دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد چهارم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹٤
http://japu.gau.ac.ir

اثرات نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی و غلظت‌های مختلف دی متیل سولفوکساید، متانول و اتیلن گلیکول روی پارامترهای حرکتی اسپرم‌های انجمادزدایی شده فیل ماهی (*Huso huso*)

*علی صادقی[1]، محمدرضا ایمانپور[2] و وحید تقی‌زاده[3]
[1]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[2]دانشیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[3]استادیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۷/۱٦ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۲/۱۵

چکیده

انجماد اسپرم به‌عنوان روشی مؤثر در جلوگیری از انقراض نسل گونه‌های در معرض خطر می‌باشد. هدف از این پژوهش، بررسی اثر حفاظتی مواد محافظ سرمایی در غلظت‌های مختلف و تأثیر نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی روی درصد و زمان تحرک اسپرم‌ها پس از انجمادزدایی بود. برای این کار از دی متیل سولفوکساید، متانول و اتیلن گلیکول به‌عنوان مواد محافظ سرمایی استفاده گردید که هر کدام درغلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد به رقیق کننده (۳۰ میلی‌مول تریس، ۲۳/٤ میلی‌مول ساکارز، ۰/۲۵ میلی‌مول کلرید پتاسیم) اضافه شدند. سپس رقیق کننده با نسبت‌های ۰/۵: ۱، ۱: ۱ و ۲: ۱ با اسپرم مخلوط شده و سپس اسپرم منجمد شد. در این تحقیق از اسپرم ۳ مولد نر فیل ماهی استفاده شد. اسپرم‌های منجمد شده بعد از ۱۵ و ۳۰ روز از حالت انجماد خارج شدند. آزمایش انجام شده نشان داد که بالاترین طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم‌های انجمادزدایی شده بعد از ۱۵ و ۳۰ روز انجماد، در اسپرمی که دارای دی متیل سولفوکساید ۱۰ درصد و نسبت رقیق‌سازی ۱:۱ بود مشاهده شد (به‌ترتیب ثانیه ۲۰/٤۲± ۲۳۰/۳۲ و درصد ۲/٦۰±۲۳/٤۱؛ ثانیه ۱۸/۱۰±۲۱۸/۲۰ و درصد

*مسئول مکاتبه: sadeghi_shilat@yahoo.com

٢٠/١٢±١/٩٠). همچنین کمترین طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم‌های انجمادزدایی شده بعد از ١٥ و ٣٠ روز انجماد، در اسپرمی که دارای اتیلن گلیکول ٢٠ درصد و نسبت رقیق‌سازی ٢:١ بود مشاهده شد (به‌ترتیب ثانیه ٩٢/٢٤±١٨/٤٠ و درصد ٩/٢٠±١/٣٠؛ ثانیه ٦٥/٣٧±١٩/٨٠ و درصد ٧/٠٠±١/٠٠).

واژه‌های کلیدی: فیل ماهی، اسپرم، محافظ سرمایی، تحرک اسپرم

مقدمه

در آب‌های سرتاسر جهان حدود ٢٧٠٠٠ گونه ماهی شناسایی شده که در بین آن‌ها ٢٧ گونه از ماهیان خاویاری از نظر ارزش اقتصادی جزء گران‌ترین و با ارزش‌ترین آن‌ها محسوب می‌گردند و منحصراً در نیمکره شمالی زیست می‌کنند (گالی و همکاران، ٢٠٠٦). شش گونه از ماهیان خاویاری در آب‌های دریای خزر و رودخانه‌های منتهی به آن وجود دارند که در مجموع ٩٠ درصد از کل ذخایر ماهیان خاویاری جهان را تشکیل می‌دهند (بیلارد و لکونینترا، ٢٠٠١). میزان ذخایر این ماهیان با ارزش به‌علت از بین رفتن زیستگاه طبیعی آن‌ها، تخریب اکوسیستم، تغییرات آب و هوایی و مهم‌تر از همه صید بی‌رویه آن‌ها کاهش یافته است (فیندی، ١٩٩٧). فیل ماهی یکی از بزرگ‌ترین ماهیان دریای خزر است که به طول ٦ متر و وزن بیش از یک تن می‌رسد (آس و همکاران، ٢٠٠٠). گوشت و به‌ویژه خاویار این ماهی موجب شده است تا از نظر تجاری دارای اهمیت زیادی باشد (فیندی، ١٩٩٧). مرور آمار صید سالانه تاس ماهیان در جهان بیانگر کاهش شدید آن طی دهه گذشته است (هلسیک، ١٩٨٩). اهمیت تکثیر مصنوعی ماهیان خاویاری زمانی آشکار می‌شود که بدانیم در حال حاضر ٧٥ درصد میزان صید ماهیان خاویاری جهان حاصل از اقدامات تکثیر مصنوعی این گونه‌ها است (درشوو و لوتس، ١٩٨٨). در آبزی پروری مدرن ارزیابی کیفیت سمن یکی از تحقیقات کاربردی و جالب جهت سنجش لقاح مصنوعی می‌باشد (آس و همکاران، ٢٠٠٠). در صنعت پرورش ماهی همواره بیشترین توجه به کیفیت تخم و لارو می‌باشد و توجه کمتری نسبت به کیفیت اسپرم شده است (لانستینر و همکاران، ٢٠٠٤). در صورتی‌که کیفیت هر دو نوع گامت روی موفقیت لقاح و بقای لارو تأثیرگذار است (رورانگوآ و همکاران، ٢٠٠٤). با توجه به روند کاهش صید ماهیان خاویاری و خطر نابودی ذخایر این ماهیان، به کارگیری تدابیر و اقدامات اساسی در این خصوص الزامی است. یکی از

روش‌های جلوگیری از انقراض نسل آن‌ها، ذخیره‌سازی و ایجاد بانک گامت منجمد با استفاده از تکنیک انجماد اسپرم است (کوسون و همکاران، ۲۰۰۰). نگهداری اسپرم در شرایط انجماد شاخه‌ای از علم بیولوژی انجماد[1] است که به حفظ و نگهداری طولانی مدت سلول در دمای بسیار پایین می‌پردازد (آشوود اسمیت، ۲۰۰۰). مهمترین اصل در فرآیند انجماد، کاهش آسیب در اثر تشکیل بلورهای یخ داخل سلولی است که با سرد کردن آهسته و خروج آب داخل سلولی تا حد مناسب، قبل از سرد کردن یا طی آن انجام می‌شود (بیلارد و همکاران، ۱۹۹۷). محلول رقیق‌کننده برای افزایش زمان نگهداری اسپرم ماهیان در نگهداری بلندمدت و برای بهبود تکثیر مصنوعی مورد استفاده قرار می‌گیرد (چولهونگ و چاپمن، ۲۰۰۵). مدت زمان تحرک اسپرم و درصد سلول‌های متحرک با توجه به گونه ماهی، دما، ترکیب رقیق کننده و همچنین نسبت رقیق‌سازی متفاوت است (علوی علوی و همکاران (۲۰۰۲)؛ بیلارد و همکاران، ۲۰۰٤). 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 (منصور و همکاران، ۲۰۰٤). از مواد محافظ سرمایی نفوذپذیر می‌توان به دی متیل سولفوکساید، متانول و اتیلن گلیکول اشاره کرد (لانتسینر و همکاران، ۲۰۰٤). در سال‌های گذشته پژوهش‌های 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 (گلوگوسکی و همکاران، ۲۰۰۲؛ هاروات و همکاران، ۲۰۰۵؛ لینهارت و همکاران، ۲۰۰٦). از این‌رو مطالعه بیشتر بر روی بررسی حیات اسپرم در شرایط انجماد و اثر مواد محافظ سرمایی در غلظت‌های مختلف و همچنین تأثیر نسبت رقیق‌سازی روی مدت زمان تحرک و درصد تحرک اسپرم برای تثبیت روش مناسب در روند انجماد اسپرم ماهیان خاویاری ضروری به‌نظر می‌رسد. از این‌رو پژوهشی جهت تعیین بهترین ماده محافظ سرمایی نفوذپذیر، مناسب‌ترین غلظت ماده محافظ سرمایی و همچنین بهترین نسبت رقیق‌سازی برای انجماد اسپرم فیل ماهی انجام گرفت.

مواد و روش کار

تهیه مولدین و نمونه‌گیری جهت انجام آزمایش: مولدین فیل‌ماهی (با طول کل ۲۳۰-۱۷۹ سانتی‌متر و وزن ۱۸۰-۱۳۵ کیلوگرم) بعد از صید در سواحل جنوب شرقی دریای خزر به مرکز تکثیر ماهیان

1- Cryobiology

خاویاری شهید مرجانی منتقل شدند. نمونه‌های اسپرم ۳ مولد نر فیل‌ماهی وحشی از مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی در اوایل فروردین ماه سال ۱۳۹۲ جمع‌آوری شد. تکثیر فیل‌ماهی در مرکز خاویاری شهید مرجانی در دامنه حرارتی ۲۰-۱۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت (بیلارد و لکوینتر، ۲۰۰۱). اسپرم‌گیری از مولدین فیل‌ماهی، بعد از انتخاب نر بالغ با وارد کردن چند ضربه به سر ماهی برای بیهوش کردن انجام شد (لینهارت و همکاران، ۲۰۰٦). برای اسپرم‌گیری از مولدین، از سرنگ ۵۰ میلی‌لیتری متصل به تیوپ پلاستیکی استفاده شد. اسپرم‌های آلوده به مواد دفعی و یا خون مورد آزمایش قرار نگرفتند (لینهارت و همکاران، ۱۹۹۵). اسپرم‌های موردنیاز برای آزمایش در داخل سرنگ‌های ۵ سی سی 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 (کوسون و همکاران، ۲۰۰۰).

ارزیابی کیفی اسپرم: کیفیت اسپرم، براساس طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم‌های متحرک ارزیابی شد. برای شروع حرکت، اسپرم‌ها با محلول فعال کننده (۳/۵ میلی‌مول کلرید سدیم، ۱۲ میلی‌مول تریس اسیدی) (هاروات و همکاران، ۲۰۰۵) به نسبت ۲۰۰ :۱ رقیق شد 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 (تورنر و منتگمری، ۲۰۰۲). در ادامه با استفاده از نرم‌افزار پریمیر[1] 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 (رانا، ۱۹۹۵). مدت زمان حرکت اسپرم، از لحظه فعال شدن تا زمانی‌که همه اسپرم‌ها از حرکت باز می‌ایستند اندازه‌گیری شد (تورنر و منتگمری، ۲۰۰۲). همه آزمایش‌ها در سه تکرار انجام گرفت. به‌منظور اجتناب از خطای آزمایشی، همه اندازه‌گیری‌ها توسط یک مشاهده کننده انجام شد (دزوبا و همکاران، ۱۹۹۹).

اضافه کردن رقیق کننده و مواد محافظ سرمایی به اسپرم: در این آزمایش از رقیق کننده (۳۰ میلی‌مول تریس، ۲۳/٤ میلی‌مول ساکارز، ۰/۲۵ میلی‌مول کلرید پتاسیم) استفاده شد (گلوگووسکی و همکاران، ۲۰۰۲) و همچنین از دی متیل سولفوکساید، متانول و اتیلن گلیکول به‌عنوان مواد محافظ

1- Adobe premeier

سرمایی نفوذپذیر استفاده گردید که هر کدام درغلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد به رقیق کننده اضافه شدند و سپس رقیق کننده با اسپرم در نسبت‌های ۰/۵ :۱، ۱ :۱ و ۲ :۱ مخلوط شد. سپس اسپرم‌های رقیق شده در پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری ذخیره شدند.

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

انجمادزدایی: برای بررسی کیفیت اسپرم‌های انجمادزدایی شده در آزمایش، اسپرم‌های منجمد بعد از ۱۵ و ۳۰ روز از حالت انجماد خارج شدند. برای این کار پایوت‌های حاوی اسپرم منجمد از تانک ازت مایع با برودت ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد خارج گردید و به‌مدت ۸ ثانیه در آب گرم ٤٠ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد تا به حالت مایع درآید (هاروات و همکاران، ۲۰۰۵). سپس درصد تحرک و مدت زمان تحرک اسپرم‌های انجمادزدایی شده زیر میکروسکوپ بررسی گردید. برای شروع حرکت اسپرم‌های انجمادزدایی شده نیز از ماده فعال کننده 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 محافظ سرمایی (دی متیل سولفوکساید، متانول و اتیلن گلیکول) و نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی توسط آنالیز واریانس دوطرفه (Two- way ANOVA analysis) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

جدول ۱- خصوصیات نرهای انتخاب شده برای انجام آزمایش.

ماهی	وزن بدن (گرم)	طول کل (سانتی‌متر)	مدت زمان تحرک اسپرم (ثانیه)	درصد تحرک اسپرم (درصد)
۱	۱۳۵	۲۱۰	۳٤۰/۲۹± ۱۹/۸۵	۸٦/٦۰± ۲/۱۵
۲	۱۷۰	۱۷۹	۳۰٤/۸۹± ۲۷/۹٦	۸۳/۳۵± ۱/۹۰
۳	۱۸۰	۲۳۰	۳۰۸/۱٤± ۲٤/۷٤	۸۳/۰۰± ۱/۷۵

نتایج

خصوصیات نرهای انتخاب شده برای انجام آزمایش

تأثیر نسبت‌های مختلف رقیق کننده همراه با غلظت‌های مختلف ماده محافظ سرمایی روی پارامترهای حرکتی اسپرم فیل ماهی، پس از ١٥ روز انجماد: همان‌گونه که در جدول ٢ مشاهده می‌شود، اثر نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی همراه با غلظت‌های مختلف دی متیل سولفوکساید، متانول و اتیلن گلیکول روی طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم‌های فیل ماهی پس از ١٥ روز انجماد، معنی‌دار است (P<٠/٠٥). به گونه‌ای که بالاترین طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم انجمادزدایی شده فیل ماهی بعد از ١٥ روز انجماد، در اسپرمی که حاوی دی متیل سولفوکساید با غلظت ١٠ درصد بود و با نسبت ١:١ رقیق شده بود مشاهده شد. همچنین کمترین طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم انجماد زدایی شده پس از ١٥ روز انجماد در اسپرمی که دارای اتیلن گلیکول با غلظت ٢٠ درصد و نسبت رقیق‌سازی ٢ :١ بود مشاهده شد (جدول ٢).

تأثیر نسبت‌های مختلف رقیق کننده همراه با غلظت‌های مختلف ماده محافظ سرمایی روی پارامترهای حرکتی اسپرم فیل ماهی، پس از ٣٠ روز انجماد: همان‌گونه که در جدول ٣ مشاهده می‌شود، اثر نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی همراه با غلظت‌های مختلف دی متیل سولفوکساید، متانول و اتیلن گلیکول روی طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم‌های فیل ماهی پس از ٣٠ روز انجماد، معنی‌دار است (P<٠/٠٥). به گونه‌ای که بالاترین طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم انجمادزدایی شده فیل ماهی بعد از ٣٠ روز انجماد، در اسپرمی که حاوی دی متیل سولفوکساید با غلظت ١٠ درصد بود و با نسبت ١ :١ رقیق شده بود مشاهده شد. همچنین کمترین طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم انجمادزدایی شده پس از ٣٠ روز انجماد مشاهده شد در اسپرمی که دارای اتیلن گلیکول با غلظت ٢٠ درصد بود و با نسبت ٢ :١ رقیق شده بود (جدول ٣).

جدول ۲- تأثیر نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی همراه با غلظت‌های مختلف دی متیل سولفوکساید، متانول و اتیلن گلیکول روی پارامترهای حرکتی اسپرم فیل‌ماهی پس از ۱۵ روز انجماد.

ماده محافظ سرمایی	غلظت (درصد)	نسبت‌های رقیق‌سازی (رقیق کننده: اسپرم)	مدت زمان حرکت (ثانیه)	درصد حرکت (درصد)
		۱ : ۰/۵	۲۱۴/۲۱± ۲۱/۴۰ ab	۱۷/۱۰± ۲/۲۰ bcd
دی متیل سولفوکساید	۵	۱ : ۱	۲۱۸/۳۳± ۲۲/۵۳ ab	۲۰/۵۰± ۲/۴۵ ab
		۱ : ۲	۱۹۱/۳۷± ۲۰/۵۸ bcd	۱۶/۳۷± ۱/۶۰ cde
		۱ : ۰/۵	۱۷۰/۰۰± ۲۳/۵۲ cde	۱۴/۶۵± ۲/۳۰ cde
متانول	۵	۱ : ۱	۱۸۰/۳۰± ۲۱/۵۰ bcd	۱۵/۱۸± ۳/۴۰ cde
		۱ : ۲	۱۵۸/۱۴± ۲۵/۶۵ efg	۱۲/۱۳± ۲/۱۵ fgh
		۱ : ۰/۵	۱۲۸/۴۲± ۲۱/۲۰ gh	۱۱/۱۰± ۱/۲۴ gh
اتیلن گلیکول	۵	۱ : ۱	۱۴۰/۱۴± ۲۰/۰۰ fgh	۱۲/۸۰± ۱/۶۰ fgh
		۱ : ۲	۱۲۲/۵۱± ۱۹/۸۰ gh	۱۱/۰۰± ۱/۱۴ gh
		۱ : ۰/۵	۲۰۹/۶۵± ۲۶/۳۷ abc	۱۶/۶۳± ۱/۷۵ cde
دی متیل سولفوکساید	۱۰	۱ : ۱	۲۳۰/۳۲± ۲۰/۴۲ a	۲۳/۴۱± ۲/۶۰ a
		۱ : ۲	۱۹۶/۶۷± ۲۲/۰۰ bcd	۱۶/۱۳± ۱/۲۰ cde
		۱ : ۰/۵	۱۷۰/۶۱± ۱۹/۳۷ cde	۱۵/۵۰± ۲/۴۵ cde
متانول	۱۰	۱ : ۱	۲۰۷/۲۵± ۲۵/۸۵ abc	۱۸/۳۱± ۲/۸۰ bc
		۱ : ۲	۱۶۱/۶۷± ۲۸/۴۴ efg	۱۲/۵۰± ۱/۹۰ fgh
		۱ : ۰/۵	۱۳۵/۱۴± ۲۲/۱۲ fgh	۱۱/۸۴± ۲/۰۰ fgh
اتیلن گلیکول	۱۰	۱ : ۱	۱۶۵/۴۰± ۲۰/۶۸ def	۱۴/۳۰± ۲/۱۰ def
		۱ : ۲	۱۳۰/۲۴± ۱۸/۲۷ fgh	۱۱/۲۲± ۱/۱۸ gh
		۱ : ۰/۵	۲۰۰/۰۰± ۲۴/۲۴ bcd	۱۷/۱۱± ۲/۶۵ bcd
دی متیل سولفوکساید	۲۰	۱ : ۱	۲۰۸/۴۷± ۱۹/۷۴ abc	۱۸/۱۰± ۱/۷۰ bcd
		۱ : ۲	۱۶۵/۵۴± ۱۴/۸۶ def	۱۴/۱۳± ۱/۹۵ def
		۱ : ۰/۵	۱۵۴/۵۱± ۲۷/۳۵ efg	۱۲/۱۰± ۲/۲۰ fgh
متانول	۲۰	۱ : ۱	۱۷۶/۲۶± ۲۳/۸۵ bcd	۱۴/۰۰± ۲/۸۰ cde
		۱ : ۲	۱۳۰/۳۲± ۲۱/۵۳ fgh	۱۱/۷۴± ۲/۴۰ fgh
		۱ : ۰/۵	۱۰۰/۰۰± ۱۸/۷۴ gh	۱۰/۳۰± ۱/۱۰ gh
اتیلن گلیکول	۲۰	۱ : ۱	۱۳۴/۳۱± ۲۴/۱۰ fgh	۱۲/۰۰± ۱/۲۰ fgh
		۱ : ۲	۹۲/۲۴± ۱۸/۴۰ h	۹/۲۰± ۱/۳۰ h

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

جدول ٣- تأثیر نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی همراه با غلظت‌های مختلف دی متیل سولفوکساید، متانول و اتیلن گلیکول روی پارامترهای حرکتی اسپرم فیل‌ماهی پس از ٣٠ روز انجماد.

ماده محافظ سرمایی	غلظت (درصد)	نسبت‌های رقیق‌سازی (رقیق کننده: اسپرم)	مدت زمان حرکت (ثانیه)	درصد حرکت (درصد)
		١ : ٠/٥	١٨٠/١٦± ٢٠/١٨ bcd	١٥/٤٠± ١/٢٠ cde
دی متیل سولفوکساید	٥	١ : ١	٢٠٠/٠٠± ١٩/٨٤ ab	١٨/٣١± ١/٨٢ ab
		١ : ٢	١٧٠/٢٠± ١٨/٢٠ bcd	١٥/٠٠± ١/٠٠ cde
		١ : ٠/٥	١٥٢/٠٠± ٢١/١٠ cde	١١/٣٥± ١/٦١ fgh
متانول	٥	١ : ١	١٦٣/١٢± ٢٠/١٢ bcd	١٣/٨٠± ١/٢٠ def
		١ : ٢	١٤١/٣٨± ١٩/٦٨ def	١٠/١٠± ١/٤٠ fgh
		١ : ٠/٥	١٠٤/٣١± ٢٠/١٠ fgh	١٠/١١± ١/٢٠ gh
اتیلن گلیکول	٥	١ : ١	١١٨/٢٧± ١٧/١٤ efg	١١/٢٠± ١/١٤ fgh
		١ : ٢	١٠٠/٠٠± ١٤/١٨ gh	٩/٤٠± ١/١٢ gh
		١ : ٠/٥	١٧٨/٤٢± ٢٠/١٨ bcd	١٦/٣٠± ١/٨٢ bcd
دی متیل سولفوکساید	١٠	١ : ١	٢١٨/٢٠± ١٨/١٠ a	٢٠/١٢± ١/٩٠ a
		١ : ٢	١٧٤/٣٠± ١٧/٦٣ bcd	١٥/٢٤± ١/٣٠ cde
		١ : ٠/٥	١٥٥/٨٠± ٢١/١٨ cde	١٣/١٤± ١/٦٧ def
متانول	١٠	١ : ١	١٨٢/١٢± ١٨/٨٣ bcd	١٥/٨٢± ١/٤٨ cd
		١ : ٢	١٤٥/٢٠± ٢٠/١٨ cde	١١/١٠± ١/٢٣ fgh
		١ : ٠/٥	١٢٠/٣٦± ١٩/٤٢ efg	١١/٣٥± ١/٢١ fgh
اتیلن گلیکول	١٠	١ : ١	١٣٨/٢٠± ٢٠/٠٠ def	١٢/٠٠± ١/١٠ fgh
		١ : ٢	١١٤/٢٠± ٢٠/٢٤ fgh	١٠/٨١± ١/٤٠ gh
		١ : ٠/٥	١٤٢/٢٠± ١٥/٤١ def	١٢/١٩± ١/١٠ fgh
دی متیل سولفوکساید	٢٠	١ : ١	١٩٢/٣٠± ١٧/٨٣ ab	١٧/٤٠± ١/١٤ bc
		١ : ٢	١٧٤/٨٠± ١٩/٨٤ bcd	١٤/٦٨± ١/٣٤ de
		١ : ٠/٥	١٣٠/٢٠± ٢١/٠٠ efg	١١/٠٠± ١/١٤ fgh
متانول	٢٠	١ : ١	١٥٠/١٢± ١٩/٦٢ cde	١٤/١٠± ١/٤١ def
		١ : ٢	١٠٠/٠٠± ٢٠/٣١ gh	٩/١٠± ١/٣٦ gh
		١ : ٠/٥	٨٣/٢٦± ٢٠/٢٤ hi	٨/١٠± ١/٢٠ gh
اتیلن گلیکول	٢٠	١ : ١	١١٠/٤٠± ١٩/٨٦ fgh	١١/١٨± ١/١٠ fgh
		١ : ٢	٦٥/٣٧± ١٩/٨٠ i	٧/٠٠± ١/٠٠ h

حروف انگلیسی متفاوت در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی‌داری در سطح ٠/٠٥ می‌باشد. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است.

بحث

با توجه به نتایج به‌دست آمده در آزمایش مشخص شد که نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی تأثیر معنی‌داری روی طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم‌های انجمادزدایی شده دارد ($p<۰/۰۵$). همچنین مشخص شد که بهترین نسبت رقیق‌سازی برای انجماد اسپرم فیل‌ماهی، نسبت رقیق‌سازی ۱:۱ است و نسبت‌های دیگر رقیق‌سازی (۰/۵ :۱ و ۲ :۱) باعث افزایش افت کیفیت اسپرم‌های منجمد شده می‌شود. شالویی در سال ۱۳۸٦ به بررسی اثر رقیق کننده‌ها در نسبت‌های مختلف بر روی ماهی شیب (*Acipenser nudiventris*) پرداخت، که با نتایج این آزمایش همخوانی داشت. به‌طوری که بهترین تیمار از نظر مدت زمان حرکت و درصد حرکت در ماهی شیب مربوط به نسبت رقیق‌سازی ۱:۱ بود. رقیق‌سازی اسپرم باعث کاهش تراکم اسپرم شده و اکسیژن را برای اسپرماتوزوآ فراهم می‌کند (منصور و همکاران، ۲۰۰٤). در نسبت‌های زیاد رقیق‌سازی به‌دلیل این‌که پلاسمای منی تأثیر حفاظتی خود را از دست می‌دهد، طول عمر اسپرم کاهش می‌یابد (مانزور و همکاران، ۲۰۰٤). دلیل کم بودن طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم در نسبت‌های کم رقیق‌سازی را می‌توان به‌خاطر کمبود ماده رقیق‌کننده دانست که با توجه به فوایدی که رقیق کننده برای اسپرم منجمد شده دارد (تأمین مواد مغذی موردنیاز اسپرم، محافظت اسپرم از شوک حرارتی و ...)، کم بودن ماده رقیق کننده باعث افزایش آسیب‌پذیری اسپرم‌ها در طول مدت انجماد می‌شود و در نتیجه باعث کاهش کیفیت اسپرم‌های انجمادزدایی شده می‌شود (لیو و همکاران، ۲۰۰٦). در انجماد اسپرم ماهیان کیفیت اولیه اسپرم برای انجماد بسیار مهم است، بنابراین مطابق جدول ۱ در این آزمایش از اسپرم ۳ مولد نر فیل ماهی که دارای بالاترین طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم بودند استفاده شد (مانزور و همکاران، ۲۰۰٤). 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 بیان کننده یک روند کاهشی است که نشان می‌دهد افزایش زمان نگهداری اسپرم‌های منجمد شده بر روی کیفیت آن‌ها از ۱۵ روز تا ۳۰ روز تأثیر منفی دارد. در فرآیند نگهداری اسپرم در دماهای پایین (۱۹٦- 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 (لیو و همکاران، ۲۰۰٦). در واقع، برای این‌که اسپرم‌ها بتوانند در حالت انجماد زنده بمانند، بایستی مقداری از آب خود

را از دست بدهند که این عمل با افزودن مواد محافظ سرمایی انجام می‌پذیرد (هاروات و همکاران، ٢٠٠٥). در مرحله انجمادزدایی تشکیل مجدد کریستال یخ داخل سلول ممکن است باعث تخریب سلول‌های اسپرم شود (گلوگووسکی و همکاران، ٢٠٠٢). تشکیل دوباره کریستال یخ، بستگی به سرعت ذوب دارد. اگر ذوب به آرامی انجام شود این فرصت به سلول داده می‌شود که آب باقیمانده هنگام عبور سلول از نقطه انجماد به کریستال تبدیل شود (لانستینر و همکاران، ٢٠٠٤). اگر سرعت ذوب زیاد باشد، از شکل‌گیری کریستال یخ جلوگیری خواهد کرد (رانا، ١٩٩٥). بر همین اساس در آزمایش انجام شده سعی شد تا انجمادزدایی اسپرم سریع صورت گیرد. با توجه به نتایج به‌دست آمده از آزمایش، مشخص شد از بین دی متیل سولفوکساید، متانول و اتیلن گلیکول، بهترین ماده محافظ سرمایی برای انجماد اسپرم فیل‌ماهی، دی متیل سولفوکساید است. این نتیجه مشابه نتایج به‌دست آمده توسط لیو و همکاران در سال ٢٠٠٦ بود. این محققان، دی متیل سولفوکساید با غلظت ١٢ درصد را به‌عنوان بهترین ماده محافظ سرمایی در انجماد اسپرم تاس ماهی چینی (*Acipenser sinensis*) عنوان کردند. همچنین لانستینر و همکاران در سال ٢٠٠٤ در مطالعاتی که بر روی انجماد اسپرم ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) انجام دادند، بیشترین درصد تحرک را با دی متیل سولفوکساید ١٠ درصد (٧/٤ ±٨٠ درصد) اعلام کردند. در بررسی دیگری که توسط گالی و همکاران در سال ٢٠٠٦ انجام پذیرفت، این گروه بهترین شرایط در انجماد اسپرم تاس ماهی ایتالیایی (*Acipenser naccarii*) را با دی متیل سولفوکساید ١٠ درصد گزارش دادند. هاروات و همکاران نیز در سال ٢٠٠٥ در مطالعاتی که بر روی انجماد اسپرم تاس ماهی پوزه کوتاه (*Acipenser brevirostrum*) انجام دادند، بالاترین میزان تحرک را پس از انجمادزدایی با دی متیل سولفوکساید ٥ درصد (١٣± ٢٦ درصد) اعلام کردند. برخلاف نتایج به‌دست آمده در این تحقیق که دی متیل سولفوکساید، به‌عنوان بهترین ماده محافظ سرمایی نفوذپذیر برای انجماد اسپرم فیل‌ماهی مشخص شد، گلوگووسکی و همکاران در سال ٢٠٠٢ متانول ١٠ درصد را برای انجماد اسپرم تاس ماهیان سیبری (*Acipenser baeri*) مناسب اعلام کردند. با مطالعه لینهارت و همکاران در سال ٢٠٠٦ بر روی انجماد اسپرم ماهی پارو پوزه (*Polyodon spathula*)، این محققین متانول ٨ درصد را برای نگهداری اسپرم مناسب گزارش کردند. علت اختلاف در تعیین مناسب‌ترین نوع ماده محافظ سرمایی و غلظت مناسب مواد محافظ سرما در نتایج بیان شده با نتایج به‌دست آمده در این تحقیق را می‌توان نوع گونه انتخاب شده، اختلاف در محلول‌های رقیق کننده به‌کار برده شده و همچنین ویژگی‌های خاص مایع منی این گونه‌ها عنوان کرد.

سپاسگزاری

از مسئولین آزمایشگاه مرکزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به‌دلیل در اختیار قرار دادن امکانات نهایت تشکر و قدردانی را دارم. همچنین از آقای مهندس شهریاری، کارشناس مرکز تکثیر ماهیان خاویاری شهید مرجانی به‌دلیل همکاری شان نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

منابع

1.Aas, G.H., Refstie, T., and Gjerde, B. 2000. Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. Aquaculture. 95: 125-132.

2.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, October 26-28, Rasht, Iran, Pp: 128-130.

3.Ashwood-smith, M.J. 2000. Low temperature preservation of cell, tissues and organs. In: Low Temperature Preservation in Medicine and biology (ed. by M. J. Ashwood-Smith). Pp: 19-44 Pitman Medical, Tunbridge Wells.

4.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. July 8-11, 1997. Abstract book, AIO.

5.Billard, R., and Lecointre, G. 2001. Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. Rev. Journal of Fish Biology. 10: 355–392.

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

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

8.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. 56: 1-20.

9.Doroshov, S.I., and Lutes, P.B. 1988. Hathery manual for the sturgeon, Acipenser transmontanus Richardson Department of wild life and Fisheres Biology university of California, Davis, publication 322: 39-43.

10.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. 15: 312-322.

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

12.Galli, A., Vanni, R., Rossetti, S., and Aleandri, R. 2006. Milt cryopreservation in Italian Cobica sturgeon (*Acipenser naccarii*). Aquaculture Society. 272.
13.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. 211: 367-373.
14.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. 247: 243-251.
15.Holcik, J. 1989. The Fresh water Fishes of Europ. Vol. 1. Part2. General introduction to Fishes Acipenseri formes Aqula. Verlage. Wiesbadon, Germany. 649p.
16.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. 35: 519-528.
17.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. 22: 389-394.
18.Liu, L., Wei, Q., Guo, F., and Zhang, T. 2006. Cryopreservation of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) sperm. Journal of Applied Ichthyology. 22: 384-388.
19.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. 35: 232-244.
20.Rana, A. 1995. The sturgeons. Pp: 95-108. In C.E. Nash and A.J. Novotny (eds). Production of Aquatic Animals. Elsevier, Amsterdam.
21.Rurangwa, E., Kime, D., Ollevier, F., and Nash, J.P. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquaculture. 234: 1-28.
22.Turner, E., and Montgomerie, R. 2002. Ovarian fluid enhances sperm movement in Arctic charr. Jornal of Fish Biology. 154-166.