جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بررسی تأثیر متانول بر درصد و زمان تحرک اسپرم تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) پس از نگهداری در سرما

مریم احمدی فخبی*[۱]، عباسعلی زمینی[۲]، شهروز برادران نویری[۳]

۱*و۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

۳- انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری، رشت، ایران، صندوق پستی: ۳۴۶۴ -۴۱۶۳۵

maryam.ahmadi6075@gmail.com

چکیده

یکی از کاربردهای انجماد اسپرم کمک به جلوگیری از انقراض نسل گونه‌های در معرض خطر می‌باشد. در شرایط عادی، عمر گامت‌های نر بسیار کوتاه بوده و نمی‌توان آن‌ها را برای مدت زمان طولانی حفظ نمود. در حالی‌که با روش انجماد و با استفاده از رقیق کننده‌ها و مواد محافظ سرمای مناسب می‌توان این اسپرم را حداقل به مدت چندین سال در ازت مایع نگهداری کرد. در این صورت می‌توان از اسپرم ذخیره شده در مواقع ضروری استفاده کرد. در این تحقیق اسپرم بدست آمده از ۵ مولد نر تاسماهی ایرانی با استفاده از محلول رقیق کننده شامل ۲۳/۴ میلی مول تریس، ۱/۸ میلی مول ساکاروز و ۲۰٪ زرده تخم مرغ به همراه متانول به عنوان ماده محافظ سرما در چهار غلظت (۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۵٪) رقیق‌سازی شده و در لوله‌های نازک پلاستیکی (پایوت) با حجم ۰/۵ میلی‌لیتر ذخیره‌سازی شدند و توسط بخار ازت مایع (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) با شدت سرمادهی سه مرحله‌ای منجمد و در کانتینرهای ازت مایع ذخیره شدند. سپس با آب ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه از حالت انجماد خارج شده و درصد و زمان تحرک اسپرماتوزوئیدها پس از انجمادزدایی در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. بالاترین درصد و زمان تحرک پس از انجمادزدایی با متانول ۸٪ پس از ۷ روز نگهداری در ازت مایع به ترتیب ۲/۱۵ ±۷/۰۰ درصد و ۳۹/۱۴±۱۰۲/۳۰ ثانیه بدست آمد. در حالی‌که کمترین میزان آن با متانول ۸٪ پس از ۷۲ روز نگهداری در ازت مایع به ترتیب ۰/۵۶± ۱/۲۵ درصد و ۹/۶۰±۲۳/۰۰ ثانیه بدست آمد. نتایج به دست آمده نشان داد که افزایش زمان نگهداری اسپرم‌های منجمد شده از ۷ روز تا ۷۲ روز روی کیفیت آن‌ها تأثیر منفی دارد. همچنین افزایش غلظت متانول از ۸ درصد تا ۱۵ درصد در نگهداری طولانی مدت اسپرم تاسماهی ایرانی تغییری در درصد سلول‌های متحرک و مدت زمان تحرک رو به جلوی آن‌ها ندارد. در این تحقیق متانول به عنوان ماده محافظ در سرما در حفظ سلول‌های متحرک اسپرم تاسماهی ایرانی پس از نگهداری در سرما کارایی چندان موفقی نداشته است.

کلمات کلیدی: تاسماهی ایرانی، اسپرم، متانول، نگهداری در سرما، درصد تحرک، زمان تحرک

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

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 ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) پرداخته می‌شود (۷). بررسی آمار صید ماهیان خاویاری در سواحل ایران نیز نشان می‌دهد که در سال‌های اخیر تنها وضعیت ذخایر تاسماهی ایرانی بهتر از سایر تاسماهیان بوده و ۴ گونه دیگر، با کاهش فوق العاده‌ای مواجه شده است (۳و۵). کاهش میزان صید مولدین ماهیان خاویاری دریای خزر در سال‌های اخیر باعث بروز مشکلات جدی در امر تکثیر مصنوعی و بازسازی ذخایر این ماهیان با ارزش شده است. این مسئله به نوبه خود سبب کاسته شدن از میزان رهاسازی بچه ماهیان تولید شده در مناطق مورد نظر می‌شود. از طرف دیگر این کاهش صید سبب شده که در فصل تکثیر، از توان تکثیر تعداد مولدین معدودی استفاده شود که خطر کاهش تنوع ژنی این ماهیان را در آینده به دنبال دارد (۱۲).

در مورد انجماد و نگهداری طولانی مدت اسپرم ماهیان خاویاری مطالعات زیادی صورت نگرفته اما این مطالعات در سال‌های اخیر رشد شدیدی پیدا کرده است (۲۲). در مطالعه Kopeika و همکاران درصد باروری تخمک‌های لقاح یافته با اسپرم منجمد تاسماهی آتلانتیک (*Acipenser sturio*) پس از ۲۲ روز حدود ۶۴٪ بوده است (۲۰). در مطالعه Tsvetkova و همکاران نیز (۲۶) درصد باروری تخمک‌های لقاح یافته با اسپرم انجماد یافته تاسماهی سیبری (*Acipenser baeri*) و استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) به ترتیب حدود ۲۳٪ و ۵۴٪ بوده است.

روش‌های بکار رفته در مورد محلول‌های رقیق کننده، مراحل سرمادهی، نسبت رقت، نتایج بدست آمده و... نیز در مورد ۶ گونه از ماهیان خاویاری توسط Billard و همکاران (۱۱) مرور شده است. مطالعاتی در زمینه انجماد اسپرم و نگهداری کوتاه مدت اسپرم ماهیان خاویاری دریای خزر توسط Cherepanov و Kopeika (۱۳) نیز انجام شد. در این تحقیق ۹۰-۴۰٪ اسپرمهای منجمد شده دارای تحرک بودند. مطالعاتی نیز در سال‌های اخیر بر روی نگهداری اسپرم تاسماهی مکزیکی (*Acipenser oxyrinchus*)، تاسماهی پوزه کوتاه (*Acipenser brevirostrum*) (۲۵) و تاسماهی چینی (*Acipenser sinensis*) نیز صورت گرفته است (۲۳).

در ایران مطالعات اولیه در ارتباط با نگهداری طولانی مدت اسپرم تاسماهیان در ابتدا با فشردن بیضه‌های مولدین و نگهداری اسپرم‌های زنده در یخچال معمولی آغاز گردید (۱). متأسفانه پیگیری نتایج بدست آمده از این مطالعات در سال‌های بعد ادامه نیافت تا اینکه با بررسی رقیق کننده ارائه شده برای ماهیان خاویاری توسط Billard و مقایسه آن با رقیق کننده‌های کپورماهیان و آزادماهیان، مشخص شد که رقیق‌کننده مخصوص ماهیان خاویاری در انجماد و نگهداری طولانی مدت اسپرم تاسماهی ایرانی، تاسماهی روسی، ازون برون و شیپ در ازت مایع کارایی بیشتری داشته و اسپرم این ماهیان در رقیق کننده ارائه شده حداکثر تا ۷۰-۶۰٪ تحرک دارند (۴).

در مطالعه دیگری امکان انجماد و نگهداری اسپرم مولدین ۵ گونه از ماهیان خاویاری جنوب دریای خزر به کمک رقیق کننده اختصاصی این ماهیان بوجود

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

آمد، ضمن القای تحرک اسپرم‌ها، لقاح ۶۰-۴۴٪ در گونه‌های مختلف نیز بدست آمد (۲).

در فرآیند انجماد اسپرم از افزودنی‌های مهم محلول رقیق کننده، مواد محافظ سرمایی می‌باشد که شامل دو نوع، محافظت کننده‌های نفوذی و محافظت کننده‌های غیر نفوذی می‌باشند. دی متیل سولفوکساید (DMSO)، متانول (MeOH) و اتیلن گلیکول (EG) رایجترین مواد محافظ سرمایی می‌باشند (۱۱).

در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی روی کاربرد انواع مواد محافظ سرمایی در انجماد اسپرم ماهیان به عمل آمده است اما متأسفانه در نحوه کاربرد این مواد و غلظت مناسب آن در روند انجماد اسپرم ماهیان خاویاری تاکنون اتفاق نظری وجود نداشته است.

متانول ماده محافظ سرمای موثری در انجماد اسپرم ماهیان خاویاری (۱۶) و ماهی پارو پوزه (۲۴) تشخیص داده شده است. اما دی متیل سولفوکساید (DMSO) پرمصرف‌ترین نوع ماده محافظ سرما می‌باشد که با توجه به سختی کار با DMSO از قبیل مضر بودن آن برای انسان و خاصیت سرطان‌زایی آن، هزینه بالا و غیره در مقایسه با متانول بر آن شدیم تا مطالعات بیشتری را در زمینه محافظت این ماده پس از انجماد روی سلول‌های متحرک اسپرم تاسماهی ایرانی که یکی از گونه‌های بومی و با ارزش کشورمان می‌باشد انجام دهیم.

Horvath و Urbanyi (۱۷) درصد لقاح بهتری را با متانول در مقایسه با DMSO و دی متیل استات (DMA) گزارش دادند. Glogowski و همکاران (۱۶) متانول را به عنوان محافظ سرما در انجماد اسپرم تاسماهی سیبری به کار بردند. با مطالعه Linhart و همکاران بر روی انجماد اسپرم ماهی پارو پوزه (*Polyodon spathula*)، این گروه متانول (۸٪ یا ۱۰٪) را به همراه مواد رقیق کننده برای نگهداری کیفیت خوب اسپرم پس از انجمادزدایی مفید گزارش کردند (۲۲).

از این رو مطالعه بیشتر روی بررسی حیات در شرایط انجماد اسپرم ماهیان خاویاری و اثر مواد محافظ سرما در غلظت‌های مختلف روی تحرک و قابلیت باروری اسپرم برای تثبیت روش مناسب در روند انجماد اسپرم ماهیان خاویاری ضروری به نظر می‌رسد. از اهداف این پروژه می‌توان به تعیین غلظت و درصد مناسب ماده محافظ سرمای متانول 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 با متانول پس از انجمادزدایی اشاره کرد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق اسپرم تاسماهی ایرانی (قره برون) از مولدین مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی واقع در ۲۵ کیلومتری جنوب شرقی شهر رشت در جوار رودخانه سفیدرود استحصال و مورد بررسی قرار گرفت. کلیه مراحل اندازه‌گیری کیفیت و کمیت اسپرم و عملیات مربوط به انجماد اسپرم در آزمایشگاه انجماد اسپرم بخش ژنتیک و آزمایشگاه فیزیولوژی انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری از تاریخ ۸۷/۱/۵ لغایت ۸۷/۴/۱ انجام پذیرفت.

تیمارها و تکرار: تیمارها شامل متانول ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۵٪ بودند که هر کدام در چهار تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. آزمایشات اندازه‌گیری و بررسی کمی و کیفی اسپرم (ارزیابی تراکم و درصد و مدت زمان تحرک اسپرماتوزوئیدها) 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 اسپرم گیری: 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، 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 (۲۱). اسپرم استحصالی درون ظروف درب دار خنک ریخته شده و سریعاً به یخچال آزمایشگاه اسپرم در دمای ۵+ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت منتقل گردیده و تا زمان انجام آزمایش (حداکثر ۳ ساعت) در یخچال نگهداری شد.

ارزیابی کمی وکیفی اسپرم قبل از انجماد: درصد تحرک و مدت زمان تحرک اسپرم با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰× ارزیابی گردید. در این بررسی درصد تحرک اسپرم به روش تخمین چشمی مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۵و۲۰). در بررسی مدت زمان تحرک اسپرم، زمان تحرک اسپرم‌ها بلافاصله پس از مخلوط کردن و از لحظه تماس با آب، با استفاده از کرنومتر دیجیتال محاسبه شد (۸، ۱۴و ۲۱) . به منظور یکسان سازی pH محلول رقیق کننده با pH اسپرم تازه، pH نمونه‌های اسپرم کامل و تازه به طور جداگانه با pH متر دیجیتال اندازه‌گیری شد و برای یکسان‌سازی pH محلول رقیق کننده با pH هر نمونه از اسید کلریدریک استفاده شد (۱۹).

جهت تعیین تراکم اسپرماتوزوئید (تعداد اسپرم در یک حجم مشخص مثلاً ۱ میلی‌لیتر) از لام هماسیتومتر استفاده شد (۶و۲۵). ارزیابی اسپرماتوکریت توسط دستگاه سانتریفوژ rpm با سرعت ۵۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت (۲۷).

رقیق سازی اسپرم توسط رقیق کننده ها: قبل از انجماد، اسپرم‌ها با مواد رقیق کننده مناسب ماهیان خاویاری حاوی ۲۳/۴ میلی مول تریس، ۱/۸ میلی مول ساکاروز و ۲۰٪ زرده تخم مرغ (۹) به همراه متانول به عنوان ماده محافظ در غلظت‌های ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۵٪ (۱۸، ۲۲و۲۳) به طور جداگانه رقیق سازی شده و به نسبت ۱:۱ با اسپرم مخلوط شدند (۱۱و۱۶). برای ذخیره اسپرم از پایوت‌های ۰/۵ میلی‌لیتری فرانسوی با رنگ‌های مختلف استفاده شد.

انجماد اسپرم توسط ازت مایع: مراحل سرمادهی به روش دستی، در آزمایشگاه انجام شد. بدین ترتیب نمونه‌ها در ۱۵ سانتی‌متری بالای سطح ازت مایع به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفته، پس از این مرحله نمونه به سطح ازت مایع نزدیکتر شده و به مدت ۵ دقیقه در ۵ سانتی‌متری بالای بخار ازت مایع قرار گرفته و سرانجام در ازت مایع غوطه‌ور شدند (۲۰). نمونه‌ها پس از سرمادهی تدریجی و رسیدن به برودت ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد برای نگهداری طولانی مدت وارد تانک ازت مایع شدند.

ارزیابی کیفی اسپرم پس از انجمادزدایی: در عملیات انجام شده برای ارزیابی کیفی اسپرماتوزوئیدها اعم از درصد تحرک و مدت زمان تحرک اسپرماتوزوئید با میکروسکوپ نوری، نیمی از نمونه‌ها بعد از حدود ۷ روز و نیمی دیگر پس از ۷۲ روز از حالت انجماد خارج شدند. برای این کار پایوت‌های حاوی اسپرم منجمد شده از کانتینر ازت مایع خارج شده و به مدت ۲۵ ثانیه در آب گرم ۴۰ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد تا اسپرم‌ها از حالت انجماد خارج گردد (۲۰).

تجزیه وتحلیل اطلاعات: کلیه داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS و آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و آزمون مقایسه میانگین دانکن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. میانگین‌ها بر اساس SE± میانگین ارائه شده در سطح ۹۵٪ و در پاره‌ای از موارد در سطح ۹۹٪ برای معنی‌دار بودن اختلافات مقایسه شدند و نمودارها با استفاده از نرم افزار SPSS رسم گردید.

نتایج

در مطالعه حاضر ارزیابی کمی و کیفی اسپرم که در برگیرنده زمان تحرک اسپرم، درصد سلول‌های متحرک اسپرم، اسپرماتوکریت، تراکم و همچنین pH اسپرم می‌باشد از تعداد ۱۶ مولد نر تاس ماهی ایرانی بعمل آمده است که نتایج آن در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: ارزیابی کمی و کیفی بر روی اسپرم تاس ماهی ایرانی قبل از انجماد

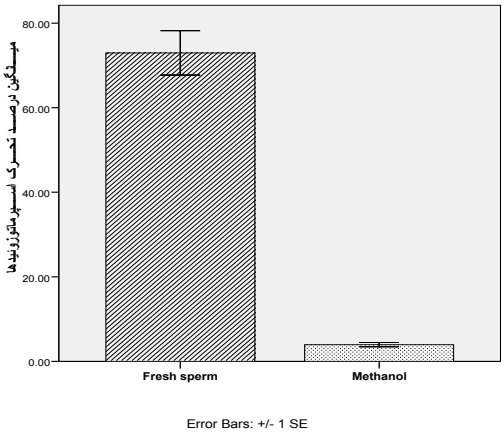
میانگین زمان تحرک اسپرم(ثانیه)	۲۶۷/۶۹ ±۳۶/۳۱
میانگین درصد تحرک اسپرم(٪)	۷۲/۹۷ ±۵/۲۳
میانگین درصد اسپرماتوکریت	۵/۵۵ ±۰/۹۲
میانگین تعداد اسپرم در ($10^6/mm^3$)	۱/۶ ±۰/۳
میانگین pH	۹/۲۵ ±۰/۰۹

جدول ۲: مقایسه میانگین درصد و زمان تحرک اسپرم پس از رقیق سازی و انجماد با متانول و اسپرم تازه

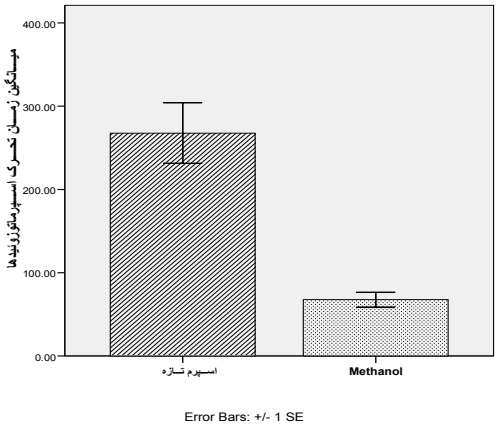
فاکتورهای اندازه گیری	اسپرم تازه	متانول (میانگین غلظت های مختلف)
میانگین زمان تحرک اسپرم (ثانیه)	۲۶۷/۶۹ ± ۳۶/۳۱ [b]	۶۷/۶۶ ± ۸/۹۸ [a]
میانگین درصد تحرک اسپرم(٪)	۷۲/۹۷ ± ۵/۲۳ [b]	۳/۹۴ ± ۰/۵۱ [a]

با توجه به آزمون تجزیه واریانس یکطرفه ANOVA بین متانول و اسپرم تازه از نظر میانگین زمان و درصد تحرک اسپرم اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد ($P<$ ۰/۰۱) (نمودار ۱).

آزمون دانکن نیز نشان می‌دهد که از نظر زمان و درصد تحرک اسپرم، متانول و اسپرم تازه هرکدام در یک گروه مجزا قرار داشته و با هم اختلاف معنی‌دار آماری دارند (P< ۰/۰۱) (نمودار ۲).



نمودار ۱: میانگین درصد تحرک اسپرم پس از رقیق سازی با متانول و اسپرم تازه



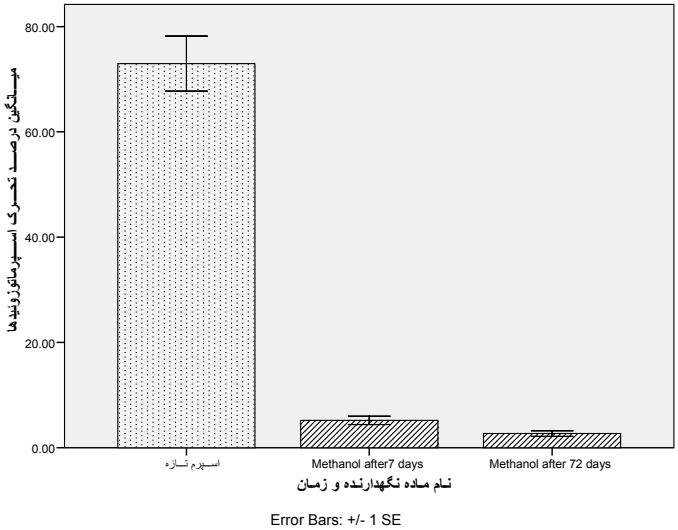
نمودار ۲: میانگین زمان تحرک اسپرم پس از رقیق سازی با متانول و اسپرم تازه

جدول ۳: میانگین درصد و زمان تحرک اسپرم بین متانول (طی نگهداری به مدت ۷ و ۷۲ روز در ازت مایع) و اسپرم تازه

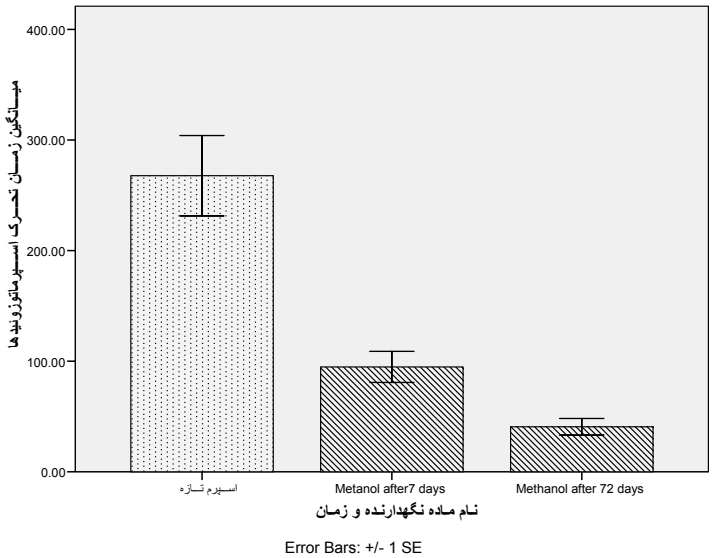
ماده نگهدارنده	زمان نگهداری	زمان تحرک (ثانیه)	درصد تحرک(٪)
متانول	۷ روز	۹۴/۷۰ ± ۱۴/۰۳ [a]	۵/۱۹ ± ۰/۸۰ [a]
	۷۲ روز	۴۰/۶۲ ± ۷/۵۶ [a]	۲/۶۹ ± ۰/۵۲ [a]
اسپرم تازه	-	۲۶۷/۶۹ ±۳۶/۳۱ [b]	۷۲/۹۷ ±۵/۲۳ [b]

با توجه به آزمون تجزیه واریانس یکطرفه ANOVA نتیجه می‌گیریم که بین متانول طی نگهداری به مدت ۷ و ۷۲ روز در ازت مایع و اسپرم تازه از نظر میانگین زمان و درصد تحرک اسپرم اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد (P<۰/۰۱) (نمودار ۳).

آزمون دانکن نشان می‌دهد که از نظر زمان و درصد تحرک اسپرم، متانول ۷ روز و ۷۲ روز در یک گروه و اسپرم تازه نیز در یک گروه دیگر قرار داشته و با هم اختلاف معنی‌دار آماری دارند (P<۰/۰۱) (نمودار ۴).



نمودار ۳: میانگین درصد تحرک اسپرم بین متانول (طی نگهداری به مدت ۷ و ۷۲ روز در ازت مایع) و اسپرم تازه



نمودار ۴: میانگین زمان تحرک اسپرم بین متانول (طی نگهداری به مدت ۷ و ۷۲ روز در ازت مایع) و اسپرم تازه

جدول ۴: میانگین درصد و زمان تحرک اسپرماتوزوئیدها در تیمارهای مختلف

ردیف	زمان نگهداری	درصد	زمان تحرک (ثانیه)	درصد تحرک(٪)
متانول	۷ روز	۸	۱۰۲/۳۰ ±۳۹/۱۴ [ab]	۷/۰۰ ±۲/۱۵ [a]
		۱۰	۹۱/۰۰ ±۲۱/۴۰ [ab]	۴/۷۵ ±۱/۲۷ [a]
		۱۲	۸۵/۵۰ ±۱۸/۲۲ [ab]	۳/۵۰ ±۰/۶۱ [a]
		۱۵	۱۰۰/۰۰ ±۳۷/۰۸ [ab]	۵/۵۰ ±۱/۹۶ [a]
	۷۲ روز	۸	۲۳/۰۰ ±۹/۶۰ [a]	۱/۲۵ ±۰/۵۶ [a]
		۱۰	۳۷/۵۰ ±۱۵/۱۶ [a]	۲/۷۵ ±۱/۲۷ [a]
		۱۲	۴۹/۵۰ ±۱۸/۶۸ [a]	۳/۵۰ ±۱/۰۷ [a]
		۱۵	۵۲/۵۰ ±۱۶/۷۱ [a]	۳/۲۵ ±۱/۱۶ [a]
اسپرم تازه	–		۲۶۷/۶۹ ±۳۶/۳۱ [c]	۷۲/۹۷ ±۵/۲۳ [b]

اسپرم رقیق‌سازی شده با متانول در غلظت‌های ۸، ۱۰، ۱۲و ۱۵٪ پس از نگهداری در ۷ روز و ۷۲ روز و اسپرم تازه از نظر میانگین زمان و درصد تحرک اسپرم اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد (P<۰/۰۱).

آزمون دانکن نشان می‌دهد که از نظر زمان تحرک اسپرم، اسپرم رقیق‌سازی شده با متانول در غلظت ۸ و ۱۰٪ پس از ۷۲ روز نگهداری در یک گروه، اسپرم رقیق‌سازی شده با متانول در غلظت‌های ۱۲ و ۱۵٪ پس از ۷۲ روز نگهداری در یک گروه، اسپرم رقیق‌سازی شده با متانول در غلظت‌های ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۵٪ پس از ۷ روز نگهداری در یک گروه و اسپرم تازه در یک گروه دیگر قرار داشته و این گروه‌ها با هم اختلاف معنی‌دار آماری دارند (P<۰/۰۱).

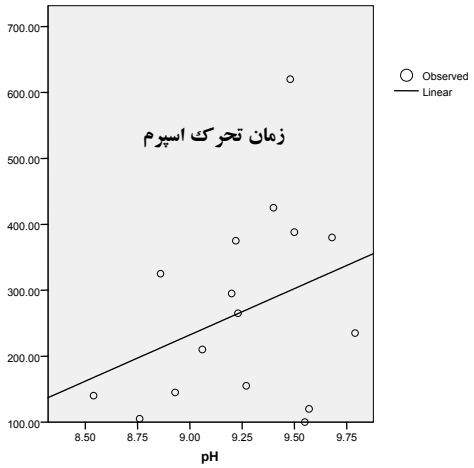
آزمون دانکن نشان می‌دهد که از نظر درصد تحرک اسپرم، متانول ۸ و ۱۰٪ پس از ۷ روز نگهداری در یک گروه، متانول ۱۲ و ۱۵٪ پس از ۷۲ روز و متانول ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۵٪ پس از ۷۲ روز نگهداری در یک گروه و اسپرم تازه نیز در یک گروه دیگر قرار داشته و این گروه‌ها با هم اختلاف معنی‌دار آماری دارند (P<۰/۰۱).

با توجه به آزمون تجزیه واریانس یکطرفه ANOVA بین متانول و غلظت‌های ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۵٪ از نظر میانگین زمان و درصد تحرک اسپرم اختلاف معنی‌دار آماری وجود ندارد (P>۰/۰۵).

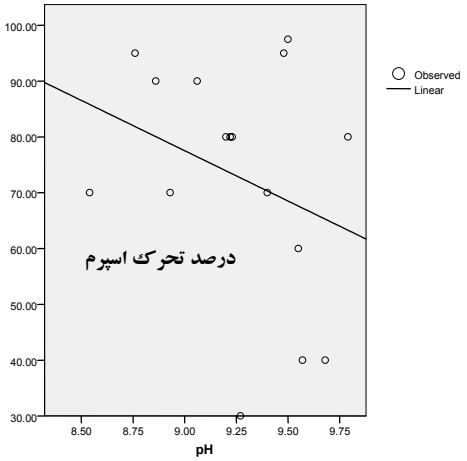
آزمون دانکن نشان می‌دهد که از نظر زمان و درصد تحرک اسپرم، متانول با درصدهای ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ در یک گروه دیگر قرار داشته و با هم اختلاف معنی‌دار آماری ندارند (P>۰/۰۵).

ضریب همبستگی پیرسون بین pH و زمان تحرک اسپرم برابر با r = ۰/۳۳۹ می‌باشد که با توجه به مقدار (P =۰/۱۹۹) این ضریب همبستگی در سطح فراتر از ۱۹/۹ درصد معنی‌دار می‌باشد (در سطح ۰/۰۱ و ۰/۰۵ معنی‌دار نیست) (شکل ۱).

ضریب همبستگی پیرسون بین pH و درصد تحرک اسپرم برابر با r = -۰/۳۰۲ می‌باشد که با توجه به مقدار (P =۰/۲۵۶) این ضریب همبستگی در سطح فراتر از ۲۵/۶ درصد معنی‌دار می‌باشد (در سطح ۰/۰۱ و ۰/۰۵ معنی‌دار نیست) (شکل ۲).



شکل ۱: همبستگی و ارتباط رگرسیونی بین pH و زمان تحرک اسپرماتوزوئیدها



شکل ۲: همبستگی و ارتباط رگرسیونی بین pH و درصد تحرک اسپرماتوزوئیدها

بحث

در شرایط عادی طول عمر اسپرم تاسماهیان بسیار کوتاه است و حداکثر زمان توانایی باروری اسپرم در دمای معمولی محیط، ۶-۵ ساعت بعد از استحصال آن از مولد نر است (۱). در حالی‌که با روش انجماد و با استفاده از رقیق‌کننده‌ها و مواد محافظ سرمای مناسب می‌توان این اسپرم را حداقل به مدت چندین سال در ازت مایع نگاهداشت. معیارهای مختلف زیادی بر روی آزمایش موفقیت انجماد و انجمادزدایی در اسپرم ماهیان استفاده شده است. این معیارها بر روی آسیب سلولی (تغییر مورفولوژی و اندامک‌های داخل سلولی)، تحرک و ظرفیت بارورسازی پایه‌ریزی شده‌اند. برای کارایی بیشتر، مطالعات باید بر روی 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 (۱۰). 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.

متانول ماده محافظ سرمای موثری در انجماد اسپرم ماهیان خاویاری (۱۶) و ماهی پارو پوزه (۲۴) تشخیص داده شده است

با توجه به مطالب ذکر شده در بخش نتایج، به طور کلی میانگین درصد و زمان تحرک در اسپرم گونه تاسماهی ایرانی با متانول پس از انجمادزدایی به ترتیب ۰/۵۱± ۳/۹۴ درصد و ۸/۹۸± ۶۷/۶۶ ثانیه بوده که در مقایسه با اسپرم تازه (به ترتیب۵/۲۳±۷۲/۹۷ درصد و ۳۶/۳۱±۲۶۷/۶۹ ثانیه) از نظر درصد و زمان تحرک اسپرم کاهش چشمگیری داشته است. همچنین در آزمایشی که بر روی تأثیر مدت زمان نگهداری اسپرم در ازت مایع بر روی درصد و زمان تحرک اسپرم منجمد شده انجام گرفت، میانگین درصد و زمان تحرک در نمونه‌های اسپرمی که توسط متانول منجمد شده و به مدت ۷ روز در ازت مایع نگهداری شده بودند به ترتیب ۰/۸۰±۵/۱۹ درصد و ۱۴/۰۳±۹۴/۷۰ ثانیه محاسبه شد. همچنین میانگین درصد و زمان

تحرک در نمونه‌های اسپرمی منجمد شده توسط متانول پس از ۷۲ روز نگهداری در ازت مایع به ترتیب ۲/۶۹±۰/۵۲ درصد و ۴۰/۶۲± ۷/۵۶ ثانیه اندازه‌گیری شد. نتایج به دست آمده بیان کننده یک روند کاهشی است که نشان می‌دهد افزایش زمان نگهداری اسپرم‌های منجمد شده بر روی کیفیت آن‌ها از ۷ روز تا ۷۲ روز تأثیر منفی دارد.

جهت تعیین غلظت مناسب از ماده محافظ سرمای انتخاب شده در انجماد اسپرم تاسماهی ایرانی، متانول در چهار غلظت متفاوت شامل ۸ ، ۱۰، ۱۲و ۱۵٪ مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین درصد و زمان تحرک با متانول ۸٪ به ترتیب ۷/۰۰±۲/۱۵ درصد و ۱۰۲/۳۰± ۳۹/۱۴ ثانیه پس از ۷ روز نگهداری در ازت مایع و کمترین میزان آن با متانول ۸٪ به ترتیب ۱/۲۵±۰/۵۶ درصد و ۲۳/۰۰±۹/۶۰ ثانیه پس از ۷۲ روز نگهداری در ازت مایع به دست آمد. اگرچه اختلاف معنی‌دار آماری در بین مقادیر به دست آمده در بین غلظت‌های منتخب وجود نداشت (P>۰/۰۵) اما در این بررسی متانول با غلظت ۱۵٪ نتایج بهتری را نشان داده است. Glogowski و همکاران (۱۶) متانول ۱۰٪ را در انجماد اسپرم تاسماهی سیبری (*Acipenser baeri*) مناسب اعلام کردند. با مطالعه Linhart و همکاران (۲۲) بر روی انجماد اسپرم ماهی پارو پوزه (*Polyodon spathula*)، این گروه متانول (۸٪ یا ۱۰٪) را به همراه مواد رقیق‌کننده برای نگهداری کیفیت خوب اسپرم پس از انجمادزدایی مفید گزارش دادند. همچنین Horvath و همکاران (۱۸) متانول ۱۰٪ را در انجماد اسپرم ماهی پاروپوزه مناسب تشخیص دادند. علت اختلاف در غلظت مناسب از متانول در نتایج ذکر شده با نتایج به دست آمده در این تحقیق را می‌توان نوع گونه انتخاب شده، اختلاف در محلول‌های رقیق‌کننده به کار برده شده و همچنین ویژگی‌های خاص مایع منی این گونه عنوان کرد. بدین ترتیب افزایش غلظت متانول 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. متانول به عنوان ماده محافظ در سرما باعث نگهداری و حفظ کیفیت اسپرم (تحرک اسپرماتوزوئید) تاسماهی ایرانی پس از انجماد می‌شود اما میزان تحرک به دست آمده در این بررسی برای باروری تخمک‌ها مناسب تشخیص داده نشد که با توجه به دلایل ذکر شده نیاز به مطالعات بیشتری در این زمینه می‌باشد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از مسئولین محترم انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان و همچنین از همکاری کارشناسان مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی سپاسگزاری می نمائیم.

منابع

۱. آذری تاکامی، ق. و کهنه شهری، 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. صفحات۲۳ تا ۲۸.

۳. تقوی مطلق، ا.، ۱۳۷۷. ترکیب سنی و پیش بینی مقدار اپتیمم صید برای چهار گونه ماهیان خاویاری ازون برون، فیلماهی، قره برون و چالباش، اولین سمپوزیوم ملی ماهیان خاویاری، ۲۵-۲۴ آذر ۱۳۷۷، رشت، خلاصه مقالات صفحه ۱.

۴. عابدی، م.، ۱۳۷۵. بررسی امکان انجماد اسپرم در ماهیان خاویاری. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، ۹۵ صفحه.

۵. مقیم، م. و فضلی، ح.، ۱۳۷۷. بررسی وضعیت کنونی ذخایر ماهیان خاویاری در سواحل جنوبی دریای خزر. اولین سمپوزیوم ملی ماهیان خاویاری، ۲۵-۲۴ آذر ۱۳۷۷، رشت، خلاصه مقالات صفحه ۲.

۶. هاشمی، م.، ۱۳۷۵. تلقیح مصنوعی در گاو (فیزیولوژی تولید مثل و تلقیح مصنوعی)، انتشارات فرهنگ جامع، چاپ دوم، ۳۰۲ صفحه.

7. 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). Pitman Medical, Tunbridge Wells, pp. 19-44.
8. Billard, R.; Cosson, J.; Perchee, G. and Linhart, O.; 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. Aquaculture, 129: 95-112.
9. Billard, R.; Tsvetkova, L.I.; Cosson, J. and 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.
10. 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.
11. Billard, R.; Cosson Noveiri, S.B. and Pourkazemi, M., 2004. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. Aquaculture, 236: 1-9.
12. Blesbois, E. and Labbe, C., 2003. Main improvement in semen and embryo cryopreservation for fish and fowl. In: Workshop on cryopreservation of animal genetic resource in Europe (Eds: Planchenault D.), Paris, pp 55-56.
13. Cherepanov, V.V. and Kopeika, E.F., 1999. Cryopreservation and low temperature storage of sturgeon sperm. J. Appl. Ichthyol. 15(4-5): 310-311.
14. Cosson, J.; Billard, R.; Dreanno, C.; Suquet, M. and Cibert, C., 1999. Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors. In the Mail Gamete from Basic Knowledege to Clinical Applications pp. Vienna, U.S.A. 161-186.
15. Drokin, S.I. and Kopeika, E.F. 1997. Cryopreservation and phospholipid content of spermatozoa of some sturgeon sppecies. J. Appl. Ichthyol. Vol. 15, pp. 311.
16. 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*, Brandt) milt cryopreserved with methanol. J. Aquaculture, 211: 367-373.
17. Horvath, A. and Urbanyi, B., 2000. Cryopreservation of starlet (*Acipenser ruthenus*) sperm. Proc. 6th Intern. Symp. Reprod. Physiol. Fish, Bergen, p. 441.
18. Horvath, 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 cryopresevation of two North-American sturgeon species. J. Aquaculture, 247: 243-251.
19. Horvath, A., 2006. Improved Cryopreservation of Sperm of Paddkefish (*Polyodon spathula*). J. World Aquaculture Society, Vol. 37, No. 4, pp. 356-362.
20. Kopieka, E.F.; Williot, P. and 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.

21. Linhart, O.; Mims, S.D. and Shelton, W.L., 1995. Motility of spermatozoa from shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platoryneclus* Rafinesque 1820) and paddlefish (*Polyodon spathulla* Walbaum, 1797). J. Fish Biol.Vol. 97, pp. 902-909.
22. 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*) frozen-thowed spermatozoa. J. Appl. Ichthyol. 22 (suppl .1), 389-394.
23. Liu, L.; Wei, Q.; Guo, F. and Zhang, T. 2006. Cryopreservation of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) sperm. . Appl. Ichthyol. 22, 384-388.
24. Mims, S.D.; Tsvetkova., L.I.; Brown, G.G. and Gomelsky, B.I., 2000. Cryopreservation of sperm of sturgeon and paddlefish. In: Tiersch, T.r., Mazik, P.M. (Eds), Cryopreservation in Aquatic Species. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA. pp. 123-129.
25. Park, C. and Chapman, F.A., 2005. An extender solution for the short-term storage of sturgeon semen. North Am. J. Aquaculture, 67: 52-57.
26. Tsvetkova, K.I.; Cosson, J.; Linhart, O. and Billard, R., 1996. Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thowed spermatozoa in sturgeon, *Acipenser baeri* and *A. ruthenus*. J. Appl. Ichthyol, 12: 107-112.
27. Williot, P.; Kopeika, E.F. and 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.