مجله شیلات
سال سوم، شماره دوم، تابستان ۸۸

کیفیت اسپرم تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) پس از نگهداری در سرما با دی‌متیل سولفوکساید (DMSO)

*مریم احمدی‌فخبی[۱]، عباس‌علی زمینی[۲]، شهروز برادران‌نویری[۳]، مسعود فرخ‌روز[۴] و علی‌رضا مبرهن‌فرد[۵]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، [۲]استادیار گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، [۳]کارشناس‌ارشد بیولوژی دریا، بخش ژنتیک، **انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت**، [۴]دکترای شیلات و عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، [۵]دکترای شیلات و عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج

چکیده

حداکثر زمان توانایی باروری اسپرم در دمای معمولی محیط، ۵ تا ٦ ساعت بعد از استحصال آن از مولد نر است. در حالی‌که با روش انجماد و با استفاده از رقیق‌کننده‌ها و مواد محافظ سرمای مناسب، می‌توان اسپرم را به‌مدت چندین سال در ازت مایع نگهداری نمود. در انجماد اسپرم ماهیان خاویاری از مواد محافظ در سرمای متنوعی استفاده می‌شود ولی از میان آنها DMSO کاربرد بیشتری دارد. هدف از این پژوهش، بررسی اثر حفاظتی DMSO در غلظت‌های مختلف (۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ درصد) و بررسی درصد و زمان تحرک اسپرم‌ها پس از انجمادزدایی می‌باشد. در این تحقیق اسپرم ۵ مولد نر از تاس‌ماهی ایرانی (قره‌برون) انتخاب و با استفاده از محلول رقیق‌کننده حاوی تریس، ساکاروز، زرده تخم‌مرغ و دی‌متیل سولفوکساید به نسبت یک به یک رقیق شد. سپس اسپرم رقیق شده در لوله‌های نازک پلاستیکی (پایوت) با حجم ۰/۵ میلی‌لیتر ذخیره و با استفاده از بخار ازت (دمای ۱۹٦- درجه سانتی‌گراد) در سه مرحله منجمد و در کانتینرهای ازت مایع ذخیره شد. پس از ۷ و ۷۲ روز نگهداری در ازت مایع، با استفاده از آب ٤۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۵ ثانیه انجمادزدایی انجام شد. سپس درصد و زمان تحرک اسپرم‌ها با استفاده از میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج به‌دست آمده، درصد تحرک اسپرم‌ها پس از انجمادزدایی در غلظت‌های ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ درصد پس از ۷ روز نگهداری در ازت مایع به‌ترتیب معادل ۸/۵۰±۰/٦۱، ۱۲/٥٤±۲/٥۷، ۱۹±٥/٦٦ و ۱٦/۳۰±٦/۱٥ درصد به‌دست آمد و مدت زمان تحرک اسپرم این ماهی پس از انجمادزدایی در غلظت‌های ذکر شده پس از ۷ روز نگهداری به‌ترتیب در حد ۱۸٤/۳۰±۲۸/۸۷، ۲٦۷/۳۰±۳٦/٥٤، ۲۷٤±٥۰/٥۱ و ۲۱۸±٦۳/۸٥ ثانیه محاسبه گردید. همچنین درصد تحرک اسپرم‌ها پس از انجمادزدایی در غلظت‌های ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ درصد پس از ۷۲ روز نگهداری در ازت مایع به‌ترتیب معادل ٥/٥۰±۱٤/۲٥، ۱۰/٥۰±۱/٦۱، ۷/٥۰±۱/۸۱ و ۱۳/۷٥±۲/۷٤ درصد و مدت زمان تحرک اسپرم نیز پس از انجمادزدایی در غلظت‌های ذکر شده پس از ۷۲ روز نگهداری به‌ترتیب معادل ۱۹٥/۰۰±۳۹/٥۰، ۱۹٤/٥۰±٤۳/٦۳، ۱٥٤/۰۰±۳۷/۳٤ و ۲۲۱/۷۰±٤۷/۳۱ ثانیه محاسبه گردید. اگرچه اختلاف معنی‌دار آماری بین غلظت‌های انتخاب شده، از لحاظ درصد و زمان تحرک اسپرم‌ها پس از انجمادزدایی وجود نداشت اما DMSO به‌میزان ۱۲ و ۱۵ درصد دارای درصد و زمان تحرک بیشتری بوده است. همچنین نتایج به‌دست آمده بیانگر این مطلب است که افزایش غلظت DMSO از ۸ درصد تا ۱۵ درصد در نگهداری درازمدت اسپرم تاس‌ماهی ایرانی تغییری در درصد سلول‌های متحرک و مدت زمان تحرک رو به جلوی آنها ندارد.

واژه‌های کلیدی: اسپرم، تاس‌ماهی ایرانی، درصد تحرک، زمان تحرک، نگهداری در سرما، DMSO

*- مسئول مکاتبه: maryam.ahmadi6075@gmail.com

مقدمه

بررسی آمار صید ماهیان خاویاری در سواحل ایران نشان می‌دهد که در سال‌های اخیر تنها وضعیت ذخایر تاس‌ماهی ایرانی بهتر از ذخایر سایر تاس‌ماهیان بوده و ٤ گونه دیگر با کاهش فوق‌العاده‌ای مواجه شده است (٦ و ٤). از طرف دیگر در طول فصل تکثیر، به‌طور عمده تعداد مولدین نر صید شده بیشتر از تعدادی است که برای پوشش دادن لقاح تخمک‌های استحصالی از مولدین صید شده لازم است و در نتیجه پتانسیل اسپرم‌دهی تعدادی از مولدین نر از دست می‌رود. از سوی دیگر گاهی با وجود مولدین نر مناسب، مولد ماده مناسب در مراکز تکثیر وجود نداشته و بدین‌ترتیب امکان استفاده از اسپرم مولدین موجود نیز کاهش می‌یابد (٣). در چنین مواقعی می‌توان با کمک تکنیک انجماد، تخمک‌ها را با اسپرم انجمادزدایی شده بارور کرد و یا اسپرم‌های مازاد را منجمد و در آینده مورد استفاده قرار داد. نگهداری اسپرم در شرایط انجماد (Cryopreservation) شاخه‌ای از علم Cryobiology است که در آن به حفظ و نگهداری مواد بیولوژیک در دماهای پایین (معمولاً ازت مایع با دمای ١٩٦- درجه سانتی‌گراد) پرداخته می‌شود (٨).

تا به امروز اسپرم بیش از ٢٠٠ گونه از ماهیان با لقاح خارجی مورد انجماد قرار گرفته و هر ساله بر این تعداد اضافه می‌شود (٩). در مورد انجماد و نگهداری طولانی مدت اسپرم ماهیان خاویاری مطالعات زیادی صورت نگرفته اما این مطالعات در سال‌های اخیر رشد فزاینده‌ای یافته است (٢٥). Kopeika و همکاران (٢٠٠٠) توانستند از اسپرم منجمد تاس‌ماهی آتلانتیک (*Acipenser sturio*) پس از ٢٢ روز نگهداری در ازت مایع، میزان لقاح معادل ٦٤ درصد به‌دست آورند. Tsvetkova و همکاران (١٩٩٦) نیز با انجماد اسپرم تاس‌ماهی سیبری (*Acipense baeri*) و استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) و انجام آزمایش لقاح برروی تخمک‌ها به‌ترتیب ٢٣ درصد و ٥٤ درصد لقاح در تخمک‌های گونه‌های مورد نظر به‌دست آوردند. روش‌های مختلف به‌کار رفته در مورد محلول‌های رقیق‌کننده، مراحل سرمادهی، نسبت رقت و نتایج به‌دست آمده در مورد ٦ گونه از ماهیان خاویاری توسط Billard و همکاران (٢٠٠٤) مرور شده است. مطالعاتی در زمینه انجماد اسپرم و نگهداری کوتاه مدت اسپرم ماهیان خاویاری دریای خزر توسط Cherepanov و Kopeika (١٩٩٩) نیز انجام شده است. در این تحقیق ٩٠-٤٠ درصد اسپرم‌های منجمد شده دارای تحرک بودند. مطالعاتی نیز در سال‌های اخیر بر روی نگهداری اسپرم تاس‌ماهی مکزیکی (*Acipenser oxyrinchus*) و تاس‌ماهی پوزه کوتاه (*Acipenser brevirostrum*) (٢٧) و تاس‌ماهی چین (*Acipenser sinensis*) صورت گرفته است (٢٦).

در ایران مطالعات اولیه در ارتباط با نگهداری طولانی مدت اسپرم تاس‌ماهیان، با فشردن بیضه‌های مولدین و نگهداری اسپرم‌های زنده در یخچال معمولی آغاز گردید (١). متأسفانه پیگیری نتایج به‌دست آمده از این مطالعات در سال‌های بعد ادامه نیافت تا اینکه با بررسی رقیق‌کننده ارائه شده برای ماهیان خاویاری توسط Billard و مقایسه آن با رقیق‌کننده‌های کپورماهیان و آزادماهیان، مشخص شد که رقیق‌کننده مخصوص ماهیان خاویاری در انجماد و نگهداری طولانی مدت اسپرم تاس‌ماهی ایرانی، تاس‌ماهی روسی، ازون‌برون و شیپ در ازت مایع کارایی بیشتری داشته و اسپرم این ماهیان در رقیق‌کننده ارائه شده حداکثر تا ٧٠-٦٠ درصد تحرک دارند (٥). در مطالعه دیگری امکان انجماد و نگهداری اسپرم مولدین ٥ گونه از ماهیان خاویاری جنوب دریای خزر به کمک رقیق‌کننده اختصاصی این ماهیان به‌وجود آمد. در این مطالعه ضمن القای تحرک اسپرم‌ها، لقاح به‌میزان ٦٠-٤٤ درصد در گونه‌های مختلف نیز به‌دست آمد (٢). کاربرد مواد محافظ سرما در فرآیند انجماد اسپرم به همراه محلول‌های رقیق‌کننده معمول است. این مواد به دو صورت، محافظت‌کننده‌های نفوذی و محافظت‌کننده‌های غیرنفوذی مورد استفاده قرار می‌گیرند. دی‌متیل سولفوکساید

(DMSO)، متانول (MeOH) و اتیلن گلیکول (EG) رایج‌ترین مواد محافظ سرمایی می‌باشند (۱۲).

در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی برروی 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. از این‌رو مطالعه بیشتر برروی بررسی حیات در شرایط انجماد اسپرم ماهیان خاویاری و اثر مواد محافظ سرما در غلظت‌های مختلف برروی تحرک و قابلیت باروری اسپرم برای تثبیت روش مناسب در روند انجماد اسپرم ماهیان خاویاری ضروری به نظر می‌رسد. از اهداف این تحقیق می‌توان به تعیین غلظت و درصد مناسب از ماده محافظ سرما (DMSO) در انجماد اسپرم تاس‌ماهی ایرانی، بررسی امکان نگهداری اسپرم تاس‌ماهی ایرانی در ازت مایع و بررسی و تعیین کیفیت اسپرم شامل درصد و زمان تحرک اسپرماتوزوئیدهای منجمد شده تاس‌ماهی ایرانی پس از انجمادزدایی اشاره نمود.

مواد و روش‌ها

تیمارها و تکرار: تیمارها شامل DMSO در غلظت‌های ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ درصد بودند که هر کدام در چهار تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. آزمایشات اندازه‌گیری و بررسی کمی و کیفی اسپرم از ۱۶ مولد نر تاس‌ماهی ایرانی انجام گرفت که از بین ۱۶ مولد نر ذکر شده، اسپرم ۵ مولد برای انجماد مناسب تشخیص داده شد و عملیات انجماد تنها بر روی اسپرم این ۵ مولد انجام گرفت.

روش اسپرم‌گیری: اسپرم‌گیری از مولدین تاس‌ماهی ایرانی، بعد از انتخاب ماهی نر رسیده با بیهوش کردن آن صورت گرفت. برای اسپرم‌گیری از مولدین با وزن کم، ابتدا محوطه مجرای تناسلی و شکمی، با پارچه کاملاً خشک شده و اسپرم از منفذ تناسلی با فشار در ظرف آلومینیومی جمع‌آوری شد. برای استحصال اسپرم از مولدین نر بزرگ‌تر از سرنگ ۵۰ میلی‌لیتری متصل به تیوپ پلاستیکی (Tygon) استفاده شد. اسپرم‌های آلوده شده به مواد دفعی و ادرار یا خون مورد آزمایش قرار نگرفتند (۲٤). اسپرم استحصالی درون ظروف درب‌دار خنک ریخته شد و بلافاصله به یخچال آزمایشگاه اسپرم در دمای ۵+ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ ساعت منتقل و تا زمان انجام آزمایش (در کوتاه‌ترین زمان ممکن) در یخچال نگهداری شد.

ارزیابی کمی وکیفی اسپرم قبل از انجماد: درصد تحرک و مدت زمان تحرک اسپرماتوزوئیدها با میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ٤۰۰× ارزیابی گردید. در این بررسی درصد تحرک اسپرماتوزوئیدها به روش تخمین چشمی مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۷ و ۲۲). زمان تحرک اسپرماتوزوئیدها بلافاصله پس از مخلوط کردن و از لحظه تماس با آب، با استفاده از کرنومتر دیجیتال محاسبه شد (۹، ۱٦ و ۲٤). به‌منظور یکسان‌سازی pH محلول رقیق‌کننده با pH اسپرم تازه، pH نمونه‌های اسپرمی به‌طور جداگانه با pH متر دیجیتال اندازه‌گیری شد و برای یکسان‌سازی pH محلول رقیق‌کننده با pH هر نمونه از اسید کلریدریک استفاده شد (۲۱).

جهت تعیین تراکم اسپرماتوزوئید (تعداد اسپرم در یک حجم مشخص) از لام هماسیتومتر استفاده شد (۷ و ۲۷). ارزیابی اسپرماتوکریت توسط دستگاه سانتریفوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) به‌مدت ۵ دقیقه صورت گرفت (۲۹).

رقیق‌سازی اسپرم توسط رقیق‌کننده‌ها: قبل از انجماد، اسپرم‌ها با مواد رقیق‌کننده مناسب ماهیان خاویاری حاوی ۲۳/٤ میلی‌مول تریس، ۱/۸ میلی‌مول ساکاروز و ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ (۱۰) به همراه DMSO به‌عنوان ماده محافظ در سرما در غلظت‌های ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ درصد (۲۰، ۲۵ و ۲٦) به‌طور جداگانه رقیق‌سازی شده و به نسبت ۱:۱ با اسپرم مخلوط شدند (شکل ۱) (۱۲ و ۱۹). برای ذخیره اسپرم از پایوت‌های ۰/۵ میلی‌لیتری فرانسوی با رنگ‌های مختلف استفاده شد (شکل ۲).

انجماد اسپرم توسط ازت مایع: مراحل سرمادهی به روش دستی، در آزمایشگاه انجام شد (شکل ۳).

بدین‌ترتیب نمونه‌ها در ۱۵ سانتی‌متری از بالای سطح ازت مایع به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت و پس این مرحله نمونه به سطح ازت مایع نزدیک‌تر شده و به‌مدت ۵ دقیقه در ۵ سانتی‌متری بالای بخار ازت مایع قرار گرفت و سرانجام در ازت مایع غوطه‌ور شدند (۲۲). نمونه‌ها پس از سرمادهی تدریجی و رسیدن به برودت ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد برای نگهداری طولانی مدت وارد تانک ازت مایع شدند (شکل ٤).

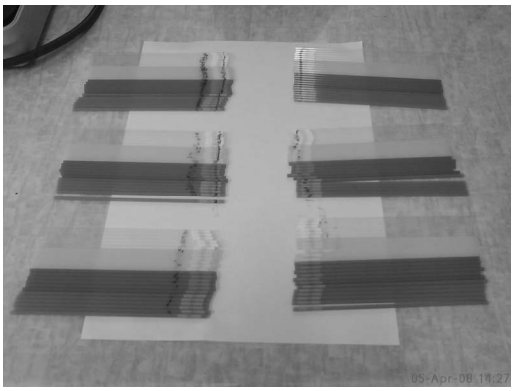
ارزیابی کیفی اسپرم پس از انجمادزدایی: در عملیات انجام شده برای ارزیابی کیفی اسپرم پس از انجمادزدایی اعم از درصد تحرک و مدت زمان تحرک اسپرماتوزئیدها، نیمی از نمونه‌ها بعد از حدود ۷ روز و نیمی دیگر پس از ۷۲ روز از حالت انجماد خارج شدند. برای این کار لوله‌های حاوی اسپرم منجمد شده از کانتینر ازت مایع خارج شده و به‌مدت ۲۵ ثانیه در آب گرم ٤۰ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد تا اسپرم‌ها از حالت انجماد خارج گردند (۲۲).

تجزیه وتحلیل اطلاعات: کلیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA و آزمون مقایسه میانگین دانکن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. میانگین‌ها براساس SE± میانگین ارائه شده در سطح ۹۵ درصد و در پاره‌ای از موارد در سطح ۹۹ درصد برای معنی‌دار بودن اختلافات مقایسه شدند و نمودارها بااستفاده از نرم‌افزار SPSS رسم گردید.

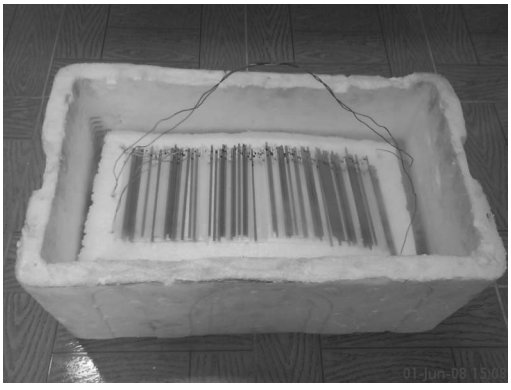
نتایج

نتایج حاصل از ارزیابی کمی و کیفی اسپرم ۱٦ مولد نر تاس‌ماهی ایرانی که شامل زمان تحرک اسپرماتوزوئیدها، درصد سلول‌های متحرک اسپرم، اسپرماتوکریت، تراکم و همچنین pH اسپرم بود، در جدول ۱ خلاصه شده است. همچنین نتایج حاصل از بررسی مدت زمان و درصد تحرک اسپرماتوزوئیدهای ۵ مولد نر تاس‌ماهی ایرانی پس از انجمادزدایی در جدول‌های ۲ تا ٤ آمده است.

شکل ۱- افزودن محلول رقیق‌کننده به همراه ماده محافظ سرما به اسپرم



شکل ۲- پایوت‌ها برای ذخیره اسپرم



شکل ۳- سرمادهی تدریجی توسط بخار ازت مایع

شکل ٤- وارد کردن نمونه‌ها در داخل تانک ازت مایع

جدول ۱- ارزیابی کمی و کیفی بر روی اسپرم تاس‌ماهی ایرانی قبل از انجماد

میانگین زمان تحرک اسپرم (ثانیه)	۲٦۷/٦۹±۳٦/۳۱
میانگین درصد تحرک اسپرم (درصد)	۷۲/۹۷±۵/۲۳
میانگین درصد اسپرماتوکریت	۵/۵۵±۰/۹۲
میانگین تعداد اسپرم ($۱۰^{٦}/mm^{۳}$)	۱/٦±۰/۳
میانگین pH	۹/۲۵±۰/۰۹

جدول ۲- مقایسه میانگین زمان و درصد تحرک اسپرماتوزوئیدها پس از رقیق‌سازی و انجماد با DMSO و اسپرم تازه

	اسپرم تازه	DMSO
میانگین زمان تحرک اسپرم (ثانیه)	۲٦۷/٦۹±۳٦/۳۱ [b]	۲۱۳/٦۲±۱۵/۵۳ [a]
میانگین درصد تحرک اسپرم (درصد)	۷۲/۹۷±۵/۲۳ [b]	۱۲/۸۲±۱/۳۷ [a]

جدول ۳- میانگین درصد و زمان تحرک اسپرماتوزوئیدها بین DMSO (طی نگهداری به‌مدت ۷ و ۷۲ روز در ازت مایع) و اسپرم تازه

ماده نگهدارنده	زمان نگهداری	زمان تحرک (ثانیه)	درصد تحرک (درصد)
DMSO	۷ روز	۲۳۵/۹۵±۲۳/۱۱ [ab]	۱٤/۱۳±۲/۲۱ [b]
	۷۲ روز	۱۹۱/۳۰±۲۰/۱۱ [a]	۱۱/۵۰±۱/٦٤ [ab]
اسپرم تازه	–	۲٦۷/٦۹±۳٦/۳۱ [b]	۷۲/۹۷±۵/۲۳ [c]

با توجه به آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه ANOVA بین DMSO و اسپرم تازه از نظر میانگین زمان و درصد تحرک اسپرماتوزوئیدها اختلاف معنی‌دار آماری وجود داشت ($P<۰/۰۱$) (جدول ۲).

آزمون دانکن نیز نشان می‌دهد که از نظر زمان و درصد تحرک اسپرماتوزوئیدها، DMSO و اسپرم تازه هر کدام در یک گروه مجزا قرار داشته و با هم اختلاف معنی‌دار آماری دارند ($P<۰/۰۱$).

با توجه به آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه ANOVA بین DMSO طی نگهداری به‌مدت ۷ و ۷۲ روز در ازت مایع و اسپرم تازه از نظر میانگین زمان و درصد تحرک اسپرماتوزوئیدها اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد ($P<۰/۰۱$).

بین زمان و درصد تحرک اسپرم‌های نگهداری شده در DMSO به‌مدت ۷ و ۷۲ اختلاف معنی‌دار وجود نداشت ولی هر دو گروه با اسپرم تازه اختلاف معنی‌دار داشتند ($P<۰/۰۱$).

جدول ٤- میانگین درصد و زمان تحرک اسپرماتوزوئیدها در تیمارهای مختلف

ماده نگهدارنده	زمان نگهداری	درصد	زمان تحرک (ثانیه)	درصد تحرک (درصد)
DMSO	۷ روز	۸	۱۸٤/۳۰±۲۸/۸۷ [abc]	۸/۵۰±۰/٦۱ [a]
		۱۰	۲٦۷/۳۰±۳٦/۵٤ [c]	۱۲/۵٤±۲/۵۷ [a]
		۱۲	۲۷٤/۰۰±۵۰/۵۱ [c]	۱۹/۰۰±۵/٦٦ [a]
		۱۵	۲۱۸/۰۰±٦۳/۸۵ [abc]	۱٦/۳۰±٦/۱۵ [a]
	۷۲ روز	۸	۱۹۵/۰۰±۳۹/۵ [ab]	۱٤/۲۵±۵/۵ [a]
		۱۰	۱۹٤/۵۰±٤۳/٦۳ [ab]	۱۰/۵۰±۱/٦۱ [a]
		۱۲	۱۵٤/۰۰±۳۷/۳٤ [abc]	۷/۵۰±۱/۸۱ [a]
		۱۵	۲۲۱/۷۰±٤۷/۳۱ [ab]	۱۳/۷۵±۲/۷٤ [a]
اسپرم تازه	–		۲٦۷/٦۹±۳٦/۳۱ [c]	۷۲/۹۷±۵/۲۳ [b]

همچنین بین اسپرم رقیق‌سازی شده با DMSO در غلظت‌های ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ درصد پس از نگهداری در۷ روز و ۷۲ روز و اسپرم تازه از نظر میانگین زمان و درصد تحرک اسپرماتوزوئیدها اختلاف معنی‌دار آماری وجود داشت ($P<۰/۰۱$).

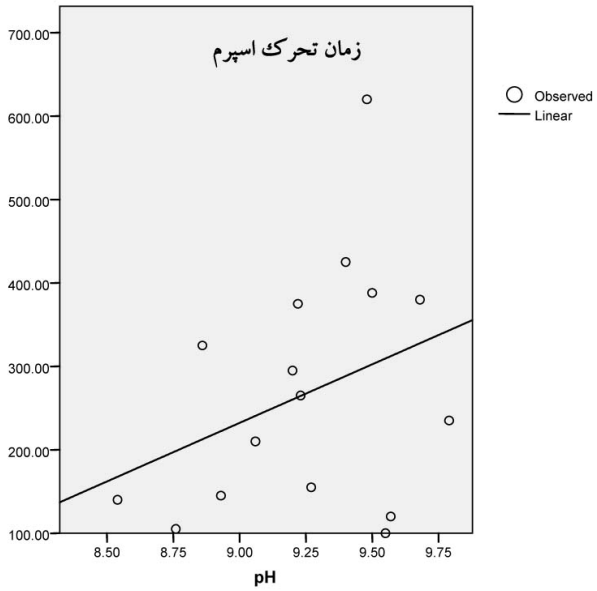
از نظر زمان تحرک اسپرماتوزوئیدها، اسپرم رقیق‌سازی شده با DMSO در غلظت ۱۵ درصد پس از ۷ روز نگهداری در یک گروه و اسپرم تازه و اسپرم رقیق‌سازی شده با DMSO در غلظت‌های ۱۰ و ۱۲ درصد پس از ۷ روز نگهداری نیز در یک گروه دیگر قرار داشته و این گروه‌ها با هم اختلاف معنی‌دار آماری داشتند ($P<۰/۰۱$).

همچنین از نظر درصد تحرک اسپرماتوزوئیدها، DMSO با غلظت ۸، ۱۰ و ۱۵ درصد پس از ۷ روز و DMSO با غلظت ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ درصد پس از ۷۲ روز نگهداری در یک گروه، DMSO با غلظت ۱۲ درصد پس از۷ روز نگهداری در یک گروه مجزا و اسپرم تازه نیز در یک گروه دیگر قرار داشته و این گروه‌ها با هم اختلاف معنی‌دار آماری داشتند ($P<۰/۰۱$).

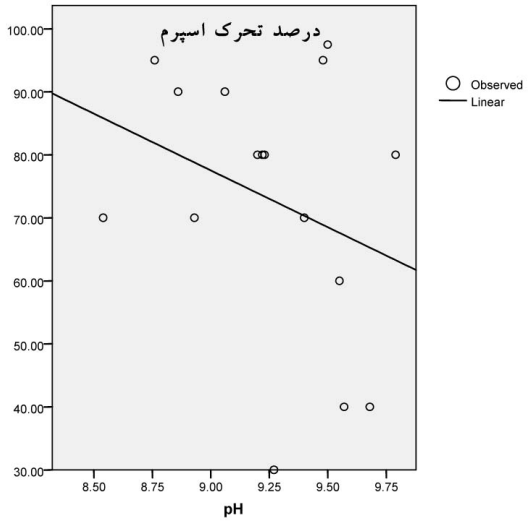
با توجه به نتایج حاصل از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه ANOVA بین DMSO در غلظت‌های ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ درصد از نظر میانگین زمان و درصد تحرک اسپرم پس از ۷ روز نگهداری در ازت مایع اختلاف معنی‌دار آماری وجود نداشت ($P>۰/۰۵$). همچنین بین DMSO در غلظت‌های ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ درصد پس از ۷۲ روز نگهداری در ازت مایع از نظر میانگین زمان و درصد تحرک اسپرم اختلاف معنی‌دار آماری وجود نداشت ($P>۰/۰۵$).

ضریب همبستگی پیرسون (r) بین pH و زمان تحرک اسپرم برابر با ۰/۳۳۹ بود که با توجه به مقدار P (۰/۱۹۹) ضریب همبستگی در سطح فراتر از ۱۹/۹ درصد معنی‌دار می‌باشد (در سطح ۰/۰۱ و ۰/۰۵ معنی‌دار نبود) (شکل ۵).

ضریب همبستگی پیرسون بین pH و درصد تحرک اسپرم برابر با ۰/۳۰۲- بود که با توجه به‌مقدار P (۰/۲۵٦) ضریب همبستگی در سطح فراتر از ۲۵/٦ درصد معنی‌دار می‌باشد (در سطح ۰/۰۱ و ۰/۰۵ معنی‌دار نبود) (شکل ٦).



شکل ۵- همبستگی و ارتباط رگرسیونی بین pH و زمان تحرک اسپرماتوزوئیدها



شکل ٦- همبستگی و ارتباط رگرسیونی بین pH و درصد تحرک اسپرماتوزوئیدها

بحث و نتیجه‌گیری

حداکثر زمان توانایی باروری اسپرم در دمای معمولی محیط، ٦-٥ ساعت بعد از استحصال آن از مولد نر است (١). در حالی‌که با روش انجماد و با استفاده از رقیق‌کننده‌ها و مواد محافظ سرمای مناسب می‌توان اسپرم را حداقل به‌مدت چندین سال در ازت مایع نگهداری نمود (١١). معیارهای مختلف زیادی برروی آزمایش موفقیت انجماد و انجمادزدایی در اسپرم ماهیان استفاده شده است. این معیارها برروی آسیب سلولی (تغییر مورفولوژی و اندامک‌های داخل سلولی)، تحرک و ظرفیت بارورسازی پایه‌ریزی شده‌اند (١١). برای کارایی بیشتر، مطالعات باید برروی برخی از نکات کلیدی اصول انجماد از جمله بررسی اسپرم تازه، رقیق‌سازی با مواد رقیق‌کننده (شامل مواد محافظ سرما و افزودنی‌ها) و اسپرم انجمادزدایی شده صورت پذیرد (١١). صدمات بیوشیمیایی و فیزیکی وارد بر سلول‌های در حال یخ زدن مثل آبگیری نمودن و تغییرات pH از جمله مهمترین صدمات وارده بر سلول طی مراحل انجماد می‌باشند. این اثرات مخرب را می‌توان با افزودن مواد محافظ سرما تا حدی کاهش داد.

DMSO ماده محافظ سرمای موثری در انجماد اسپرم ماهیان خاویاری ذکرشده است (١٣، ١٤، ١٥ و ٢٨).

با توجه به نتایج، به‌دست آمده، میانگین درصد و زمان تحرک در اسپرم گونه تاس‌ماهی ایرانی با DMSO پس از انجمادزدایی به‌ترتیب ١٢/٨٢±١/٣٧ درصد و ٢١٣/٦٢±١٥/٥٣ ثانیه بوده که در مقایسه با اسپرم تازه (به‌ترتیب ٧٢/٩٧±٥/٢٣ درصد و ٢٦٧/٦٩±٣٦/٣١ ثانیه) از درصد و زمان تحرک کمتری برخوردار بوده است. همچنین در آزمایشی که برروی تأثیر مدت زمان نگهداری اسپرم در ازت مایع برروی درصد و زمان تحرک اسپرم منجمد شده انجام گرفت، میانگین درصد و زمان تحرک در نمونه‌های اسپرمی که توسط DMSO منجمد شده و به‌مدت ٧ روز در ازت مایع نگهداری شده بودند، به‌ترتیب ١٤/١٣±٢/٢١ درصد و ٢٣٥/٩٥±٢٣/١١ ثانیه محاسبه شد. همچنین میانگین درصد و زمان تحرک در نمونه‌های اسپرمی منجمد شده توسط DMSO پس از ٧٢ روز نگهداری در ازت مایع به‌ترتیب ١١/٥٠±١/٦٤ درصد و ١٩١/٣٠±٢٠/١١ ثانیه اندازه‌گیری شد. نتایج به‌دست آمده بیان‌کننده روند کاهشی است که نشان می‌دهد افزایش زمان نگهداری اسپرم‌های منجمد شده برروی کیفیت آنها تأثیر منفی دارد.

جهت تعیین غلظت مناسب ماده محافظ سرما در انجماد اسپرم تاس‌ماهی ایرانی، DMSO در چهار غلظت متفاوت شامل ۸، ۱۰، ۱۲ و۱۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج به‌دست آمده بیشترین درصد و زمان تحرک با DMSO در غلظت ۱۲ درصد به‌ترتیب ۵/٦٦±۱۹/۰۰ درصد و ۵۰/۵۱±۲۷٤/۰۰ ثانیه پس از ۷ روز نگهداری در ازت مایع و کمترین میزان آن با DMSO در غلظت ۱۲ درصد به‌ترتیب ۱/۸۱±۷/۵۰ درصد و ۳۷/۳٤±۱٥٤/۰۰ ثانیه پس از ۷۲ روز نگهداری در ازت مایع به‌دست آمد. اگرچه اختلاف معنی‌دار آماری در بین مقادیر به‌دست آمده در بین غلظت‌های منتخب وجود نداشت ($P>۰/۰۵$)، اما در این بررسی DMSO با غلظت ۱۲ و ۱۵ درصد نتایج بهتری را نشان داده است.

Liu و همکاران (۲۰۰٦) نیز DMSO با غلظت ۱۲ درصد را به‌عنوان ماده محافظ سرمای مناسب در انجماد اسپرم تاس‌ماهی چینی (*Acipenser persicus*) عنوان کردند. در حالی‌که Lahnsteiner و همکاران (۲۰۰٤) بیشترین درصد تحرک را با DMSO در غلظت ۱۰ درصد (۷/٤±۸۰/۰ درصد) اعلام کردند. در بررسی دیگری که توسط Galli و همکاران (۲۰۰٦) انجام پذیرفت، این گروه بهترین شرایط در انجماد اسپرم تاس‌ماهی ایتالیایی (*A. naccarii*) را با DMSO در غلظت ۱۰ درصد گزارش کردند. Horvath و همکاران نیز (۲۰۰۵) بالاترین میزان تحرک را پس از انجمادزدایی با DMSO در غلظت ۵ درصد (۱۳±۲٦ درصد) اعلام کردند. علت اختلاف در غلظت مناسب از DMSO در نتایج ذکر شده با نتایج به‌دست آمده و همچنین علت پایین بودن درصد تحرک اسپرماتوزوئیدها در این تحقیق را می‌توان نوع گونه انتخاب شده، اختلاف در محلول‌های رقیق‌کننده به‌کار برده شده، روش سرمادهی منتخب در این تحقیق و همچنین ویژگی‌های خاص مایع منی این‌گونه عنوان کرد. بدین‌ترتیب افزایش غلظت DMSO از ۸ درصد تا ۱۵ درصد در نگهداری دراز مدت اسپرم تاس‌ماهی ایرانی تغییری در درصد سلول‌های متحرک و مدت زمان تحرک رو به جلوی آنها ندارد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مسئولین محترم انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان و همچنین از همکاری کارشناسان مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

۱- آذری‌تاکامی، ق.، و کهنه‌شهری، م.، ۱۳۵۳. تکثیر مصنوعی و پرورش ماهیان خاویاری. انتشارات دانشگاه تهران. ۲۹۸ صفحه.

۲- برادران نویری، ش.، علیپور، ع.، و پورکاظمی، م.، ۱۳۸۲. انجماد اسپرم ۵ گونه از تاس‌ماهیان دریای خزر. ویژه‌نامه اولین سمپوزیوم ملی ماهیان خاویاری. مجله علمی شیلات ایران، پاییز ۱۳۸۲. صفحات ۲۳ تا ۲۸.

۳- برادران نویری، ش.، ۱۳۸٦. ایجاد بانک اسپرم از مولدین ماهیان خاویاری حاشیه جنوبی دریای خزر. وزارت جهاد کشاورزی، سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، برنامه محیط زیست دریای خزر. ۱٦ صفحه.

٤- تقوی‌مطلق، ا.، ۱۳۷۷. ترکیب سنی و پیش‌بینی مقدار اپتیمم صید برای چهار گونه ماهیان خاویاری ازون‌برون، فیل‌ماهی، قره‌برون و چالباش. اولین سمپوزیوم ملی ماهیان خاویاری، ۲۵-۲٤. آذر ۱۳۷۷، رشت، خلاصه مقالات صفحه ۱.

۵- عابدی، م.، ۱۳۷۵. بررسی امکان انجماد اسپرم در ماهیان خاویاری. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی. واحد لاهیجان. ۹۵ صفحه.

٦- مقیم، م.، و فضلی، ح.، ۱۳۷۷. بررسی وضعیت کنونی ذخایر ماهیان خاویاری در سواحل جنوبی دریای خزر. اولین سمپوزیوم ملی ماهیان خاویاری، ۲۵-۲٤ آذر ۱۳۷۷، رشت، خلاصه مقالات. صفحه ۲.

۷- هاشمی، م.، ۱۳۷۵. تلقیح مصنوعی در گاو (فیزیولوژی تولیدمثل و تلقیح مصنوعی). انتشارات فرهنگ جامع، چاپ دوم. ۳۰۲ صفحه.

8.Ashwood-Smith, M.J., 1980. Low temperature preservation of cells, tissues and organs. In: Low Temperature Preservation in Medicine and biology (ed. by M.J. Ashwood-Smith), pp. 19-44 Pitman Medical, Tunbridge Wells.

9.Billard, R., Cosson, J., Perchee, G., Linhart, O., 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. Aquaculture 129, 95-112.

10.Billard, R., Tsvetkova, L.I., Cosson, J., Linhart, O., 1997. Motility analysis of fresh and Thawed spermatozoa in *Acipenser baeri*. 3rd Inter. Sym. Sturgeon. Piacenza, Italy. July 8-11, 1997. Abstract book, AIO.

11.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.

12.Billard, R., Cosson., Noveiri, S.B., Pourkazemi, M., 2004. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. Aquaculture 236, 1-9.

13.Cherepanov, V.V., Drokin, S.I., ochkur, S.I., Dzuba B.B., Chikhachoc, A.S., Kopeika, E.F., 1993. Freezing of sperm of the Azov-Black sea Acipenserids: In Sympo. On sturgeons. Sep 6-11 1993. Moscow, Russia, pp. 63-64.

14.Cherepanov, V.V., Kopeika, E.F., 1999. Cryopreservation and low temperature storage of sturgeon sperm. J. Appl. Ichthyol. 15(4-5), 310-311.

15.Ciereszko, A., Toth, G.P., Christ, S.A., Dabrowski K., 1996. Effect of Cryopresevation and theophylline on motility characteristics of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) spermatozoa. Theriogenology 45, 665-672.

16.Cosson, J., Billard, R., Dreanno, C., Suquet, M., Cibert, C., 1999. Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors. In the Male Gamete from Basic Knowledege to Clinical Applications. pp, 161-186. Vienna, U.S.A.

17.Drokin, S.I., Kopeika, E.F., 1997. Cryopreservation and phospholipid content of spermatozoa of some sturgeon species. J. Appl. Ichthyol. Vol. 15, 311p.

18.Galli, A., Vanni, R, Rossetti, S., Aleandri R., 2006. Milt cryopreservation in Italian Cobice sturgeon *Acipenser naccarii*. The Aquaculture Society, 272p.

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

20.Horvath, A., Wayman, W.R., Urbanyi, B., Ware, K.M., Dean, J.C., Tiersch, T.S., 2005. The relationship of the cryoprotectants methanol and dimethyl sulfoxide and hyperosmotic extenders on sperm cryopresevation of two North-American sturgeon species. Aquaculture 247, 243-251.

21.Horvath, A., 2006. Improved Cryopreservation of Sperm of Paddlefish (*Polyodon spathula*). J. World Aquaculture Society 37(4), 356-362.

22.Kopieka, E.F., Williot, P., Goncharov, B.F., 2000. Cryopreservation of Atlantic sturgeons *Acipenser sturio* L., 1758 sperm: First results and associated problems. Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 16(1-4), 167-173.

23.Lahnsteiner, F., Berger, B., Horvath, A., Urbanyi, B., 2004. Studies on the sperm biology and sperm cryopreservation in the sterlet, *Acipenser ruthenu*s L. Aquaculture research 35, 519-528.

24.Linhart, O., Mims, S.D., Shelton, W.L., 1995. Motility of spermatozoa from shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platoryneclus* Rafinesque 1820) and paddlefish (*Polyodon spathulla* Walbaum, 1797). J. Fish Biol. 97, 902-909.

25.Linhart, O., Mims, S.D., Glomelsky, B., Cvetkova, L.I., Cosson, J., Rodina, M., Horvath, A., Urbanyi, B., 2006. Effect of cryoprotectant and male on motility parameters and fertilization rate

in paddlefish (*Polyodon spathula*) frozen-thawed spermatozoa. J. Appl. Ichthyol. 22 (suppl. 1), 389-394.
26. Liu, L., Wei, Q., Guo, F., Zhang, T., 2006. Cryopreservation of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) sperm. Appl. Ichthyol. 22, 384-388.
27. Park, C., Chapman, F.A., 2005. An extender solution for the short-term storage of sturgeon semen. North Am. Aquaculture 67, 52-57.
28. Tsvetkova, K.I., Cosson, J., Linhart, O., Billard, R., 1996. Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawed spermatozoa in sturgeon, *Acipenser baeri* and *A. ruthenus*. J. Appl. Ichthyol. 12, 107-112.
29. Williot, P., Kopeika, E.F., Gonocharov, B., 2000. Influence of testis states temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). Aquaculture 189, 53-61.

Sperm quality of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) after Cryopreservation with Dimethyl Sulfoxide

M. Ahmadi Fakhabi[1], A.A. Zamini[2], S. Baradran Noveiri[3], M. Farokhrooz[4] and A.R. Mobarhan Fard

[1]M.Sc. Graduated in Fisheries, Islamic Azad University, Lahijan Branch, [2]Assistant Prof., Dept. of Fisheries, Islamic Azad University, Lahijan Branch, [3]M.Sc. of Marine Bioliogy, Dr. Dadman International Sturgeon Research Institute, Rasht, [4]Ph.D. in Fisheries, Faculty Member of Islamic Azad University, Lahijan Branch, [5]Ph.D. in Fisheries, Faculty Member of Islamic Azad University, Sanandag Branch

Abstract

The maximum ability of sperm for fertilization is 5-6 hours after collecting sperm from males in normal temperature. While by semen freezing and use of suitable extenders and cryoprotectants we can conserve it in liquid nitrogen for several years and we can use stored sperms in essential Conditions. Varied cryoprotectants are used in sturgeon semen cryopreservation but DMSO is the most important cryoprotectant. In this study, we have investigated the protective effect of DMSO as a cryoprotectant using different concentrations (8%, 10%, 12%, and 15%) and we have determined sperm motility rate and its motility time after thaw. The sperm of Persian sturgeon was collected from five males. They were diluted in appropriate extender containing Tris, Sacharose, egg yolk, and dimethyl sulfoxide in 1:1 ratio and the suspension were poured in to 0.5 ml straws and frozen in -196˚C liquid nitrogen vapour in a three storage program. Then straws were transferred to liquid nitrogen tank. The sperm samples were thawed in 40˚C water bath for 25s. The sperm motility rate and its motility time were observed using microscope. According to the results, the sperm motility rate after preservation in liquid nitrogen about 7 days were measured as 8.5±0.61, 12.54±2.57, 19±5.66, and 16.3±6.15% in concentrations 8%, 10%, 12%, and 15%; the sperm motility time after this time was 184.3±28.87, 267.3±36.54, 274±50.51, and 218±63.85s, respectively. Also the sperm motility rate after preservation in liquid nitrogen about 72 days were measured as 14.25±5.50, 10.50±1.61, 7.50±1.81, and 13.75±2.74%; the sperm motility time after this time was 195±39.50, 194.50±43.63, 154±37.34, and 221.70±47.31s, respectively. There was no statistical significant difference between selected concentration. However, 12 and 15% of DMSO had better motility rate and time. Results indicated that the increase in concentration of DMSO from 8% to 15% does not change the percentage of motile cells and motility time on sperm cryopreservation of Persian sturgeon.

Keywords: Sperm; *Acipenser persicus*; Motility rate; Motility time; Cryopreservation; DMSO

*- Corresponding Author; E-mail: maryam.ahmadi6075@gmail.com