اثر سمیت مواد ضد انجماد گلیسرول، دی‌متیل‌سولفوکساید و استامید در جنین ماهی قره‌برون (*Acipenser persicus*)

- **سعیده کیوانلو*:** دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
صندوق پستی: ١٥٧٣٩-٤٩١٣٨
- **محمد سوداگر:** دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
صندوق پستی: ١٥٧٣٩-٤٩١٣٨

تاریخ دریافت: تیر ١٣٩٠ تاریخ پذیرش: آذر ١٣٩٠

چکیده

انجماد جنین ماهیان عبارت از جایگزین کردن مواد ضد انجماد با آب درون جنین است. این مواد در غلظت‌های بالا سبب ایجاد مسمومیت و مرگ در جنین ماهیان می‌شوند، از اینرو توجه به غلظت مواد مورد استفاده و مدت زمان در معرض قرار گرفتن جنین با این مواد بسیار حائز اهمیت است. در این تحقیق جنین ماهی قره‌برون در دو مرحله تکامل جنینی (٢٤ و ٤٨ ساعت پس از لقاح) برای دو زمان ٥ و ١٠ دقیقه در مواد ضد انجماد شامل گلیسرول، استامید و دی متیل سولفوکساید در غلظت‌های ١ تا ٦ مولار غوطه‌ور شد. سپس جنین‌ها آبکشی شدند و در داخل انکوباتورها ادامه روند مراحل تکاملی خود را طی کردند. نتایج نشان داد غلظت‌های مختلف دی متیل‌سولفوکساید نسبت به گلیسرول و استامید، سمیت کمتری برای جنین ماهی قره‌برون داشت و جنین توانست این ماده را در غلظت‌های بالا به خوبی تحمل کند. استامید بیشترین اثرات سمی را بر جنین ماهی قره‌برون داشت بطوریکه در مرحله ٢٤ و ٤٨ ساعت پس از لقاح، درصد تفریخ بترتیب در غلظت‌های بالاتر از ٣ و ٤ مولار، به صفر رسید. با افزایش غلظت مواد ضد انجماد، درصد تفریخ کاهش یافت (بجز دی‌متیل‌سولفوکساید در مرحله ٢٤ ساعت پس از لقاح). در تحقیق، افزایش زمان غوطه‌وری از ٥ به ١٠ دقیقه در جنین ماهی قره‌برون سبب شد درصد تفریخ کاهش یابد. با پیشرفت روند تکاملی از ٢٤ به ٤٨ ساعت، حساسیت جنین ماهی قره‌برون نسبت به دو ماده دی‌متیل‌سولفوکساید و گلیسرول کاهش یافت. اما در استامید شرایط کاملاً متفاوت بود و با پیشرفت روند تکاملی، حساسیت جنین نسبت به غلظت‌های مختلف این ماده افزایش یافت و روند درصد تفریخ بصورت کاهشی بود بنحویکه درصد تفریخ در غلظت‌های بالاتر از ٣ مولار استامید به صفر رسید.

کلمات کلیدی: مواد ضد انجماد، جنین ماهی قره‌برون، گلیسرول، دی‌متیل‌سولفوکساید، استامید

*پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Skeivanloo@yahoo.com

مقدمه

ماهی قره‌برون (*Acipenser persicus*) یکی از گونه‌های بسیار با ارزش تاسماهیان است که زیستگاه اصلی آن سواحل جنوبی دریای خزر می‌باشد. گوشت و خاویار این ماهی ارزش غذایی بالایی داشته و خاویار آن در دنیا از مرغوبیت خاصی برخوردار است (۱۴). از آن جا که نسل این ماهی در معرض خطر انقراض قرار دارد برای جلوگیری از انقراض آن نیاز به استفاده از تکنولوژی‌های نوین می‌باشد. یکی از تکنولوژی‌های پیشرفته در این زمینه انجماد جنین است. دستیابی به تکنیک انجماد جنین فواید بسیاری را بدنبال خواهد داشت که یکی از آنها حفظ ذخایر و تهیه بانک ژنتیکی از ماهیانی است که در معرض خطر انقراض قرار دارند.

اولین قدم موفقیت‌آمیز در انجماد جنین، ورود مواد ضد انجماد درون قسمت‌های مختلف جنین می‌باشد که این مواد در دماهای پایین از جنین محافظت کرده و مانع از مرگ آن می‌شوند. از سوی دیگر این مواد در غلظت‌های بالا می‌توانند ایجاد مسمومیت نموده و درصد تفریخ را کاهش و تلفات را در جنین ماهیان افزایش دهند (۱).

مطالعات صورت گرفته روی جنین ماهی توربوت (*Scophthalmus maximus*) و ماهی گورخری (*Danio rerio*) بیانگر آن است که برای دستیابی به یک روش و پروتکل مناسب برای انجماد، عوامل متعددی دخیل هستند که یکی از این عوامل سمیت مواد ضد انجماد می‌باشد (۳، ۱۲ و ۱۳). سطوح سمیت مواد ضد انجماد در گونه‌های متنوع ماهیان و طی مراحل مختلف تکامل جنینی متفاوت می‌باشد و نیاز است که سمیت این محلول‌ها در مراحل تکاملی و در گونه‌های متنوع ماهیان مورد بررسی قرار گیرد (۴).

هدف از این تحقیق، دستیابی به اطلاعات بنیادی و پایه در مورد واکنش جنین ماهی قره‌برون (*Acipenser persicus*) نسبت به مواد ضد انجماد بود و به همین دلیل آزمایشاتی برای تعیین اثرات مواد ضد انجماد بر درصد تفریخ و میزان بقا در جنین ماهی قره‌برون انجام شد.

مواد و روشها

این تحقیق در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۰ در مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی گرگان به انجام رسید. تخمک و اسپرم استحصال شده از مولدین ماهی قره‌برون این مرکز، پس از لقاح به انکوباتورهای یوشچنکو منتقل شدند تا مراحل تکامل جنینی را طی کنند. دو گروه از تخم‌ها برای انجام آزمایش در نظر گرفته شدند. گروه اول تخم‌هایی که ۲۴ ساعت از زمان لقاح آنها گذشته بود و گروه دوم تخم‌هایی که ۴۸ ساعت از زمان لقاح آنها سپری گشته بود.

همه مواد مورد استفاده در این تحقیق از نمایندگی شرکت مرک آلمان در ایران خریداری شد. برای تهیه غلظت‌های مختلف از مواد ضد انجماد از محلول رینگر (۲/۹۹ گرم کلرید پتاسیم + ۶/۴۹ گرم کلرید سدیم + ۰/۲۹ گرم کلرید کلسیم و ۰/۲۰ گرم بی‌کربنات سدیم در یک لیتر آب) استفاده شد. سپس ۱۰۰ عدد تخم از گروه اول (تخم‌هایی که ۲۴ ساعت از زمان لقاح آنها گذشته است) و گروه دوم (تخم‌هایی که ۴۸ ساعت از زمان لقاح آنها گذشته است) به مدت ۵ دقیقه در محلول آنزیم پروناز با غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر قرار گرفت تا کوریون بوسیله این آنزیم نفوذپذیر گردد (۴)، سپس جنین‌های لقاح یافته ماهی قره‌برون در دمای ۱±۱۹/۳ درجه سانتیگراد در ۳۰ میلی‌لیتر از هر یک از محلول‌های ضد انجماد شامل: گلیسرول، استامید و دی متیل سولفوکساید در ۶ غلظت (۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و۶ مولار) و در زمانهای ۵ و ۱۰ دقیقه غوطه‌ور شدند. پس از آن جنین‌ها آبکشی گردیدند و ادامه مراحل تکاملی خود را در انکوباتورها طی کردند. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد (گروه شاهد نیز در همان زمان بدون آن‌که در معرض مواد ضد انجماد قرار بگیرند، در آب کارگاه مراحل انکوباسیون خود را طی کردند).

بررسی تاثیر مواد ضد انجماد با تعیین درصد تفریخ لارو (براساس فرمول ۱) صورت گرفت:

(فرمول ۱)

درصد تفریخ = تعداد لارو تفریخ/ (تعداد کل تخم‌های مورد آزمایش شده) × ۱۰۰

نمونه‌برداری در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام و برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. داده‌های بدست آمده از این آزمایش به کمک آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA One Way) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. همچنین برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه دانکن (Duncan) استفاده شد.

نتایج

در میان تیمار آزمایشی مربوط به گلیسرول، در مرحله ۲۴ ساعت پس از لقاح، در بین جنین‌هایی که برای مدت ۵ دقیقه در معرض غلظت‌های مختلف این ماده قرار گرفته بودند، بالاترین درصد تفریخ پس از گروه شاهد در غلظت ۳ مولار مشاهده شد. در مدت زمان ۱۰ دقیقه نیز پس از تیمار شاهد بالاترین درصد تفریخ در غلظت ۳ مولار ثبت گردید که اختلاف معنی‌داری با غلظت ۱ مولار نداشت (P>۰/۰۵). پایین‌ترین درصد تفریخ در این تیمار، در مدت زمان ۱۰ دقیقه غوطه‌وری، در غلظت ۶ مولار ثبت گردید که در این غلظت درصد تفریخ به صفر رسید. در تیمار ۴۸ ساعت پس از لقاح نیز، پس از غوطه‌وری جنین‌ها برای مدت ۵ دقیقه، بالاترین درصد تفریخ در غلظت ۳ مولار مشاهده گردید. در مدت زمان ۱۰ دقیقه غوطه‌وری، پس از گروه شاهد بالاترین درصد تفریخ در غلظت ۴ مولار مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با غلظت‌های ۱، ۵ و ۶ مولار نداشت (P>۰/۰۵). در این مرحله پایین‌ترین درصد تفریخ در غلظت ۱ مولار گلیسرول در مدت زمان ۵ دقیقه غوطه‌وری ثبت گردید. بطور کلی با افزایش غلظت، درصد تفریخ کاهش یافت، همچنین جنین‌های تیمار ۴۸ ساعته حساسیت کمتری نسبت به غلظت‌های بالای گلیسرول از خود نشان دادند.

در جنین‌های تیمار ۲۴ ساعته هنگامی که برای مدت ۵ دقیقه در معرض غلظت‌های مختلف دی متیل سولفوکساید قرار گرفتند، بالاترین درصد تفریخ در گروه شاهد مشاهده گردید اما، بین سایر گروه‌های آزمایشی (بجز غلظت ۲ مولار) هیچ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). در تیمار ۱۰ دقیقه غوطه‌وری، بالاترین درصد تفریخ در گروه شاهد و به دنبال آن در غلظت ۶ مولار دی متیل سولفوکساید مشاهده شد. پایین‌ترین درصد تفریخ در این مرحله در غلظت‌های ۱ و ۲ مولار ثبت گردید. علاوه بر این، بین تیمارهای ۱، ۲ و ۵ مولار و نیز بین تیمارهای ۳، ۴ و ۵ مولار اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). در این مرحله با افزایش غلظت، درصد تفریخ افزایش یافت. بالاترین درصد تفریخ در تیمار ۴۸ ساعته در مدت زمان ۵ دقیقه غوطه‌وری، پس از گروه شاهد در غلظت‌های ۱و ۵ مولار مشاهده گردید اما، اختلاف معنی‌داری با غلظت ۲ مولار نداشتند (P>۰/۰۵). هنگامی که جنین‌ها برای مدت ۱۰ دقیقه در غلظت‌های مختلف دی متیل سولفوکساید غوطه‌ور شدند، بالاترین درصد تفریخ پس از گروه شاهد در غلظت ۲ مولار مشاهده گردید اما، با غلظت ۱ مولار اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). پایین‌ترین درصد تفریخ تیمار ۵ دقیقه غوطه‌وری در غلظت ۶ مولار و در تیمار ۱۰ دقیقه غوطه‌وری در غلظت ۳ مولار ثبت گردید ولی با غلظت ۴ مولار تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). بطور کلی با افزایش غلظت دی متیل سولفوکساید، درصد تفریخ کاهش یافت و با پیشرفت روند تکاملی جنین از ۲۴ ساعت به ۴۸ ساعت، توانایی جنین برای تحمل غلظت‌های مختلف دی متیل سولفوکساید افزایش یافت (جدول ۱).

در میان تیمارهای استامید در مرحله ۲۴ ساعته، هنگامی که جنین‌ها برای مدت ۵ دقیقه در معرض غلظت‌های مختلف این ماده قرار گرفتند، پس از گروه شاهد، بالاترین درصد تفریخ در غلظت ۱ مولار مشاهده گردید که با غلظت ۲ مولار اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). در مدت زمان ۱۰ دقیقه غوطه‌وری در این مرحله، بالاترین درصد تفریخ در غلظت ۲ مولار بود. در هر دو مدت زمان با افزایش غلظت، درصد تفریخ کاهش یافت بطوریکه در غلظت ۶ مولار در تیمار ۵ دقیقه غوطه‌وری و در غلظت‌های ۵ و ۶ مولار در تیمار ۱۰ دقیقه غوطه‌وری، درصد تفریخ به صفر رسید. با افزایش مدت زمان غوطه‌وری از ۵ به ۱۰ دقیقه، درصد تفریخ بصورت معنی‌داری کاهش یافت (P>۰/۰۵). در تیمار ۴۸ ساعته در مدت زمان ۵ دقیقه، بالاترین درصد تفریخ در گروه شاهد و پس از آن در غلظت ۱ مولار مشاهده گردید. در مدت زمان ۱۰ دقیقه غوطه‌وری، پس از تیمار شاهد بالاترین درصد تفریخ در غلظت ۲ مولار ثبت گردید. با افزایش غلظت استامید، درصد تفریخ بصورت معنی‌داری کاهش یافت (P>۰/۰۵). بطوریکه در غلظت‌های بالاتر از ۳ مولار، درصد تفریخ به صفر رسید با پیشرفت روند تکامل جنینی از ۲۴ به ۴۸ ساعت، حساسیت جنین ماهی قره‌برون نسبت به غلظت‌های بالای استامید (غلظت‌های بالاتر از ۳ مولار) ، افزایش یافت بطوریکه درصد تفریخ در غلظت‌های ۴، ۵ و ۶ مولار برای هر دو مدت زمان ۵ و ۱۰ دقیقه غوطه‌وری به صفر رسید (جدول۱).

جدول ۱: درصد تفریخ در جنین‌های ۲۴ ساعته (الف) و ۴۸ ساعته (ب) ماهی قره‌برون در غلظت‌های مختلف گلیسرول، دی متیل سولفوکساید و استامید

مواد ضد انجماد		درصد تفریخ					
		غلظت					
		شاهد	۱ مولار	۲ مولار	۳ مولار	۴ مولار	۵ مولار	۶ مولار
الف								
گلیسرول	۵ دقیقه	۷۵±۲/۸۸ a	۴۵± ۲/۸۸ c	۲۶/۶۶± ۴/۴۰ d	۶۱/۶۶±۱/۶۶ b	۳۸/۳۳±۱/۶۶ c	۴۰±۲/۸۸ c	۳۶/۶۶/±۳/۳۳ c
	۱۰ دقیقه	۷۰±۵/۷۷ a	۶۱/۶۶±۱/۶۶ a	۲۶/۶۶± ۴/۴۰ bc	۶۶/۶۶±۴/۴۰ a	۳۱/۶۶±۴/۴۰ b	۱۶/۶۶±۴/۴۰ c	۰ d
دی متیل سولفوکساید	۵ دقیقه	۷۳/۳۳±۱/۶۶ a	۴۰±۲/۸۸ c	۲۱/۶۶±۴/۴۰ d	۴۶/۶۶±۳/۳۳ bc	۴۱/۶۶±۴/۴۰ bc	۵۱/۶۶±۳/۳۳ b	۵۰±۲/۸۸ bc
	۱۰ دقیقه	۷۱/۶۶±۱/۶۶ a	۳۰±۲/۸۸ d	۲۸/۳۳± ۱/۶۶ d	۴۱/۶۶±۳/۳۳ c	۴۰±۲/۸۸ c	۳۵±۲/۸۸ cd	۵۵±۲/۸۸ b
استامید	۵ دقیقه	۷۵±۲/۸۸ a	۶۰± ۲/۸۸ b	۵۸/۳۳± ۴/۴۰ b	۳۸/۳۳±۱/۶۶ c	۲۵± ۲/۸۸ d	۸/۳۳± ۴/۴۰ e	۰ e
	۱۰ دقیقه	۷۳/۳۳±۱/۶۶ a	۲۶/۶۶±۱/۶۶ c	۳۵± ۲/۸۸ b	۲۶/۶۶± ۴/۴۰ c	۱۳/۳۳± ۱/۶۶ d	۰ e	۰ e
ب								
گلیسرول	۵ دقیقه	۷۵±۲/۸۸ a	۲۵±۲/۸۸ e	۴۸/۳۳±۱/۶۶ cd	۶۵± ۲/۸۸ ab	۵۸/۳۳± ۴/۴۰ bc	۴۵± ۵/۷۷ d	۴۶/۶۶± ۱/۶۶ d
	۱۰ دقیقه	۷۳/۳۳±۳/۳۳ a	۵۳/۳۳±۱/۶۶ bc	۴۱/۶۶± ۴/۴۰ d	۴۸/۳۳± ۴/۴۰ cd	۶۱/۶۶± ۴/۴۰ b	۵۱/۶۶± ۱/۶۶ bcd	۵۱/۶۶± ۱/۶۶ bcd
دی متیل سولفوکساید	۵ دقیقه	۷۵±۲/۸۸ a	۷۰± ۲/۸۸ ab	۶۳/۳۳± ۱/۶۶ b	۵۰±۲/۸۸ c	۵۱/۶۶± ۱/۶۶ c	۶۸/۳۳± ۱/۶۶ ab	۲۰± ۲/۸۸ d
	۱۰ دقیقه	۷۵±۲/۸۸ a	۵۰± ۲/۸۸ bc	۵۱/۶۶± ۴/۴۰ b	۲۱/۶۶± ۱/۶۶ f	۲۶/۶۶±۱/۶۶ ef	۴۰± ۵ cd	۳۶/۶۶± ۴/۴۰ de
استامید	۵ دقیقه	۷۱/۶۶±۱/۶۶ a	۲۵± ۲/۸۸ b	۱۸/۳۳±۱/۶۶ c	۳/۳۳±۱/۶۶ d	۰ d	۰ d	۰ d
	۱۰ دقیقه	۷۵±۲/۸۸ a	۱۶/۶۶±۱/۶۶ c	۳۵±۲/۸۸ b	۱/۶۶±۲/۸۸ d	۰ d	۰ d	۰ d

در هر ردیف میانگین‌هایی (± انحراف معیار) که دارای حروف متفاوت هستند اختلاف معنی‌دار با یکدیگر دارند (P<۰/۰۵).

بحث

غلظت مواد ضد انجماد، مرحله تکامل جنینی و مدت زمانی که جنین در معرض مواد ضد انجماد قرار می‌گیرد از جمله عوامل کلیدی در زمینه انجماد جنین موجودات هستند (۲۰). از آن جا که گونه‌های مختلف موجودات واکنش‌های متفاوتی نسبت به مواد ضد انجماد از خود نشان می‌دهند، ضروری است که آستانه تحمل و حساسیت هر موجود نسبت به این عوامل بصورت جداگانه مورد ارزیابی قرار گیرد.

بیش از یک دهه است که از دی متیل سولفوکساید بعنوان یکی از بهترین و رایج‌ترین مواد در زمینه انجماد جنین موجودات استفاده می‌شود. نتایج بررسی‌های صورت گرفته در جنین ماهی باس کانالی (*Sciaenops ocellatus*) نشان داد از میان مواد ضد انجماد متنوع مورد آزمایش، دی متیل سولفوکساید یکی از موادی بود که کمترین اثرات سمی را بر جای گذاشت (۱۱). جنین‌های ماهی قزل‌آلای رنگین کمان و ماهی آزاد کوهو (نقره‌ای)، از میان سه غلظت ۱، ۲ و ۴ مولار دی متیل سولفوکساید تنها توانستند غلظت ۱ مولار را تحمل کنند و در سایر غلظت‌ها از بین رفتند (۱۶).

Suzuki و همکاران (۱۹۹۵) نتایجی را مبنی بر تلفات دسته جمعی در جنین ماهی مداکا، قزل‌آلای رنگین کمان و کپور، هنگامی که در غلظت‌های بالاتر از ۵ مولار دی متیل سولفوکساید قرار گرفتند، گزارش کردند. با این وجود، نتایج تحقیقات حاضر نشان داد هیچ یک از غلظت‌های دی متیل سولفوکساید سبب تلفات در جنین‌های ماهی قره‌برون نشد و جنین توانست این ماده را حتی در غلظت‌های بالاتر از ۵ مولار نیز به خوبی تحمل نماید. در تحقیق حاضر آزمایش غلظت‌های ۱ تا ۶ مولار دی متیل سولفوکساید نیز موید این حقیقت بود که غلظت‌های مختلف این ماده نسبت به گلیسرول و استامید، سمیت کمتری برای جنین ماهی قره‌برون داشت و جنین می‌تواند این ماده را حتی در غلظت‌های بالا به خوبی تحمل کند.

نتایج تحقیق صورت گرفته در ماهی باس کانالی توسط Robertson و همکاران (۱۹۸۸)، با نتایج این تحقیق نشان داد در جنین ماهی قره‌برون نیز، گلیسرول از نظر سمیت در حد متوسطی قرار داشت. نتایج تحقیقات دیگری در این زمینه نشان داده است که در جنین ماهیان، گلیسرول نسبت به دی متیل سولفوکساید سمیت بیشتری دارد.

Harvey و همکاران (۱۹۸۳) به بررسی اثر سمیت این دو ماده در جنین ماهی گورخری پرداختند، نتایج نشان داد غلظت ۱ مولار دی متیل سولفوکساید نتوانست روی درصد تفریخ جنین ماهی گورخری اثرگذار باشد در حالی که گلیسرول در همان غلظت برای جنین ماهی گورخری بسیار سمی بود.

نتایج بررسی‌های Ben-Amotz و Rosenthal (۱۹۸۱) نیز نشان داد جنین شاه ماهی اقیانوس اطلس می‌تواند به مدت دو ساعت غلظت ۱/۵ مولار دی متیل سولفوکساید را تحمل کند در حالی که گلیسرول در همان غلظت، اثرات سمی بر جای گذاشت. نتایج تحقیق حاضر نشان داد در جنین ماهی قره‌برون، در مرحله ۲۴ ساعت پس از لقاح، در غلظت ۶ مولار گلیسرول، درصد تفریخ به صفر رسید. در هر دو مرحله ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از لقاح بالاترین درصد تفریخ پس از گروه شاهد در غلظت ۳ مولار به ثبت رسید.

در بین مواد ضد انجماد مورد بررسی در تحقیق حاضر، استامید بیشترین اثرات سمی را در جنین ماهی قره‌برون بر جای گذاشت بطوریکه، در مرحله ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از لقاح، درصد تفریخ بترتیب در غلظت‌های بالاتر از ۴ و ۳ مولار، به صفر رسید.

در تحقیق حاضر، با افزایش غلظت مواد ضد انجماد، روند درصد تفریخ کاهش یافت (بجز دی متیل سولفوکساید در مرحله ۲۴ ساعت پس از لقاح). این احتمال وجود دارد که این مواد ضد انجماد سبب ایجاد اثرات زیان‌آوری در همه یا بخشی از پیکره موجود شده و از این طریق درصد تفریخ را کاهش می‌دهند. مواد ضد انجماد می‌توانند سبب بروز صدمات بیوشیمیایی و اسمزی شوند. با وجود بررسی‌های فراوان، علت اصلی و نحوه بروز

صدمات بیوشیمیایی هنوز ناشناخته است. این صدمات با افزایش زمان در معرض‌گذاری، افزایش می‌یابند. صدمات اسمزی بعلت تغییر در حجم و اندازه سلولها ایجاد می‌شوند که می‌توانند روی نفوذپذیری مواد ضد انجماد اثرگذار باشند (۱۰). در تحقیق حاضر، افزایش زمان غوطه‌وری از ۵ به ۱۰ دقیقه نیز سبب شد روند درصد تفریخ در جنین ماهی قره‌برون بصورت کاهشی باشد.

لارو ماهیان در مراحل اولیه تکامل جنینی از نفوذپذیری نسبتاً بالایی برخوردار هستند اما، نسبت به ورود مواد ضد انجماد و تغییرات غلظت مایعات درون و برون سلولی بسیار حساس بوده و خطر مرگ جنین وجود دارد (۱۹). طی مراحل تکامل جنینی آبزیان از جمله: ماهی، بی‌مهرگان دریایی و سخت‌پوستان، حساسیت نسبت به مواد ضد انجماد کاهش یافته و مقاومت در برابر سمیت مواد ضد انجماد افزایش می‌یابد (۵، ۶، ۸، ۹، ۱۵و ۱۸). نتایج بررسی‌های Robertson و همکاران (۱۹۸۸) نشان داد، جنین ماهی باس کانالی در مرحله ظهور دم نسبت به مرحله مورولا، حساسیت کمتری نسبت به غلظت‌های مختلف مواد ضد انجماد دارد. علت این امر می‌تواند افزایش تحمل نسبت به دستکاری، تغییر در نفوذپذیری غشای سلولی و توانایی تنظیم اسمزی باشد. با پیشرفت روند تکاملی از ۲۴ به ۴۸ ساعت، حساسیت جنین ماهی قره‌برون نسبت به دو ماده دی متیل سولفوکساید و گلیسرول کاهش یافت. حال آن که در استامید شرایط کاملاً متفاوت بود و با پیشرفت روند تکاملی، حساسیت جنین نسبت به غلظت‌های مختلف این ماده افزایش یافته و روند درصد تفریخ بصورت کاهشی بود بطوریکه درصد تفریخ در غلظت‌های بالاتر از ۳ مولار استامید به صفر رسید. نتایج تحقیق حاضر در جنین ماهی قره‌برون نشان داد با افزایش غلظت مواد ضد انجماد، درصد تفریخ کاهش یافت (بجز دی متیل سولفوکساید در مرحله ۲۴ ساعت پس از لقاح)، همچنین افزایش زمان غوطه‌وری از ۵ به ۱۰ دقیقه سبب شد درصد تفریخ کاهش یابد. با پیشرفت روند تکاملی از ۲۴ به ۴۸ ساعت، حساسیت جنین ماهی قره‌برون نسبت به دو ماده دی‌متیل سولفوکساید و گلیسرول کاهش یافت. حال آن که در استامید شرایط کاملاً متفاوت بود و با پیشرفت روند تکاملی، حساسیت جنین نسبت به غلظت‌های مختلف این ماده افزایش یافت.

منابع

۱-کیوانلو، س.؛ حاجی بگلو، ع.ع. و سوداگر، م.، ۱۳۹۰. مطالعات اولیه بر روی انجماد (محافظت در برابر سرما) در جنین ماهیان. دومین کنفرانس ملی علوم شیلات و آبزیان ایران. لاهیجان، ۲۲-۲۰ اردیبهشت.

2-Ben-Amotz, A. and Rosenthal, H., 1981. Cryopreservation of marine unicellular algae and early life stages of fish for use in mariculture. European Marinculture Society Publication. 6: 149-162. Bredene, Belgium.

3-Cabrita, E.; Robles, V.; Chereguini, O.; Wallace, J.C. and Herra´ez, M.P., 2003. Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). Cryobiol., 47:204–213.

4-Cabrita, E.; Robles, V.; Wallace, J.C.; Sarasquete, M.C. and Herra´ez, M.P., 2006. Preliminary studies on the cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. Aquacult., 251:245– 255.

5-Chao, N.H.; Chiang, C.P.; Hsu, H.W.; Tasi, C.T. and Lin, T.T., 1994. Toxicity tolerance of oyster embryos to selected cryoprotectants. Aquatic Living Resources. 9:99-104.

6-Dinnyes, A.; Urbanyi, B., Baranyai, B. and Magyary, I., 1998. Chiling sensivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different develop-

mental stages in the presence of cryoprotectants: work in progress. Theriogenol., 50:1-13.

7-Harvey, B.; Kelley, R.N. and Ashwood-Smith, J., 1983. Permeability of intac and dechorionated zebra fish embryos to glycerol and dimethyl sulfoxide. Cryobiol., 20:432-439.

8-Liu, X.H.; Zhang, T. and Rawson, D.M., 1998. Feasibility of vitrification of zebrafish embryos using methanol. Cryo-Letters. 19:309-318.

9-Newton, S.S. and Subramoniam, T., 1996. Cryoprotectant toxicity in penaeid prawn embryos. Cryobiol., 33:172-177.

10-Renard, P. and Cochard, J.C., 1989. Effects of various cryoprotectants on Pacific oyster (*Crassostria gigas*). Thunberg, Manil clam, *Ruditapes philippinarium*, Peeve and king scallop *Pecten manimus* embryos: Influence of the biochemical and osmotic effects. Cryoletters, York, UK. 10:69-180.

11-Robertson, S.N.; Lawrence, A.L.; Neil, W.H., Arnold, C.R. and McCarty, G., 1988. Toxicity of the cryoprotectants glycerol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, methanol, sucrose, and sea salt solution to the embryos of red drum. The Progressive Fish Culturist. 50:148-154.

12-Robles, V.; Cabrita, E.; Real, M.; Alvarez, R. and Herraez, M.P., 2003. Vitrification of turbot embryos: Preliminary assays. Cryobiol., 47:30-39.

13-Robles, V.; Cabrita, E.; Anel, L. and Herráez, M.P., 2006. Microinjection of the antifreeze protein type III (AFPIII) in turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos: Toxicity and protein distribution. Aquacult., 261:1299–1306.

14-Ronyai, A. and Varadi, L., 1995. The sturgeons. In reproduction of aquatic animals: Fishes World Animal Sciences, Amsterdam, Elsevier. pp.95-108.

15-Simon, C.; Dumont, P.; Cuende, F.X.; Diter, A. and Aquacop, 1994. Determination of suitable freezing media for cryopreservation of *Penaus indicus* embryos. Cryobiol., 31:245-253.

16-Stoss, J. and Donaldson, E.M., 1983. Studies on cryopreservation of eggs from rainbow trout (*Salmon gairdnert*) and coho salmon (*Oncorhyncus kisutch*). Aquacult., 31:51-56.

17-Suzuki, T.; Komada, H.; Takai, R.; Arii, K. and Kozima, T.T., 1995. Relation between toxicity of cryoprotectant Me_2SO and its concentration in several fish embryos. Fish. Sci., 61:193-197.

18-Urbanyi, B.; Baranyai, B.; Magyary, I. and Dinnyes, A., 1997. Toxicity of methanol, DMSO and glycerol on carp (*Cyprinus carpio*) embryos in different development stages. Theriogenol., Vol. 47, No. 1, 5175P.

19-Vuthiphandchai, V.; Pengpun, B. and Nimrat, S., 2005. Effects of cryoprotectant toxicity and temperature sensitivity on the embryos of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquacult., 246:275–284.

20-Whittingham, D.G., 1980. Principles of embryo preservation In: Low temperature preservation in medicine and biology. (M.J. Ashwood Smith and J. Farrant ed.). Pitman Medical Ltd. Turnbridge Wells. Kent. U.K. pp.65-83.