، مشخص شد که رقیق‌کننده مخصوص ماهیان خاویاری در انجماد و نگهداری طولانی مدت اسپرم تاس‌ماهی ایرانی، تاس‌ماهی روسی، ازون‌برون و شیب در ازت مایع کارایی بیشتری داشته و اسپرم این ماهیان در رقیق‌کننده ارائه شده حداکثر تا ۷۰-۶۰ درصد تحرک دارند (۵). در مطالعه دیگری امکان انجماد و نگهداری اسپرم مولدین ۵ گونه از ماهیان خاویاری جنوب دریای خزر به کمک رقیق‌کننده اختصاصی این ماهیان به‌وجود آمد. در این مطالعه ضمن القای تحرک اسپرم‌ها، لقاح به‌میزان ۶۰-۴۴ درصد در گونه‌های مختلف نیز به‌دست آمد (۲). کاربرد مواد محافظ سرما در فرآیند انجماد اسپرم به همراه محلول‌های رقیق‌کننده معمول است. این مواد به دو صورت، محافظت‌کننده‌های نفوذی و محافظت‌کننده‌های غیرنفوذی مورد استفاده قرار می‌گیرند. دی‌متیل سولفوکساید

(DMSO)، متانول (MeOH) و اتیلن گلیکول (EG) رایج‌ترین مواد محافظ سرمایی می‌باشند (۱۲).

در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی بر روی کاربرد انواع مواد محافظ سرمایی در انجماد اسپرم ماهیان به عمل آمده است، اما در نحوه کاربرد این مواد و غلظت مناسب آن در روند انجماد اسپرم ماهیان خاویاری اتفاق نظری وجود نداشته است. از این رو مطالعه بیشتر بر روی بررسی حیات در شرایط انجماد اسپرم ماهیان خاویاری و اثر مواد محافظ سرما در غلظت‌های مختلف بر روی تحرک و قابلیت باروری اسپرم برای تثبیت روش مناسب در روند انجماد اسپرم ماهیان خاویاری ضروری به نظر می‌رسد. از اهداف این تحقیق می‌توان به تعیین غلظت و درصد مناسب از ماده محافظ سرما (DMSO) در انجماد اسپرم تاس‌ماهی ایرانی، بررسی امکان نگهداری اسپرم تاس‌ماهی ایرانی در ازت مایع و بررسی و تعیین کیفیت اسپرم شامل درصد و زمان تحرک اسپرماتوزوئیدهای منجمد شده تاس‌ماهی ایرانی پس از انجمادزدایی اشاره نمود.

مواد و روش‌ها

تیمارها و تکرار: تیمارها شامل DMSO در غلظت‌های ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ درصد بودند که هر کدام در چهار تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. آزمایشات اندازه‌گیری و بررسی کمی و کیفی اسپرم از ۱۶ مولد نر تاس‌ماهی ایرانی انجام گرفت که از بین ۱۶ مولد نر ذکر شده، اسپرم ۵ مولد برای انجماد مناسب تشخیص داده شد و عملیات انجماد تنها بر روی اسپرم این ۵ مولد انجام گرفت.

روش اسپرم‌گیری: اسپرم‌گیری از مولدین تاس‌ماهی ایرانی، بعد از انتخاب ماهی نر رسیده با بیهوش کردن آن صورت گرفت. برای اسپرم‌گیری از مولدین با وزن کم، ابتدا محوطه مجرای تناسلی و شکمی، با پارچه کاملاً خشک شده و اسپرم از منفذ تناسلی با فشار در ظرف آلومینیومی جمع‌آوری شد. برای استحصال اسپرم از مولدین نر بزرگ‌تر از سرنگ ۵۰ میلی‌لیتری متصل به تیوپ پلاستیکی (Tygon) استفاده شد. اسپرم‌های آلوده

شده به مواد دفعی و ادرار یا خون مورد آزمایش قرار نگرفتند (۲۴). اسپرم استحصالی درون ظروف درب‌دار خنک ریخته شد و بلافاصله به یخچال آزمایشگاه اسپرم در دمای +۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت منتقل و تا زمان انجام آزمایش (در کوتاه‌ترین زمان ممکن) در یخچال نگهداری شد.

ارزیابی کمی و کیفی اسپرم قبل از انجماد: درصد تحرک و مدت زمان تحرک اسپرماتوزوئیدها با میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی $\times 400$ ارزیابی گردید. در این بررسی درصد تحرک اسپرماتوزوئیدها به روش تخمین چشمی مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۷ و ۲۲). زمان تحرک اسپرماتوزوئیدها بلافاصله پس از مخلوط کردن و از لحظه تماس با آب، با استفاده از کرنومتر دیجیتال محاسبه شد (۹، ۱۶ و ۲۴). به منظور یکسان‌سازی pH محلول رقیق‌کننده با pH اسپرم تازه، pH نمونه‌های اسپرمی به‌طور جداگانه با pH متر دیجیتال اندازه‌گیری شد و برای یکسان‌سازی pH محلول رقیق‌کننده با pH هر نمونه از اسید کلریدریک استفاده شد (۲۱).

جهت تعیین تراکم اسپرماتوزوئید (تعداد اسپرم در یک حجم مشخص) از لام هماسیتومتر استفاده شد (۷ و ۲۷). ارزیابی اسپرماتوکریت توسط دستگاه سانتریفوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت (۲۹).

رقیق‌سازی اسپرم توسط رقیق‌کننده‌ها: قبل از انجماد، اسپرم‌ها با مواد رقیق‌کننده مناسب ماهیان خاویاری حاوی ۲۳/۴ میلی‌مول تریس، ۱/۸ میلی‌مول ساکاروز و ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ (۱۰) به همراه DMSO به‌عنوان ماده محافظ در سرما در غلظت‌های ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ درصد (۲۰، ۲۵ و ۲۶) به‌طور جداگانه رقیق‌سازی شده و به نسبت ۱:۱ با اسپرم مخلوط شدند (شکل ۱) (۱۲ و ۱۹). برای ذخیره اسپرم از پایوت‌های ۰/۵ میلی‌لیتری فرانسوی با رنگ‌های مختلف استفاده شد (شکل ۲).

انجماد اسپرم توسط ازت مایع: مراحل سرمادهی به روش دستی، در آزمایشگاه انجام شد (شکل ۳).

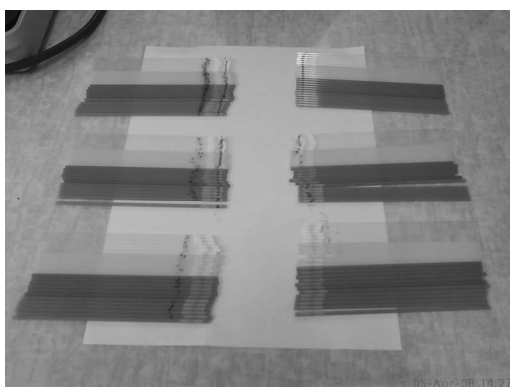
تجزیه و تحلیل اطلاعات: کلیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA و آزمون مقایسه میانگین دانکن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. میانگین‌ها براساس $\pm SE$ میانگین ارائه شده در سطح ۹۵ درصد و در پاره‌ای از موارد در سطح ۹۹ درصد برای معنی‌دار بودن اختلافات مقایسه شدند و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار SPSS رسم گردید.

نتایج

نتایج حاصل از ارزیابی کمی و کیفی اسپرم ۱۶ مولد نر تاس‌ماهی ایرانی که شامل زمان تحرک اسپرماتوزوئیدها، درصد سلول‌های متحرک اسپرم، اسپرماتوکریت، تراکم و همچنین pH اسپرم بود، در جدول ۱ خلاصه شده است. همچنین نتایج حاصل از بررسی مدت زمان و درصد تحرک اسپرماتوزوئیدهای ۵ مولد نر تاس‌ماهی ایرانی پس از انجمادزدایی در جدول‌های ۲ تا ۴ آمده است.

بدین ترتیب نمونه‌ها در ۱۵ سانتی‌متری از بالای سطح ازت مایع به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت و پس این مرحله نمونه به سطح ازت مایع نزدیک‌تر شده و به مدت ۵ دقیقه در ۵ سانتی‌متری بالای بخار ازت مایع قرار گرفت و سرانجام در ازت مایع غوطه‌ور شدند (۲۲). نمونه‌ها پس از سرمادهی تدریجی و رسیدن به برودت ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد برای نگهداری طولانی مدت وارد تانک ازت مایع شدند (شکل ۴).

ارزیابی کیفی اسپرم پس از انجمادزدایی: در عملیات انجام شده برای ارزیابی کیفی اسپرم پس از انجمادزدایی اعم از درصد تحرک و مدت زمان تحرک اسپرماتوزوئیدها، نیمی از نمونه‌ها بعد از حدود ۷ روز و نیمی دیگر پس از ۷۲ روز از حالت انجماد خارج شدند. برای این کار لوله‌های حاوی اسپرم منجمد شده از کاننتینر ازت مایع خارج شده و به مدت ۲۵ ثانیه در آب گرم ۴۰ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد تا اسپرم‌ها از حالت انجماد خارج گردند (۲۲).



شکل ۲- پایوت‌ها برای ذخیره اسپرم



شکل ۱- افزودن محلول رقیق‌کننده به همراه ماده محافظ سرما به اسپرم



شکل ۴- وارد کردن نمونه‌ها در داخل تانک ازت مایع



شکل ۳- سرمادهی تدریجی توسط بخار ازت مایع

جدول ۱- ارزیابی کمی و کیفی بر روی اسپرم تاس ماهی ایرانی قبل از انجماد

۲۶۷/۶۹±۳۶/۳۱	میانگین زمان تحرک اسپرم (ثانیه)
۷۲/۹۷±۵/۲۳	میانگین درصد تحرک اسپرم (درصد)
۵/۵۵±۰/۹۲	میانگین درصد اسپرمتوکریت
۱/۶±۰/۳	میانگین تعداد اسپرم ($10^6/mm^3$)
۹/۲۵±۰/۰۹	میانگین pH

جدول ۲- مقایسه میانگین زمان و درصد تحرک اسپرمتوزوئیدها پس از رقیق سازی و انجماد با DMSO و اسپرم تازه

DMSO	اسپرم تازه	
۲۱۳/۶۲±۱۵/۵۳ ^a	۲۶۷/۶۹±۳۶/۳۱ ^b	میانگین زمان تحرک اسپرم (ثانیه)
۱۲/۸۲±۱/۳۷ ^a	۷۲/۹۷±۵/۲۳ ^b	میانگین درصد تحرک اسپرم (درصد)

جدول ۳- میانگین درصد و زمان تحرک اسپرمتوزوئیدها بین DMSO (طی نگهداری به مدت ۷ و ۷۲ روز در ازت مایع) و اسپرم تازه

ماده نگهدارنده	زمان نگهداری	زمان تحرک (ثانیه)	درصد تحرک (درصد)
DMSO	۷ روز	۲۳۵/۹۵±۲۳/۱۱ ^{ab}	۱۴/۱۳±۲/۲۱ ^b
	۷۲ روز	۱۹۱/۳۰±۲۰/۱۱ ^a	۱۱/۵۰±۱/۶۴ ^{ab}
اسپرم تازه	-	۲۶۷/۶۹±۳۶/۳۱ ^b	۷۲/۹۷±۵/۲۳ ^c

با توجه به آزمون تجزیه واریانس یک طرفه ANOVA بین DMSO طی نگهداری به مدت ۷ و ۷۲ روز در ازت مایع و اسپرم تازه از نظر میانگین زمان و درصد تحرک اسپرمتوزوئیدها اختلاف معنی دار آماری وجود دارد ($P < 0/01$).

بین زمان و درصد تحرک اسپرم های نگهداری شده در DMSO به مدت ۷ و ۷۲ اختلاف معنی دار وجود نداشت ولی هر دو گروه با اسپرم تازه اختلاف معنی دار داشتند ($P < 0/01$).

با توجه به آزمون تجزیه واریانس یک طرفه ANOVA بین DMSO و اسپرم تازه از نظر میانگین زمان و درصد تحرک اسپرمتوزوئیدها اختلاف معنی دار آماری وجود داشت ($P < 0/01$) (جدول ۲). آزمون دانکن نیز نشان می دهد که از نظر زمان و درصد تحرک اسپرمتوزوئیدها، DMSO و اسپرم تازه هر کدام در یک گروه مجزا قرار داشته و با هم اختلاف معنی دار آماری دارند ($P < 0/01$).

جدول ۴- میانگین درصد و زمان تحرک اسپرمتوزوئیدها در تیمارهای مختلف

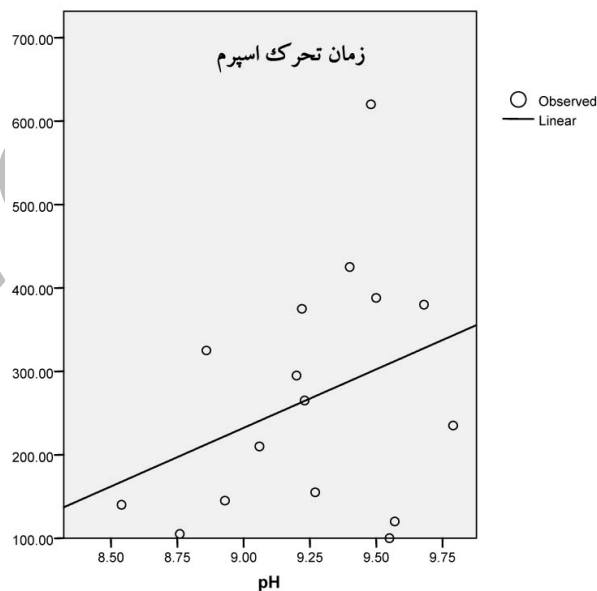
ماده نگهدارنده	زمان نگهداری	درصد	زمان تحرک (ثانیه)	درصد تحرک (درصد)
DMSO	۷ روز	۸	۱۸۴/۳۰±۲۸/۸۷ ^{abc}	۸/۵۰±۰/۶۱ ^a
		۱۰	۲۶۷/۳۰±۳۶/۵۴ ^c	۱۲/۵۴±۲/۵۷ ^a
		۱۲	۲۷۴/۰۰±۵۰/۵۱ ^c	۱۹/۰۰±۵/۶۶ ^a
		۱۵	۲۱۸/۰۰±۶۳/۸۵ ^{abc}	۱۶/۳۰±۶/۱۵ ^a
	۷۲ روز	۸	۱۹۵/۰۰±۳۹/۵ ^{ab}	۱۴/۲۵±۵/۵ ^a
		۱۰	۱۹۴/۵۰±۴۳/۶۳ ^{ab}	۱۰/۵۰±۱/۶۱ ^a
		۱۲	۱۵۴/۰۰±۳۷/۳۴ ^{abc}	۷/۵۰±۱/۸۱ ^a
		۱۵	۲۲۱/۷۰±۴۷/۳۱ ^{ab}	۱۳/۷۵±۲/۷۴ ^a
اسپرم تازه	-	-	۲۶۷/۶۹±۳۶/۳۱ ^c	۷۲/۹۷±۵/۲۳ ^b

با توجه به نتایج حاصل از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه ANOVA بین DMSO در غلظت‌های ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ درصد از نظر میانگین زمان و درصد تحرک اسپرم پس از ۷ روز نگهداری در ازت مایع اختلاف معنی‌دار آماری وجود نداشت ($P > 0/05$). همچنین بین DMSO در غلظت‌های ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ درصد پس از ۷۲ روز نگهداری در ازت مایع از نظر میانگین زمان و درصد تحرک اسپرم اختلاف معنی‌دار آماری وجود نداشت ($P > 0/05$).

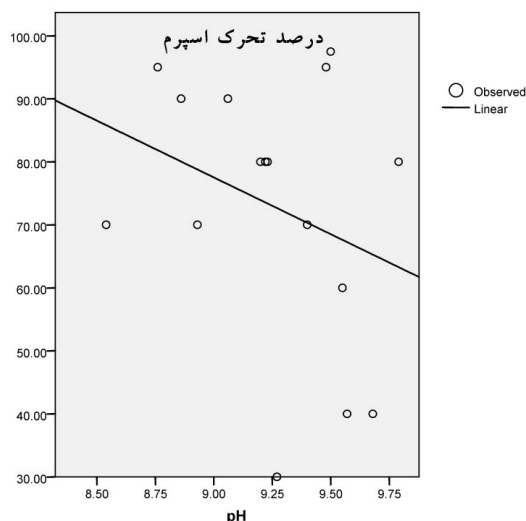
ضریب همبستگی پیرسون (r) بین pH و زمان تحرک اسپرم برابر با ۰/۳۳۹ بود که با توجه به مقدار P (۰/۱۹۹) ضریب همبستگی در سطح فراتر از ۱۹/۹ درصد معنی‌دار می‌باشد (در سطح ۰/۰۱ و ۰/۰۵ معنی‌دار نبود) (شکل ۵). ضریب همبستگی پیرسون بین pH و درصد تحرک اسپرم برابر با -۰/۳۰۲ بود که با توجه به مقدار P (۰/۲۵۶) ضریب همبستگی در سطح فراتر از ۲۵/۶ درصد معنی‌دار می‌باشد (در سطح ۰/۰۱ و ۰/۰۵ معنی‌دار نبود) (شکل ۶).

همچنین بین اسپرم رقیق‌سازی شده با DMSO در غلظت‌های ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ درصد پس از نگهداری در ۷ روز و ۷۲ روز و اسپرم تازه از نظر میانگین زمان و درصد تحرک اسپرماتوزوئیدها اختلاف معنی‌دار آماری وجود داشت ($P < 0/01$).

از نظر زمان تحرک اسپرماتوزوئیدها، اسپرم رقیق‌سازی شده با DMSO در غلظت ۱۵ درصد پس از ۷ روز نگهداری در یک گروه و اسپرم رقیق‌سازی شده با DMSO در غلظت‌های ۱۰ و ۱۲ درصد پس از ۷ روز نگهداری نیز در یک گروه دیگر قرار داشته و این گروه‌ها با هم اختلاف معنی‌دار آماری داشتند ($P < 0/01$). همچنین از نظر درصد تحرک اسپرماتوزوئیدها، DMSO با غلظت ۸، ۱۰ و ۱۵ درصد پس از ۷ روز و DMSO با غلظت ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ درصد پس از ۷۲ روز نگهداری در یک گروه، DMSO با غلظت ۱۲ درصد پس از ۷ روز نگهداری در یک گروه مجزا و اسپرم تازه نیز در یک گروه دیگر قرار داشته و این گروه‌ها با هم اختلاف معنی‌دار آماری داشتند ($P < 0/01$).



شکل ۵- همبستگی و ارتباط رگرسیونی بین pH و زمان تحرک اسپرماتوزوئیدها



شکل ۶- همبستگی و ارتباط رگرسیونی بین pH و درصد تحرک اسپرماتوزوئیدها

بحث و نتیجه گیری

حداکثر زمان توانایی باروری اسپرم در دمای معمولی محیط، ۵-۶ ساعت بعد از استحصال آن از مولد نر است (۱). در حالی که با روش انجماد و با استفاده از رقیق کننده ها و مواد محافظ سرمای مناسب می توان اسپرم را حداقل به مدت چندین سال در ازت مایع نگهداری نمود (۱۱). معیارهای مختلف زیادی بر روی آزمایش موفقیت انجماد و انجمادزدایی در اسپرم ماهیان استفاده شده است. این معیارها بر روی آسیب سلولی (تغییر مورفولوژی و اندامک های داخل سلولی)، تحرک و ظرفیت بارورسازی پایه ریزی شده اند (۱۱). برای کارایی بیشتر، مطالعات باید بر روی برخی از نکات کلیدی اصول انجماد از جمله بررسی اسپرم تازه، رقیق سازی با مواد رقیق کننده (شامل مواد محافظ سرما و افزودنی ها) و اسپرم انجمادزدایی شده صورت پذیرد (۱۱). صدمات بیوشیمیایی و فیزیکی وارد بر سلول های در حال یخ زدن مثل آگیری نمودن و تغییرات pH از جمله مهمترین صدمات وارده بر سلول طی مراحل انجماد می باشند. این اثرات مخرب را می توان با افزودن مواد محافظ سرما تا حدی کاهش داد.

DMSO ماده محافظ سرمای موثری در انجماد اسپرم

ماهیان خاویاری ذکر شده است (۱۳، ۱۴، ۱۵ و ۲۸). با توجه به نتایج، به دست آمده، میانگین درصد و زمان تحرک در اسپرم گونه تاس ماهی ایرانی با DMSO پس از انجمادزدایی به ترتیب $12/82 \pm 1/37$ درصد و $213/62 \pm 15/53$ ثانیه بوده که در مقایسه با اسپرم تازه (به ترتیب $72/97 \pm 5/23$ درصد و $267/69 \pm 36/31$ ثانیه) از درصد و زمان تحرک کمتری برخوردار بوده است. همچنین در آزمایشی که بر روی تأثیر مدت زمان نگهداری اسپرم در ازت مایع بر روی درصد و زمان تحرک اسپرم منجمد شده انجام گرفت، میانگین درصد و زمان تحرک در نمونه های اسپرمی که توسط DMSO منجمد شده و به مدت ۷ روز در ازت مایع نگهداری شده بودند، به ترتیب $14/13 \pm 2/21$ درصد و $235/95 \pm 23/11$ ثانیه محاسبه شد. همچنین میانگین درصد و زمان تحرک در نمونه های اسپرمی منجمد شده توسط DMSO پس از ۷۲ روز نگهداری در ازت مایع به ترتیب $11/50 \pm 1/64$ درصد و $191/30 \pm 20/11$ ثانیه اندازه گیری شد. نتایج به دست آمده بیان کننده روند کاهشی است که نشان می دهد افزایش زمان نگهداری اسپرم های منجمد شده بر روی کیفیت آنها تأثیر منفی دارد.

تاس ماهی ایتالیایی (*A. naccarii*) را با DMSO در غلظت ۱۰ درصد گزارش کردند. Horvath و همکاران نیز (۲۰۰۵) بالاترین میزان تحرک را پس از انجمادزدایی با DMSO در غلظت ۵ درصد (26 ± 13 درصد) اعلام کردند. علت اختلاف در غلظت مناسب از DMSO در نتایج ذکر شده با نتایج به دست آمده و همچنین علت پایین بودن درصد تحرک اسپرماتوزوئیدها در این تحقیق را می توان نوع گونه انتخاب شده، اختلاف در محلول های رقیق کننده به کار برده شده، روش سرمادهی منتخب در این تحقیق و همچنین ویژگی های خاص مایع منی این گونه عنوان کرد. بدین ترتیب افزایش غلظت DMSO از ۸ درصد تا ۱۵ درصد در نگهداری دراز مدت اسپرم تاس ماهی ایرانی تغییری در درصد سلول های متحرک و مدت زمان تحرک رو به جلوی آنها ندارد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مسئولین محترم انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان و همچنین از همکاری کارشناسان مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی سپاسگزاری می گردد.

جهت تعیین غلظت مناسب ماده محافظ سرما در انجماد اسپرم تاس ماهی ایرانی، DMSO در چهار غلظت متفاوت شامل ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج به دست آمده بیشترین درصد و زمان تحرک با DMSO در غلظت ۱۲ درصد به ترتیب $19/00 \pm 5/66$ درصد و $274/00 \pm 50/51$ ثانیه پس از ۷ روز نگهداری در ازت مایع و کمترین میزان آن با DMSO در غلظت ۱۲ درصد به ترتیب $7/50 \pm 1/81$ درصد و $154/00 \pm 37/34$ ثانیه پس از ۷۲ روز نگهداری در ازت مایع به دست آمد. اگرچه اختلاف معنی دار آماری در بین مقادیر به دست آمده در بین غلظت های منتخب وجود نداشت ($P > 0/05$)، اما در این بررسی DMSO با غلظت ۱۲ و ۱۵ درصد نتایج بهتری را نشان داده است.

Liu و همکاران (۲۰۰۶) نیز DMSO با غلظت ۱۲ درصد را به عنوان ماده محافظ سرمای مناسب در انجماد اسپرم تاس ماهی چینی (*Acipenser persicus*) عنوان کردند. در حالی که Lahnsteiner و همکاران (۲۰۰۴) بیشترین درصد تحرک را با DMSO در غلظت ۱۰ درصد ($80/0 \pm 7/4$ درصد) اعلام کردند. در بررسی دیگری که توسط Galli و همکاران (۲۰۰۶) انجام پذیرفت، این گروه بهترین شرایط در انجماد اسپرم

منابع

- ۱- آذری تاکامی، ق.، و کهنه شهری، م.، ۱۳۵۳. تکثیر مصنوعی و پرورش ماهیان خاویاری. انتشارات دانشگاه تهران. ۲۹۸ صفحه.
- ۲- برادران نویری، ش.، علیپور، ع.، و پورکاظمی، م.، ۱۳۸۲. انجماد اسپرم ۵ گونه از تاس ماهیان دریای خزر. ویژه نامه اولین سمپوزیوم ملی ماهیان خاویاری. مجله علمی شیلات ایران، پاییز ۱۳۸۲. صفحات ۲۳ تا ۲۸.
- ۳- برادران نویری، ش.، ۱۳۸۶. ایجاد بانک اسپرم از مولدین ماهیان خاویاری حاشیه جنوبی دریای خزر. وزارت جهاد کشاورزی، سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، برنامه محیط زیست دریای خزر. ۱۶ صفحه.
- ۴- تقوی مطلق، ا.، ۱۳۷۷. ترکیب سنی و پیش بینی مقدار اپتیمم صید برای چهار گونه ماهیان خاویاری از برون، فیل ماهی، قره برون و چالباش. اولین سمپوزیوم ملی ماهیان خاویاری، ۲۵-۲۴. آذر ۱۳۷۷، رشت، خلاصه مقالات صفحه ۱.
- ۵- عابدی، م.، ۱۳۷۵. بررسی امکان انجماد اسپرم در ماهیان خاویاری. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی. واحد لاهیجان. ۹۵ صفحه.

۶- مقیم، م.، و فضلای، ح.، ۱۳۷۷. بررسی وضعیت کنونی ذخایر ماهیان خاویاری در سواحل جنوبی دریای خزر. اولین سمپوزیوم ملی ماهیان خاویاری، ۲۴-۲۵ آذر ۱۳۷۷، رشت، خلاصه مقالات. صفحه ۲.

۷- هاشمی، م.، ۱۳۷۵. تلقیح مصنوعی در گاو (فیزیولوژی تولیدمثل و تلقیح مصنوعی). انتشارات فرهنگ جامع، چاپ دوم. ۳۰۲ صفحه.

8. Ashwood-Smith, M.J., 1980. Low temperature preservation of cells, tissues and organs. In: Low Temperature Preservation in Medicine and biology (ed. by M.J. Ashwood-Smith), pp. 19-44 Pitman Medical, Tunbridge Wells.
9. Billard, R., Cosson, J., Perchee, G., Linhart, O., 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture* 129, 95-112.
10. Billard, R., Tsvetkova, L.I., Cosson, J., Linhart, O., 1997. Motility analysis of fresh and Thawed spermatozoa in *Acipenser baeri*. 3rd Inter. Sym. Sturgeon. Piacenza, Italy. July 8-11, 1997. Abstract book, AIO.
11. Billard, R., 2001. Techniques of Genetic Resource Banking in Fish. In: Cryobanking the Genetic Resource, (Eds: Watson, P.F., Holt, W.V), London and New York, pp. 145-158.
12. Billard, R., Cosson, J., Noveiri, S.B., Pourkazemi, M., 2004. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. *Aquaculture* 236, 1-9.
13. Cherepanov, V.V., Drokin, S.I., ochkur, S.I., Dzuba B.B., Chikhachoc, A.S., Kopeika, E.F., 1993. Freezing of sperm of the Azov-Black sea Acipenserids: In Sympo. On sturgeons. Sep 6-11 1993. Moscow, Russia, pp. 63-64.
14. Cherepanov, V.V., Kopeika, E.F., 1999. Cryopreservation and low temperature storage of sturgeon sperm. *J. Appl. Ichthyol.* 15(4-5), 310-311.
15. Ciereszko, A., Toth, G.P., Christ, S.A., Dabrowski K., 1996. Effect of Cryopresevation and theophylline on motility characteristics of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) spermatozoa. *Theriogenology* 45, 665-672.
16. Cosson, J., Billard, R., Dreanno, C., Suquet, M., Cibert, C., 1999. Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors. In the Male Gamete from Basic Knowledge to Clinical Applications. pp, 161-186. Vienna, U.S.A.
17. Drokin, S.I., Kopeika, E.F., 1997. Cryopreservation and phospholipid content of spermatozoa of some sturgeon species. *J. Appl. Ichthyol.* Vol. 15, 311p.
18. Galli, A., Vanni, R., Rossetti, S., Aleandri R., 2006. Milt cryopreservation in Italian Cobice sturgeon *Acipenser naccarii*. *The Aquaculture Society*, 272p.
19. Glogowski, J., Kolman, R., Szcepkowski, M., Horvath, A., Urbanyi, B., Sieczynski, P., Rzemieniecki, A., Domagala, J., Demianowicz, W., Kowalski, A., Ciereszko, A., 2002. Fertilization rate of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) milt cryopreserved with methanol. *Aquaculture* 211, 367-373.
20. Horvath, A., Wayman, W.R., Urbanyi, B., Ware, K.M., Dean, J.C., Tiersch, T.S., 2005. The relationship of the cryoprotectants methanol and dimethyl sulfoxide and hyperosmotic extenders on sperm cryopresevation of two North-American sturgeon species. *Aquaculture* 247, 243-251.
21. Horvath, A., 2006. Improved Cryopreservation of Sperm of Paddlefish (*Polyodon spathula*). *J. World Aquaculture Society* 37(4), 356-362.
22. Kopeika, E.F., Williot, P., Goncharov, B.F., 2000. Cryopreservation of Atlantic sturgeons *Acipenser sturio* L., 1758 sperm: First results and associated problems. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 16(1-4), 167-173.
23. Lahnsteiner, F., Berger, B., Horvath, A., Urbanyi, B., 2004. Studies on the sperm biology and sperm cryopreservation in the sterlet, *Acipenser ruthenus* L. *Aquaculture research* 35, 519-528.
24. Linhart, O., Mims, S.D., Shelton, W.L., 1995. Motility of spermatozoa from shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platyrhynchus* Rafinesque 1820) and paddlefish (*Polyodon spathulla* Walbaum, 1797). *J. Fish Biol.* 97, 902-909.
25. Linhart, O., Mims, S.D., Glomelsky, B., Cvetkova, L.I., Cosson, J., Rodina, M., Horvath, A., Urbanyi, B., 2006. Effect of cryoprotectant and male on motility parameters and fertilization rate

- in paddlefish (*Polyodon spathula*) frozen-thawed spermatozoa. J. Appl. Ichthyol. 22 (suppl. 1), 389-394.
- 26.Liu, L., Wei, Q., Guo, F., Zhang, T., 2006. Cryopreservation of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) sperm. Appl. Ichthyol. 22, 384-388.
- 27.Park, C., Chapman, F.A., 2005. An extender solution for the short-term storage of sturgeon semen. North Am. Aquaculture 67, 52-57.
- 28.Tsvetkova, K.I., Cosson, J., Linhart, O., Billard, R., 1996. Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawed spermatozoa in sturgeon, *Acipenser baeri* and *A. ruthenus*. J. Appl. Ichthyol. 12, 107-112.
- 29.Williot, P., Kopeika, E.F., Gonocharov, B., 2000. Influence of testis states temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). Aquaculture 189, 53-61.

Archive of SID

Sperm quality of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) after Cryopreservation with Dimethyl Sulfoxide

M. Ahmadi Fakhabi¹, A.A. Zamini², S. Baradran Noveiri³,
M. Farokhrooz⁴ and A.R. Mobarhan Fard

¹M.Sc. Graduated in Fisheries, Islamic Azad University, Lahijan Branch, ²Assistant Prof., Dept. of Fisheries, Islamic Azad University, Lahijan Branch, ³M.Sc. of Marine Biology, Dr. Dadman International Sturgeon Research Institute, Rasht, ⁴Ph.D. in Fisheries, Faculty Member of Islamic Azad University, Lahijan Branch, ⁵Ph.D. in Fisheries, Faculty Member of Islamic Azad University, Sanandag Branch

Abstract

The maximum ability of sperm for fertilization is 5-6 hours after collecting sperm from males in normal temperature. While by semen freezing and use of suitable extenders and cryoprotectants we can conserve it in liquid nitrogen for several years and we can use stored sperms in essential conditions. Varied cryoprotectants are used in sturgeon semen cryopreservation but DMSO is the most important cryoprotectant. In this study, we have investigated the protective effect of DMSO as a cryoprotectant using different concentrations (8%, 10%, 12%, and 15%) and we have determined sperm motility rate and its motility time after thaw. The sperm of Persian sturgeon was collected from five males. They were diluted in appropriate extender containing Tris, Sacharose, egg yolk, and dimethyl sulfoxide in 1:1 ratio and the suspension were poured in to 0.5 ml straws and frozen in -196°C liquid nitrogen vapour in a three storage program. Then straws were transferred to liquid nitrogen tank. The sperm samples were thawed in 40°C water bath for 25s. The sperm motility rate and its motility time were observed using microscope. According to the results, the sperm motility rate after preservation in liquid nitrogen about 7 days were measured as 8.5±0.61, 12.54±2.57, 19±5.66, and 16.3±6.15% in concentrations 8%, 10%, 12%, and 15%; the sperm motility time after this time was 184.3±28.87, 267.3±36.54, 274±50.51, and 218±63.85s, respectively. Also the sperm motility rate after preservation in liquid nitrogen about 72 days were measured as 14.25±5.50, 10.50±1.61, 7.50±1.81, and 13.75±2.74%; the sperm motility time after this time was 195±39.50, 194.50±43.63, 154±37.34, and 221.70±47.31s, respectively. There was no statistical significant difference between selected concentration. However, 12 and 15% of DMSO had better motility rate and time. Results indicated that the increase in concentration of DMSO from 8% to 15% does not change the percentage of motile cells and motility time on sperm cryopreservation of Persian sturgeon.

Keywords: Sperm; *Acipenser persicus*; Motility rate; Motility time; Cryopreservation; DMSO

*- Corresponding Author; E-mail: maryam.ahmadi6075@gmail.com