دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد پنجم، شماره اول، بهار ۱۳۹۵
http://japu.gau.ac.ir

اثر رقیق کننده‌ها و غلظت‌های مختلف مواد محافظ سرمایی (متانول و گلیسرول) روی کیفیت اسپرم انجمادزدایی شده ماهی قرمز (*Carassius auratus*)

***علی صادقی[۱]، محمدرضا ایمانپور[۲] و وحید تقی‌زاده[۳]**

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۲]دانشیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۳]استادیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۱٤ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۲/۲۸

چکیده

در این آزمایش از ٤ رقیق کننده (رقیق کننده ۱: ۰/٤٦ گرم کلرید پتاسیم، ۱/۹۳ گرم فروکتوز، ۰/۵ میلی‌لیتر آنتی بیوتیک; رقیق کننده ۲: ۰/۳٤ گرم کلرید سدیم، ۳/٤۳ گرم ساکارز، ۰/۵ میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک؛ رقیق کننده ۳: ۰/٤٦ گرم کلرید پتاسیم، ۳/٤۱ گرم ساکارز، ۰/۵ میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک؛ رقیق کننده ٤: ۳/۸۷ گرم فروکتوز، ۰/۵ میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک) استفاده شد و همچنین از متانول و گلیسرول به عنوان ماده محافظ سرمایی استفاده شد. هر کدام از مواد محافظ سرمایی در غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد به رقیق کننده‌ها اضافه شدند. سپس رقیق کننده‌ها با نسبت ۱:۱ با اسپرم مخلوط شده و سپس اسپرم منجمد شد. بعد از ۵ و ۱۰ روز اسپرم‌ها از حالت انجماد خارج شدند. نتایج به‌دست آمده از آزمایش نشان داد که اثر رقیق کننده‌ها همراه با غلظت‌های مختلف متانول و گلیسرول روی طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم ماهی قرمز پس از ۵ و ۱۰ روز انجماد، اختلاف معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۵$). بالاترین طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم‌ها پس از ۵ و ۱۰ روز انجماد در اسپرمی مشاهده شد که حاوی رقیق کننده ۲ و متانول با غلظت ۲۰ درصد بود (به‌ترتیب ۱۳/۵۳± ۸٤/۰۰ ثانیه و ۲/۸۰±۳۱/۲۰ درصد؛ ۱۵/۲۸± ۷۵/٦۰ ثانیه و ۲/۵۱±۲۵/۳۳ درصد). نتایج حاصل از آزمایش نشان

*مسئول مکاتبه: sadeghi_shilat@yahoo.com

داد که بهترین رقیق کننده برای انجماد اسپرم ماهی قرمز، رقیق کننده ۲ و بهترین ماده محافظ سـرمایی برای انجماد اسپرم ماهی قرمز، متانول بود.

واژه‌های کلیدی: ماهی قرمز، تحرک اسپرم، محافظ سرمایی

مقدمه

نگهداری اسپرم در شرایط انجماد شاخه‌ای از علم بیولوژی انجماد[1] است که در آن به حفظ و نگهداری مواد زیستی در دماهای پایین (معمولاً ازت مایع با دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) پرداخته می‌شود (ایروان و همکاران، ۲۰۱۰). 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). بلکستر در سال ۱۹۵۳ اولین کسی بود که توانست اسپرم شاه ماهی اطلس (*Clupea harengus*) را به‌مدت ٦ ماه زنده نگهدارد. از آن زمان به بعد به جهت سهولت در کسب نتایج بهتر، بر روی نگهداری اسپرم بسیاری از گونه‌های سردآبی از جمله قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) کار شده است (گاتلین و همکاران، ۲۰۰۵). همچنین تحقیقاتی در مورد لای ماهی توسط کلداز و بینیارز در سال ۱۹۸۲ انجام شده است. لینهارت و همکاران در سال ۱۹۹۳ با استفاده از اسپرم منجمد ماهی اسبله (*Silurus glanis*) توانستند ٤٥ درصد لقاح به‌دست آورند. رقیق کننده‌ها ترکیباتی از محلول‌های نمکی می‌باشند که برای رقیق‌سازی اسپرم استفاده می‌شوند. شایان ذکر است که اسپرم رقیق نشده غیر قابل انجماد می‌باشد (بیلارد، ۲۰۰۱). رقیق کننده‌ها محلول‌هایی شبیه ترکیبات غیر آلی پلاسمای منی‌اند که در ماهیان مورد استفاده قرار گرفته تا حرکت اسپرم را غیرفعال کنند (هاروات و همکاران، ۲۰۰۵). رقیق کننده‌ها برای افزایش زمان نگهداری اسپرم ماهیان در نگهداری بلند مدت و برای بهبود تکثیر مصنوعی مورد استفاده قرار می‌گیرند (آس و همکاران، ۱۹۹۱). مهمترین خاصیت رقیق کننده‌ها ایجاد شرایط فیزیکی و شیمیایی مطلوب برای اسپرم در طول زمان انجماد می‌باشد (بیلارد، ۲۰۰۱). در فرایند انجماد اسپرم از افزودنی‌های مهم در محلول رقیق کننده، مواد محافظ سرمایی می‌باشد که شامل دو نوعند: محافظت کننده نفوذی و محافظت کننده غیر نفوذی (رانا، ۱۹۹۵). دی متیل سولفوکساید، متانول و گلیسرول رایج‌ترین مواد محافظ سرمایی می‌باشند (رانا،

1- Cryobiology

۱۹۹۵). یکی از اهداف انجماد اسپرم ماهیان، هم زمان‌سازی قابلیت دسترسی به هر دو جنس است (هاروات و همکاران، ۲۰۰۵). ماهی قرمز (*Carassius auratus gibelio*) از خانواده کپور ماهیان (*Cyprinidae*) بوده و به لحاظ زیستی و تغذیه‌ای شبیه کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) می‌باشد (اسمیت و همکاران، ۲۰۰۰). تکثیر طبیعی ماهی قرمز در فصل بهار انجام می‌شود. همچنین می‌توان با فراهم آوردن شرایط محیطی مناسب ماهی قرمز را در فصول دیگر بصورت مصنوعی تکثیر کرد (اسمیت و همکاران، ۲۰۰۰). با توجه به این‌که در تکثیر مصنوعی ماهی قرمز امکان دارد که مولدین نر زودتر آماده اسپرم ریزی شوند ولی مولدین ماده آمادگی لازم را برای تخم‌ریزی نداشته باشند، می‌توان اسپرم‌ها را از مولدین نر گرفت و با تکنیک انجماد، اسپرم‌ها را برای مدتی ذخیره کرد و پس از تخم‌گیری از مولدین ماده، تخم‌ها را با اسپرم‌های انجمادزدایی شده لقاح داد (اسمیت و همکاران، ۲۰۰۰).

در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی بر روی کاربرد انواع رقیق کننده‌ها و 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 کپور ماهیان اتفاق نظری وجود نداشته است. از این رو مطالعه بیشتر بر روی بررسی حیات اسپرم در شرایط انجماد و اثر رقیق کننده‌ها و مواد محافظ سرمایی روی مدت زمان تحرک و درصد تحرک اسپرم‌های انجمادزدایی شده برای تثبیت روش مناسب در روند انجماد اسپرم کپور ماهیان به‌خصوص ماهی قرمز ضروری به‌نظر می‌رسد.

مواد و روش کار

زمان و مکان انجام تحقیق: این تحقیق از آبان سال ۱۳۹۱ به‌مدت ۳ ماه در آزمایشگاه گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. مولدین نر ماهی قرمز در اوایل آبان جهت انجام آزمایش از مراکز تکثیر ماهیان تزیئنی در استان گلستان تهیه و به سالن ونیرو دانشکده شیلات منتقل و ماهیان در حوضچه‌های ونیرو تا اواخر دی نگهداری شدند. در نهایت هنگام مهیا شدن شرایط دمایی ۱۹ درجه سانتی‌گراد بعد از خشک کردن منفذ تناسلی با فشار ملایم به ناحیه شکمی از ماهیان مولد نر اسپرم‌گیری به عمل آمد (رانا، ۱۹۹۵). در آزمایشگاه اسپرم‌ها در مدت آنالیز حرکتی در یخچال معمولی (دمای ٤-۳ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند.

ارزیابی کیفی اسپرم: کیفیت اسپرم از روی درصد تحرک و مدت زمان حرکت اسپرم بعد از فعال شدن ارزیابی شد. برای شروع حرکت، اسپرم‌ها با محلول فعال کننده (آب مقطر) به نسبت ۱:۲۰۰۰ رقیق شدند و پارامترهای حرکتی اسپرم بلافاصله (با تأخیر زمانی کمتر از ۷ ثانیه) بعد از شروع فعالیت اسپرم تا زمانی که ۱۰۰ درصد اسپرم‌ها غیر متحرک شوند توسط میکروسکوپ متصل به دوربین ثبت و روی صفحه مانیتور

نشان داده شد، در ادامه با استفاده از نرم‌افزار پریمیر هر ثانیه به ٦ فریم تبدیل شد و با مقایسه دو فریم متوالی، درصد اسپرم‌های متحرک محاسبه گردید. برای اندازه‌گیری مدت زمان حرکت اسپرم‌ها، زمان تحرک از لحظه فعال شدن تا زمانی که همه اسپرم‌ها از حرکت باز ایستند اندازه‌گیری شد و مشاهدات در دمای اتاق (۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد) صورت گرفت (تورنر و منتگمری، ۲۰۰۲).

نمونه اسپرم‌هایی که در بررسی اولیه از لحاظ حرکتی از کیفیت بالایی برخوردار بودند برای آزمایش در نظر گرفته شد و عملیات انجماد تنها بر روی این اسپرم‌ها انجام شد (هاروات و همکاران، ۲۰۰۵).

اضافه کردن رقیق کننده‌ها و مواد محافظ سرمایی به اسپرم: در این آزمایش از ٤ رقیق کننده (رقیق کننده ۱: ۰/٤٦ گرم کلرید پتاسیم، ۱/۹۳ گرم فروکتوز، ۰/۵ میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک؛ رقیق کننده ۲: ۰/۳٤ گرم کلرید سدیم، ۳/٤۳ گرم ساکارز، ۰/۵ میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک؛ رقیق کننده ۳: ۰/٤٦ گرم کلرید پتاسیم، ۳/٤۱ گرم ساکارز، ۰/۵ میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک؛ رقیق کننده ٤: ۳/۸۷ گرم فروکتوز، ۰/۵ میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک) استفاده شد و همچنین از متانول و گلیسرول به‌عنوان مواد محافظ سرمایی استفاده گردید که در غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد به رقیق کننده‌ها اضافه شدند، سپس رقیق کننده‌ها با نسبت ۱:۱ با اسپرم مخلوط شده و سوسپانسیون‌های حاصل در پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری ریخته شدند و انجماد پس از هم دمایی نمونه‌های رقیق شده انجام شد.

روش انجماد: مراحل انجماد اسپرم به روش دستی در آزمایشگاه انجام شد، بدین ترتیب که پایوت‌ها در ۱۵ سانتی‌متری بالای سطح ازت مایع به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند و سپس برای ۵ دقیقه در ۵ سانتی‌متری بالای ازت مایع قرار گرفتند و سرانجام در ازت مایع غوطه‌ور شدند. پایوت‌ها پس از رسیدن به برودت ۱۹٦- درجه سانتی‌گراد برای نگهداری طولانی مدت در تانک ازت مایع نگهداری شدند (ایروان و همکاران، ۲۰۱۰).

انجمادزدایی: برای بررسی کیفیت اسپرم، اسپرم‌های منجمد شده بعد از ۵ و ۱۰ روز از حالت انجماد خارج شدند، برای این کار پایوت‌های حاوی اسپرم از تانک ازت مایع خارج و به‌مدت ۱۰ ثانیه در آب گرم ٤۵ درجه سانتی‌گراد گذاشته شدند تا اسپرم‌ها از حالت انجماد خارج شوند. سپس درصد تحرک و مدت زمان تحرک اسپرم زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت (ایروان و همکاران، ۲۰۱۰).

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 و رقیق کننده‌های مختلف توسط آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA analysis) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

جدول ۱- ترکیب رقیق‌کننده‌های استفاده شده برای آزمایش.

	رقیق‌کننده‌ها			
	رقیق کننده ۱	رقیق کننده ۲	رقیق کننده ۳	رقیق کننده ٤
کلرید سدیم	-	۰/۳٤ گرم	-	-
کلرید پتاسیم	۰/٤٦ گرم	-	۰/٤٦ گرم	-
فروکتوز	۱/۹۳ گرم	-	-	۳/۸۷ گرم
ساکارز	-	۳/٤۳ گرم	۳/٤۳ گرم	-
آنتی‌بیوتیک	۰/۵ میلی‌لیتر	۰/۵ میلی‌لیتر	۰/۵ میلی‌لیتر	۰/۵ میلی‌لیتر

نتایج

تأثیر رقیق کننده‌های همراه با غلظت‌های مختلف متانول و گلیسرول روی کیفیت اسپرم ماهی قرمز، پس از ۵ روز انجماد: همان‌گونه که در جدول ۲ مشاهده شد، اثر رقیق‌کننده‌ها همراه با غلظت‌های مختلف متانول و گلیسرول روی طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم‌های فیل ماهی پس از ۵ روز انجماد، معنی‌دار است (P<۰/۰۵). بالاترین درصد تحرک اسپرم‌های انجمادزدایی شده پس از ۵ روز انجماد در اسپرمی که دارای رقیق‌کننده ۲ و متانول با غلظت ۲۰ درصد بود مشاهده شد (۳۱/۲۰±۲/۸۰ درصد)، همچنین بیشترین طول دوره تحرک اسپرم‌های انجمادزدایی شده در اسپرمی که دارای رقیق کننده ۲ و متانول با غلظت ۲۰ درصد بود مشاهده شد (۸٤/۰۰ ±۱۳/۵۳ ثانیه). کمترین طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم‌های انجمادزدایی شده در اسپرم‌هایی که حاوی رقیق کننده شماره ٤ و گلیسرول ۵ درصد بودند مشاهده شد (٤۵/۲۰ ±۱٤/۱۰ ثانیه و ۱٤/۱۰±۱/۲۰ درصد).

تأثیر رقیق کننده‌های همراه با غلظت‌های مختلف متانول و گلیسرول روی کیفیت اسپرم ماهی قرمز، پس از ۱۰ روز انجماد: در جدول ۳، اثر رقیق کننده‌های همراه با غلظت‌ها مختلف متانول و گلیسرول روی طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم‌های فیل ماهی پس از ۱۰ روز انجماد، معنی‌دار است (P<۰/۰۵). بالاترین طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم‌های انجمادزدایی شده پس از ۱۰ روز انجماد در اسپرمی که دارای رقیق کننده شماره ۲ و متانول ۲۰ درصد بود مشاهده شد (۷۵/٦۰ ثانیه و ۲۵/۳۳±۲/۵۱ درصد). جدول ۳ نشان می‌دهد که پایین‌ترین طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم‌های انجمادزدایی شده پس از ۱۰ روز انجماد در اسپرمی که دارای رقیق کننده شماره ٤ و گلیسرول ۵ درصد بود مشاهده شد (٤۰/۰۰ ±۱۳/٦۳ ثانیه و ۱۲/۰۰±۱/٤۲ درصد).

جدول ۲- اثرات رقیق کننده‌ها و غلظت‌های مختلف مواد محافظ سرمایی روی طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم‌های انجمادزدایی شده پس از ۵ روز انجماد.

رقیق‌کننده‌ها	غلظت ماده محافظ سرمایی (درصد)	ماده محافظ سرمایی	مدت حرکت (ثانیه)	درصد حرکت (درصد)
	۵		۶۶/۲۰± ۱۲/۷۱^{ab}	۲۵/۳۴± ۲/۱۲^{b}
رقیق‌کننده ۱	۱۰	متانول	۶۸/۴۰± ۱۴/۰۱^{ab}	۲۴/۱۵± ۲/۵۰^{bc}
	۲۰		۸۳/۳۳± ۱۰/۱۱^{a}	۲۹/۰۰± ۲/۰۰^{a}
	۵		۵۰/۱۰± ۱۴/۲۳^{ab}	۱۷/۲۴± ۱/۴۲^{fg}
رقیق‌کننده ۱	۱۰	گلیسرول	۵۴/۲۸± ۱۵/۸۰^{b}	۱۹/۲۰± ۱/۳۴^{ef}
	۲۰		۶۰/۲۰± ۱۴/۱۲^{ab}	۲۱/۱۰± ۱/۸۰^{cd}
	۵		۶۴/۰۰± ۱۲/۵۵^{ab}	۲۴/۵۴± ۲/۵۰^{bc}
رقیق‌کننده ۲	۱۰	متانول	۶۹/۲۵± ۱۴/۱۰^{ab}	۲۳/۳۴± ۲/۷۸^{bcd}
	۲۰		۸۴/۰۰± ۱۳/۵۳^{a}	۳۱/۲۰± ۲/۸۰^{a}
	۵		۵۱/۲۳± ۱۰/۴۰^{b}	۱۸/۵۰± ۲/۰۰^{ef}
رقیق‌کننده ۲	۱۰	گلیسرول	۵۸/۱۴± ۱۶/۱۰^{ab}	۱۸/۶۰± ۱/۹۴^{ef}
	۲۰		۶۳/۲۰± ۱۲/۱۴^{ab}	۲۰/۱۴± ۲/۰۰^{cd}
	۵		۵۹/۴۵± ۱۱/۱۳^{ab}	۲۱/۴۷± ۲/۰۸^{cd}
رقیق‌کننده ۳	۱۰	متانول	۶۰/۳۸± ۱۲/۰۸^{ab}	۲۲/۰۰± ۲/۲۰^{bcd}
	۲۰		۶۳/۰۰± ۱۶/۰۸^{ab}	۲۴/۳۳± ۲/۱۰^{bc}
	۵		۴۸/۶۰± ۱۶/۲۰^{b}	۱۶/۴۸± ۱/۹۲^{gh}
رقیق‌کننده ۳	۱۰	گلیسرول	۵۰/۲۰± ۱۱/۸۴^{b}	۱۶/۸۰± ۱/۲۴^{gh}
	۲۰		۵۲/۳۰± ۱۴/۱۳^{ab}	۱۷/۳۲± ۱/۷۰^{fg}
	۵		۵۴/۵۲± ۱۰/۶۵^{b}	۱۷/۰۰± ۱/۸۵^{fg}
رقیق‌کننده ۴	۱۰	متانول	۵۶/۸۴± ۱۲/۲۹^{b}	۲۲/۴۰± ۲/۰۰^{bcd}
	۲۰		۵۸/۱۵± ۱۲/۱۳^{ab}	۲۴/۳۷± ۲/۴۰^{bc}
	۵		۴۵/۲۰± ۱۴/۱۰^{b}	۱۴/۱۰± ۱/۲۰^{h}
رقیق‌کننده ۴	۱۰	گلیسرول	۴۸/۲۰± ۱۲/۸۰^{b}	۱۶/۰۰± ۱/۱۰^{gh}
	۲۰		۵۰/۴۲± ۱۴/۸۷^{b}	۱۷/۲۴± ۱/۳۲^{fg}
کنترل	-	-	۱۱۶ /۸۹± ۲۲/۹۰	۸۷/۵۰± ۳/۱۸

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- اثرات رقیق‌کننده‌ها و غلظت‌های مختلف مواد محافظ سرمایی روی طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم‌های انجمادزدایی شده پس از ۱۰ روز انجماد.

رقیق‌کننده‌ها	غلظت ماده محافظ سرمایی (درصد)	ماده محافظ سرمایی	مدت حرکت (ثانیه)	درصد حرکت (درصد)
	۵		۶۴/۰۰± ۱۳/۶۰^{ab}	۲۱/۳۳± ۲/۵۱^{bc}
رقیق کننده ۱	۱۰	متانول	۶۱/۳۰± ۱۴/۲۲^{ab}	۲۰/۲۰± ۱/۹۰^{bc}
	۲۰		۵۸/۰۰± ۱۶/۰۰^{ab}	۲۰/۴۰± ۲/۲۰^{bc}
	۵		۴۳/۲۴± ۱۲/۱۴^{b}	۱۴/۳۶± ۱/۱۰^{gh}
رقیق کننده ۱	۱۰	گلیسرول	۵۰/۳۷± ۱۰/۴۸^{ab}	۱۶/۸۰± ۱/۲۴^{efg}
	۲۰		۵۲/۲۱± ۱۴/۲۰^{ab}	۱۸/۲۴± ۱/۳۷^{cde}
	۵		۶۲/۵۰± ۱۷/۴۲^{ab}	۲۲/۵۰± ۱/۴۹^{ab}
رقیق کننده ۲	۱۰	متانول	۶۰/۱۵± ۱۴/۴۳^{ab}	۲۲/۶۶± ۲/۴۰^{ab}
	۲۰		۷۵/۶۰± ۱۵/۲۸^{a}	۲۵/۳۳± ۲/۵۱^{a}
	۵		۴۵/۸۵± ۱۶/۲۰^{b}	۱۶/۱۰± ۱/۸۳^{efg}
رقیق کننده ۲	۱۰	گلیسرول	۵۲/۲۰± ۱۴/۳۱^{ab}	۱۷/۰۰± ۲/۰۰^{def}
	۲۰		۵۷/۱۰± ۱۵/۸۲^{ab}	۱۸/۷۲± ۱/۳۷^{cde}
	۵		۵۳/۳۰± ۱۴/۰۴^{ab}	۱۸/۰۰± ۲/۰۰^{cde}
رقیق کننده ۳	۱۰	متانول	۵۰/۰۰± ۱۳/۶۰^{ab}	۱۹/۲۰± ۱/۸۶^{cde}
	۲۰		۵۴/۶۱± ۱۶/۲۹^{ab}	۱۹/۴۱± ۲/۴۰^{cde}
	۵		۴۴/۲۲± ۱۳/۸۲^{b}	۱۴/۲۰± ۱/۲۱^{gh}
رقیق کننده ۳	۱۰	گلیسرول	۴۶/۳۶± ۱۴/۶۵^{b}	۱۵/۱۰± ۱/۳۲^{fg}
	۲۰		۵۱/۱۰± ۱۶/۴۲^{ab}	۱۶/۰۰± ۱/۸۰^{efg}
	۵		۴۷/۳۳± ۱۰/۰۸^{ab}	۱۵/۳۵± ۱/۵۲^{fg}
رقیق کننده ۴	۱۰	متانول	۵۳/۰۰± ۱۳/۶۰^{ab}	۱۷/۱۸± ۲/۱۰^{de}
	۲۰		۵۰/۱۰± ۱۴/۵۸^{ab}	۱۶/۴۵± ۱/۶۰^{efg}
	۵		۴۰/۰۰± ۱۳/۶۳^{b}	۱۲/۰۰± ۱/۴۲^{h}
رقیق کننده ۴	۱۰	گلیسرول	۴۴/۲۰± ۱۴/۸۲^{b}	۱۳/۱۰± ۱/۵۷^{gh}
	۲۰		۴۵/۴۲± ۱۶/۶۳^{b}	۱۵/۲۴± ۱/۷۳^{fg}
کنترل	-	-	۱۱۶/۸۹± ۲۲/۹۰	۸۷/۵۰± ۳/۱۸

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

بحث

در شرایط عادی طول عمر اسپرم ماهیان بسیار کوتاه است و حداکثر زمان توانایی باروری اسپرم در دمای معمولی محیط، ٦-٥ ساعت بعد از استحصال آن از مولد نر است (هاروات، ۲۰۰۵). در حالی‌که با روش انجماد و با استفاده از رقیق کننده‌ها و مواد محافظ سرمایی مناسب می‌توان این اسپرم را حداقل به‌مدت چندین سال در ازت مایع نگاه داشت (بیلارد، ۲۰۰۱). معیارهای مختلف زیادی بر روی آزمایش موفقیت انجماد و انجمادزدایی در اسپرم ماهیان استفاده شده است. این معیارها روی آسیب سلولی، تحرک و ظرفیت بارورسازی پایه‌ریزی شده‌اند (بیلارد، ۲۰۰۱). برای کارایی بیشتر، مطالعات باید بر روی تعدادی از پایه‌های کلیدی از اصول انجماد شامل مطالعه روی اسپرم تازه، رقیق‌سازی با مواد رقیق کننده (شامل مواد محافظ سرما و افزودنی‌ها) و نسبت رقیق‌سازی صورت پذیرد (استوس، ۱۹۸۳). 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 (بلاسین و همکاران، ۲۰۰٦). 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. 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 (هاروات، ۲۰۰۵). در مرحله انجمادزدایی تشکیل مجدد کریستال یخ داخل سلول ممکن است باعث تخریب سلول‌های اسپرم شود (هاروات، ۲۰۰۵). تشکیل مجدد 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. اگر سرعت ذوب زیاد باشد، از شکل‌گیری کریستال یخ جلوگیری خواهد کرد (رانا، ۱۹۹۵). بر همین اساس در آزمایش انجام شده سعی شد تا انجمادزدایی اسپرم سریع صورت گیرد. مطابق جدول ۱ در این آزمایش از ٤ رقیق‌کننده‌ای که در انجماد اسپرم کپور ماهیان کاربرد بیشتری داشتند استفاده شد. محلول‌های رقیق کننده باید تهیه انرژی و دیگر مواد غذایی برای اسپرم‌های ذخیره را در طول زمان انجماد فراهم نماید. از جمله مواد مغذی لازم برای متابولیسم اسپرم که در رقیق کننده‌های به‌کار برده شده در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفته است می‌توان به قندهایی مثل ساکارز و فروکتوز اشاره کرد که منبع انرژی برای اسپرم در طول زمان انجماد است (هاروات، ۲۰۰۵). در این آزمایش بهترین رقیق کننده برای انجماد اسپرم ماهی قرمز، رقیق کننده شماره ۲ که حاوی

(کلرید سدیم، ساکارز، آنتی‌بیوتیک) بود معرفی شد. بلاسین و همکاران در سال ۲۰۰۶ بهترین محلول رقیق‌کننده برای انجماد اسپرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) را رقیق کننده حاوی (کلرید کلسیم، کربنات سدیم، کلرید منیزیم و کلرید پتاسیم) گزارش کردند. ایروان و همکاران در سال ۲۰۱۰ در مطالعاتی که بر روی انجماد اسپرم ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) انجام دادند، بهترین رقیق کننده را برای انجماد اسپرم ماهی کپور رقیق کننده حاوی (کلرید پتاسیم، فروکتوز و ساکارز) اعلام کردند. علت به‌کارگیری رقیق کننده‌های مختلف در گونه‌های مختلف ماهیان را می‌توان در ویژگی‌های خاص اسپرم از قبیل غلظت‌های مختلف یون‌ها در اسپرم گونه‌های مختلف ماهی عنوان کرد (هاروات و همکاران، ۲۰۰۵). در این آزمایش متانول با غلظت ۲۰ درصد برای انجماد اسپرم ماهی قرمز مناسب تشخیص داده شد و این نتایج مشابه بود با تحقیقات انجام شده توسط ایروان و همکاران در سال ۲۰۱۰ این محققان در مطالعاتی که روی انجماد اسپرم ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) انجام دادند، بهترین ماده محافظ سرمایی برای انجماد اسپرم ماهی کپور معمولی را متانول با غلظت ۲۰ درصد اعلام کردند. در بررسی دیگری که توسط ارگون و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام پذیرفت، این گروه بهترین شرایط در انجماد اسپرم کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) را با متانول ۱۰ درصد گزارش دادند. بلاسین و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مطالعاتی که بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) انجام دادند، بهترین ماده محافظ سرمایی برای انجماد اسپرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را متانول با غلظت ۱۲ درصد اعلام کردند. گئورک و همکاران در سال ۲۰۱۰ در مطالعاتی که بر روی ماهی لوچ (*Misgurnus anguillicaudatus*) انجام دادند، بهترین ماده محافظ سرمایی برای انجماد اسپرم ماهی لوچ را گلیسرول ۱۰ درصد گزارش کردند. علت اختلاف در تعیین بهترین ماده محافظ سرمایی و مناسب‌ترین غلظت آن در نتایج ذکر شده با نتیجه به‌دست آمده در این تحقیق را می‌توان اختلاف در محلول‌های رقیق کننده به‌کار برده شده و همچنین ویژگی‌های خاص مایع اسپرمی 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.

منابع

1. Aas, G.H., Refstie, T., and Gjerde, B. 1991. Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. Aquaculture. 95: 125-132.
2. Asmit, R., Olsen, K.H., and Zheng, W. 2000. Endocrine, gonadal and behavioral responses of male crucian carp (*Carassius carassius*) to the hormonal pheromone dihydroxy-4-pregnen-3-one Chem. Aquaculture. 20: 221-230.
3. 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.
4. Billard, R. 2001. Techniques of Genetic Resource Banking in Fish. In: Cryobanking the Genetic Resource, (Eds: Watson, P.F., Holt, W.V), London and New York, Pp: 145-158.
5. Blasyn, S.J., Mifsud, C.H., Nixon, M., and Boyd, P. 2006. The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation method on (*Oncorhynchus mykiss*) sperm. Aquaculture Reserch. 35: 127-139.
6. Blexter, R. 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. Aquaculture, 129: 95–112.
7. Cherepanov, V.V., and Kopeika, E.F. 1999. Cryopreservation and low temperature storage of sturgeon sperm. Journal of Applied Ichthyology. 15: 310-315.
8. Ergun, A., Bozkurt, Y., and Kayam, S. 2006. Cryopreservation of *Cyprinus carpio* sperm: with emphasis on post-thaw motility. Aquaculture Reserch. 42: 100-112.
9. Koldas, P., and Bieniarz, N. 1982. Recent advances in carp seed production and milt cryopreservation. Fish Physiol. Biochem, 33: 413–427.
10. Galli, A., Vanni, R., Rossetti, S., and Aleandri, R. 2006. Milt cryopreservation in Italian Cobica sturgeon (*Acipenser naccarii*). Aquaculture Society. 272.
11. Gatlin, D.M., Poe, E., Wilson, R.P., Ainsworth, A.J., and Bowser, P. 2005. The effect of cryoprotectants methanol and dimethyl sulfoxide and hyperosmotic extenders on sperm cryopreservation of two salmon species. Aquaculture. 140: 85–94.
12. 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.
13. George, S.Y., Lenin, A., Takafumi, F., and Katsutoshi, A. 2010. A sperm cryopreservation protocol for the loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) and its applicability for other related species. Aquaculture Reserch. 18: 174-186.

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. Irawan, H., Vuthiphandchai, V., and Nimrat, S. 2010. The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation method on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. Animal Reproduction Science. 122: 236-243.
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, A.D., and Shelton, W.L. 1993. Motility of spermatozoa from shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platorynechus*) and Paddlefish (*Polyodon spathula*). Journal of fish Biology. 47: 902-909.
18. 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.
19. Liu, L., Wei, Q., Guo, F., and Zhang, T. 2006. Cryopreservation of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) sperm. Journal of Applied Ichthyology. 22: 384-388.
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. Stoss, J. 1983. Fish gamete preservation and spermatozoa physiology. Pages 305-350 in W.S., Hoar, D.J., Randall, and E.M., Donaldson, editors. Fish physiology, volume IXB. Academic Press, New York.
23. Sneed, M., and Clemens, R. 1960. Cryopreservation of sperm in marine fish. Aquaculture, 31: 231–43.
24. Turner, E., and Montgomerie, R. 2002. Ovarian fluid enhances sperm movement in *Arctic charr*. Jornal of Fish Biology. 1570-1579.