Archive of SID

ارزیابی کیفیت اسپرم ماهیان سفید(*Rutilus frisii kutum*) و آزاد دریای خزر(*Salmon trutta caspius*) قبل و بعد از انجماد

محمد بینایی[۱]، رضا پور غلام[۱]، شهروز برادران نویری[۲]، مریم قیاسی*[۱]، محمود بهمنی[۲]، محمود قانعی تهرانی[۱]

۱- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران، صندوق پستی: ۹۶۱

۲- موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی رشت، ایران، صندوق پستی: ۳۴۶۴-۴۱۶۳۵

تاریخ دریافت: ۱۴ فروردین ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: ۲۰ مرداد ۱۳۹۵

چکیده

در خارج از فصل تکثیر، تهیه و دستیابی به سلول‌های جنسی ماهیان امری غیر ممکن است لذا جهت آسان‌تر نمودن تحقیقات و نیز بهبود مدیریت تکثیر ماهیان، اقداماتی در جهت نگهداری این سلول‌ها در بهترین کیفیت جهت افزایش زمینه فعالیت‌های تحقیقاتی و مدیریت تکثیر صورت گرفته است که مهم‌ترین آن حفاظت انجمادی است. در این بررسی ۱۱مولد نر ماهی آزاد دریای خزربا متوسط طول ۵/۳ ± ۳۷/۸سانتی‌متر و وزن ۲۴/۷ ± ۵۲۳/۳ گرم و ۲۳ مولد نر ماهی سفید با متوسط طول ۷/۱ ± ۳۶/۱ سانتی‌متر و وزن ۲۱/۶ ± ۶۳۱/۳ گرم با رسیدگی جنسی مناسب مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از تهیه نمونه اسپرم، فاکتورهایی چون درصد تحرک، مدت تحرک، تراکم، اسمولالیته و pH اندازه‌گیری شد. پس از این مرحله نمونه‌های اسپرم ماهیان آزاد دریای خزر به نسبت ۱ : ۳ با محلول رقیق کننده حاوی ترکیبات ۰/۳ مول گلوکز، ۱۰٪ متانول و ۱۰٪ زرده تخم مرغ رقیق شده و با روش دستی منجمد گردید. اسپرم ماهیان سفید دریای خزر نیز به نسبت ۱ : ۳ با دو محلول رقیق کننده شامل ترکیبات ۳۵۰ میلی مول گلوکز، ۳۰ میلی‌مول تریس، پلی اتیلن گلی کول ۴٪ و ۳۵۰ میلی‌مول گلوکز، ۳۰ میلی‌مول تریس و ۲٪ گلیسرول رقیق و با دستگاه Planner Kryo به روش اتوماتیک منجمد شد. تمامی نمونه‌ها طی مدت آزمایش در ازت مایع نگهداری شدند. سپس ۱ تا ۳ ماه بعد از اولین تاریخ انجماد، نمونه‌ها از انجماد خارج شده، کیفیت آن‌ها با اندازه‌گیری مدت و درصد تحرک مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد درصد تحرک در نمونه‌های اسپرم ماهی آزاد یک و سه ماه بعد از انجماد نسبت به اسپرم تازه بطور معنی‌داری کاهش یافته است. لیکن مدت تحرک علی رغم کاهش عددی در نمونه منجمد شده تفاوت معنی‌داری را با نمونه تازه نشان نداد. نتایج در ماهیان سفید نشان داد که درصد تحرک و مدت زمان تحرک در نمونه‌های اسپرم یک و سه ماه بعد از انجماد نسبت به اسپرم تازه بطور معنی‌داری کم‌تر شده است. همچنین درصد تحرک و مدت زمان تحرک نمونه‌های اسپرم بعد از سه ماه انجماد بطور معنی‌داری کم‌تر از نمونه‌هایی بود که تنها یک ماه در شرایط انجماد نگهداری شده بودند. در ارزیابی ماندگاری اسپرم ماهی سفید از دو ماده محافظ سرما شامل گلیسرول با غلظت ۲٪ و اتیلن‌گلی‌کول با غلظت ۴٪ استفاده شد. نتایج نشان داد که نمونه اسپرم‌هایی که به آن‌ها اتیلن‌گلی‌کول اضافه شده بود بعد از خارج شدن از انجماد همگی مرده بودند و تحرکی در این اسپرم‌ها مشاهده نشد. این در حالی بود که در نمونه‌های حاوی گلیسرول ماندگاری اسپرم کاملاً حفظ شده بود. با توجه به نتایج، به نظر می‌رسد تفاوت‌های گونه‌ای امری بسیار مهم است که در روند فرآیند انجماد اسپرم باید مد نظر قرار گیرد.

کلمات کلیدی: انجماد اسپرم، ماهی سفید دریای خزر، ماهی آزاد دریای خزر، زمان تحرک.

* عهده‌دار مکاتبات (✉). ghiasimaryam4@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

حرکت اسپرم معیاری مهم در تعیین کیفیت و قابلیت باروری منی است و پارامترهای مختلفی در این ارزیابی مورد استفاده قرار می‌گیرند. رایج‌ترین معیار مورد استفاده در این خصوص تعداد سلول‌های متحرک و نیز مدت زمان فعال شدن حرکت اسپرم تا رسیدن به توقف نسبی حرکت است (Sadiqul Islam and Akhter, 2011). برخلاف اسپرم خزندگان و پستانداران، اسپرم ماهیان در مجرای سمینال فاقد تحرک است و با قرار گرفتن در مجاورت آب شروع به حرکت می‌کند. خاصیت اسمزی و ترکیبات مایع سمینال معمولاً مانع از تحرک اسپرم در مجرای اسپرم می‌گردد (Billard, 1986). در حرکت اسپرم ماهی عواملی چون فشار اسمزی، pH، درجه حرارت و غلظت یون‌های سدیم، پتاسیم، کلسیم و منیزیوم دخالت دارند (Morisawa *et al.*, 1983).

حفاظت انجمادی اسپرم (Cryopreservation)، یکی از فناوری‌های مهم جهت حفظ و نگهداری ذخایر ژنتیکی است که تا به امروز در بیش از ۲۰۰ گونه ماهی صورت گرفته است (Billard *et al.*, 2004). در بین گونه‌های مختلف آزاد ماهیان و کپور ماهیان در این زمینه بسیار مورد توجه بوده‌اند. بیش‌ترین تحقیقات در آزاد ماهیان در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، قزل‌آلای قهوه‌ای (*Salmo trutta*)، قزل‌آلای نهری (*Salvelinus fontinalis*)، و ماهی چار (*S. alpinus*) انجام شده است (پورکاظمی و همکاران ۱۳۹۱؛ Lahnsteiner *et al.*,1996; Cabrita *et al.*, 1998; Martínez- Parámo *et al.*, 2009). در گروه کپور ماهیان بیش‌ترین تحقیقات بر روی گونه‌های کپور معمولی(*Cyprinus carpio*) و کپور نقره‌ای (*Hypophtalmichthys militrix*) صورت گرفته است (Horváth and Urbanyi, 2000; Alvarez *et al.*, 2008; Maisse *et al.*, 2008; Viverious and Komen, 2008؛ برادران نویری و همکاران، ۱۳۸۴).

علیرغم مزایای این تکنیک گزارش‌های زیادی مبنی بر کاهش کیفیت اسپرم طی انجماد وجود دارد که در این زمینه می‌توان به کاهش تعداد و قابلیت تحرک آن‌ها اشاره نمود (Horvath and Urbanyi 2000; Fraser *et al.*, 2006). از مهم‌ترین دلایلی که موجب کاهش کیفیت اسپرم می‌گردد می‌توان به حساسیت سلول اسپرم به شوک سرمایی و گرمایی، استرس اسمزی و تشکیل بلورهای یخ در سیتوپلاسم سلول اشاره نمود (Cabrita *et al.*, 2005). لذا در روند انجام انجماد اسپرم برای به حداقل رساندن آسیب‌های فوق از دو گروه ترکیبات شامل رقیق کننده‌ها و ماده محافظ از سرما استفاده می‌شود. این دو گروه مواد سلول اسپرم را در برابر شوک‌های حرارتی سرد و گرم در طی فرآیند انجماد و ذوب، دهیدراتاسیون حاد و عملکرد برخی آنزیم‌ها مانند کاتالاز محافظت نموده، سبب پایداری پروتئین‌ها در محلول‌های آبی شده و مانع شکل‌گیری بلورهای یخ در سیتوپلاسم طی مرحله قبل از فریز می‌شوند (Chao, 1996). علی رغم محاسن ذکر شده، سمیت این ترکیبات یکی از عوامل محدود کننده اصلی در موفقیت آمیز بودن انجماد اسپرم در ماهیان است و در واقع کیفیت اسپرم پس از گذراندن روند انجماد کاهش می‌یابد (Muchlisin, 2005). به عبارت دیگر کیفیت اسپرم بعد از این فرآیند به عواملی چون کیفیت اولیه اسپرم، نوع مواد رقیق کننده، مواد محافظ، روش انجماد و مدت زمانی که تحت این شرایط اسپرم

www.SID.ir

Archive of SID

نگهداری شده است ارتباط بسیار نزدیکی دارد (Cabrita *et al.*, 2005).

ماهیان سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) مهم‌ترین گونه صید شده (بیش از ۷۰٪ آمار صید طی سال‌های ۹۳ - ۸۹) از ماهیان استخوانی دریای خزر است (فضلی، ۱۳۹۴). کاهش شدید صید این ماهی در اواخر دهه ۱۳۵۰ به خاطر از بین رفتن محل‌های طبیعی تخمریزی آن‌ها، سبب گردید که تکثیر مصنوعی آن با جدیت بیشتری پیگیری شود و به همین سبب با تصویب طرح تکثیر مصنوعی ماهی سفید در ۱۰ رشته از رودهای جنوبی دریای خزر در سال ۱۳۶۱، عملیات بازسازی ذخایر ماهی سفید رسماً از سال ۱۳۶۲ در ایران آغاز گردید(رضوی صیاد، ۱۳۷۴) و این امر تاکنون ادامه دارد. ماهی آزاد دریای خزر (*Salmon trutta caspius*) یکی از گونه‌های نادر آزاد ماهیان است که تنها در دریای خزر زندگی می‌کند. میزان صید این ماهی از اواخر دهه ۱۳۵۰ تا اوایل ۱۳۶۰ به حدود صفر نزول پیدا کرد و این امر سبب شد تا در سال ۱۹۹۹ این ماهی از نظر سازمان IUCN در فهرست گونه‌های در معرض خطر قرار گیرد (سعیدی و همکاران، ۱۳۸۶).

از آنجایی که حفاظت انجمادی اسپرم یکی از روش‌های مهم در امر حفظ و نگهداری ذخایر ژنتیکی است و نیز تهیه یک روش استاندارد واحد که بتوان از آن برای تمام گونه‌های ماهیان استفاده نمود شدنی نیست، لذا در این بررسی تلاش شده تا مطالعه اولیه‌ای در خصوص دستیابی به یک پروتکل اجرایی اولیه و نیز تاثیراتی که این فرآیند بر کیفیت اسپرم این ماهیان می‌گذارد مورد مطالعه و بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۲۴ عدد مولد نر ماهی آزاد در اوایل آبان ماه از رودخانه چشمه کیله منطقه دوهزار تنکابن صید و به مرکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی کلاردشت منتقل شدند و پس از ارزیابی اولیه و داشتند آمادگی جهت اسپرم دهی ، ۱۱ ماهی نر جهت نمونه برداری انتخاب شدند (Sarvi *et al.*, 2006). تعداد ۵۶ عدد ماهی سفید نر از رودخانه‌های شیرود تنکابن تهیه گردید و پس از ارزیابی اولیه، ۳۲ ماهی نر جهت نمونه برداری انتخاب شدند (فارابی و همکاران، ۱۳۸۶).

ابتدا ماهیان مولد نر با استفاده از عصاره گل میخک بیهوش شدند(مولدین نر آزاد به مدت حدود ۱۰ دقیقه، در دمای آب ۹/۴ - ۹/۱ درجه سانتی‌گراد و مولدین نر سفید به مدت حدود ۷ دقیقه، در دمای آب ۱۴/۱-۱۳/۵ درجه سانتی‌گراد). پس از بیهوشی ماهیان فوق ابتدا بیومتری شده و منطقه تناسلی آن‌ها با یک پارچه تمیز کاملاً خشک گردید و با ماساژ ملایم ناحیه شکمی نمونه اسپرم (میزان ۲ میلی‌لیتر از هر مولد نر آزاد و ۳ میلی‌لیتر از هر مولد نر سفید) تهیه گردید. نمونه‌های استحصال شده تا زمان بررسی‌های کمی و کیفی (شمارش سلولی، بررسی درصد تحرک، شدت تحرک و pH) در دمای ۳-۱ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Sarvi *et al*., 2006، فارابی و همکاران ۱۳۸۶).

ارزیابی درصد تحرک نمونه اسپرم با استفاده از سیستم میکروسکوپ Hamilton thrown (Hamilton Co., USA) که مجهز به سیستم نرم افزاری به نامCasa و با رقت ۱:۱۰ انجام شد. تعیین تراکم با شمارش مستقیم پس از رقیق‌سازی به نسبت ۱:۱۰۰۰ و با استفاده از لام توما انجام شد. مدت زمان تحرک نیز پس از القای تحرک از لحظه تماس با آب رودخانه تا

www.SID.ir

Archive of SID

بی‌تحرکی بیش از ۹۰٪ اسپرم‌ها با کرونومتر محاسبه شد. اندازه‌گیری فشار اسمزی مایع سمینال با استفاده از اسمومتر Vapor Pressure 5520 (Vapro Co., USA) انجام گردید. در نهایت میانگین اعداد بدست آمده از هر نمونه به عنوان مبنای فشار اسمزی در نمونه‌ها در نظر گرفته شد (Yavas and Bozkurt, 2011; Tuset *et al.*, 2008).

جهت انجام انجماد اسپرم استحصالی از ماهیان آزاد دریای خزر، ابتدا دمای نمونه اسپرم و ماده رقیق‌کننده تا دمای ۴ درجه سانتی‌گراد پایین آورده شد. هر نمونه اسپرم به نسبت ۳ : ۱ (رقیق کننده : اسپرم) با محلول رقیق کننده(۰/۳ مول گلوکز،۱۰٪ متانول و ۱۰٪ زرده تخم مرغ) که pH آن بر حسب pH نمونه تنظیم شده بود مخلوط گردیدند(Sarvi *et al.*, 2006). نمونه‌های فوق سپس به نی‌های انجماد ۰/۵ میلی‌لیتری منتقل شدند (Ninhaus-Silveria *et al.*, 2006). پس از هم دمایی نمونه‌ها، انجماد به روش دستی و با رعایت فاصله ۲ سانتی‌متر از سطح ازت مایع به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. نرخ سرمادهی با استفاده از بخار ازت مایع معادل $30\ ^{o}C\ min^{-1}$ بود. در نهایت نمونه‌ها در ازت مایع قرارگرفتند.

برای انجام انجماد اسپرم استحصالی ازماهیان سفید دریای خزر نیز ابتدا دمای نمونه اسپرم و ماده رقیق کننده تا دمای ۴ درجه سانتی‌گراد پایین آورده شد. هر نمونه اسپرم به نسبت ۳ : ۱ (رقیق کننده : اسپرم) با دو محلول رقیق‌کننده(۳۵۰ میلی مول گلوکز، ۳۰ میلی‌مول تریس، پلی‌اتیلن‌گلی‌کول ۴٪) و (۳۵۰ میلی‌مول گلوکز، ۳۰ میلی مول تریس و ۲٪ گلیسرول) که pH آن بر حسب pH نمونه تنظیم شده بود مخلوط گردید. نمونه‌های فوق سپس به نی‌های انجماد ۰/۵ میلی‌لیتری منتقل شدند. پس از هم دمایی نمونه‌ها اقدام به انجماد در دستگاه Planer Kryo (Planer Co. England) گردید. نی‌های حاوی نمونه‌ها در رک مخصوص دستگاه قرار داده شد. کاهش دامنه حرارتی دستگاه از ۲۰ تا ۲۰- درجه سانتی‌گراد $5\ ^{o}C\ min^{-1}$ و از ۲۰- تا ۴۰- درجه سانتی‌گراد $10^{o}C\ min^{-1}$ بود. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و در نهایت داخل ازت مایع قرار گرفتند.

نمونه‌های اسپرم ماهیان آزاد جهت انجماد زدایی به مدت ۳۰ ثانیه در حمام آب با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. برای تحریک فعالیت اسپرم‌ها از محلول ۰/۳٪ NaCl استفاده گردید (Sarvi *et al.*, 2006). نمونه‌های اسپرم ماهیان سفید جهت انجماد زدایی به مدت ۲۰ ثانیه در حمام آب با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرارگرفتند. برای تحریک فعالیت اسپرم‌ها از محلول ۰/۳٪ NaCl استفاده گردید (Yavas and Bozkurt, 2011; Rani and Munuswamy 2014).

داده‌های بدست آمده از درصد تحرک و مدت زمان تحرک سلول‌های اسپرم در نرم افزار SPSS وارد و برای آنالیز داده‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و برای مقایسه میانگین‌ها از تست Duncan استفاده شده و در نهایت داده‌ها بصورت انحراف معیار ± میانگین گزارش شد(Zar, 1994).

نتایج

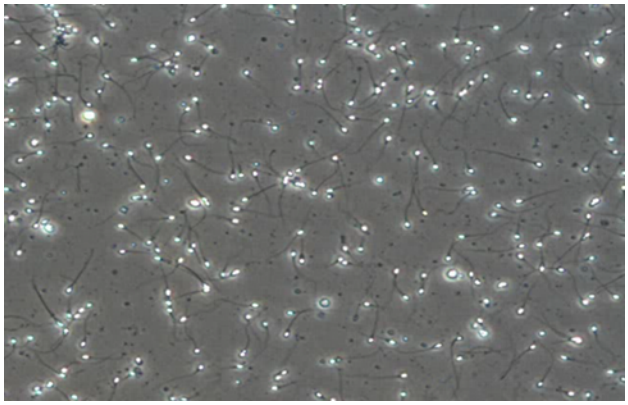
در این بررسی طول و وزن ماهیان آزاد نربه ترتیب ۵/۳± ۳۷/۸ سانتی‌متر و۲۴/۷± ۵۲۳/۳ گرم و طول و وزن ماهیان سفید نر به ترتیب ۷± ۳۶/۱ سانتی‌متر ۲۱/۶± ۶۳۱/۳ گرم بود. نتایج ارزیابی اسپرم تازه مولدین نر آزاد و سفید در جدول ۱ آمده است.

www.SID.ir

Archive of SID

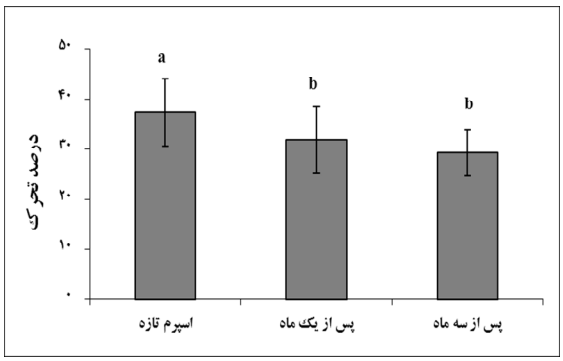
جدول ۱: نتایج خصوصیات مولدین نر آزاد و سفید و اسپرم استحصالی از آن‌ها

مولد	اسپرم استحصالی (ml)	درصد تحرک(٪)	مدت تحرک (ثانیه)	تراکم (10^9/mL)	اسمولالیته ($OsmKg^{-1}$)	pH
آزاد	۴/۵ ±۳/۴	۳۹/۵ ±۲۸	۳۷/۳ ±۶/۷	۳/۶ ±۰/۸	۲۸۲/۶ ±۱۳/۸	۷/۳۵ ±۰/۳
سفید	۳/۵±۰/۹	۳۶/۷±۲۴	۳۳/۵±۷/۸	۱/۹±۰/۶	۳۴۱/۶ ±۱۵/۸	۷/۶۵ ±۰/۵

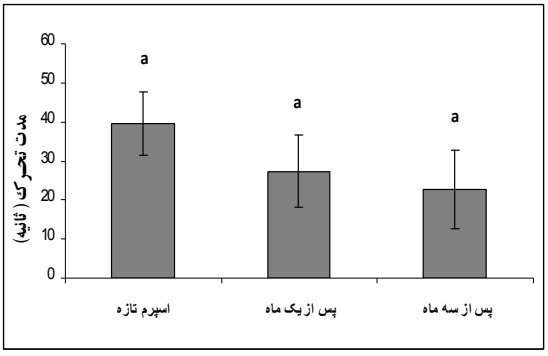


شکل ۱: نمایی از اسپرم تازه مورد ارزیابی با برنامه Casa

نتایج ارزیابی اسپرم‌های منجمد شده در ماهیان آزاد نشان داد که درصد تحرک در نمونه‌های اسپرم یک و سه ماه بعد از انجماد نسبت به اسپرم تازه بطور معنی-داری کم‌تر شده بود (P< ۰/۰۵) (شکل ۲). لیکن مدت تحرک علی‌رغم کاهش عددی تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های منجمد شده و تازه وجود نداشت (شکل ۳).



شکل ۲: مقایسه درصد تحرک اسپرم ماهی آزاد در نمونه تازه، یک و سه ماه بعد از انجماد



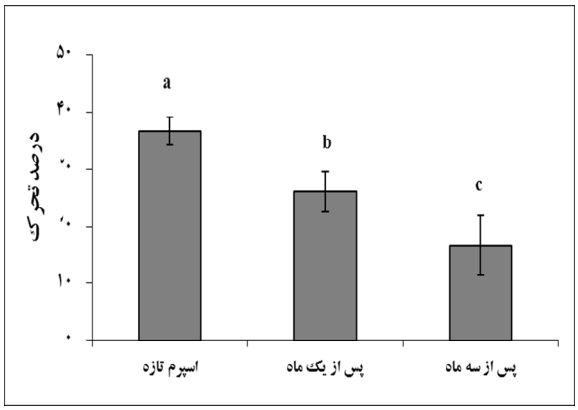
شکل ۳: مقایسه مدت زمان تحرک اسپرم ماهی آزاد در نمونه تازه، یک و سه ماه بعد از انجماد

نتایج ارزیابی اسپرم‌های منجمد شده در ماهیان سفید نشان داد که درصد تحرک و مدت زمان تحرک در نمونه‌های اسپرم یک و سه ماه بعد از انجماد نسبت به اسپرم تازه بطور معنی‌داری کم‌تر بوده است (P<۰/۰۵) (شکل‌های ۴ و ۵). همچنین درصد تحرک و مدت زمان تحرک نمونه‌های اسپرم بعد از سه ماه

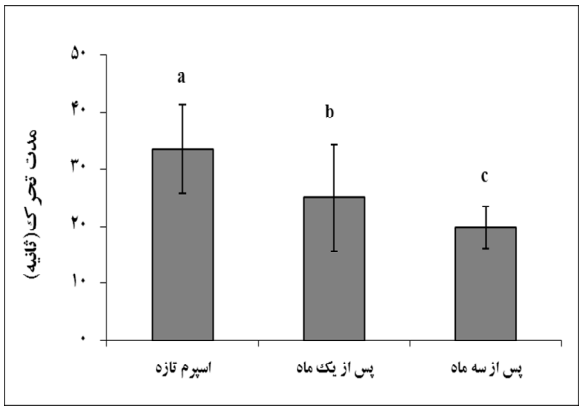
www.SID.ir

Archive of SID

انجماد بطور معنی‌داری کم‌تر از نمونه‌هایی بود که تنها یک ماه در شرایط انجماد نگهداری شده بودند ($P< ۰/۰۵$). در ارزیابی ماندگاری اسپرم ماهی سفید از دو ماده محافظ سرما شامل گلیسرول با غلظت ۲٪ و اتیلن‌گلی‌کول با غلظت ۴٪ استفاده شد. نتایج نشان داد که نمونه اسپرم‌هایی که به آن‌ها اتیلن‌گلی‌کول اضافه شده بود بعد از خارج شدن از انجماد همگی مرده بودند و تحرکی در این اسپرم‌ها مشاهده نشد. این در حالی بود که در نمونه‌هایی که گلیسرول استفاده شده بود ماندگاری اسپرم کاملاً حفظ شده بود.



شکل ۴: مقایسه درصد تحرک اسپرم ماهی سفید در نمونه تازه، یک و سه ماه بعد از انجماد



شکل ۵: مقایسه مدت زمان تحرک اسپرم ماهی سفید در نمونه تازه، یک و سه ماه بعد از انجماد

بحث

کیفیت اسپرم منجمد شده بستگی به عوامل مختلفی دارد که در درجه اول مرتبط به خود مایع منی(درجه رسیدگی جنسی و کیفیت اولیه اسپرم) و در درجه دوم مرتبط به فاکتورهای دخیل در روند انجماد (تغییر دامنه حرارتی، رقیق‌کننده و مواد محافظ از سرما) هستند. از مهم‌ترین عوامل در این مسیر باید به رقیق‌کننده‌ها اشاره نمود. در این بررسی در هر دو ماهی از رقیق‌کننده‌ای برپایه گلوکز استفاده شد. از رقیق کننده‌های برپایه گلوکز در بسیاری از ماهیان مانند کپور معمولی، گربه ماهی آفریقایی(*Clarias gariepinus*) و ماهی آزاد دریای خزر بطور موفقیت‌آمیزی استفاده شده است. موفقیت رقیق‌کننده بر پایه گلوکز را می‌توان به نقش آن‌ها به عنوان یک ماده خوب محافظ سرما و نیز کمک کننده به حفظ پایداری غشا اسپرم نسبت داد (Horváth *et al.*, 2003; Sarvi *et al.*, 2006).

در این بررسی در ماده رقیق‌کننده اسپرم ماهی آزاد از متانول و زرده تخم مرغ استفاده شد. گزارش شده است که زرده تخم مرغ پوششی در سطح دیواره سلولی اسپرم ایجاد می‌کند و به این ترتیب موجب کاهش لیز سلولی طی فرآیند انجماد می‌گردد. عملکرد اختصاصی زرده تخم مرغ کاملاً مشخص نشده است لیکن عنوان شده که این ماده واجد لیپوپروتئنی با دانسیته کم است که به غشا سلول اسپرم می‌چسبد و یا واجد چربی‌هایی است که اسپرم را در ترمیم دیواره آسیب دیده‌اش کمک می‌کند. اما این تأثیر زرده تخم مرغ بسیار اختصاصی است و در همه گونه‌های آزاد ماهیان به یک میزان تأثیر بر کیفیت اسپرم ندارد. متانول متداول‌ترین محافظ سرمایی است که در بسیاری از

www.SID.ir

Archive of SID

گونه‌های آزاد ماهیان بطور موفقیت آمیزی مورد استفاده قرار گرفته است. مطالعات نشان داده استفاده از متانول اثرات سمی بسیار اندکی در مقایسه با دی متیل سولفوکساید(DMSO) بر اسپرم دارد و در مقایسه با DMSO ، اسپرم‌های رقیق شده با متانول بطور معنی-داری قابلیت تحرک و باروری بیش‌تری داشته‌اند. این امر شاید مربوط به کم نمودن آب سلول توسط متانول باشدکه به این ترتیب موجب افزایش مقاومت سلول اسپرم در برابر انجماد می‌گردد(Jodun *et al*., 2006).

در این مطالعه مشخص شد نمونه‌های اسپرم ماهی سفید که با پلی اتیلن‌گلی کول رقیق شده بودند همگی از بین رفتند در حالیکه نمونه‌هایی که با گلیسرول رقیق شده بودند زنده ماندند. مطالعات نشان داده است که گلیسرول یکی از نفوذپذیرترین ترکیبات محافظ سرما به داخل سلول با کم‌ترین تأثیر سمی است. بدلیل نفوذ عالی که این ماده به داخل سلول دارد، موجب پایداری دیواره سلولی شده و نیز موجب ممانعت از تشکیل کریستال‌های یخ در سیتوپلاسم اسپرم می‌گردد(Yavas and Bozkurt, 2011).

در این بررسی برای القا تحرک در اسپرم ماهیان از آب رودخانه در نمونه‌های تازه و از محلول ۰/۳٪ NaCl بعد از مرحله خارج شدن از انجماد استفاده شد. اصولاً جهت جلوگیری از حرکت اسپرم خارج از ساختار اندام تولید مثلی(بیضه‌ها) از محلول ممانعت کننده از تحرک که فشار اسمزی مشابه مایع سمینال دارد استفاده می‌گردد(Billard *et al.,* 1995). مطالعات نشان داده است که فشار اسمزی مایع سمینال در ماهیان آب شیرین و یا رودکوچ $OsmKg^{-1}$ ۳۴۶ – ۲۳۰ است (Alavi and Cosson, 2006). بنابراین جهت تحریک اسپرم در این گروه از ماهیان نیاز به ایجاد یک شوک هیپواسموتیک است یا در آزاد ماهیان این کار را با کاهش غلظت یون پتاسیم انجام می‌دهند. بنابراین استفاده از آب رودخانه و یا محلول ۰/۳٪ NaCl که فشار اسمزی در حد $OsmKg^{-1}$ ۹۶ دارد و یک محلول هیپواسموتیک است می‌تواند به عنوان بهترین محیط فعال سازی جهت اسپرم تازه و یا ایجاد تحرک در اسپرمی که از انجماد خارج شده است استفاده نمود (Nahidozzaman *et al.,* 2012).

در این بررسی از دو روش دستی و اتوماتیک(استفاده از دستگاه) برای منجمد نمودن نمونه‌ها استفاده گردید. در روش دستی دامنه کاهش حرارت در اسپرم ماهی آزاد $^{\circ}C\ min^{-1}$ ۳۰- بود در حالیکه در روش اتوماتیک(با استفاده از دستگاه) که برای نمونه ماهی سفید استفاده شد، دامنه کاهش درجه حرارت از ۴ تا ۲۰- در جه سانتی‌گراد $^{\circ}C\ min^{-1}$ ۵ و از ۲۰- تا ۴۰- در جه سانتی‌گراد این دامنه $^{\circ}C\ min^{-1}$ ۱۰ بود. مطالعات نشان داده است که مهم‌ترین مرحله در روند انجماد، حرارت‌های بیش‌تر از ۴۰- درجه سانتی‌گراد است. زیرا معمولاً ایجاد کریستال‌های یخ در این مرحله صورت می‌گیرد و زمانی که دمای نمونه به ۴۰- درجه سانتی‌گراد رسید، می‌توان سلول‌ها را بدون کم‌ترین آسیب در ازت مایع قرار داد. اصولاً موفقیت یک روند مناسب کاهش دما بستگی به عوامل مختلفی مانند نوع سلول، سایز سلول، ترکیب غشا سلولی، نوع ماده محافظ از سرما و غلظت آن، مدت زمان هم دما سازی و تداخلات بین این فاکتورها دارد (Friedler *et al.,* 1988; Yao *et al.,* 2000).

به غیر از تأثیر تغییرات دمایی در زمان انجام روند انجماد، نحوه خارج نمودن نمونه‌ها از انجماد نیز عامل مؤثر دیگری بر ماندگاری سلول‌های اسپرم است. در

www.SID.ir

Archive of SID

این بررسی برای خارج نمودن نمونه اسپرم ماهی آزاد از انجماد از حمام آب با دمای ۲۵درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و برای از انجماد خارج نمودن نمونه‌های اسپرم ماهی سفید از حمام آب با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه استفاده گردید. مطالعات نشان داده است که بهترین دما برای ذوب اسپرم منجمد شده آزاد ماهیان حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد در مدت ۳۰ ثانیه است و در این حالت نمونه اسپرم در مقایسه با نمونه‌ای که در حرات ۳۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۵ ثانیه قرار گرفته است بطور معنی‌داری میزان تحرک و لقاح آن بیش‌تر بوده است (Lahnsteiner, 2000). براساس مطالعات مشخص شده که موفقیت آمیز بودن نتیجه از انجماد خارج نمودن اسپرم کپور ماهیان با استفاده از دامنه حرارتی ۴۰ – ۳۰ درجه سانتی‌گراد بدست می‌آید. استفاده از زمان و دمای مناسب در مرحله ذوب از شکل گیری مجدد کریستال‌های یخ تا حدود زیادی ممانعت نموده و در عین حال موجب می‌گردد تا فعالیت‌های آنزیمی سلول اسپرم در بهترین حالت خود حفظ گردد (Yavas and Bozkur, 2011).

نتایج این بررسی نشان داد که با افزایش زمان انجماد میزان درصد تحرک و مدت زمان آن در مقایسه با نمونه اسپرم تازه کاهش می‌یابد. مطالعات پیشین نشان داده است که کیفیت اسپرم پس از انجماد در مقایسه با نمونه تازه از کیفیت کم‌تری برخوردار است و این مسئله با بررسی میزان تحرک اسپرم، درصد لقاح و مطالعات ریز ساختاری سلول اسپرم به اثبات رسیده است (Ogier de Baulny *et al.,* 1997; Cabrita *et al.,* 2005; Li *et al.,* 2010). مطالعات فلوسیتومتری بر روی اسپرم ماهی قزل‌آلا نشان داد که تنها بخش اندکی از سلول‌های اسپرم بعد از خارج شدن از انجماد (در بهترین حالت حدود ۱۸٪) دارای غشا سلولی سالم و فعالیت طبیعی میتوکندری هستند(Ogier de Baulny *et al.,* 1997). در اولین قدم باید توجه داشت که فرآیند انجماد و استفاده از رقیق‌کننده‌ها موجب وارد آوردن استرس اسمزی و اکسیداتیو به اسپرم می‌گردد. رادیکال‌های آزاد اکسیژنی که طی این فرآیند بوجود می‌آیند سبب پراکسیداسیون چربی دیواره سلول، آسیب دیدن قطعه میانی و ساختار آکسونمی تاژک می‌شوند. همچنین وجود رادیکال‌های آزاد اکسیژن اختلال در عملکرد میتوکندری ایجاد نموده، تولید ATP را کاهش می‌دهند. در نهایت مجموعه مشکلاتی که به آن‌ها اشاره شد سبب کاهش درصدتحرک و کوتاه شدن زمان آن شده و در آخر کاهش باروری و لقاح موفق با اسپرم منجمد شده را بدنبال دارند (Cabrita *et al.,* 2005; Li *et al.,* 2010).

با توجه به نتایج، به نظر می‌رسد حساسیت اسپرم ماهیان آزاد نسبت به اسپرم ماهیان سفید تحت فرآیند انجماد متفاوت است. مطالعات نشان داده است. با توجه به تنوعی که در شرایط محیط زندگی ماهیان وجود دارد، این مسئله سبب تفاوت‌های اساسی در خصوصیات شکلی و فیزیولوژی آن‌ها شده و در نتیجه آن‌ها را مجبور نموده تا مکانیسم‌های ادبتاسیون خود با شرایط محیطی را توسعه دهند و به این ترتیب بتوانند در شرایط محیطی مختلف بقا خود را حفظ کنند. همین مسئله نیز سبب شده تا اسپرم گونه‌های مختلف ماهیان واکنش‌های متفاوتی را به پروتکل‌های انجماد اسپرم نشان دهند. (Day and Stacey, 2007).

با توجه به آنچه گفته شد به نظر می‌رسد تهیه یک روش استاندارد واحد انجماد اسپرم که بتوان از آن برای

www.SID.ir

Archive of SID

تمام ماهیان آب شیرین و دریا استفاده نمود بسیار سخت است، زیرا موفقیت آمیز بودن این فرآیند بر اساس نوع مواد رقیق‌کننده، روند انجماد و سیستم خارج ساختن از انجماد در هر گونه ماهی و حتی از یک ماهی نر تا ماهی نر دیگر در همان گونه متفاوت است و در انجام این کار ضروری است شرایط هر گونه بطور خاص مورد مطالعه و بررسی قرارگیرد. لذا ضروری است تا مطالعات تکمیلی در جهت شناسایی رقیق‌کننده‌های مناسب برای ماهیان ارزشمند دریای خزر و نیز ارزیابی ماندگاری و کیفی بودن اسپرم آن‌ها بعد از بازه‌های زمانی طولانی‌تر تحت شرایط انجماد مورد بررسی و تحقیق قرار گیرد.

سپاسگزاری

این تحقیق حاصل قسمتی از پروژه ایجاد بانک انجماد اسپرم ماهیان استخوانی که با حمایت مالی موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور اجراگردید. در این جا ضروری است که از مساعدت مسئولین محترم موسسه، همکاران ارجمند در موسسه، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر و موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند تقدیر و تشکر نماییم.

منابع

۱. برادران نویری، ش.، پورکاظمی، م.، کوچینین، پ.، یاوری، و.، ۱۳۸۴. انجماد اسپرم ماهی کپور با استفاده از رقیق کننده‌های مختلف، مجله علمی شیلا ت ایران، ۴، ۱۷–۳۰.

۲. پورکاظمی، م.، شکیبی دریا کناری، ع.، کلباسی، م.ر.، عبدالحی، ح.، برادران نویری، ش.، ۱۳۹۱. بیوتکنیک نگهداری کوتاه مدت اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان(*Oncorhynchus mykiss*)، مجله علمی شیلا ت ایران، ۴، ۱۵۷ – ۱۶۴.

۳. سعیدی، ع.آ.، خوشباور رستمی،ح.ع.، بهروزی، ش.، فارابی، س.م.و.، قیاسی، م.، ۱۳۸۹. پایش کمی، کیفی و بهداشتی بچه ماهی آزاد تولیدی در مجتمع تکثیر و پرورش شهید باهنر استان مازندران تا رها سازی به دریای خزر، شیلات (واحد آزاد شهر)، ۴، ۷۱ – ۸۲.

۴. فارابی، س.م.و.، خوشباور رستمی،ح.ع.، قانعی تهرانی، م.، قیاسی، م.، آذری، ع.ح.، بهروزی، ش.، موسوی،ه.، فیروزکندیان، ش.، حبیبی، ف.، زاهدی طبرستانی، آ.، ملایی، ح.، مهدوی امیری، م.، عقلمندی، ف.، بینایی،م.، ۱۳۸۶. بررسی وضعیت تکثیر مولدین و رهاسازی بچه ماهیان سفیددر حوزه جنوبی دریای خزر(استان مازندران ، سال ۱۳۸۳)، پژوهش و سازندگی(دام و آبزیان)، ۷۴، ۵۶ – ۶۶.

۵. فضلی، ح.، ۱۳۹۴. پویایی جمعیت ماهیان استخوانی در آب‌های ایرانی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور. ۱۱۷ صفحه.

۶. رضوی صیاد، ب.، ۱۳۷۴. ماهی سفید(*Rutilus frisii kutum*) موسسه تحقیقات و آموزش شیلات ایران. ۱۶۴ صفحه.

7. Alavi, S. M.H., Cosson, J., 2006, Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. Cell Biology International, 30, 1-14

8. Alvarez, B., Arenal, A., Fuentes, R., Pimentel, R., Abad, Z., Pimentel,E., 2008. Use of post-thaw silver carp (*Hypophtalmichthys molitrix*) spermatozoa to increase hatchery productions. Methods in Reproductive Aquaculture, Marine and

www.SID.ir

Archive of SID

Freshwater Species. Biology series, CRC Press (Taylor and Francis group), 273-294
9. Billard, R., Cosson, J., Crim, L.W., Suquet, M., 1995. Sperm physiology and quality. In: Bromage, N.R., Roberts, R.J. (Eds.), Broodstock nagementm and Egg and Larval Quality. Blackwell Science, Oxford, 25–52.
10. Billard, R., 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. Reproduction Nutrition Development, 26, 877 – 920.
11. Billard, R., Cosson, J., Noveiri, S., Pourkazemi, M., 2004. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. Aquaculture, 236, 1-9.
12. Cabrita, E., Alvarez, R., Anel, L., Rana, K. J., Herráez, M.P., 1998. Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm. Cryobiology, 37, 245-253.
13. Cabrita, E., Robles, V., Cuñado, S., Wallace, J.C., Sarasquete, C.,Herráez, M. P., 2005. Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5 ml macro tubes. Cryobiology, 50, 273-284.
14. Chao, N.H., 1996. Cryopreservation of finfish and shellfish sperms. Taiwan Fisheries Research, 4, 157- 170.
15. Day, J.C., Stacy, G.N., 1997. Cryopreservation and freeze – drying protocols, second Ed, Human Press, Totowa, New Jersy, USA, 203 – 217.
16. Fraser, L., Wysocki, P., Ciereszko, A., Pluciennicz ak, G., Kotlowska, M., Kordan, W., Wojtczak, M., Dietrich, G., Strzezek, J., 2006. Application of biochemical markers for identification of biological properties of animal semen. Reproductive Biology, 6, 5–20.
17. Friedler, S., Giudice, L., Lamb, E., 1988. Cryopreservation of embryos and ova. Fertility and Sterility, 49, 743-764.
18. Horváth, A., Urbányi, B., 2000. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) sperm. Aquaculture Research, 31, 317–324.
19. Horváth, A., Miskolczi, E., Urbányi, B., 2003. Cryopreservation of common carp sperm. Aquatic Living Resources, 16, 457–460.
20. Jodun, W., King, K., Farrell, P., 2006. Methanol and Egg Yolk as Cryoprotectants for Atlantic Salmon Spermatozoa. North American Journal of Aquaculture, 69, 36-40.
21. Lahnsteiner, F., Berger, F., Weismann, T., Patzner, R., 1996. The influence of various cryoprotectants on semen quality of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) before and after cryopreservation. Journal of Applied Ichthyology, 12, 99-106.
22. Lahnsteiner, F., 2000. Semen cryopreservation in the salmonide and in the Northern pike. Aquaculture Research, 31, 245-258.
23. Li, P., Li, Z.H., Dzyuba, B., Hulak, M., Rodina, M., Linhart, O., 2010. Evaluating the impacts of osmotic and oxidative stress on common carp (*Cyprinus carpio*, L.) sperm caused by cryopreservation techniques. Biology of Reproduction, 83, 852-858.
24. Maisse, G., Ogier de Balny, B., Labbe´, C., 2008. Cryopreservation of testicular sperm from European catfish (*Silurus glanis*). In: Methods in Reproductive quaculture: Marine and reshwater Species Biology Series. E. Cabrita, V. Robles, M. P.; Herráez (Eds), CRCPress (Taylor and Francis group), 397-401.
25. Martínez-Páramo, S., Pérez-Cerezales, S., Gómez-Romano, F., Blanco, G., Sánchez, J. A., Herráez, M. P., 2009. Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential. Theriogenology, 71,594–604.
26. Morisawa, M., Suzuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S., Yasuda, K., 1983. Effect of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from fresh-water cyprinid fishes. Journal of Experimental Biology, 107, 95-103.
27. Muchlisin, Z.A., 2005. Review: current status of extenders and cryoprotectants on fish spermatozoa cryopreservation. Biodiversitas, 6, 12 – 15.
28. Nahiduzzamana, M.D., Hassan, M., Roy, P.K., Hossain, M.A.R., Tiersch, T.R.,

www.SID.ir

Archive of SID

2012. Sperm cryopreservation of the Indian major carp, *Labeo calbasu*: Effects of cryoprotectants, cooling rates and thawing rates on egg fertilization. Animal Reproduction Science, 136,133–138.

29. Ninhaus-Silveira, A., Foresti, F., Tabata, Y.A., Rigolino, M.G., Veríssimo-Silveira, R., 2006. Cryopreservation of semen from functional sex-reversed genotypic females of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 49 (1) 73-77.
30. Ogier de Baulny, B., Le Vern, Y., Kerboeup, D., Maisse, G., 1997. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. Cryobiology, 34, 141–149.
31. Rani, K.U., Munuswamy, N., 2014. Preliminary studies on the cryopreservation of spermatozoa in the fresh water fish common carp (*Cyprinus carpio* L.). Journal of Coastal Life Medicine, 2, 181-186.
32. Sadiqul Islam, M., Akhter, T., 2011. Tale of fish sperm and factors affecting sperm motility: a review. Advances in Life Sciences, 1(1), 11-19.
33. Sarvi, K., Niksirat, H., Mojazi Amiri, B., Mirtorabi, S.M., Rafiee, G.R., Bakhtiyari, M., 2006. Cryopreservation of semen from the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). Aquaculture, 256, 564–569.
34. Tuset, V.M., Dietrich, G.J., Wojtczak, M., Słowin´ska, M., de Monserrat, J., Ciereszko, A., 2008. Relationships between morphology, motility and fertilization capacity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa, Journal of Applied Ichthyology, 24, 393–397.
35. Viveiros, A.T.M., Komen, J., 2008. Semen cryopreservation of the African catfish, *Clarias gariepinus*. In: Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species. Biology. Series. E. Cabrita, V. Robles, M. P.; Herráez (Eds), CRC Press (Taylor and Francis group), 403–407.
36. Yao, Z., Crim, L.W., Richardson, G.F., Emerson, C.J., 2000. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. Aquaculture, 181, 361–375.
37. Yavas, I., Bozkurt, Y., 2011. Effect of different thawing rates on motility and fertilizing capacity of cryopreserved grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) sperm. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 25, 2254-2257
38. Zar, J.H., 1994,.Biostatistical analysis. New Jersey: Prentice-Hall, 662.

www.SID.ir