اثرات مواد محافظ سرمایی مختلف و نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی روی کیفیت اسپرم انجمادزدایی شده ازون برون (*Acipenser stellatus*)

- **مهدی عادلی***: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران
- **شهرام ملکی**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران
- **محمدرضا ایمانپور**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- **ابراهیم مسعودی**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- **زینب عادلی**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹٦ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹٦

چکیده

انجماد اسپرم به‌عنوان روشی موثر در جلوگیری از انقراض نسل گونه‌های در معرض خطر می‌باشد. هدف از این پژوهش، بررسی اثر حفاظتی دی متیل سولفوکساید و اتیلن گیلکول در غلظت‌های مختلف و تاثیر نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی روی درصد و زمان تحرک اسپرم‌ها پس از انجمادزدایی بود. برای این کار دی متیل سولفوکساید و اتیلن گیلکول هر کدام درغلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد به رقیق‌کننده اضافه شدند. سپس رقیق‌کننده با نسبت‌های ۱:۰/۵، ۱:۱، ۱:۲ و ۱:۵ با اسپرم مخلوط شده و سپس اسپرم منجمد شد. در این تحقیق از اسپرم ٤ مولد نر ازون برون استفاده شد. اسپرم‌های منجمد شده بعد از ۲۰و ٤۰ روز از حالت انجماد خارج شدند. نتایج به‌دست آمده از آزمایش نشان داد که در بین تیمارهای مختلف رقیق‌سازی همراه با غلظت‌های مختلف دی متیل سولفوکساید و اتیلن گلیکول روی طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم ازون‌برون پس از ۲۰ و ٤۰ روز انجماد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۵). بالاترین طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم‌های انجمادزدایی شده بعد از ۲۰ و ٤۰ روز انجماد، در اسپرمی که دارای دی متیل سولفوکساید ۱۰ درصد و نسبت رقیق‌سازی ۱:۱ بود مشاهده شد (به‌ترتیب ثانیه ۲٤/۸۱±۲۵۳/۰۰ و درصد ۳/۲۰±۳٦/۵۱؛ ثانیه ۲۳/۷۰±۲۳٤/۳٦ و درصد ۲/۱۲±۲۷/۵٤).

کلمات کلیدی: ازون برون، دی متیل سولفوکساید، اتیلن گیلکول، تحرک اسپرم

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Mehdi.adeli1361@chmail.ir

مقدمه

دریای خزر یکی از مهم‌ترین حوضه‌های آبی است که ۹۰ درصد تولید ماهیان خاویاری جهان را به‌خود اختصاص می‌دهد (Galli و همکاران، ۲۰۰۶) این دریا همراه با رودخانه‌های منتهی به آن محل زیست ۶ گونه از ماهیان خاویاری است که یکی از گونه‌های با ارزش آن ماهی ازون‌برون (*Acipenser stellatus*) می‌باشد (Findeis، ۱۹۹۷). اما متاسفانه مدتی است که ذخایر با ارزش ماهیان خاویاری دریای خزر ازجمله ازون برون رو به کاهش است (Findeis، ۱۹۹۷). در حال حاضر ذخایر ماهیان ازون‌برون در دریای‌خزر ازدو طریق تکثیر طبیعی و تکثیر مصنوعی بازسازی می‌شود (Liu و همکاران، ۲۰۰۶). براساس تحقیقات انجام شده به‌طور تخمینی حدود ۳۰/۱ درصد صید ازون برون، حاصل تکثیر مصنوعی، در کارگاه‌های تکثیر و پرورش می‌باشد (Stoss، ۱۹۸۳). جهت حفظ و احیاء ذخایر ارزشمند ماهیان خاویاری، هر ساله میلیون‌ها قطعه بچه‌ماهی به رودخانه‌های منتهی به دریا رهاسازی می‌شود (Liu و همکاران، ۲۰۰۶). تولید بچه‌ماهیان طی عملیات تکثیر مصنوعی در مراکز تکثیر و پرورش تاس‌ماهیان انجام می‌گیرد. در هنگام تکثیر وجود هم‌زمان مولد نر و ماده رسیده امری ضروری محسوب می‌شود، اما در برخی موارد به‌ویژه در اواخر فصل تکثیر و به‌دلیل کمبود مولدین نر مناسب و یا به‌علت تاخیر در رسیدگی جنسی مولدین ماده عملیات تکثیر با مشکلاتی مواجه می‌شود (Harvath و همکاران، ۲۰۰۵). تکنیک انجمادا‌سپرم یکی از روش‌های حفاظت و نگه‌داری از اسپرم برای مدت زمان طولانی محسوب می‌شود (Lahnsteiner و همکاران، ۲۰۰۴). انجماد موفقیت‌آمیز با روش‌های ساده و در اختیار بودن اسپرم در تمام طول سال برای مراکز تکثیر و پرورش ماهیان می‌تواند نقش مهمی در توسعه فناوری انجماد اسپرم داشته‌باشد(Rana، ۱۹۹۵). هم‌چنین انجماد اسپرم سهولت جابه‌جایی در مراکز تکثیر، ساده کردن عملیات به‌گزینی و جبران کمبود مولدین یا تخم لقاح یافته در شرایط خاص را به‌دنبال دارد (Findeis، ۱۹۹۷). مهم‌ترین اصل در فرآیند انجماد، کاهش آسیب در اثر تشکیل بلورهای یخ داخل‌سلولی است‌که با سرد‌کردن آهسته و خروج آب داخل سلولی تا حد مناسب، قبل از سرد کردن یا طی آن انجام می‌شود (Billard و همکاران، ۱۹۹۷). محلول‌رقیق‌کننده برای‌افزایش‌زمان نگه‌داری اسپرم ماهیان در نگه‌داری بلندمدت و برای بهبود تکثیر مصنوعی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Chulhong و Chapman، ۲۰۰۵). مدت زمان تحرک اسپرم و درصد سلول‌های متحرک با توجه به گونه ماهی، دما، ترکیب‌رقیق‌کننده و هم‌چنین نسبت رقیق‌سازی متفاوت است (Alavi و همکاران، ۲۰۰۲). در فرایند انجماد اسپرم از افزودنی‌های مهم رقیق کننده، مواد محافظ سرمایی است که شامل دو نوع محافظت کننده نفوذپذیر و محافظت کننده نفوذناپذیر می‌باشد. دی‌متیل سولفوکساید، متانول و اتیلن گلیکول رایج‌ترین مواد محافظت‌کننده نفوذپذیر می‌باشد (Billard و همکاران، ۲۰۰۴). در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی روی کاربرد انواع مواد محافظ سرمایی در انجماد اسپرم ماهیان به‌عمل آمده است، اما در نحوه کاربرد این مواد و غلظت مناسب آن در روند انجماد اسپرم‌ماهیان‌خاویاری اتفاق نظری وجود نداشته است. از این‌رو مطالعه بیش‌تر برای بررسی حیات اسپرم در شرایط انجماد و اثر مواد محافظ سرمایی در‌غلظت‌های مختلف و هم‌چنین تاثیر نسبت‌رقیق‌سازی روی مدت‌زمان تحرک و درصد تحرک اسپرم برای تثبیت روش مناسب در روند انجماد اسپرم ماهیان‌خاویاری‌ضروری به‌نظر می‌رسد. از این‌رو تحقیقی با‌هدف تعیین‌بهترین‌ماده‌محافظ سرمایی‌نفوذپذیر، مناسب‌ترین غلظت ماده‌محافظ سرمایی‌و هم‌چنین بهترین نسبت رقیق‌سازی برای انجماد اسپرم ازون‌برون انجام شده است.

مواد و روش‌ها

زمان و مکان انجام تحقیق: نمونه‌های اسپرم ۴ مولد نر ازون برون از مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی در اوایل فروردین ماه سال ۱۳۹۱ جمع‌آوری شد. اسپرم‌گیری از مولدین ازون برون، بعد از انتخاب نر رسیده با وارد کردن چند ضربه به سر ماهی برای بی‌هوش کردن انجام شد. برای اسپرم‌گیری از مولدین، از سرنگ ۵۰ میلی‌لیتری متصل‌به تیوپ‌پلاستیکی‌استفاده شداسپرم‌های آلوده به مواد دفعی و یا خون مورد آزمایش قرار نگرفتند (Linhart و همکاران، ۱۹۹۵). اسپرم‌های‌موردنیاز‌برای‌آزمایش در‌داخل‌سرنگ‌های ۵ سی‌سی قرار داده شد و به‌وسیله فلاسک محتوی یخ، بلافاصله به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان برای انجام آزمایشات انتقال داده شد (Cosson و همکاران، ۲۰۰۰).

ارزیابی‌کیفی اسپرم: کیفیت اسپرم، براساس طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم‌های متحرک ارزیابی شد. برای شروع حرکت، اسپرم‌ها با محلول فعال‌کننده به نسبت ۱:۲۰۰ رقیق شد (Billard، ۲۰۰۱) و پارامترهای حرکتی اسپرم بلافاصله (با تاخیر کم‌تر از ۷ ثانیه) بعد از شروع فعالیت اسپرم تا زمانی‌که ۱۰۰ درصد اسپرم‌ها غیرمتحرک شدند فیلم‌برداری گردید. در ادامه با استفاده از نرم‌افزار پریمیر (Adobe premeier) هر ثانیه حرکتی اسپرم در فاصله زمانی بین ۲۰-۱۰ ثانیه اول بعد از فعال‌سازی به ۱۲ فریم (اسلاید) تبدیل شده و موقعیت ۱۰ اسپرم به‌صورت تصادفی در فرم‌های گرفته شده انتخاب شده و با مقایسه فرم‌های بعدی میزان درصد اسپرم متحرک به‌دست آورده شد. مدت زمان حرکت اسپرم، از لحظه فعال شدن تا زمانی‌که همه اسپرم‌ها از حرکت باز می‌ایستند اندازه‌گیری

شد (Turner و Montgomerie، ۲۰۰۲). دراین آزمایش از محلول فعال‌کننده (Activation solution) اسپرم (۳/۵ میلی‌مول کلریدسدیم، ۱۲ میلی‌مول تریس اسیدی) استفاده شد (Dzuba و همکاران، ۱۹۹۹). همه آزمایشات در سه تکرار انجام گرفت. به‌منظور اجتناب از خطای آزمایشی، همه اندازه‌گیری‌ها توسط یک مشاهده‌کننده انجام شد.

اضافه کردن رقیق‌کننده و مواد محافظ سرمایی به اسپرم: در این آزمایش از رقیق‌کننده (۳۰ میلی‌مول تریس، ۲۳/۴ میلی‌مول ساکارز، ۰/۲۵ میلی‌مول کلریدپتاسیم) استفاده شد (Glogowski و همکاران، ۲۰۰۲) و هم‌چنین از دی‌متیل سولفوکساید و اتیلن گیلکول به‌عنوان مواد محافظ سرمایی نفوذپذیر استفاده گردید که هر کدام درغلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد (Liu و همکاران، ۲۰۰۶) به رقیق کننده اضافه شدند و سپس رقیق‌کننده با اسپرم در نسبت‌های ۱:۰/۵، ۱:۱، ۱:۲ و ۱:۵ (Liu و همکاران، ۲۰۰۶؛ Linhart و همکاران، ۲۰۰۶) مخلوط شد. سپس اسپرم‌های رقیق‌شده در پایوت‌های ۰/۲۵ میلی-لیتری ذخیره شدند.

روش انجماد: مراحل انجماد اسپرم به‌روش دستی در آزمایشگاه انجام شد، برای این منظور از جعبه استایروفوم پر شده از ازت مایع استفاده شد. بدین‌ترتیب که پایوت‌ها در ۳ سانتی‌متری بالای سطح ازت مایع به‌مدت ۵ دقیقه قرار داده شد و سپس در داخل ازت مایع قرار گرفتند (Harvath و همکاران، ۲۰۰۵). سرانجام پایوت‌ها برای نگه‌داری طولانی مدت در مخزن ازت مایع نگه‌داری شدند.

انجمادزدایی: برای بررسی کیفیت اسپرم‌های انجمادزدایی شده در آزمایش، اسپرم‌های منجمد بعد از ۲۰ و ۴۰ روز از حالت انجماد خارج شدند. برای این کار پایوت‌های حاوی اسپرم منجمد را از تانک ازت مایع با برودت ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد خارج نموده و به‌مدت ۵ ثانیه در آب گرم ۴۰ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد تا به‌حالت مایع درآید. سپس درصد تحرک و مدت زمان تحرک اسپرم‌های انجمادزدایی شده زیر میکروسکوپ بررسی گردید. برای شروع حرکت اسپرم‌های انجمادزدایی شده نیز از ماده فعال‌کننده اسپرم (۳/۵ میلی‌مول کلرید سدیم، ۱۲ میلی‌مول تریس اسیدی) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های به‌دست آمده در ارتباط با مدت زمان حرکت و درصد حرکت اسپرم‌های انجمادزدایی شده در غلظت‌های مختلف مواد سرمایی (دی‌متیل سولفوکساید و اتیلن گیلکول) و نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA analysis) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج

خصوصیات نرهای انتخاب شده برای انجام آزمایش (جدول ۱):

جدول ۱: خصوصیات نرهای انتخاب شده برای انجام آزمایش

ماهی	وزن بدن (گرم)	طول کل (سانتی‌متر)	مدت زمان تحرک اسپرم (ثانیه)	درصد تحرک اسپرم (٪)
۱	۱۵	۱۴۴	۳۴۲/۲۴± ۱۴/۲۴[a]	۸۰/۶۴± ۲/۸۴[a]
۲	۱۸	۱۴۳	۳۳۰/۱۱± ۱۷/۷۰[a]	۸۵/۴۱± ۲/۷۰[a]
۳	۲۰	۱۵۵	۳۴۰/۶۷± ۱۲/۹۴[a]	۸۲/۲۰± ۳/۳۵[a]
۴	۱۹	۱۶۶	۳۲۵/۶۲± ۲۰/۴۲[a]	۸۰/۴۲± ۲/۲۰[a]

تاثیر نسبت‌های مختلف رقیق‌کننده همراه با غلظت‌های مختلف دی‌متیل سولفوکساید و اتیلن‌گلیکول روی پارامترهای حرکتی اسپرم ازون برون، پس از ۲۰ روز انجماد: همان‌گونه که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، اثر نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی همراه با غلظت‌های مختلف دی‌متیل سولفوکساید و اتیلن گلیکول روی طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم‌های ازون برون پس از ۲۰ روز انجماد، معنی‌دار است ($P<0/05$). به گونه‌ای که بالاترین طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم انجمادزدایی شده ازون برون بعد از ۲۰ روز انجماد، در اسپرمی که حاوی دی متیل سولفوکساید با غلظت ۱۰ درصد و با نسبت ۱:۱رقیق شده بود مشاهده شد. هم‌چنین کم‌ترین طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم انجمادزدایی شده پس از ۲۰ روز انجماد در اسپرمی که دارای اتیلن گلیکول با غلظت ۲۰ درصد و با نسبت ۱:۵رقیق شده بود مشاهده شد (جدول ۲). هم‌چنین مشاهده شد، در تمام غلظت‌های دی متیل سولفوکساید و اتیلن گلیکول مدت زمان تحرک و درصد تحرک اسپرم‌های انجمادزدایی شده در نسبت ۱:۱ از همه بالاتر بود و با افزایش و کاهش نسبت رقیق‌سازی طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم‌ها کاهش یافت.

تاثیر نسبت‌های مختلف رقیق کننده همراه با غلظت‌های مختلف دی‌متیل سولفوکساید و اتیلن‌گلیکول روی پارامترهای حرکتی اسپرم ازون برون، پس از ۴۰ روز انجماد: همان‌گونه که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، اثر نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی همراه با غلظت‌های مختلف دی‌متیل سولفوکساید و اتیلن گلیکول روی طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم‌های ازون برون پس از ۴۰ روز انجماد، معنی دار است ($P<0/05$). به گونه‌ای که بالاترین طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم انجمادزدایی شده ازون‌برون بعد از ۴۰ روز انجماد، در اسپرمی که حاوی دی‌متیل سولفوکساید با غلظت ۱۰ درصد و با نسبت ۱:۱رقیق شده بود مشاهده شد. هم‌چنین کم‌ترین طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم انجمادزدایی شده پس از ۴۰ روز انجماد در اسپرمی مشاهده شد که دارای اتیلن گلیکول با غلظت ۵ درصد و با نسبت ۱:۵رقیق شده بود (جدول ۳). هم‌چنین مشاهده شد، در تمام غلظت‌های دی متیل سولفوکساید و اتیلن گلیکول مدت زمان تحرک و درصد تحرک اسپرم‌های انجمادزدایی شده در نسبت ۱:۱ از همه بالاتر و با افزایش و کاهش نسبت رقیق‌سازی طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم‌ها کاهش می‌یافت.

جدول ۲: تاثیر نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی همراه با غلظت‌های مختلف دی‌متیل سولفوکساید و اتیلن‌گلیکول روی پارامترهای حرکتی اسپرم ازون برون پس از ۲۰ روز انجماد

تیمار	ماده محافظ سرمایی	غلظت (٪)	نسبت‌های رقیق‌سازی (رقیق‌کننده: اسپرم)	مدت زمان حرکت (ثانیه)	درصد حرکت (٪)
۱			۱ : ۰/۵	۲۴۰/۶۷± ۲۴/۲۹^{ab}	۳۰/۰۰± ۲/۶۰^{bc}
۲	دی متیل سولفوکساید	۵	۱ : ۱	۲۵۱/۳۳± ۱۶/۵۰^{a}	۳۵/۴۰± ۳/۵۱^{a}
۳			۱ : ۲	۲۲۲/۳۳± ۲۱/۵۸^{abc}	۲۵/۰۰± ۲/۹۰^{cde}
۴			۱ : ۵	۱۸۸/۶۷± ۲۱/۵۰^{cde}	۲۳/۵۰± ۲/۸۷^{ef}
۵			۱ : ۰/۵	۱۹۱/۲۴± ۱۹/۱۰^{cde}	۲۰/۳۶± ۲/۱۰^{fg}
۶	اتیلن گلیکول	۵	۱ : ۱	۲۰۸/۵۴± ۲۱/۶۲^{bcd}	۲۳/۵۴± ۳/۰۴^{ef}
۷			۱ : ۲	۱۷۰/۷۲± ۲۳/۴۲^{efg}	۱۸/۰۰± ۲/۱۰^{g}
۸			۱ : ۵	۱۴۴/۲۰± ۲۲/۳۴^{h}	۱۶/۲۳± ۲/۸۷^{g}
۹			۱ : ۰/۵	۲۳۷/۶۷± ۲۳/۸۰^{ab}	۳۳/۴۵± ۲/۴۲^{ef}
۱۰	دی متیل سولفوکساید	۱۰	۱ : ۱	۲۵۳/۰۰± ۲۴/۸۱^{a}	۳۶/۵۱± ۳/۲۰^{a}
۱۱			۱ : ۲	۲۲۰/۶۷± ۲۲/۳۰^{abc}	۲۸/۳۴± ۲/۸۶^{cde}
۱۲			۱ : ۵	۲۰۰/۳۳± ۱۸/۲۱^{bcd}	۲۵/۰۰± ۲/۲۴^{cde}
۱۳			۱ : ۰/۵	۱۹۴/۴۳± ۲۳/۵۴^{cde}	۲۴/۳۳± ۳/۳۵^{def}
۱۴	اتیلن گلیکول	۱۰	۱ : ۱	۲۲۰/۰۰± ۲۱/۶۲^{abc}	۲۹/۲۸± ۲/۳۶^{bcd}
۱۵			۱ : ۲	۱۹۰/۲۸± ۲۲/۵۵^{cde}	۱۷/۲۸± ۱/۹۷^{g}
۱۶			۱ : ۵	۱۵۰/۴۷± ۱۹/۲۴^{gh}	۱۶/۰۰± ۲/۱۰^{g}
۱۷			۱ : ۰/۵	۲۲۹/۶۷± ۲۰/۴۸^{abc}	۲۷/۳۰± ۳/۰۸^{cde}
۱۸	دی متیل سولفوکساید	۲۰	۱ : ۱	۲۵۲/۵۸± ۲۲/۰۷^{a}	۳۳/۸۰± ۳/۱۰^{ab}
۱۹			۱ : ۲	۲۱۷/۶۷± ۲۰/۵۱^{abc}	۲۵/۰۰± ۲/۵۰^{cde}
۲۰			۱ : ۵	۱۷۶/۵۸± ۱۹/۶۳^{def}	۲۰/۴۸± ۲/۲۱^{fg}
۲۱			۱ : ۰/۵	۲۰۰/۵۴± ۲۰/۵۹^{bcd}	۱۷/۴۰± ۲/۲۴^{g}
۲۲	اتیلن گلیکول	۲۰	۱ : ۱	۲۰۹/۴۷± ۲۳/۲۱ ^{bcd}	۲۴/۵۷± ۲/۲۸^{def}
۲۳			۱ : ۲	۱۶۰/۲۶± ۲۲/۴۷^{fgh}	۱۶/۲۴± ۳/۳۷^{g}
۲۴			۱ : ۵	۱۴۳/۲۴± ۱۸/۸۶^{h}	۱۵/۳۱± ۲/۹۵^{g}

حروف انگلیسی متفاوت در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ می‌باشد. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است.

جدول ۳:تاثیر نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی همراه با غلظت‌های مختلف دی متیل سولفوکساید و اتیلن گلیکول روی پارامترهای حرکتی اسپرم ازون برون پس از ۴۰ روز انجماد

تیمار	ماده محافظ سرمایی	غلظت (٪)	نسبت‌های رقیق‌سازی (رقیق‌کننده: اسپرم)	مدت زمان حرکت (ثانیه)	درصد حرکت (٪)
۱			۱ : ۰/۵	۱۹۲/۶۷± ۲۲/۲۹^{abc}	۲۰/۲۰± ۲/۱۵^{bc}
۲	دی متیل سولفوکساید	۵	۱ : ۱	۲۱۲/۰۰± ۲۱/۳۰^{ab}	۲۳/۴۰± ۲/۲۱^{abc}
۳			۱ : ۲	۲۰۰/۶۷± ۱۹/۵۸^{abc}	۲۲/۰۰± ۲/۹۰^{bc}
۴			۱ : ۵	۱۳۰/۶۷± ۲۱/۵۰^{ghi}	۱۴/۳۳± ۲/۵۲^{def}
۵			۱ : ۰/۵	۱۴۰/۲۸± ۲۲/۱۲^{fgh}	۱۵/۵۴± ۳/۲۷^{de}
۶	اتیلن گلیکول	۵	۱ : ۱	۱۷۹/۱۴± ۲۱/۲۴^{bcd}	۱۸/۳۵± ۲/۹۲^{cde}
۷			۱ : ۲	۱۵۸/۶۷± ۲۱/۰۷^{def}	۱۶/۰۰± ۲/۱۰^{cde}
۸			۱ : ۵	۱۰۰/۵۴± ۱۹/۸۴^{i}	۱۱/۳۸± ۲/۹۴^{f}
۹			۱ : ۰/۵	۱۹۷/۶۷± ۲۲/۸۰^{abc}	۲۲/۰۰± ۳/۱۲^{bc}
۱۰	دی متیل سولفوکساید	۱۰	۱ : ۱	۲۳۴/۳۶± ۲۳/۷۰^{a}	۲۷/۵۴± ۲/۱۲^{a}
۱۱			۱ : ۲	۲۰۰/۶۷± ۲۱/۳۰^{abc}	۲۴/۴۲± ۲/۴۰^{ab}
۱۲			۱ : ۵	۱۵۶/۰۰± ۲۰/۲۱^{efg}	۱۷/۰۰± ۲/۹۷^{cde}
۱۳			۱ : ۰/۵	۱۶۴/۲۹± ۲۰/۷۳^{cde}	۱۸/۵۱± ۳/۱۲^{cde}
۱۴	اتیلن گلیکول	۱۰	۱ : ۱	۲۰۵/۱۹± ۲۳/۵۴^{abc}	۲۲/۳۷± ۳/۵۱^{bc}
۱۵			۱ : ۲	۱۴۸/۳۸± ۲۲/۳۰^{fgh}	۱۶/۴۸± ۲/۹۴^{cde}
۱۶			۱ : ۵	۱۲۰/۴۲± ۲۱/۲۷^{hi}	۱۵/۲۸± ۲/۲۷^{de}
۱۷			۱ : ۰/۵	۱۹۶/۶۷± ۲۲/۴۸^{abc}	۱۹/۶۰± ۲/۰۸^{bcd}
۱۸	دی متیل سولفوکساید	۲۰	۱ : ۱	۲۱۴/۶۷± ۲۳/۰۷^{ab}	۲۳/۳۰± ۳/۸۲^{abc}
۱۹			۱ : ۲	۱۹۸/۳۳± ۲۵/۵۱^{abc}	۲۲/۲۰± ۲/۵۸^{bc}
۲۰			۱ : ۵	۱۲۰/۱۴± ۲۱/۴۱^{hi}	۱۱/۸۵± ۲/۰۲^{ef}
۲۱			۱ : ۰/۵	۱۵۵/۷۴± ۲۰/۲۷^{efg}	۱۳/۵۰± ۲/۱۰^{ef}
۲۲	اتیلن گلیکول	۲۰	۱ : ۱	۱۸۰/۶۴± ۲۳/۱۸^{bcd}	۱۹/۳۳± ۱/۳۷^{bcd}
۲۳			۱ : ۲	۱۵۵/۶۷± ۲۴/۳۴^{efg}	۱۶/۸۵± ۲/۹۰^{cde}
۲۴			۱ : ۵	۱۰۷/۵۴± ۱۹/۸۴^{i}	۱۲/۴۰± ۱/۹۴^{ef}

حروف انگلیسی متفاوت در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ می‌باشد. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است.

بحث

برای انجماد اسپرم مطالعات باید بر روی تعدادی از پایه‌های کلیدی از اصول انجماد شامل مطالعه روی اسپرم تازه، رقیق‌سازی با مواد رقیق‌کننده (شامل مواد محافظ سرما و افزودنی‌ها) و نسبت رقیق سازی صورت پذیرد (Billard، ۲۰۰۱). صدمات بیوشیمیایی و فیزیکی وارد بر سلول‌های درحال یخ‌زدن مثل آبگیری نمودن و تغییرات PH ازجمله مهم‌ترین صدمات وارده بر سلول طی مراحل انجماد می‌باشند (Liu و همکاران، ۲۰۰۶). این اثرات مخرب را می‌توان بـا افزودن مواد محافظ سرما تاحدی کاهش داد (Lahnsteiner و همکاران، ۲۰۰۴). با توجه به نتایج به‌دست آمده در آزمایش مشخص شد که نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی تاثیر معنی‌داری روی طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم‌های انجمادزدایی شده دارد ($P<0/05$). هم‌چنین مشخص شد که بهترین نسبت رقیق‌سازی برای انجماد اسپرم ازون‌برون، نسبت رقیق‌سازی ۱:۱ است و نسبت‌های دیگر رقیق‌سازی باعث افزایش افت کیفیت اسپرم‌های منجمد شده می‌شود. شالویی (۱۳۸۶) به بررسی اثر رقیق کننده‌ها در نسبت‌های مختلف بر روی ماهی شیب (*Acipenser nudiventris*) پرداخت، که با نتایج این آزمایش هم‌خوانی داشت. بطوریکه بهترین تیمار از نظر مدت زمان حرکت و درصد حرکت در ماهی شیب مربوط به نسبت رقیق سازی ۱:۱ بود. رقیق سازی اسپرم باعث کاهش تراکم اسپرم شده و اکسیژن را برای اسپرماتوزوآ فراهم می‌کند (Mansour و همکاران، ۲۰۰۴). در نسبت‌های زیاد رقیق‌سازی به‌دلیل این‌که پلاسمای منی تاثیر حفاظتی خود را از دست می‌دهد، حیات اسپرم کاهش می‌یابد (Mansour و همکاران، ۲۰۰۴). دلیل کم بودن طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم در نسبت‌های کم رقیق سازی را می‌توان به‌خاطر کمبود ماده رقیق‌کننده دانست که با توجه به فوایدی که رقیق‌کننده برای اسپرم منجمد شده دارد (تامین مواد مغذی مورد نیاز اسپرم، محافظت اسپرم از شوک حرارتی و ...)، کم بودن ماده رقیق‌کننده باعث افزایش آسیب‌پذیری اسپرم‌ها در طول مدت انجماد می‌شود و در نتیجه باعث کاهش کیفیت اسپرم‌های انجمادزدایی شده می‌شود (Liu و همکاران، ۲۰۰۶). تحقیقات نشان می‌دهد که نسبت رقیق‌سازی در مدت زمان تحرک و درصد تحرک اسپرم موثر است، البته این نتایج در تمام ماهیان یکسان نیست به‌طوری که در ماهی تورپوت افزایش نسبت رقیق‌سازی در مدت زمان تحرک و درصد تحرک اسپرم تاثیر خاصی ندارد (Alavi و همکاران، ۲۰۰۲). کیفیت اولیه اسپرم در موفقیت انجماد نقش اساسی دارد که این کیفیت به‌عوامل مختلفی بستگی دارد ازجمله شرایط زیست‌محیطی ماهیان نر از قبیل دما و کیفیت غذا طی مرحله گامتوژنز که بر ترکیب و ساختار غشاء اسپرم مؤثر خواهدبود (Aas و همکاران، ۱۹۹۱). با توجه به نتایج به‌دست آمده، در مجموع مدت زمان تحرک و درصد تحرک اسپرم‌های انجمادزدایی شده نسبت به اسپرم‌های تازه استحصال شده به‌طور قابل مشهودی کم‌تر بود. نتایج به‌دست آمده بیان‌کننده یک روند کاهشی است که نشان می‌دهد افزایش زمان نگه‌داری اسپرم‌های منجمد شده بر روی کیفیت آن‌ها از ۲۰ روز تا ۴۰ روز تاثیر منفی دارد. در فرآیند نگه‌داری اسپرم در دماهای پایین (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) بایستی شرایطی ایجاد شود تا سلول‌های اسپرم قادر باشند شرایط سخت انجماد را تحمل کنند. در این برودت آب به شکل کریستال درآمده و هیچ واکنش وابسته به حرارت در این سیستم آبی انجام‌پذیر نیست و اسپرم‌ها می‌توانند قدرت حیاتی خود را تا مدت طولانی حفظ کنند (Liu و همکاران، ۲۰۰۶). در واقع، برای این‌که اسپرم‌ها بتوانند در حالت انجماد زنده بمانند، بایستی مقداری از آب خود را از دست بدهند. این عمل با افزودن مواد محافظ سرمایی انجام می‌پذیرد (Harvath و همکاران، ۲۰۰۵). در مرحله انجمادزدایی تشکیل مجدد کریستال یخ داخل سلول ممکن است باعث تخریب سلول‌های اسپرم شود (Glogowski و همکاران، ۲۰۰۲). تشکیل مجدد کریستال یخ، بستگی به سرعت ذوب دارد. اگر ذوب به‌آرامی انجام شود این فرصت به سلول داده می‌شود که آب باقی‌مانده هنگام عبور سلول از نقطه انجماد به کریستال تبدیل شود (Lahnsteiner و همکاران، ۲۰۰۴). اگر سرعت ذوب زیاد باشد، از شکل‌گیری کریستال یخ جلوگیری خواهد کرد (Harvath و همکاران، ۲۰۰۵). بر همین اساس در آزمایش انجام شده سعی شد تا انجماد زدایی اسپرم سریع صورت گیرد. در این تحقیق، دی‌متیل سولفوکساید به‌عنوان بهترین ماده محافظ سرمایی نفوذپذیر برای انجماد اسپرم ازون‌برون مشخص گردید و این نتیجه مشابه بود با نتایج به‌دست آمده توسط Glogowski و همکاران (۲۰۰۲) که دی‌متیل سولفوکساید ۱۰ درصد را برای انجماد اسپرم تاس‌ماهیان سیبری (*Acipenser baeri*) مناسب اعلام کردند. با مطالعه Linhart و همکاران (۲۰۰۶) بر روی انجماد اسپرم ماهی پارو پوزه (*Polyodon spathula*)، این گروه دی متیل سولفوکساید ۸ درصد را برای نگه‌داری اسپرم مفید گزارش کردند. برخلاف نتایج به‌دست آمده در این تحقیق که دی‌متیل سولفوکساید، به‌عنوان بهترین ماده محافظ سرمایی برای انجماد اسپرم ازون‌برون مشخص شد، Liu و همکاران (۲۰۰۶)، اتیلن گلیکول با غلظت ۱۲ درصد را به‌عنوان بهترین ماده محافظ سرمایی در انجماد اسپرم تاس‌ماهی چینی (*Acipenser sinensis*) عنوان کردند. هم‌چنین Lahnsteiner و همکاران (۲۰۰۴) در مطالعاتی که بر روی انجماد اسپرم ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) انجام دادند، بیش‌ترین درصد تحرک را با متانول ۱۰ درصد (٪ ۷/۴ ±۸۰) اعلام کردند. علت اختلاف در تعیین مناسب‌ترین نوع ماده محافظ سرمایی و غلظت مناسب مواد محافظ سرما در نتایج ذکر شده با نتایج به‌دست آمده در

این تحقیق را می‌توان نوع گونه انتخاب شده، اختلاف در محلول‌های رقیق‌کننده به‌کار برده شده و هم‌چنین ویژگی‌های خاص مایع منی این گونه‌ها عنوان کرد.

منابع

۱. **Aas, G.H.; Refstie, T. and Gjerde, B., 1991.** Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. Aquaculture. Vol. 95, pp: 125-132.

۲. **Alavi, S.M.H.; Amiri, B.M.; Cosson, J.; Pourkazemi, M. and Karami, M., 2002.** A preliminary investigation on motility of *Acipenser persicus* spermatozoa: a comparative study between freshwater and saline solutions at di, erent dilution rate. The 2nd National Regional Symposium on Sturgeon, Rasht, Iran. pp: 128-130.

۳. **Billard, R.; Tsvetkova, L.I.; Cosson, J. and Linhart, O., 1997**. Motility analysis of fresh and thawed spermatozoa in (*Acipenser beari*). 3rd Inter. Sym. Sturgeon. Piacenza, Italy.

۴. **Billard, R., 2001**. Techniques of Genetic Resource Banking in Fish. In: Cryobanking the Genetic Resource, (Eds: Watson, P.F. and Holt, W.V.,), London and New York. pp: 145-158.

۵. **Billard, R.: Cosson, S.B. and Pourkazemi, M., 2004.** Cryopreservation and short-term sturgeon sperm, a review. Aquaculture. Vol. 236, pp: 1-9.

۶. **Chulhong, P.F. and Chapman, A., 2005**. An extenser solution for the short-term storage of sturgeon semen. Aquaculture. Vol. 67, pp: 52-57.

۷. **Cosson, J.; Linhart, O.: Mims, S.D., Shelton, W.L. and Rodina, M., 2000**. Analysis of motility parameters from paddlefish and shovelnose sturgeon spermatozoa. Journal of Fish Biology. Vol. 56, pp: 1-20.

۸. **Dzuba, B.B.; Kopeika, F.F., Cherepanov, V.V. and Drokin, S.L., 1999.** Sturgeon sperm quality after 6 years of cryopreservation. Journal of Applied Ichthyology. Vol. 15, pp: 312-322.

۹. **Findeis, E.K., 1997.** Osteology and phylogenetic relationships of recent sturgeons. In: Sturgeon Biodiversity and Conservation (eds Birstein, V.J.; Waldman, J.R. and Bemis, W.E.,). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp: 73-106.

۱۰. **Galli, A.; Vanni, R.; Rossetti, S. and Aleandri, R., 2006.** Milt cryopreservation in Italian Cobica sturgeon (*Acipenser naccarii*). Aquaculture Society. 272 p.

۱۱. **Glogowski, J.; Kolman, R.; Szcepkowski, M.; Horvath, A.; Urbanyi, B.; Sieczynski, P.; Rzemieniecki, A.; Domagala, J.; Demianowicz, W.; Kowalski, A. and Ciereszko, A., 2002.** Fertilization rate of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) milt cryopreserved with methanol. Journal Aquaculture. Vol. 211, pp: 367-373.

۱۲. **Harvath, A.; Wayman, W.R.; Urbanyi, B.; Ware, K.M.; Dean, J.C. and Tiersch, T.S., 2005.** The relationship of the cryoprotectants methanol and dimethyl sulfoxide and hyperosmotic extenders on sperm cryopreservation of two North-American sturgeon species. Journal Aquaculture. Vol. 247, pp: 243-251.

۱۳. **Lahnsteiner, F.; Berger, B.; Horvath, A. and Urbanyi, B., 2004.** Stuies on the semen biology and sperm cryopreservation in the starlet (*Acipenser ruthenus*). Aquaculture Reserch. Vol. 35, pp: 519-528.

۱۴. **Linhart, O.; mims, A.D. and Shelton, W.L., 1995.** Motility of spermatozoa from shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platorynechus*) and Paddlefish (*Polyodon spathula*). Journal of fish Biology. Vol. 47, pp: 902-909.

۱۵. **Linhart, O.; Mims, S.D.; Glomelsky, B.; Cvetkova, L.I.; Cosson, J.; Rodina, M.; Horvath, A. and Urbanyi, B., 2006.** Effect of cryoprotectant and male on motility parameters and fertilization rate in paddlefish (*Polyodon spathula*) frozenthowed spermatozoa. Journal of Applied Ichthyology. Vol. 22, pp: 389-394.

۱۶. **Liu, L.; Wei, Q.; Guo, F. and Zhang, T., 2006.** Cryopreservation of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) sperm. Journal of Applied Ichthyology. Vol. 22, pp: 384-388.

۱۷. **Mansour, N.; Lahnsteiner, F. and Berger, B., 2004.** Characterization of the testicular semen of the African catfish (*Clarias gariepinus*) and its short-term storage. Aquaculture Reserch. Vol. 35, pp: 232-244.

۱۸. **Rana, A., 1995.** The sturgeons. In Nash, C.E. and Novotny, A.J., (eds). Production of Aquatic Animals. Elsevier, Amsterdam. pp: 95-108.

۱۹. **Stoss, J., 1983.** Fish gamete preservation and spermatozoa physiology. In Hoar, W.S.; Randall, D.J. and Donaldson, E.M., editors. Fish physiology, volume IXB. Academic Press, New York. pp: 305-350.

۲۰. **Turner, E. and Montgomerie, R., 2002.** Ovarian fluid enhances sperm movement in Arctic charr. Jornal of Fish Biology. pp: 1570-1579.