

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور - انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان

عنوان :

ایجاد بانک اسپرم از مولدین ماهیان خاویاری
حاشیه جنوبی دریای خزر

مجری :

شهر روز برادران نویری

شماره ثبت

۴۰۶۰۷

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور - انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان

عنوان پروژه : ایجاد بانک اسپرم از مولدین ماهیان خاویاری حاشیه جنوبی دریای خزر
شماره مصوب : ۴-۸۶-۱۲-۸۸۰۸۵
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : شهروز برادران نویری
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : شهروز برادران نویری
نام و نام خانوادگی همکاران : علیرضا علیپور ، محمد پوردهقانی، فریدون چکمه دوز قاسمی ، محمود محسنی ، علی
حلاجیان
نام و نام خانوادگی مشاوران : محمد پورکاظمی
نام و نام خانوادگی ناظر : -
محل اجرا : استان گیلان
تاریخ شروع : ۸۸/۱۱/۱
مدت اجرا : ۱ سال و ۱ ماه
ناشر : مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
شمارگان (تیراژ) : ۲۰ نسخه
تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۱
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری»

پروژه : ایجاد بانک اسپرم از مولدین ماهیان خاویاری حاشیه جنوبی دریای خزر

مصوب : ۴-۸۶-۱۲-۸۸۰۸۵

تاریخ : ۹۱/۱/۲۹

شماره ثبت (فروست) : ۴۰۶۰۷

با مسئولیت اجرایی جناب آقای شهروز برادران نویری دارای مدرک تحصیلی

کارشناسی ارشد در رشته بیولوژی دریا می باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش اصلاح نژاد و تکثیر و پرورش آبزیان در

تاریخ ۹۰/۸/۱۱ مورد ارزیابی و با نمره ۱۸ و رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد پژوهشکده مرکز ایستگاه

با سمت مسئول آزمایشگاه انجماد اسپرم انستیتو و معاون بخش ژنتیک انستیتو تحقیقات

بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان مشغول بوده است.

به نام خدا

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه
چکیده.....		۱
۱- مقدمه.....		۳
۱-۱- مروری بر خصوصیات کلی تاسماهیان.....		۶
۱-۲- خصوصیات اسپرم در ماهیان خاویاری.....		۷
۱-۳- تکنیک انجماد اسپرم و قابلیت های آن.....		۷
۱-۴- سوابق تحقیق در خارج کشور با تاکید بر نتایج آن ها.....		۸
۱-۵- سوابق تحقیق در داخل کشور با تاکید بر نتایج آن ها.....		۱۰
۱-۶- اهداف پروژه.....		۱۱
۲- مواد و روش ها.....		۱۲
۲-۱- زمان و مکان انجام کار.....		۱۲
۲-۲- مولدین.....		۱۴
۲-۳- تزریقات هورمون.....		۱۴
۲-۴- ارزیابی اسپرمهای استحصالی.....		۱۵
۲-۵- خصوصیات رقیق کننده.....		۱۷
۲-۶- شدت سرمادهی.....		۱۸
۲-۷- انجماد زدائی و لقاح.....		۲۱
۲-۸- بررسی های آماری.....		۲۵
۳- نتایج.....		۲۶
۴- بحث.....		۳۰
منابع.....		۳۹
چکیده انگلیسی.....		۴۴

چکیده

ذخایر با ارزش ماهیان خاویاری دریای خزر در دو دهه اخیر کاهش چشمگیری یافته است. این کاهش صید به تبع خود کاهش دسترسی به مولدین مناسب جهت استحصال مواد تناسلی را بدنبال داشته است. این پروژه به منظور جمع آوری اسپرم های مازاد مصرف مولدین ماهیان خاویاری جنوب دریای خزر، انجماد و نگهداری طولانی مدت آنها جهت استفاده های بعدی، پیشنهاد و مورد تصویب قرار گرفت.

در مدت نمونه برداری طی دو فصل تکثیر سالهای ۸۶-۱۳۸۵، بررسی های کمی و کیفی بر روی اسپرم ۲۵ مولد تاسماهی ایرانی، ۴ مولد ازون برون، ۳ مولد فیلماهی و ۲ مولد شیپ (کلاً ۳۴ مولد) صورت گرفت. از بین این مولدین، اسپرم ۱۸ مولد شامل ۱۲ عدد تاسماهی ایرانی، ۴ عدد ازون برون، ۱ عدد فیلماهی و ۱ عدد تاسماهی شیپ که کیفیت مناسبی داشتند انتخاب و منجمد شدند.

پس از رقیق سازی نمونه ها با رقیق کننده مخصوص اسپرم ماهیان خاویاری (شامل ۱۱۸ mM تریس، ۲۳/۴ mM ساکارز، ۱۵٪ DMSO) به نسبت ۱:۱، مخلوط اسپرم/ رقیق کننده با دستگاههای خاص این کار به نی های انجماد ۰/۵ میلی لیتری انتقال داده شده و طبق برنامه سرمادهی چند مرحله ای منجمد شده و وارد فاز ازت مایع گردیدند. نمونه ها جهت ارزیابی های بعدی و لقاح آزمایشی در حمام آب گرم ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه انجمادزدایی شدند.

طی اجرای این پروژه ۱۰۱۰ میلی لیتر از اسپرم تاسماهی ایرانی، ۱۱۰ میلی لیتر اسپرم ماهی شیپ، ۹۰ میلی لیتر اسپرم ازون برون و ۸۰ میلی لیتر اسپرم فیلماهی منجمد و نگهداری شد. میزان کاهش تحرک اسپرمهای منجمد شده در مقایسه با نمونه های تازه بین ۱۰ تا ۵۲/۵ درصد متفاوت بود، اما این کاهش تحرک پس از وارد شدن به فاز ازت مایع در تمامی نمونه ها پس از ۷ ماه تفاوت معنی داری را با اولین لحظه ورود به ازت مایع نشان نداده است ($P < 0/005$).

بررسی نمونه های اسپرم مولدین تاسماهی ایرانی صید شده در رودخانه سفیدرود نشان داد که تراکم اسپرم در نمونه های رودخانه ای بطور معنی داری بیشتر از تراکم اسپرم مولدین غیر رودخانه ای این گونه است ($P < 0/005$). همچنین مقایسه کاهش میزان تحرک اسپرم انجمادزدایی شده ماهی ازون برون نسبت به اسپرم

انجمادزدایی شده تاسماهی ایرانی نشان می دهد که اسپرم ازون برون نسبت به تحمل شرایط انجماد تحمل بیشتری دارد.

لقاح آزمایشی تخم تازه با اسپرم منجمد ازون برون و تاسماهی ایرانی به ترتیب ۲۷/۴٪ و ۵۸/۲٪ (پس از ۴ ساعت) را نشان داد.

کلمات کلیدی: انجماد اسپرم، درصد تحرک، بانک اسپرم، ماهیان خاویاری، دریای خزر

۱- مقدمه

افزایش چشمگیر و رو به رشد جمعیت جهان، ضرورت تولید غذای بیشتر و سالم تر و همچنین بهره برداری بهینه و دراز مدت از منابع زیستی موجود را دو چندان کرده است. این موضوع از دو دیدگاه برنامه ریزی جهت مدیریت منابع و جستجو و ارایه راهکارهای فنی نوین، مطابق با جغرافیای زیستی هر کشور، قابل بررسی است. بر کسی پوشیده نیست که ذخایر با ارزش ماهیان خاویاری در جهان، از جمله دریای خزر، بشدت در حال کاهش می باشد (پورکاظمی، ۱۳۷۶؛ Ivanov & Vlasenko, 2001). این امر به دلیل اثر فعالیت های مختلف انسانی در چند دهه اخیر شتاب بیشتری گرفته است (برادران نویری، ۱۳۸۰؛ Lahnsteiner et al., 2004). از جمله این عوامل تاثیر گذار می توان به تخریب بستر رودخانه های محل زیست و تخمیزی طبیعی این ماهیان (پورکاظمی، ۱۳۷۶؛ Billard & Lecointre, 2001)، سد سازی بر روی رودخانه ها (Chebanov & Billard, 2004؛ Lenhardt et al., 2001)، صید بی رویه و نظارت کم رنگ بر آن (رضوانی گیل کلایی، ۱۳۷۷)، افزایش بار آلاینده ها به دریا (Williot et al., 2002) همزمان با افزایش تقاضای مصرف در بازار جهانی (Chebanov & Billard, 2001) اشاره نمود.

آمار صید حاکی از آن است که میزان صید قانونی ماهیان خاویاری در دریای خزر از ۲۸۵۰۰ تن در سال ۱۹۸۵ به ۱۳۴۵ تن در سال ۲۰۰۵ کاهش یافته است (Pourkazemi, 2006). چنین کاهش صیدی را می توان در آبهای سایر کشورها نیز مشاهده نمود (Holcik et al., 2006). به همین علت، کلیه گونه های ماهیان خاویاری که محل زیست طبیعی آنها در دریای خزر و حوضه آبریز اطراف آن می باشد، در فهرست ماهیان در معرض خطر سازمان^۱ IUCN قرار دارند (IUCN, 2007). همچنین اسامی این ماهیان از سال ۱۹۹۷ میلادی در فهرست های مختلف کنوانسیون بین المللی نظارت بر تجارت گونه های در معرض خطر^۲ CITES قرار گرفته است (Ivanov & Vlasenko, 2001 ; Raymarkers, 2002).

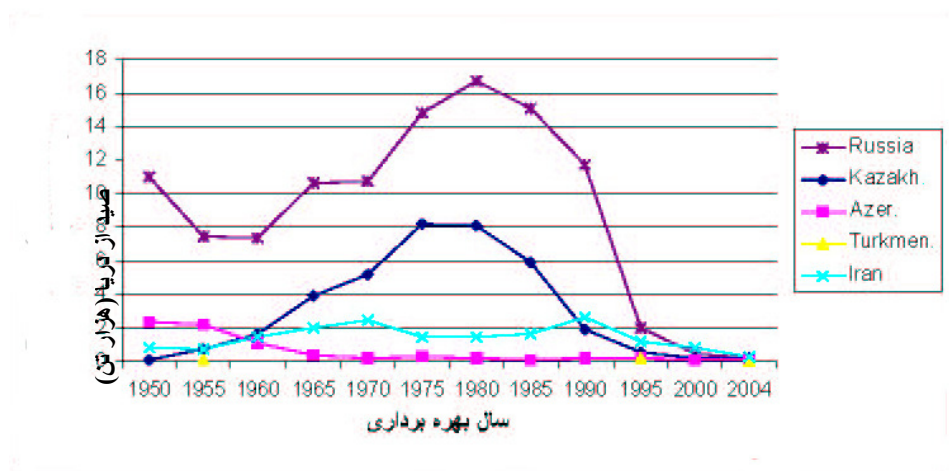
بررسی آمار صید ماهیان خاویاری در سواحل ایران نیز نشان می دهد که در سال های اخیر تا حدی وضعیت ذخایر تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) امیدوار کننده بوده و ذخایر سایر گونه ها، با کاهش فوق العاده ای

¹. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources

². Convention on International Trading in Endangered Species of Wild Fauna and Flora

مواجهه شده است (مقیم و فضلی، ۱۳۷۷؛ تقوی مطلق، ۱۳۷۷). این موضوع با توجه به نتایج حاصل از گشت ارزیابی ذخایر ماهیان خاویاری طی سالهای ۸۴-۱۳۸۳ نیز تایید شده است. علیرغم آنکه کاهش صید کلیه گونه های ماهیان خاویاری قابل صید در حوضه خزر در این مطالعه در ترکیب گونه ای نمونه برداری شده کاملاً مشخص است، اما نتایج نشان می دهد که همچنان غالبیت گونه ای در نمونه های صید شده با تاسماهی ایرانی است. بطوری که در آبهای ایران در تابستان بیش از ۸۰ درصد و در زمستان بیش از ۶۰ درصد صید را تاسماهی ایرانی تشکیل داده است. نتایج حاصل از گشت ارزیابی ذخایر در خزر شمالی و خزر میانی نیز موید آن است که در همین سالها تاسماهی ایرانی ۷۱/۵-۸۶/۵ درصد (تابستان- زمستان) صید این مناطق را تشکیل داده است (توکلی، ۱۳۸۶).

آمار مقایسه ای صید ماهیان خاویاری در حوضه دریای خزر، به تفکیک کشورهای حاشیه این دریا طی سالهای مختلف در نمودار شماره ۱ آمده است.



نمودار ۱: آمار مقایسه ای صید ماهیان خاویاری دریای خزر در سالهای ۲۰۰۴-۱۹۵۰ به تفکیک کشورهای حاشیه (Pourkazemi, 2006)

از ۲۷ گونه ماهیان خاویاری حال حاضر جهان (۲۵ گونه تاسماهی و ۲ گونه پاروپوزه) (بهمنی، ۱۳۷۷؛ Raymarkers, 2002)، تاکنون با تلاش محققین مختلف کشورهای گوناگون، ۱۹ گونه با موفقیت مورد تکثیر مصنوعی قرار گرفته اند

(Bauer, 1997). از این میان، تعدادی با توجه به تحمل کمبود اکسیژن، سرعت رشد بالاتر و رسیدگی جنسی زودتر (Williot *et al.*, 2005) مورد توجه آبی پروران قرار دارند (Birstein, 1993).

کاهش میزان صید مولدین ماهیان خاویاری دریای خزر (فیلماهی، ازون برون، شیپ، تاسماهی ایرانی و تاسماهی روسی) 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 می شود. از طرف دیگر این کاهش صید سبب شده که در فصل تکثیر، از توان تکثیر تعداد مولدین معدودی استفاده شود که این امر خطر کاهش تنوع ژنی این ماهیان را در آینده به دنبال دارد (Blesbois & Labbe, 2003).

در طول فصل تکثیر، عمدتاً تعداد مولدین نر صید شده بیشتر از تعدادی است که برای پوشش دادن لقاح تخمکهای استحصالی از مولدین ماده صید شده لازم است و در نتیجه پتانسیل اسپرم دهی تعدادی از مولدین نر از دست می رود. از طرف دیگر گاهی با وجود مولدین نر مناسب، مولد ماده مناسب در مراکز تکثیر وجود نداشته و بدین ترتیب امکان استفاده از اسپرم مولدین موجود نیز کاهش می یابد. همچنین در پاره ای از موارد با وجود آمادگی مولدین ماده جهت تخم دهی، مولد نر با کیفیت جهت استحصال اسپرم و انجام عملیات لقاح وجود ندارد. در این پروژه در نظر است ضمن ایجاد یک مرکز نگهداری طولانی مدت اسپرم ماهیان خاویاری، از اسپرم با کیفیت و مازاد مصرف مولدین بصورت منجمد نگهداری شده و در مواقع لازم، جهت تامین احتمالی اسپرم مورد نیاز مراکز تکثیر مصنوعی این ماهیان، در اختیار آنان قرار گیرد. این پروژه، جزو پروژه های مصوب برنامه بین المللی محیط زیست دریای خزر (CEP) بوده که از بین ۳۱ پروژه ارایه شده برای سال ۲۰۰۶ مورد تصویب قرار گرفته و بصورت مشترک با موسسه تحقیقات شیلات ایران (IFRO) به مرحله اجرا در آمده است.

۱-۱: مروری بر خصوصیات کلی تاسماهیان

خانواده تاسماهیان (Acipenseridae) به راسته بزرگتری از ماهیان بسیار قدیمی کره زمین به نام تاسماهی شکلان (Acipenseriformes) تعلق دارند که قدمت آنها به بیش از ۲۰۰ میلیون سال پیش می رسد (کیوان، ۱۳۸۲). بدن این ماهیان کشیده و دوکی شکل بوده و از پنج ردیف پلاکهای استخوانی طولی (۲ ردیف پلاکهای جانبی، ۲ ردیف پلاکهای شکمی و ۱ ردیف پلاکهای پشتی) پوشیده شده است. در بین این ردیفها معمولاً برجستگیهای استخوانی پوستی نامنظم نیز دیده می شود (Sokolov & Berdichevskii, 1989). این ماهیان دارای یک عدد باله پشتی بوده و باله دمی در این ماهیان شکافدار و دو قسمتی بوده و بخش بالایی آن حجیم تر و طولیتر از بخش پایینی (heterocercal) است. گاهی فلسهای لوزی شکل گانوبید هم بر روی دم دیده می شود (آذری تاکامی و کهنه شهری، ۱۳۵۳). سر، پوشیده از پلاکهای استخوانی با منشا پوستی است و دهان شکمی، عرضی و استوانه ای بوده و می تواند به صورت قابل جهش به طرف جلو حرکت کند. در زیر دهان، ۴ سیلیک بصورت عرضی قرار دارند که در جستجوی غذا و سنجش ترکیبات شیمیایی بکار رفته و از نظر کلید شناسایی نیز اهمیت دارند. طول بدن این گروه از ماهیان از یک متر تا بیش از ۶ متر گزارش شده است (Holcik, 1989).

این ماهیان عمدتاً مهاجر بوده و جهت تخم‌ریزی و تولید مثل از دریا به رودخانه‌ها مهاجرت می نمایند و پس از تخم‌ریزی مجدداً به دریا بر می گردند (کیوان، ۱۳۸۲). تغذیه تاسماهیان از موجودات کفزی و سخت پوستان و سایر ماهی‌ها بوده و در اعماق ۱۵۰-۱۰۰ متری زیست می نمایند. از نظر پراکنش طبیعی مختص نیمکره شمالی بوده و در شمال و شرق آسیا، آمریکای شمالی و اروپا پراکنده اند (Birstein & DeSalle, 1998). اخیراً به منظور فعالیت های آبرزی پروری، توسط انسان به آبگیرهای سایر مناطق جهان نیز گسترش پیدا کرده اند. عمر گونه های مختلف این ماهیان بطور معمول بین ۱۰۰-۸ سال گزارش شده و سن بلوغ جنسی با توجه به گونه های مختلف در گونه ها و زیستگاههای مختلف ۲۰-۷ سال در نظر گرفته می شود (Holcik, 1989). از مجموع ۲۷ گونه از ماهیان خاویاری جهان، شش گونه در دریای خزر و حوضه ولگا زندگی می کنند که تا دو دهه قبل بیش از ۹۰ درصد خاویار جهان را تولید می کردند (Holcik, 1989).

۲-۱: خصوصیات اسپرم در ماهیان خاویاری

اسپرم ماهیان خاویاری همچون اسپرم ماهیان استخوانی (teleosts) در مایع منی بی تحرک بوده و پس از تماس با آب یا سایر فعال کننده ها تحرک خود را آغاز کرده و سرعت رو به جلو حرکت می کند (Linhart *et al.*, 1995; Alavi *et al.*, 2004). اما تفاوت های زیادی همچون وجود آکروزوم (Dettlaff *et al.*, 1993; Ciereszko *et al.*, 1996)، هسته کشیده و قطعه میانی با میتوکندری های زیاد (Cherr & Clark, 1984)، مدت زمان نسبتاً زیاد تحرک آنها (Cosson *et al.*, 2000; Linhart *et al.*, 2006) و تفاوت در محتوای بیوشیمیایی مایع منی (Piros *et al.*, 2002) بین خصوصیات مورفومتریک و فیزیولوژیک اسپرم ماهیان خاویاری با اسپرم انواع ماهیان استخوانی دیده می شود. حجم اسپرم دهی این ماهیان نیز در مقایسه با مولدین ماهیان استخوانی، بسیار بیشتر است. برای مثال اسپرم دهی ۲۰۰ ml برای ماهی ازون برون، ۵۰۰ ml برای تاسماهی ایرانی و بیش از ۱۰۰۰ ml برای فیلماهی گزارش شده است (Dettlaff *et al.*, 1993). تعداد اسپرماتوزوای تولید و آزاد شده توسط مولدین نر در ماهیان خاویاری بسیار بیشتر از تخمک های آزاد شده توسط مولدین ماده آنهاست.

پس از القای تحرک اولیه، این اسپرم ها با صرف انرژی ذخیره شده درون سلول، کاهش تحرک پیدا کرده و نوع حرکت آنها بشکل حرکت دورانی، نامنظم و سپس حرکت درجا تغییر می یابد (نظری و همکاران، ۱۳۸۵). قابلیت حفظ قدرت تحرک در اسپرم ماهیان خاویاری نسبت به مدت زمان تحرک در اسپرم ماهیان استخوانی از جمله مولدین کپورماهیان و آزادماهیان که در حد ۳-۱ دقیقه است، به مراتب بیشتر است (Dettlaff *et al.*, 1993).

۳-۱: تکنیک انجماد اسپرم و قابلیت های آن

در رابطه با حفظ و نگهداری اسپرم، روش های مختلفی توسط محققین مختلف ارائه شده است. میزان موفقیت هر یک از روشها، بر اساس نوع گونه مورد نظر و تنوع روشهای مورد استفاده همچون محلولهای رقیق کننده متنوع، نسبت های رقت، نوع و مقدار مواد محافظ سرما، شدت سرمادهی و مدت زمان و شرایط نگهداری در ازت مایع بسیار متنوع است (Stoss, 1983). صرف نظر از نتایج بدست آمده، این روش قابلیت های بالقوه متنوعی را در

اختیار پرورش دهندگان آبزیان از یک طرف و مدیران ذخایر شیلاتی دنیا از طرف دیگر قرار می دهد که برخی از مهمترین کاربردهای آن را می توان بشرح ذیل عنوان کرد:

- کمک به جلوگیری از انقراض نسل انواع گونه های در معرض خطر (Endangered species) و نژادهایی از آبزیان که نگهداری خزانه ژنی آنها از نظر جمعیتی و تکاملی اهمیت دارند (Cosson *et al.*, 1995).
- کمک به تکثیر گونه هایی که رسیدگی جنسی همزمان مولدین در آنها کمتر دیده می شود و یا در طول فصل تکثیر کیفیت مولدین وحشی بدست آمده رضایت بخش نیست (Cosson & Linhart 1996).
- (Lahnsteiner *et al.*, 2004).
- در اختیار بودن اسپرم زایا در تمام طول سال و امکان لقاح های آزمایشی بخصوص برای کشورهایی که در زمان مشخصی از سال شرایط آب و هوایی متنوعی دارند (Christ *et al.*, 1996; Urbanyi *et al.*, 2003).
- به وجود آمدن امکان نگهداری اسپرم به جای مولدین نر و کاهش هزینه های نگهداری مولدین در استخرهای جداگانه ، هزینه های تغذیه و کاهش اثرات نامطلوب استرس بر کیفیت اسپرم استحصالی مولدین کارگاهی (Kerby, 1983).
- تهیه و نگهداری اسپرم از نژادهای با ارزش یا مولدین با سابقه خاص مثل نرهای زیستگاه خاص یا نرهای با سابقه دستکاری کروموزومی (برادران نویری، ۱۳۸۴؛ Lahnsteiner *et al.*, 2004; Babiak *et al.*, 1997).
- کنترل و بهبود خزانه ژنی مولدین تکثیر شده بخصوص در شرایط ناکافی بودن تعداد یا نامناسب بودن کیفیت مولدین وحشی (Russel, 1996 ; Blesbois & Labbe, 2003).

۴-۱: سوابق تحقیق در خارج کشور با تاکید بر نتایج آنها

تاکنون اسپرم بیش از ۲۰۰ گونه از ماهیان با لقاح خارجی مورد انجماد قرار گرفته و هر ساله بر این تعداد اضافه می شود (Billard *et al.*, 1995; Linhart *et al.*, 2006). در مورد انجماد و نگهداری طولانی مدت اسپرم ماهیان خاویاری در سالهای دور ، مطالعات زیادی صورت نگرفته اما این مطالعات در سالهای اخیر به دلیل کاهش شدید

ذخایر طبیعی آنها، گسترش آبی پروری این ماهیان در جهان و افزایش قیمت جهانی گوشت و خاویار استحصالی از تاسماهیان رشد شدیدی پیدا کرده است (Linhart et al., 2006).

روشهای به کاررفته در مورد محلولهای رقیق کننده، مراحل سرمادهی، نسبت رقت، نتایج بدست آمده و ... نیز در مورد گونه های ماهیان خاویاری دریای خزر و تاسماهیان سایر مناطق جهان همچون تاسماهی سیبری (*A. baeri*)، تاسماهی آتلانتیک (*A. sturio*) و تاسماهی دریاچه ای (*A. fulvescenc*)، توسط Billard و همکاران (۲۰۰۴) مرور شده و گفته شده که در نمونه های مورد بررسی، درصد سلولهای متحرک پس از انجمادزدایی بین ۱۰ تا ۶۰ درصد متغیر بوده است (Billard et al., 2004).

مطالعاتی در زمینه انجماد اسپرم و نگهداری کوتاه مدت اسپرم ماهیان خاویاری دریای خزر توسط Cherepanov & Kopeika, 1996 نیز انجام شد. در این تحقیق بدون آنکه اشاره ای به گونه های کار شده صورت گیرد، گزارش شده که ۹۰ - ۴۰٪ اسپرمهای منجمد شده دارای تحرک بودند. Kopeika و همکاران، توانستند از اسپرم منجمد تاسماهی آتلانتیک پس از ۲۲ روز ۶۴٪ لقاح بگیرند (Kopeika et al., 2000). Tsvetkova و همکاران نیز در سال ۱۹۹۶ با انجماد اسپرم تاسماهی سیبری و استرلیاد به ترتیب ۲۳٪ و ۵۴٪ لقاح گرفتند.

در سال ۲۰۰۲ میلادی Glogowski و همکارانش نمونه اسپرم استحصالی از ۳ مولد تاسماهی سیبری را با تکنیک سرمادهی دستی با بخار ازت مایع منجمد کرده و بلافاصله مورد آزمایش لقاح قرار دادند. در آزمایش این گروه دو محلول رقیق کننده مختلف مورد استفاده قرار گرفته و درصد لقاح بدست آمده ۲۹/۶ و ۱۸/۲ درصد بود (Glogowski et al., 2002).

در سالهای اخیر بررسی هایی بر روی نگهداری اسپرم تاسماهی مکزیکی (*A. oxyrinchus*)، تاسماهی پوزه کوتاه (*A. brevirostrum*) و تاسماهی چین (*A. sinensis*) نیز صورت گرفته است. محققین چینی پس از انجماد اسپرم تاسماهی چینی آنرا پس از ۲۴ ساعت مورد استفاده قرار داده و ۶۸/۱٪ لقاح گزارش کردند (Liu et al., 2006). در حالی که اسپرم تاسماهی مکزیکی پس از رقیق سازی با محلول رقیق کننده و نگهداری در یخچال تا ۶۵٪ تحرک اولیه خود را پس از ۲۱ روز حفظ کرده، اما با انجماد در ازت مایع فقط ۲۰٪ تحرک داشته است

(Park & Chapman, 2005). اسپرم منجمد پاروپوزه، ۶۴ درصد لقاح (بررسی شده تا مرحله ۳۲ سلولی) را نشان داد (Linhart et al., 2006).

تحقیق دیگری در زمینه انجماد اسپرم ماهی بستر (فیلماهی ماده × استرلیاد نر) صورت گرفته و نشان داد که استفاده از پایوت های مخصوص این کار در مقایسه با روش سرمادهی مستقیم بر روی یخ خشک (روش پلت) کارایی بیشتری دارد (Shin et al., 2007).

۱-۵: سوابق تحقیق در داخل کشور با تاکید بر نتایج آنها

در ایران، مطالعات اولیه در ارتباط با نگهداری طولانی مدت اسپرم تاسماهیان در ابتدا با فشردن بیضه های مولدین و نگهداری اسپرمهای زنده در یخچال معمولی آغاز گردید (آذری تاکامی و کهنه شهری، ۱۳۵۳). متأسفانه پیگیری نتایج بدست آمده از این مطالعات به دلیل عدم احساس نیاز به کاربردهای آن، در سالهای بعد ادامه نیافت تا اینکه با بررسی رقیق کننده ارایه شده برای ماهیان خاویاری توسط Billard و مقایسه آن با رقیق کننده های کپورماهیان و آزاد ماهیان، مشخص شد که رقیق کننده مخصوص ماهیان خاویاری در انجماد و نگهداری طولانی مدت اسپرم تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)، تاسماهی روسی (*A. gueldenstaedtii*)، ماهی ازون برون (*A. stellatus*) و ماهی شیپ (*A. nudiventris*) در ازت مایع، کارایی بیشتری داشته و اسپرم این ماهیان در رقیق کننده ارایه شده حداکثر تا ۷۰٪-۶۰٪ تحرک دارد (عابدی، ۱۳۷۵). نتایج این بررسی نشان داد که رقیق کننده مخصوص ماهیان خاویاری بهتر از رقیق کننده های معرفی شده مخصوص ماهیان گرمابی و سردآبی در نگهداری طولانی مدت اسپرم تاسماهیان روسی، ایرانی و شیپ جواب می دهد. همچنین تفکر استفاده از ازت مایع و سرمادهی تدریجی در این مطالعه پایه ریزی گردید.

در مطالعه دیگری، امکان انجماد و نگهداری اسپرم مولدین هر ۵ گونه ماهیان خاویاری جنوب دریای خزر به کمک رقیق کننده اختصاصی این ماهیان و با استفاده از روش سرمادهی دستی، به وجود آمد. در این بررسی ضمن القای تحرک اسپرمها پس از انجماد آنها، در گونه های مختلف لقاح ۶۰٪ - ۲۷٪ بدست آمد (برادران نویری و همکاران، ۱۳۸۲). در ضمن مشخص گردید که در این نوع مطالعات استفاده از نی های مخصوص

انجماد اسپرم نسبت به ظروف اپندورف و سرنگهای معمولی کارایی بیشتری دارد. طی این بررسی همچنین مشخص گردید اسپرم کلیه تاسماهیان جنوب دریای خزر را می توان به کمک رقیق کننده مخصوص این ماهیان در نی های انجماد، منجمد کرد و جهت لقاح در شرایط کمبود یا ضعف مولدین بکار گرفت. این مطالعه همچنین نشان داد که اسپرم های با کیفیت بالاتر، قابلیت تحرک و لقاح پس از انجماد زدایی بیشتری از خود نشان می دهند (برادران نویری و همکاران، ۱۳۸۲).

پس از تلاشهای فراوان و تهیه سیستم سرمادهی وانجماد قابل کنترل از کشور فرانسه، تکنیک انجماد اسپرم ماهیان خاویاری جنوب دریای خزر به کمک دستگاه فریزر اتوماتیک قابل برنامه ریزی به اجرا در آمد (علیپور و همکاران، ۱۳۸۰) و طی آن مشخص شد که کارایی این دستگاه به منظور دستیابی به یک تکنیک تعریف شده از نظر نسبت رقت، دقت در شدت سرمادهی و بسته بندی نی های انجماد بسیار بالاست و جهت اجرای روش تعریف شده انجماد برای کلیه آبزیان با قابلیت تکرار پذیری زیاد کاربرد دارد.

۶-۱: اهداف پروژه

- ۱- انجماد اسپرم و نگهداری طولانی مدت نمونه های مناسب از مولدین نر پنج گونه ماهیان خاویاری صید شده در جنوب دریای خزر (از هر یک به میزان یک لیتر، کلاً پنج لیتر)
- ۲- نگهداری طولانی مدت نمونه های اسپرم مازاد مصرف مراکز تکثیر در طول فصل تکثیر ماهیان خاویاری
- ۳- انجماد اسپرم مولدین گونه های با ارزش ماهیان خاویاری وارد شده به رودخانه های منتهی به جنوب دریای خزر در صورت امکان
- ۴- گسترش استفاده از تکنیک انجماد اسپرم در مدیریت ذخایر ماهیان خاویاری در مقیاس کاربردی و پایه گذاری یک مرکز رفرانس بانک اسپرم در منطقه

۲- مواد و روشها

۲-۱: زمان و مکان انجام کار

طی مدت اجرای پروژه که شامل دو فصل تکثیر ماهیان خاویاری در فروردین- خرداد سالهای ۱۳۸۶-۱۳۸۵ می شد، مولدین صید شده (تصویر شماره ۱) پس از بررسی های اولیه (تصاویر شماره ۲ و ۳) به مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی رشت انتقال یافته و پس از تزریق هورمونی مورد ارزیابی و نمونه برداری قرار گرفتند.

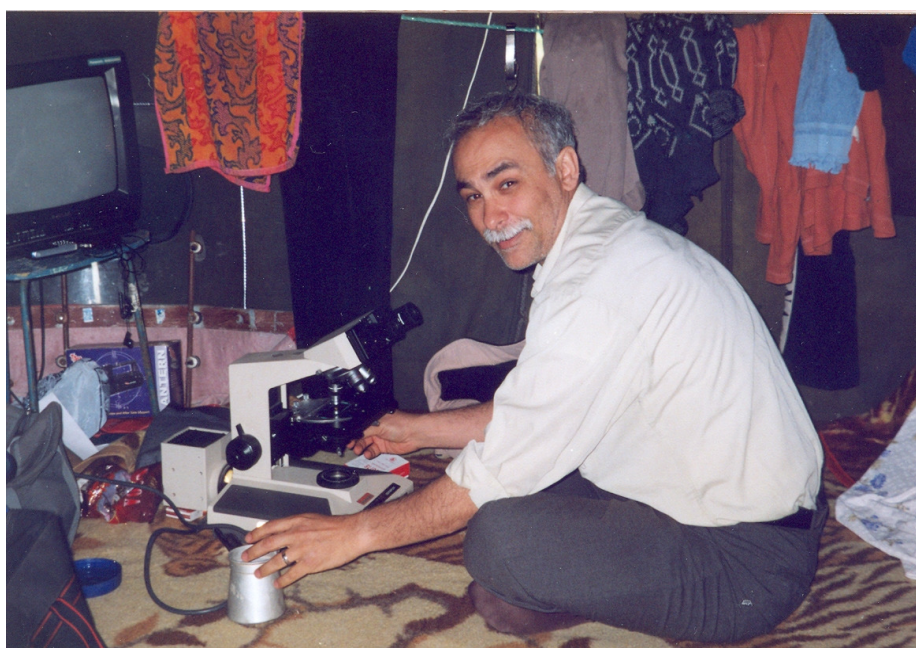
نمونه های استحصال شده جهت بررسی های کمی و کیفی به آزمایشگاههای انجماد اسپرم، ژنتیک و فیزیولوژی انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان رشت منتقل شدند.



تصویر ۱- پره کشی عرضی رودخانه سفیدرود جهت صید مولدین



تصویر ۲- اسپرم گیری در محل از مولدین رودخانه



تصویر ۳- بررسی کیفیت اسپرم مولدین صید شده از رودخانه در محل تکثیر

۲-۲: مولدین

عملیات نمونه برداری و بررسی کمیت و کیفیت اسپرم از ۳۴ مولد نر انواع ماهیان خاویاری شامل ۲۵ عدد تاسماهی ایرانی، ۴ عدد ازون برون، ۲ عدد شیپ و ۳ عدد فیلماهی صورت گرفت. این مولدین شامل مولدین تحویلی به صیدگاههای ماهیان خاویاری جنوب دریای خزر بوده و پس از تحویل به مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید بهشتی، مدتی را در استخرهای نگهداری مولدین گذرانده و سپس برای تکثیر مورد استفاده قرار گرفتند (تصویر شماره ۴). از میان ۳۴ مولدی که طی این مدت برای عملیات تکثیر استفاده شد، از ۱۸ مولد با کیفیت مناسب و تحرک بیش از ۷۰٪ (Kopeika & Kopeika, 2008)، اسپرم گیری بعمل آمد.



تصویر ۴- تزریق هورمون به مولدین نگهداری شده در حوضچه های مجتمع شهید بهشتی

۲-۳: تزریق هورمون

استحصال اسپرم از مولدین مورد نظر، پس از تزریق عضلانی $2-3 \text{ mg/kg}$ عصاره هیپوفیز حل شده در سرم فیزیولوژی، با سرکشی مدام و پس از ۷-۱۲ ساعت (با توجه به دمای آب) انجام گرفت (Dettlaff et al., 1993). اسپرم گیری پس از خشک نمودن ناحیه مخرجی با دستمال خشک و تمیز با کمک فشار شکمی در

ظرفهای از قبل آماده (تصویر شماره ۵) و بدون اختلاط با آب، ادرار یا مدفوع صورت گرفت (Horvath *et al.*, 2005; Williot *et al.*, 2005).

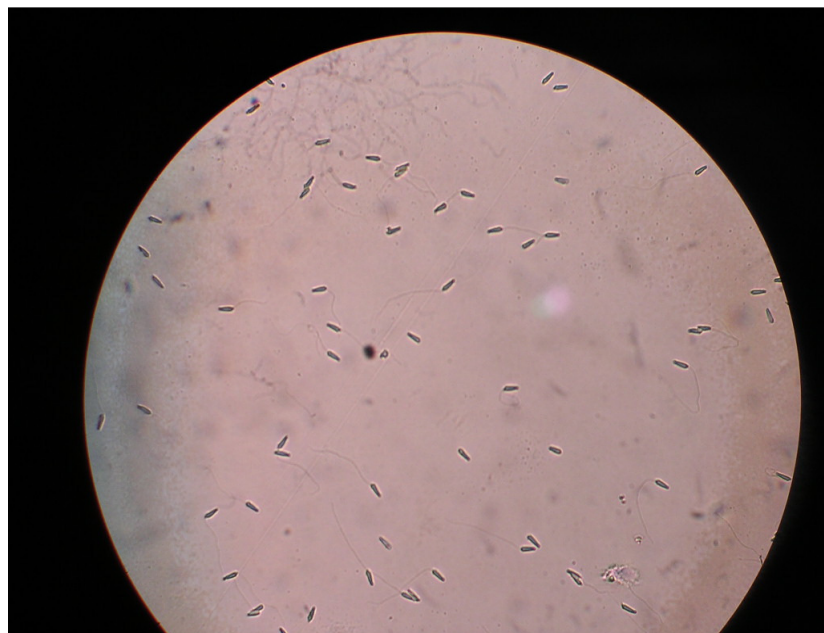


تصویر ۵- اسپرم گیری از مولدین نر مناسب

۴-۲: ارزیابی اسپرم های استحصال

نمونه های استحصال شده پس از بررسی های کمی و کیفی (شمارش سلولی، بررسی درصد تحرک، شدت تحرک و pH) جهت رقیق سازی در یخچال معمولی (دمای ۴-۳ درجه سانتی گراد) نگهداری شدند (Park & Chapman, 2005).

ارزیابی درصد تحرک نمونه اسپرم با بررسی چشمی (X ۴۰۰) زیر میکروسکوپ معمولی و با رقت ۱:۱۰ در آزمایشگاه انجام شد (Kopeika *et al.*, 2000; Sarosiek *et al.*, 2004; Cosson, 2008). تعیین تراکم با شمارش مستقیم (لام هماسیتومتر) پس از رقیق سازی به نسبت ۱:۳۰۰۰ (تصویر شماره ۷) (Park & Chapman, 2008; Alavi *et al.*, 2005) و ارزیابی اسپرماتوکریت پس از سانتریفوژ ۵۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت (Williot *et al.*, 2000).



تصویر ۶- نمونه اسپرم ماهیان تاسماهی ایرانی با بزرگنمایی ۴۰۰



تصویر ۷- رقیق سازی نمونه ها به منظور تعیین تراکم

تنظیم pH محلول رقیق کننده پس از بررسی pH هر نمونه و قبل از اختلاط با نمونه اسپرم تازه، بطور مجزا با HCl انجام گرفت (Tsvetkova *et al.*, 1996; Horvath *et al.*, 2006).

۲-۵: خصوصیات رقیق کننده

محلول رقیق کننده مورد استفاده شامل ۱۱۸ mM تریس، ۲۳/۴ mM ساکارز، ۱۵٪ DMSO بود. (Cherepanov & Kopeika, 1996; Dzuba *et al.*, 1999; Kopeika *et al.*, 2000). در تهیه این محلول ابتدا نمکهای مورد نیاز در آب حل شده و ماده محافظ سرمای DMSO دقایقی قبل از مصرف به آن اضافه می گردید (تصویر شماره ۸). نمونه اسپرمها به آرامی و به نسبت ۱:۱ با این رقیق کننده مخلوط شدند (Glogowski *et al.*, 2002; Billard *et al.*, 2004) (تصویر شماره ۹) و جهت هم دمایی یک ساعت در یخچال معمولی (دمای ۴ درجه سانتی گراد) نگهداری شدند.



تصویر ۸- تهیه محلول رقیق کننده اسپرم ماهیان خاویاری



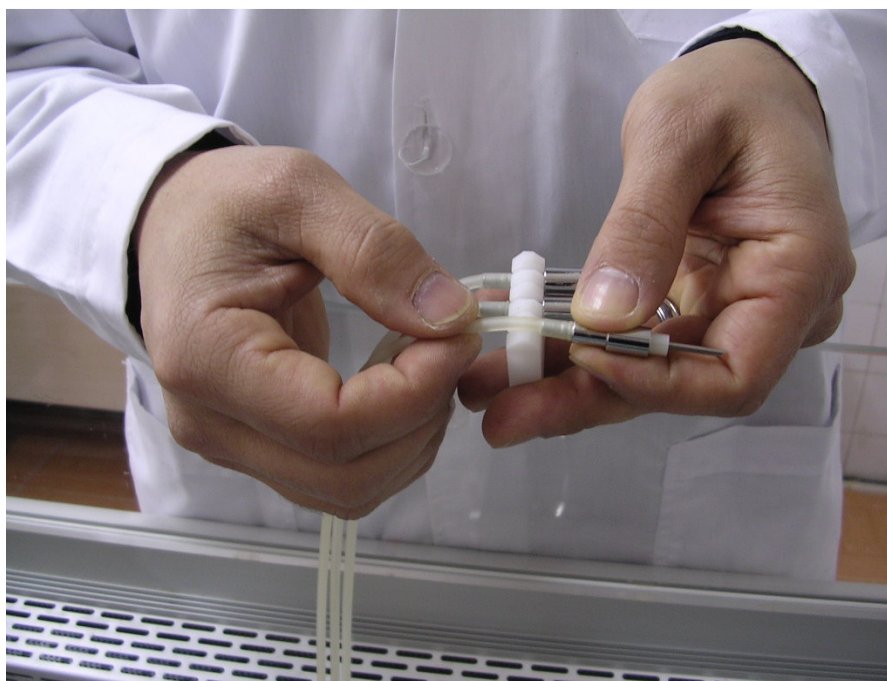
تصویر ۹- رقیق سازی اسپرم با محلول رقیق کننده

۶-۲: شدت سرما دهی

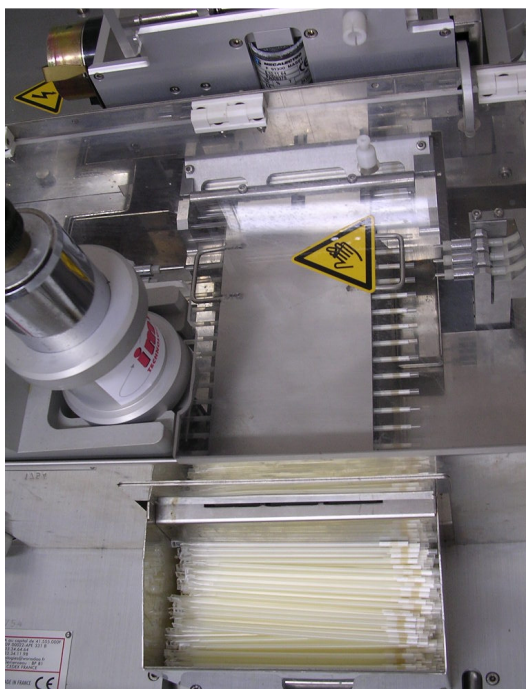
انتقال نمونه ها بداخل نی های انجماد (پایوت ها) با حجم ۰/۵ میلی لیتر (تصویر شماره ۱۰) پس از تنظیم دستگاه (تصویر شماره ۱۱) و با کمک دستگاه پرکن خودکار (شرکت IMV فرانسه) انجام شد (تصویر شماره ۱۲). سپس سرمادهی چند مرحله ای (Drokin & Kopeika, 1999) پس از هم دمایی نمونه های رقیق شده، با کمک دستگاه فریزر قابل برنامه ریزی با دقت $\pm 0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ و برای هر گونه بطور مجزا بشرح جداول شماره ۳ و ۲، ۱ اجرا شد (Glogowski, et al., 2002; Kopeika & Kopeika, 2008; Linhart et al., 2006). خصوصیات تنظیم دمایی مراحل چندگانه سرمادهی برای هر گونه در تمام آزمایشها یکسان بود (تصویر شماره ۱۳).



تصویر ۱۰- انواع نی های انجماد و محفظه های مورد استفاده



تصویر ۱۱- آماده سازی سوزن ها و شیلنگ های ارتباطی دستگاه پرکن



تصویر ۱۲- دستگاه پر کننده خودکار جهت انتقال نمونه رسپرم رقیق شده به نی های انجماد

جدول شماره ۱: شدت سرمادهی نمونه اسپرم در فیلماهی (Billard *et al.*, 2004)

نوع ماهی	فیلماهی	شدت (°C/min)	
دمای سرمادهی	شروع (°C)	پایان (°C)	
مرحله I	۵	-۱۰	۲
مرحله II	-۱۰	-۷۰	۲۰
مرحله III	-۷۰	-۹۰	۳۰
مرحله IV	-۹۰	-۱۹۶	بلافاصله

جدول شماره ۲: شدت سرمادهی نمونه اسپرم در ماهیان شیب و ازون برون (Billard *et al.*, 2004)

نوع ماهی	شیب و ازون برون	شدت (°C/min)	
دمای سرمادهی	شروع (°C)	پایان (°C)	
مرحله I	۵	-۹	۳/۵
مرحله II	-۹	-۷۰	۲۵
مرحله III	-۷۰	-۹۰	۳۰
مرحله IV	-۹۰	-۱۹۶	بلافاصله

جدول شماره ۳: شدت سرمادهی نمونه اسپرم در تاسماهی ایرانی (Baradaran Noveiri *et al.*, 2006)

نوع ماهی	تاسماهی ایرانی	شدت (°C/min)	
دمای سرمادهی	شروع (°C)	پایان (°C)	
مرحله I	۵	-۱۵	۳
مرحله II	-۱۵	-۷۰	۲۰
مرحله III	-۷۰	-۹۰	۲۵
مرحله IV	-۹۰	-۱۹۶	بلافاصله



تصویر ۱۳- سیستم سرمادهی تدریجی قابل برنامه ریزی

۲-۷: انجماد زدایی و لقاح

در مرحله آخر، نمونه های منجمد، جمع آوری شده (تصویر شماره ۱۴) و جهت نگهداری طولانی مدت بطور مجزا وارد محفظه های جداگانه تانک های ازت مایع (-۱۹۶- درجه سانتی گراد) شدند (تصاویر شماره ۱۶ و ۱۵). این نمونه ها جهت ارزیابی های بعدی و لقاح آزمایشی در حمام آب گرم ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه (Tsvetkova *et al.*, 1996; Lahnsteiner *et al.*, 2004) مورد انجمادزدایی قرار گرفتند (تصویر شماره ۱۷).
 لقاح آزمایشی در دو ماهی تاسماهی ایرانی و ازون برون با شرایط ذیل انجام گرفت (Dettlaff *et al.*, 1993):

۱ ml اسپرم اولیه برای لقاح ۱۰۰ گرم تخمک ازون برون

۱/۷ ml اسپرم اولیه برای لقاح ۱۷۰ گرم تخمک تاسماهی ایرانی

بررسی درصد لقاح پس از ۴ و ۲۴ ساعت در آب ۱۶-۱۵ درجه سانتی گراد بصورت نمونه برداری تصادفی

(تصویر شماره ۱۸) با بزرگنمایی ۱۰ X در زیر استریومیکروسکوپ صورت گرفت.



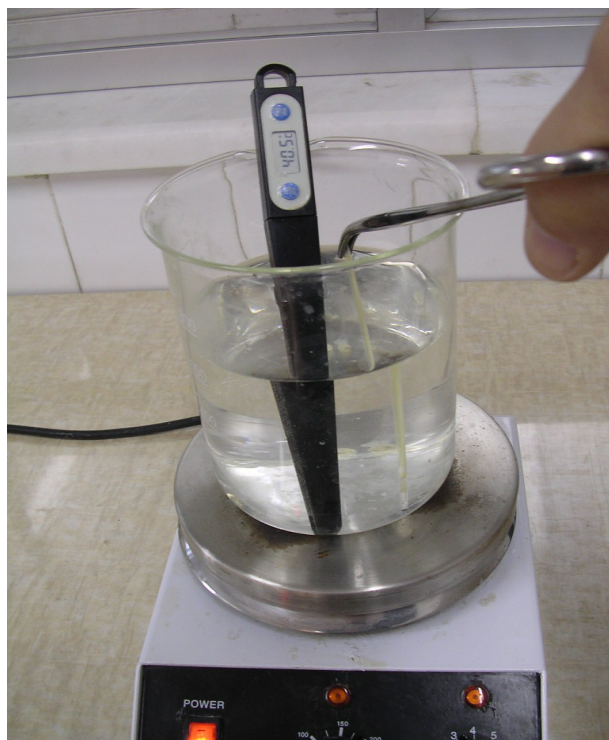
سرمادهی چند مرحله ای



تصویر ۱۵: انتقال نمونه ها به داخل ازت مایع



تصویر ۱۶- تانک ازت ۲۳۰ لیتری جهت نگهداری درازمدت نمونه ها



تصویر ۱۷- انجمادزدائی نمونه ها در حمام آب گرم



تصویر ۱۸- بررسی درصد لقاح پس از لقاح آزمایشی

۸-۲: بررسی های آماری

در صد لقاح (F_r) برای هر آزمایش بر اساس فرمول ذیل محاسبه شد (Linhart *et al.*, 2006).

$$F_r = [(E_t - E_d) / E_t] \times 100$$

F_r = درصد لقاح ، E_t = تعداد کل تخمها ، E_d = تخمهای لقاح نیافته

تمامی داده ها بر اساس \pm SD میانگین ارایه شده است. در جاهایی که به تعداد نمونه های مورد بررسی اشاره

نشده ، حداقل موارد سنجش شده ، سه تکرار بوده است. مقایسه های آماری با کمک نرم افزارهای (2003)

Excell و SPSS (ver.11) توسط آزمونهای دانکن و در سطح معنی دار $P < 0/05$ انجام گرفت.

۳- نتایج

تاریخ نمونه برداری و حجم اسپرم ۱۸ عدد از مولدینی که هم اکنون اسپرم آنها بصورت منجمد در تانکهای ازت مایع آزمایشگاه انجماد اسپرم انستیتو موجود است ، بشرح جدول شماره ۴ می باشد.

جدول ۴ : تاریخ و مقادیر اسپرم منجمد شده ماهیان خاویاری با خصوصیات درصد تحرک آنها

ردیف	تاریخ آزمایش	نام گونه	تحرک اولیه (%)	حجم منجمد شده (ml)
۱	۸۵/۲/۲۴	ازون برون	۸۰	۳۰
۲	۸۵/۲/۲۴	ازون برون	۸۰	۳۰
۳	۸۶/۱/۷	فیلماهی	۸۰	۸۰
۴	۸۶/۱/۲۲	تاسماهی ایرانی	۹۰	۵۰
۵	۸۶/۱/۲۲	تاسماهی ایرانی	< ۹۰	۶۰
۶	۸۶/۲/۳	تاسماهی ایرانی	۹۰	۵۰
۷	۸۶/۲/۳	تاسماهی ایرانی	< ۸۰	۶۰
۸	۸۶/۲/۱۱	تاسماهی ایرانی	> ۹۰	۵۰
۹	۸۶/۲/۱۱	تاسماهی ایرانی	< ۹۰	۶۰
۱۰	۸۶/۲/۱۸	تاسماهی ایرانی	۹۰	۱۷۰
۱۱	۸۶/۲/۱۸	تاسماهی ایرانی	۷۰	۱۱۰
۱۲	۸۶/۲/۲۵	ازون برون	۷۰	۱۰
۱۳	۸۶/۲/۲۵	ازون برون	۸۰	۲۰
۱۴	۸۶/۲/۲۵	تاسماهی ایرانی	۷۰	۱۷۰
۱۵	۸۶/۲/۲۵	شیپ	۵۰	۱۱۰
۱۶	۸۶/۲/۳۰	تاسماهی ایرانی	۷۰	۹۵
۱۷	۸۶/۲/۳۰	تاسماهی ایرانی	< ۷۰	۷۵
۱۸	۸۶/۳/۲	تاسماهی ایرانی	۷۰	۶۰

میزان کل اسپرم منجمد شده از ماهیان مولد تهیه شده بشرح جدول شماره ۵ بود.

جدول شماره ۵ : حجم کل اسپرم منجمد شده به تفکیک هر گونه

نام گونه	حجم اسپرم منجمد و نگهداری شده (ml)	تعداد ماهی (n)
فیلماهی	۸۰	۱
تاسماهی ایرانی	۱۰۱۰	۱۲
ازون برون	۹۰	۴
شیپ	۱۱۰	۱
تاسماهی روسی	-	۰
جمع	۱۲۹۰	۱۸

همچنین تعداد ماهیان مولد مورد بررسی به تفکیک گونه نیز در جدول شماره ۶ آمده است.

جدول ۶: تعداد کل مولدین بررسی شده و مورد استفاده در این پروژه به تفکیک گونه و سال نمونه برداری

شپ	تاسماهی ایرانی	ازون برون	فیلماهی	
-	-	۲	-	فصل تکثیر ۱۳۸۵
۲	۲۵	۲	۳	فصل تکثیر ۱۳۸۶
۲	۲۵	۴	۳	جمع تعداد بررسی شده (۳۴ مولد)
۱	۱۲	۴	۱	جمع تعداد استفاده شده (۱۸ مولد)

خصوصیات بیومتریکی و شاخص های نمونه اسپرم مولدین مورد استفاده مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج بدست آمده به شرح ذیل بود:

جدول ۷: خصوصیات بیومتریکی و شاخص های ارزیابی شده نمونه اسپرم مولدین تاسماهی ایرانی

نام گونه	تراکم اسپرم ($10^9/ml$)	اسپرماتوکریت (%)	pH	وزن (kg)	طول کل (cm)
تاسماهی ایرانی	۱/۲۱۷	۴	۹/۱۸	۱۷/۹	۱۴۵
	۱/۱۸۶	۵	۹/۰۲	۱۸/۲	۱۴۴
*	۳/۲۷۶	۸	۸/۵	۱۶/۵	۱۴۴
*	۶/۸۸۸	۱۶/۶	۷/۹۷	۱۸/۳	۱۶۰
*	۰/۸۸۸	۳	۷/۳۴	۱۷/۶	۱۵۰
*	۳/۷۹۲	۱۳	۷/۷۱	۱۸/۵	۱۶۴
	۱/۲۳۶	۴	۸/۲۳	-	-
	۲/۷۰۰	۷/۳	۸/۴۸	-	-
	۲/۲۳۲	۶	۸/۸۲	۱۵/۳	۱۴۹
	۲/۵۸۶	۷	۸/۴۴	-	-
	۴/۱۱۶	۱۴	۸/۶۹	-	-
	۲/۹۲۰	۱۰	۸/۷	۱۵	۱۴۸
میانگین (۱۲)	$۲/۷۵ \pm ۱/۶۸$	$۸/۱۶ \pm ۴/۳$	$۸/۴۲ \pm ۰/۵۴$	$۱۷/۱۷۵ \pm ۱/۴$	$۱۵۰/۵ \pm ۷/۵$

* : نمونه های مشخص شده، مولدین صید شده خاص رودخانه سفیدرود می باشند.

مشخصات بیومتریك و ازریابی اسپرم مولدین مورد استفاده ازون برون نیز در جدول زیر خلاصه شده است:

جدول ۸: خصوصیات بیومتریك و شاخص های ازریابی شده نمونه اسپرم مولدین ازون برون

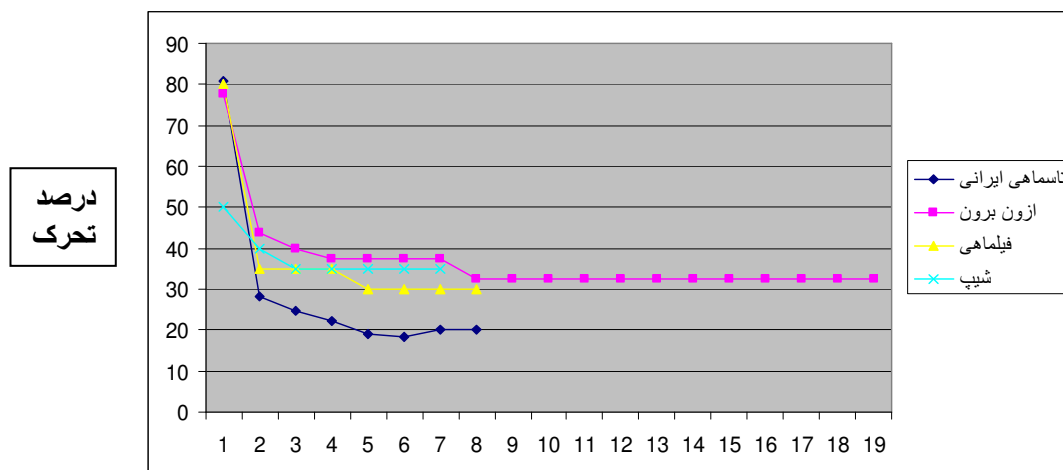
نام گونه	تراکم اسپرم (10 ⁹ /ml)	اسپرماتوکریت (%)	pH	وزن (kg)	طول کل (cm)
ازون برون	۰/۷۰۸	۰/۹	۸/۱	۸/۱	۱۰۵
	۰/۶۳۶	۱	۸	۹	۱۱۱
	۱/۱۴۰	۱/۶	۹/۵۸	۱۴/۲۶	۱۲۳
	۱/۲۹۸	۱/۷	۹/۵۶	۱۱/۶	۱۱۲
میانگین (ع)	۰/۹۵ ± ۰/۳۲	۱/۳ ± ۰/۴	۸/۸۱ ± ۰/۸۸	۱۰/۷۴ ± ۲/۷۸	۱۱۲/۷۵ ± ۷/۵

کیفیت اسپرم مولدین فیلماهی و شیپ (از هر کدام فقط یک نمونه) نیز در جدول شماره ۸ آمده است.

جدول ۹: خصوصیات بیومتریك و شاخص های ازریابی شده نمونه اسپرم مولدین فیلماهی و شیپ

نام گونه	تراکم اسپرم (10 ⁹ /ml)	اسپرماتوکریت (%)	pH	وزن (kg)	طول کل (cm)
فیلماهی	۲/۱۳۱	۲	۸/۵۷	۸۳	۲۱۷
شیپ	۱/۱۱۶	۲	۹/۱۱	-	-

میزان و چگونگی کاهش درصد تحرک نمونه های اسپرم تازه و نمونه های منجمد شده در نمودار شماره ۲ آمده است. در این نمودار مشخص شده که تحرک اسپرم های انواع ماهیان خاویاری مورد مطالعه، با گذشت زمان و فواصل ۳۰ روزه به چه ترتیب تغییر کرده است.



نمودار ۲: چگونگی و میزان تغییر درصد تحرک نمونه اسپرم های منجمد شده مولدین ماهیان خاویاری
 ۱: تحرک اولیه ، ۲: بلافاصله پس از انجماد ، ۳: ۶۰:۳ روز بعد ، ۴: ۹۰:۴ روز بعد

لقاح آزمایشی اسپرم های منجمد در دو گونه ازون برون و تاسماهی ایرانی صورت گرفته و نتایج بشرح ذیل بود:

جدول ۱۰: نتایج لقاح اسپرم انجمادزدایی شده با تخم مولدین ازون برون و تاسماهی ایرانی

نوع ماهی	مدت زمان نگهداری	درصد لقاح (۴ ساعت)	درصد لقاح (۲۴ ساعت)
ازون برون	۲ سال و ۵ روز	۲۴/۷	۱۴/۳
تاسماهی ایرانی	۵ سال و ۱۱ روز	۵۸/۲	۴۳/۷

۴- بحث

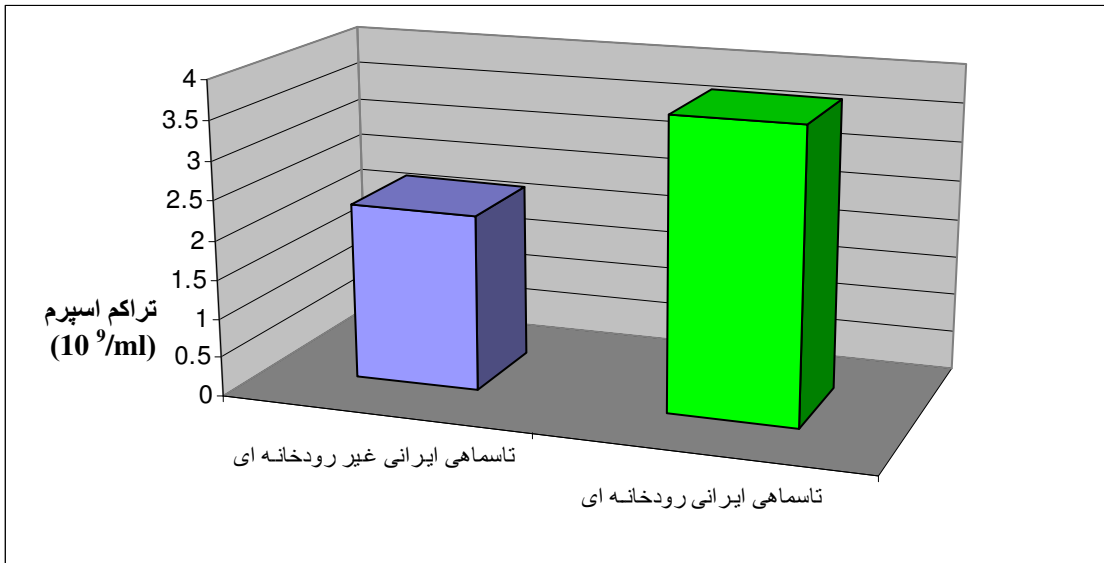
یافته های بدست آمده از مطالعات محققین و اساتید مختلف در رابطه با نگهداری دراز مدت اسپرم تاسماهیان مختلف نشان داد که این تکنیک، یک روش کاربردی جهت جلوگیری از به هدر رفتن اسپرم مازاد مصرف و حفظ اسپرم مولدین با شناسنامه خاص بوده (Blesbois & Labbe, 2003) و امکان استفاده از اسپرم های منجمد در زمان عدم دسترسی به مولدین نر مناسب در فصل تکثیر و یا امکان انجام آزمایشهای لقاح خارج از فصل تکثیر را مهیا می سازد (Billard *et al.*, 2004).

با توجه به نمودار شماره ۲، مشخص می گردد که میانگین درصد تحرک اسپرم کلیه مولدین مورد استفاده، بلافاصله پس از انجماد کاهش قابل توجهی را نشان می دهد. این میزان کاهش برای تاسماهی ایرانی $52/5 \pm 5\%$ ، برای ازون برون $33/7 \pm 7\%$ ، برای فیلماهی 45% و برای شیپ 10% است. اما مقدار کاهش تحرک پس از وارد شدن به فاز ازت مایع در تمامی نمونه ها پس از ۷ ماه تفاوت معنی داری را با اولین لحظه ورود به ازت مایع نشان نداده است ($P < 0/005$).

کاهش تحرک و قابلیت لقاح در اسپرم منجمد شده بسیاری از ماهیان گزارش شده است (Billard *et al.*, 2004; Linhart *et al.*, 2006; Cosson, 2008). از جمله موارد کاهش نسبی یا شدید درصد لقاح و قدرت باروری نمونه اسپرم های پس از انجماد زدایی، می توان به ماهیان خاویاری پاروپوزه (Mims *et al.*, 2000)، تاسماهی سبیری (Tsvetkova *et al.*, 1996; Glogowski *et al.*, 2002)، تاسماهی آتلانتیک (Kopeika *et al.*, 2000)، تاسماهی مکزیکی (Park & Chapman, 2005) و تاسماهی آمریکا (Ingermann *et al.*, 2002) اشاره نمود. در مورد ماهیان خاویاری دریای خزر نیز قبلاً به این مورد در ماهیان شیپ و ازون برون (Dzuba *et al.*, 1999)، تاسماهی روسی (Cherepanov & Kopeika, 1996)، فیلماهی (Cherepanov & Kopeika, 1996) و استرلیاد (Tsvetkova *et al.*; Jahnichen *et al.*, 1999) اشاره شده است. محققین مختلف اعلام داشته اند که این کاهش باروری را می توان با افزایش میزان اسپرم انجمادزدایی شده برای لقاح تخم تازه جبران کرد (Lahnsteiner *et al.*, 2004; Alavi *et al.*, 2008).

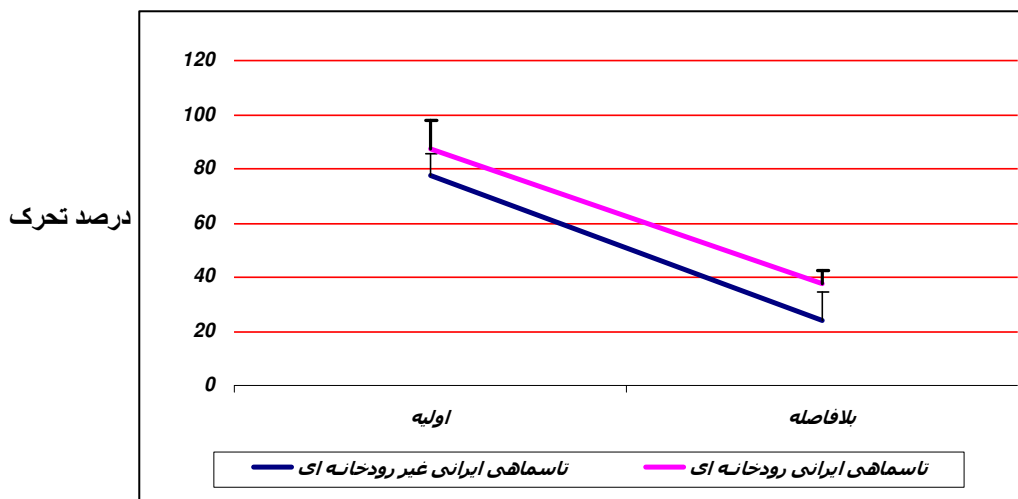
از آنجایی که ۴ مولد نرتاسماهی ایرانی مشخصاً از داخل رودخانه سفیدرود صید شده و به مرکز تکثیر انتقال یافتند، خصوصیات کمی و کیفی این مولدین بطور جداگانه با سایر نمونه های مولدین تاسماهی ایرانی مورد مقایسه قرار گرفت (جدول ۷). در تعدادی از مطالعات گذشته هنگام کار با چند مولد، به جهت سهولت کار نمونه اسپرمهای استحصالی از مولدین مختلف با یکدیگر مخلوط شده و سپس مورد انجماد قرار گرفتند (Glogowski *et al.*, 2002). با توجه با اینکه خصوصیات نمونه مایع پلازما و اسپرماتوزوای هر مولد از نظر pH، اسمولاریته، ترکیبات یونی و تراکم اسپرم منحصر به فرد می باشد (Alavi *et al.*, 2002; Ingermann *et al.*, 2000; Cosson *et al.*, 2004)، این کار سبب می شود که نمونه های با کیفیت بهتر کارایی خود را از دست بدهند. گفته شده که قرار دادن نمونه اسپرم های استحصالی در محلولهای با pH پایین تر از اسپرم اولیه، سبب کاهش تحرک اسپرماتوزوا در ماهیان خاویاری می شود (Alavi & Cosson, 2005). لذا در این تحقیق برای نخستین بار در این زمینه، تنظیم pH، اختلاط اسپرم با رقیق کننده و مراحل انجماد برای هر نمونه بطور مجزا صورت گرفت.

اسپرم نمونه های اسپرم مولدین رودخانه ای تاسماهی ایرانی از نظر کمیت تفاوت معنی داری با سایر مولدین این گونه داشتند ($P < 0.05$) (نمودار شماره ۳) و این امر نشان می دهد که تراکم اسپرم مولدین رودخانه ای بیش از مولدین غیر رودخانه ای است. این موضوع می تواند نشانگر کامل شدن مراحل رسیدگی جنسی در مولدین نر رودخانه ای باشد. این مورد که نمونه اسپرم با تحرک اولیه بهتر، پس از انجماد زدایی منجر به افزایش درصد لقاح نسبت به اسپرم اولیه می شود، قبلاً در مورد پاروپوز های شمال آمریکا گزارش گردیده است (Linhart *et al.*, 2006).



نمودار ۳: مقایسه تراکم اسپرم مولدین رودخانه ای و غیر رودخانه ای تاسماهی ایرانی

نمونه های اسپرم مولدین تاسماهی ایرانی رودخانه ای از نظر کیفیت تحرک ، هم در تحرک اولیه و هم پس از انجمادزدایی با نمونه های غیر رودخانه ای تفاوت معنی دار نداشتند ($P > 0.05$) . این کاهش کیفیت تحرک در نمونه های رودخانه ای در حد ۵۳ درصد و در نمونه اسپرمهای مولدین غیر رودخانه ای در حد ۵۲ درصد بود. منحنی کاهش میزان تحرک برای نمونه های رودخانه ای و غیر رودخانه ای با شیب یکسان و موازی هم بوده است (نمودار شماره ۴).



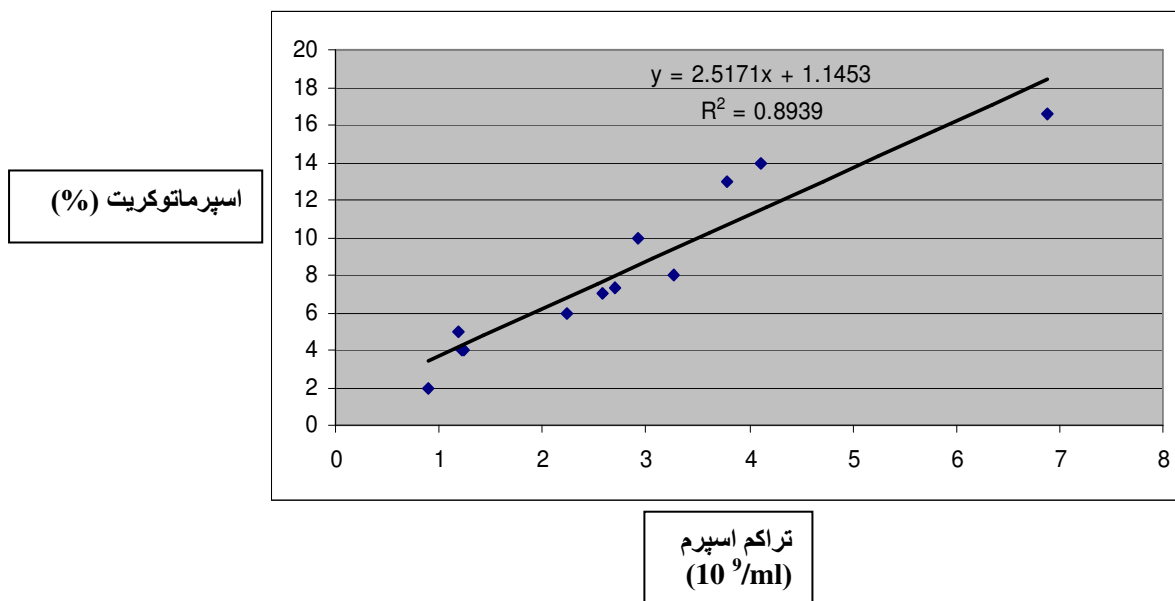
نمودار ۴: منحنی مقایسه میزان کاهش درصد تحرک اسپرم در اسپرم تازه و منجمد شده مولدین رودخانه ای و غیر رودخانه ای تاسماهی ایرانی

تراکم اسپرم در نمونه های تاسماهی ایرانی ($r = 0.94$) و ازون برون ($r = 0.97$) رابطه معنی داری با میزان اسپرماتوکریت نشان داد. چنین همبستگی بالایی در ماهیان خاویاری فیلماهی ($r = 0.90$) (علیپور، ۱۳۸۴)، پاروپوزه ($r = 0.93$) (Linhart et al., 2000)، ازون برون ($r = 0.92$) (Alipour et al., 2007) و تاسماهی ایرانی ($r = 0.79$) و ($r = 0.88$) (Baradaran Noveiri et al., 2006; Baradaran Noveiri et al., 2007) نیز تایید شده است. قبلاً وجود ارتباط قوی بین این عوامل در ماهیان *Oncorhynchus mykiss*, *O.kisutch*, *Salmo salar*, *Siganus guttatus*, *Coregonus* و *Hippoglossus hippoglossus* نیز گزارش شده است (Liley et al., 2002; Rakithin et al., 1999; Tvedt et al., 2001;)

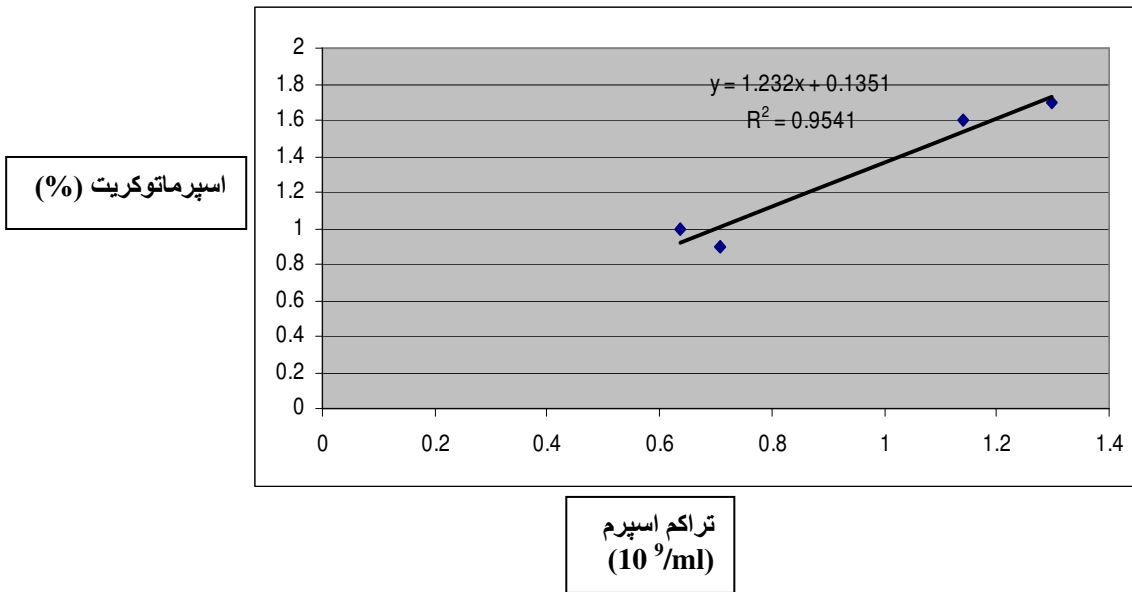
مولدین تاسماهی ایرانی (نمودار شماره ۵) و ازون برون (نمودار شماره ۶) بشرح ذیل محاسبه شد:

$$\text{تاسماهی ایرانی: } 1/1453 + \text{تراکم اسپرم (} 10^9/\text{ml)} \times 2/5171 = \text{اسپرماتوکریت (\%)}.$$

$$\text{ازون برون: } 0/1351 + \text{تراکم اسپرم (} 10^9/\text{ml)} \times 1/232 = \text{اسپرماتوکریت (\%)}.$$

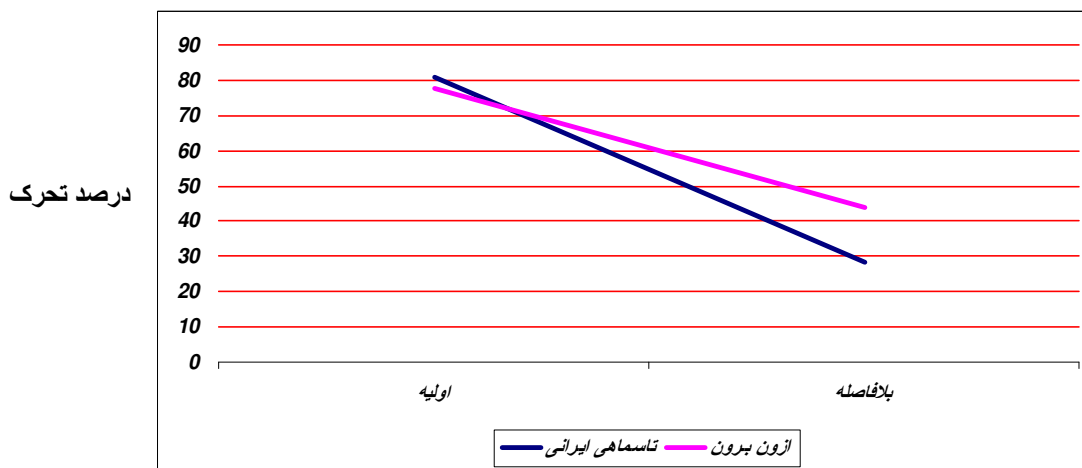


نمودار ۵: چگونگی رابطه تراکم اسپرم با اسپرماتوکریت در مولدین تاسماهی ایرانی



نمودار ۶: چگونگی رابطه تراکم اسپرم با اسپرماتوکریت در مولدین ازون برون

مقایسه کاهش میزان تحرک اسپرم انجمادزدایی شده ماهی ازون برون (کاهش میانگین تحرک ۳۳/۷۵٪) نسبت به اسپرم انجمادزدایی شده تاسماهی ایرانی (کاهش میانگین تحرک ۵۲/۵٪) نشان می دهد که اسپرم ازون برون نسبت به تحمل شرایط انجماد تحمل بیشتری دارد (نمودار شماره ۷). این موضوع با مقایسه اسپرم های انجمادزدایی شده این دو ماهی در ماههای چهارم تا هشتم تحقیق نیز دیده می شود (نمودار شماره ۲).



نمودار ۷: چگونگی میزان کاهش درصد تحرک اسپرم انجمادزدایی شده مولدین تاسماهی ایرانی و ازون برون

تراکم اسپرم در نمونه های تاسماهی ایرانی مورد بررسی ارتباط معنی داری با میزان تحرک اولیه آنها نداشت ($r^2=0.095$). همچنین رابطه تراکم اسپرم و تحرک اولیه آن در نمونه های اسپرم ماهی ازون برون نیز معنی دار نبود ($r^2=0.16$). چنین موضوعی پس از بررسی اسپرم تاسماهی سیبری نیز گزارش شده است (Williot *et al.*, 2000).

از آنجایی که ترکیب محتوا و pH مایع سمینال در نمونه های تازه اسپرم های استحصالی ماهیان با توجه به زمان و درجه حرارت محیط بطور مدام در حال تغییر بوده (Williot *et al.*, 2000; Atse *et al.*, 2002) و بخصوص تغییر pH می تواند نقش مهمی در القای تحرک قبل از عملیات انجماد بر سلولهای مورد نظر داشته باشد (Ciereszko, 2008)، در این تحقیق pH رقیق کننده مورد استفاده برای هر نمونه، جهت دستیابی به کارایی بیشتر مطابق با pH نمونه اسپرم تازه تنظیم گردید. این کار قبلاً در انجماد اسپرم تاسماهیان بی سابقه بوده و محققین مختلف تنها به ذکر محدوده pH اندازه گیری شده در نمونه ها اکتفا می نمودند (Alavi *et al.*, 2008).

با توجه به نتایج بدست آمده می توان اظهار نمود که بهترین تراکم و تحرک در اسپرم مولدین تاسماهی ایرانی صید شده در محدوده زمانی هفته آخر فروردین و تا هفته اول اردیبهشت دیده می شود و در این بین نمونه های صید شده از داخل رودخانه کیفیت بالاتری دارند.

طی مدت اجرای پروژه، پس از استحصال تخمک به روش برش مجرای تخمدانی از یک مولد ماده ازون برون پرورشی ۹ کیلو گرمی با طول ۱۲۶ سانتی متر، به کمک اسپرم منجمد ۲ ساله از مولدین وحشی موفق به لقاح تخمکهای مذکور شده و درصد لقاح ۲۷/۴٪ (پس از ۴ ساعت) و ۱۴/۳ درصد پس از ۴۰ ساعت بعد از لقاح بدست آمد که تاییدی بر صحت روش به کار رفته می باشد (برادران نویری و همکاران، ۱۳۸۵).

همچنین یک مورد لقاح اسپرم منجمد ۵ ساله تاسماهی ایرانی با تخمک تازه استحصال شده نیز انجام گرفت که درصد لقاح بدست آمده معادل ۴۳/۴٪ بود که نشان دهنده کارایی روش و سیستمهای به کار رفته در این مطالعه است (Baradaran Noveiri *et al.*, 2007).

همچنین از دیدگاه مدیریت ذخایر می توان به این تکنیک به عنوان یک گزینه عملی در بازسازی ذخایر نگاه کرد. نتایج بدست آمده از این تحقیقات در چهاردهمین کنفرانس سراسری زیست شناسی ایران (برادران نویری

و همکاران، ۱۳۸۵)، اولین همایش بین المللی بیولوژی اسپرم ماهیان (Baradaran Noveiri *et al.*, 2007) و اولین همایش ملی علوم دام و آبزیان دانشگاه آزاد اسلامی (برادران نویری و همکاران، ۱۳۸۷) رایه گردیده است.

با پایه گذاری مرکز انجماد، نگهداری و حفظ اسپرم مناسب از مولدین مناسب ماهیان خاویاری، می توان در مواقع لزوم از هدر رفتن پتانسیل تکثیر این ماهیان با ارزش جلوگیری به عمل آورده و پس از نگهداری نمونه های مناسب، در صورت نیاز کارگاههای تکثیر اقدام به رایه اسپرمهای مورد نیاز از هر یک از مولدین به این مراکز نمود تا بازده تکثیر و رهاسازی بچه ماهیان مورد نظر در این مراکز افزایش یابد. این روش یک ابزار مدیریتی جدید را در اختیار مسئولین بازسازی ذخایر شیلاتی کشور قرار می دهد تا از پتانسیل تکثیر مولدین بیشتری استفاده شود و همکاران بخش اجرا نیز بتوانند با آموزش های لازم در این خصوص از امکانات فراهم شده بهره ببرند.

با توجه به تهیه امکانات موجود، توانایی انجام مراحل انجماد و نگهداری طولانی مدت اسپرم انواع گونه های آبزیان و گروههای دیگر جانوری در آزمایشگاه انجماد اسپرم انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، مهیا شده است. همچنین این تجهیزات علاوه بر این که امکان توسعه تبادل اسپرم با سایر کشورها را فراهم نموده است، افق انجام تحقیقات گسترده تر در زمینه انجماد تخمک، انجماد جنین، نگهداری سلولهای بنیادی، انجماد سلولهای سوماتیک و ... را نیز به ایجاد کرده است. در حال حاضر بانک اسپرم ماهیان خاویاری بومی در تعدادی از کشورها از جمله روسیه، اکراین، مجارستان و جمهوری چک پایه ریزی شده است (Flajshans *et al.*, 1999; Linhart, *et al.*, 2006).

با تجهیزات و امکاناتی که در طی اجرای این پروژه فراهم گردیده، توانمندیهای تکنیکی در جهت حفظ و بهبود خزانه ژنی ماهیان خاویاری جنوب دریای خزر گسترش یافته اند که در زیر به برخی از آنها اشاره می شود:

- به وجود آمدن امکان نگهداری اسپرم منجمد بیشتر از ماهیان خاویاری دریای خزر

- توان انجماد و نگهداری اسپرم مولدین غیر تکثیری ماهیان خاویاری

- امکان جمع آوری و نگهداری اسپرم از مولدین با ارزش کلیه رودخانه ها

- انجماد اسپرم سایر ماهیان با ارزش همچون ماهی آزاد، قزل آلائی خال قرمز،
- پتانسیل کار بر روی انجماد اسپرم گونه های در معرض خطر حیات وحش ایران (غیر از آبزیان)
- امکان توسعه گسترش فعالیتهای جاری در بعد انجماد سلولهای جنسی، جنین، سلولهای سوماتیک و سلولهای بنیادی آبزیان
- پایه ریزی توان تبادل اسپرم بعنوان یک فعالیت بین المللی و تجاری با سایر مراکز

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات آقایان دکتر عباسعلی مطلبی، ریاست محترم موسسه تحقیقات شیلات ایران، دکتر محمد پورکاظمی، ریاست محترم انستیتو و مشاور پروژه، دکتر حمیدرضا غفارزاده، ریاست محترم دفتر CEP در ایران، دکتر مصطفی شریف روحانی، معاونت محترم پژوهشی موسسه تحقیقات شیلات ایران، دکتر همایون حسین زاده صحافی، ریاست محترم بخش آبیاری پروری مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، دکتر احمد غروقی رییس محترم بخش بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات شیلات ایران، دکتر محمود بهمنی، معاون محترم تحقیقاتی انستیتو، دکتر علی محمدی، مشاور محترم دفتر برنامه محیط زیست دریای خزر و مهندس عباس توکل، مسئول محترم طرح و برنامه مؤسسه تحقیقات شیلات ایران بخاطر تلاشهای فراوانشان در تصویب و حمایت از مراحل اجرایی پروژه سپاسگزاری می گردد.

همچنین از حمایت های مهندس محمد حسین طلوعی، ریاست محترم مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر شهید بهشتی، مهندس علیرضا عباسعلیزاده، معاونت محترم مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر شهید بهشتی و مهندس حسین محمدی پرشکوه، مسئول محترم بخش تکثیر مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر شهید بهشتی در مراحل اجرایی پروژه قدردانی می نماید.

مجری و همکاران پروژه، از زحمات، حمایت ها و همکاری صمیمانه مهندس اسماعیل شعبانی، معاونت محترم اداری مالی انستیتو، مهندس محمد رضا نوروز فشخامی، مسئول محترم بخش ژنتیک انستیتو، مهندس رضوانا.. کاظمی، مسئول محترم بخش فیزیولوژی انستیتو، جناب آقای نقی آبیاری، مسئول محترم امور مالی انستیتو و مهندس شهرام محمدی، مسئول محترم طرح و برنامه انستیتو کمال تشکر و امتنان را دارند.

منابع

۱. آذری تاکامی، ق. و کهنه شهری، م. (۱۳۵۳) تکثیر مصنوعی و پرورش ماهیان خاویاری. انتشارات دانشگاه. تهران، ۲۹۰ صفحه.
۲. برادران نویری، ش. (۱۳۸۰) پرورش تاسماهیان. انتشارات حق شناس، رشت، ۱۱۵ صفحه.
۳. برادران نویری، ش. (۱۳۸۴) انجماد اسپرم، انتخابی برای حفظ تنوع زیستی جانوران. دنیای آبزیان، شماره ۶، پاییز ۸۴، صص ۴۴-۴۰.
۴. برادران نویری، ش. ؛ علیپور، ع. و پوردهقانی، م. (۱۳۸۵). لقاح تخمک های ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*) پرورشی با اسپرمهای منجمد دو ساله. چهاردهمین کنفرانس زیست شناسی ایران. ۹-۷ شهریور ۱۳۸۵. دانشگاه تربیت مدرس، تهران. خلاصه مقالات، صص: ۳۱۸.
۵. برادران نویری، ش. ؛ علیپور، ع. ؛ پوردهقانی، م. ؛ چکمه دوز قاسمی، ف. ؛ پورکاظمی، م. ؛ محسنی، م. و حلاجیان، ع. (۱۳۸۷). پایه گذاری بانک اسپرم ماهیان خاویاری جنوب دریای خزر. اولین همایش ملی علوم دام و آبزیان، ۱۱-۱۲ خرداد ۱۳۸۷، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سمنان، خلاصه مقالات، صص: ۲۰۱.
۶. برادران نویری، ش. ؛ علیپور، ع. و پورکاظمی، م. (۱۳۸۲) انجماد اسپرم ۵ گونه از تاسماهیان دریای خزر. ویژه نامه اولین سمپوزیوم ملی ماهیان خاویاری، مجله علمی شیلات ایران، پاییز ۱۳۸۲. صص: ۲۳-۲۸
۷. بهمنی، م. (۱۳۷۷) بررسی فیلوژنیک و سیستماتیک تاسماهیان. مجله علمی شیلات ایران، شماره ۲، سال هفتم، صص ۳۰-۹.
۸. پور کاظمی، م. (۱۳۷۶) نگرشی بر وضعیت تاسماهیان دریای خزر و چگونگی حفظ ذخایر آن. مجله علمی شیلات ایران، شماره ۳، سال ششم، صص ۲۲-۱۳.
۹. تقوی مطلق، ا. (۱۳۷۷) ترکیب سنی و پیش بینی مقدار اپتیمم صید برای چهار گونه ماهیان خاویاری ازون برون، فیلهامی، قره برون و چالباش. اولین سمپوزیوم ملی ماهیان خاویاری، ۲۴-۲۵ آذر ۱۳۷۷، رشت، خلاصه مقالات، صص: ۱.

۱۰. توکلی، م. (۱۳۸۶) ارزیابی ذخایر ماهیان خاویاری در حوضه جنوبی دریای خزر (آبهای ایران). گزارش نهایی پروژه. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۱۵۵ صفحه.

۱۱. رضوانی گیل کلایی، س. (۱۳۷۷) بررسی قابلیت های پرورش ماهیان خاویاری، هشتمین همایش ملی شیلات ایران، ۲۸-۲۶ بهمن ۱۳۷۷، دانشگاه تهران، خلاصه مقالات، ص ص ۴۹-۵۰.

۱۲. عابدی، م. (۱۳۷۵) بررسی امکان انجماد اسپرم در ماهیان خاویاری. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی. واحد لاهیجان. ۹۵ صفحه.

۱۳. علیپور، ع. برادران نویری، ش. نوروز فشخامی، م. ر. و پورکاظمی، م. (۱۳۸۰) انجماد اسپرم ماهیان خاویاری شیپ، فیلماهی، ازون برون و تاسماهی ایرانی در فصل تکثیر. گزارش نهایی پروژه. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۴۶ صفحه.

۱۴. کیوان، ا. (۱۳۸۲) ماهیان خاویاری ایران، انتشارات نقش مهر، ۴۰۰ صفحه.

۱۵. مقیم، م. و فضلای، 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، ص ۲.

۱۶. نظری، ر. م. عبدالحی، ح. و مخدومی، ن. م. (۱۳۸۵) تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری. ترجمه: Sturgeon

Fishes: developmental biology and aquaculture. By: Dettlaff, T.A.; Ginsburg, A.S. and

Schmalhausen, O.I. (1993). انتشارات شیلات ایران، معاونت تکثیر و پرورش آبزیان. ۴۲۲ صفحه.

17. Alavi, S.M.H.; Cosson, J. (2005) Sperm motility in fishes: I. Effect of temperature and pH: a review. Cell Biol. Intern., 29: 101-110.
18. Alavi, S.M.H.; Cosson, J.; Karami, M.; Abdolhay, H. and Mojazi Amiri, B. (2004) Chemical composition and osmolarity of seminal fluid of *Acipenser persicus*; their physiological relationship with sperm motility. Aquacult. Res., 35: 1238-1243.
19. Alavi, S.M.H.; Linhart, O.; Coward, K. and Rodina, M. (2008) Fish spermatology: Implications for aquaculture management. In: Fish spermatology, (Eds: Alavi, S.M.H.; Cosson, J.; Coward, K. & Rafiee, G.). Alpha Scientific Ltd, Oxford, p: 397-460.
20. Atse, C.B.; Audet, C. and de la Noue, J. (2002) Effects of temperature and salinity on the reproductive success of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.): egg composition, milt characteristics and fry survival. Aqua. Res., 33: 299-309.
21. Babiak, I.; Glogowski, J.; Brzuska, E.; Suemiec, J. and Adamek, J. (1997) Cryoprotection of sperm of common carp, *Cyprinus carpio* L. Aquacult. Res., 28: 567-571.
22. Baradaran Noveiri, S.; Alipour, A. & Pourkazemi, M. (2006) Sperm morphometry, density and spermatocrit study in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). J. Appl. Ichthyol., 22(1): 380-383.
23. Baradaran Noveiri, S.; Alipour, A. & Pourkazemi, M. (2007) Fertilization test of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) spermatozoa after 5 years cryopreservation. In: The 1st International workshop on biology of fish sperm (Ed: Linhart, O.), Vodnany, Czech Rep., pp 68-69.

24. Bauer, A. (1997) Overview: Economic importance and conservation of sturgeons. *In: Sturgeon stocks and caviar trade workshop.* (Eds: Bristein, J.; Bauer, A. & Kaiser-Pohlmann, A.) IUCN, Gland, Switzerland, p:1-7.
25. Billard, R.; Cosson, J.; Noveiri, S.B. & Pourkazemi, M. (2004) Cryopreservation and short – term storage of sturgeon sperm, A review. *Aquaculture*, 236: 1-9.
26. Billard, R.; Cosson, J.; Perchec, G. & Linhart, O. (1995) Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*, 129: 95-112.
27. Billard, R. & Lecointre, G. (2001) Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 48:1164-1178.
28. Birstein, V.J. (1993) Sturgeon and paddlefishes: Threatened fishes in need to conservation. *Cons. Biol.*, 7(4): 773-787.
29. Birstein, B. J. and DeSalle, R. (1998) Molecular phylogeny of *Acipenseridae*. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 9: 141-155.
30. Blesbois, E. & Labbe, C. (2003) Main improvements 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.
31. Cherpanov, V.V. and Kopeika, E.F. (1999) Cryopreservation and low temperature storage of sturgeon sperm. *J. Appl. Ichthyol.*, 15(4-5):310-311
32. Cherr, G.M. and Clark, W.H. (1984) Gamete interaction in the white sturgeon *Acipenser transmontanus* : a morphological and physiological review. *Environ. Biol. Fishes*, 14: 11-22.
33. Chebanov, M. & Billard, R. (2001) The culture of sturgeons in Russia: production of juveniles for stocking and meat for human consumption. *Aquat. Living Resour.*, 14: 375-381.
34. Ciereszko, A.; Dabrowski, K. and Ochur, S.I. (1996) Characterization of acrosin like activity of lake sturgeon (*Acipenser fluvescens*) spermatozoa. *Mol. Rep. Devel.*, 45: 72-77.
35. Ciereszko, A. (2008) Chemical composition of seminal plasma and its physiological relationship with sperm motility, fertilizing capacity and cryopreservation success in fish. *In: Fish spermatology*, (Eds: Alavi, S.M.H.; Cosson, J.; Coward, K. & Rafiee, G.). Alpha Scientific Ltd, Oxford, p:215-240.
36. Cosson, J. (2008) Methods to analyze the movement of fish spermatozoa and their flagella. *In: Fish spermatology*, (Eds: Alavi, S.M.H.; Cosson, J.; Coward, K. & Rafiee, G.). Alpha Scientific Ltd, Oxford, p:63-102.
37. Cosson, J. and Linhart, O. (1996) Paddlefish (*Polyodon spathula*) spermatozoa: Effects of Potassium and pH on motility. *Folia Zool.*, 45(4): 361-371.
38. Cosson, J.; Linhart, O. and Billard, R. (1995) Motility of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) spermatozoa. *The Sturgeon Quarterly*, 3(4): 9-10.
39. Cosson, J.; Linhart, O.; Mims, S.D.; Shelton, W.L. and Rodina, M. (2000) analysis of motility parameters from paddlefish and shovelnose sturgeon spermatozoa. *J. Fish Biol.*, 56: 1348-1367.
40. Christ, S.A.; Toth, G.P.; McCarth, H.W.; Torsella, A. and Smith, M.K. (1996) Monthly variation in sperm motility in common carp assessed using computer- assisted sperm analysis (CASA). *J. Fish Biol.*, 48: 1210-1222.
41. Dettlaff, T.A.; Ginsburg, A.S. & Schmalhausen, O.I. (1993) *Sturgeon Fishes: Developmental biology and aquaculture*, Springer-Verlag, Berlin. 300 pp.
42. Dzuba, B.B.; Kopeika, E.F.; Cherepanov, V.V. and Drokin, I. (1999) Sturgeon sperm quality after 6 years of cryopreservation. *J. Appl. Ichthyol.* 15(4-5): 312.
43. Flajshans, M.; Linhart, O.; Slechtova, V. and Slechta, V. (1999) Genetic resources of commercially important fish species in Czech Republic. Present status and future strategy. *Aquaculture*, 173: 471-483.
44. Glogowski, J.; Kolman, R.; Szcpekowski, 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.
45. Holcik, J. (1989) *The freshwater fishes of Europe, Vol. I., Part II. Acipenseriformes*, Aula-Verlag, Weisbaden, 470 p.
46. Holcik, J.; Klindova, A.; Masar, J. & Meszaros, J. (2006) Sturgeons in the Slovakian rivers of the Danube river basin: an overview of their current status and proposal for their conservation and restoration. *J. Appl. Ichthyol.*, 22(1): 17-22.
47. Horvath, A.; Wayman, W.R.; Urbanyi, B.; Ware, K.M. and Tiersch, T.R. 2005. The relationship of the cryoprotectants methanol and dimethylsulfoxide and hypersmotic extenders on sperm cryopreservation of two North-American sturgeon species. *Aquaculture*, 247(1-4): 243-251.
48. Horvath, A.; Urbanyi, B.; Mims, S.D.; Bean, W.B. and Gomelsky, B. (2006). Improved cryopreservation of sperm of paddlefish (*Polyodon spathula*) . *J. World Aquacult. Soc.* 37(4): 356-326.

49. Ingerman,R.; Holcomb,M.; Robinson,M. and Cloud, J.(2002) Carbon Dioxide and pH affect sperm motility of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*).J.Exp.Biol. 205:2885-2890
50. IUCN (2007) IUCN Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 28 October 2007. Gland,Switzerland,
51. Ivanov, V.P. & Vlasenko, A.D.(2001) The relic fish of the Caspian Sea, The sturgeons. Fish Farm. Fish., 1: 20-21.
52. Jahnichen, H.; Warnecke,W.; Trolsch,E.; Kohlman,K.; Bergler,H. and Pluta,H.(1999) Motility and fertilizing capacity of cryopreserved *Acipenser ruthenus* . sperm. J.Appl. Ichthyol.15: 204-206.
53. Kerby, J.H.(1983) Cryogenic preservation of sperm from stripped bass. Trans. Am. Fish. Soc., 112(1): 86-94.
54. Kopeika,E.. and Kopeika,J.(2008) Variability of sperm quality after cryopreservation in fish. In: Fish spermatology, (Eds: Alavi,S.M.H.; Cosson,J.; Coward,K. & Rafiee,G.).Alpha Scientific Ltd,Oxford, p:345-396.
55. Kopeika, E. F., Williot,P., Goncharov, B.F., (2000) Cryopreservation of Atlantic sturgeon *Acipenser sturio* L., 1758 sperm: First results and associated problems. Bol. Inst. Esp. Oceanogr., 16(1-4):167-173.
56. Lahnsteiner, F.; Berger, B.; Horvath,A. and Urbanyi,B. (2004) Studies on the semen biology and cryopreservation in the starlet, *Acipenser ruthenus* L. Aquacul.Res. 35(6): 519-528.
57. Liley, N.R.; Tamkee,P.; Tsai, R. and Hoysak,D.J.(2002) Fertilization and dynamics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects of male age, social experience and sperm concentration and motility on in vitro fertilization. Can.J.Fish.Aquacult. Sci., 59: 144-152.
58. Linhart.O.; Mims,S.; Gomelsky,B.; Cvetkova,L.I.; Cosson,J.; Rodina,M.; Horvath,A. & Urbanyi, B. (2006) Effect of cryoprotectants and male on motility parameters and fertilization rate in paddlefish (*Polyodon spathula*) frozen-thawed spermatozoa. J.Appl. Ichthyol. ,22(1): 389-394
59. Linhart.O.; Mims,S.; Shelton, W.L.(1995) Motility of spermatozoa from shovelnose sturgeon, *Scaphirhynchus platyrhynchus*, and paddlefish, *Polyodon spathula*. J.Fish Biol., 47: 902-909.
60. Liu,L.; Wei,Q.; Guo,F.; Zhang,J. & Zhang,T.(2006) Cryopreservation of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) sperm. J Appl. Ichthyol., 22(1): 384-388.
61. Mims,S.D; Tsvetkova,L.I.; Brown,G.G. and Gomelski,B.I.(2000) Cryopreservation of sperm of sturgeon and paddlefish. In: Cryopreservation in aquatic species. Adv.Wold Aquacult. Vol 7 (Eds): Tiersch,T. and Mazil,P.M. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, pp.123-129.
62. Park, C. & Chapman, F.A. (2005) An extender solution for the short- term storage of sturgeon semen. North Am. J. Aquacul., 67:52-57.
63. Piros,B.; Glogowski,J.; Kolman,R.; Rzemieniecki,A.; Domagala, J.; Horvath,A.; Urbanyi,B. and Ciereszko,A. (2002) Biochemical characterization of siberian sturgeon *Acipenser baeri* and sterlet *Acipenser ruthenus* milt plasma and spermatozoa. Fish Physiol. Biochem., 26: 289-295.
64. Pourkazemi,M.(2006) Caspian Sea sturgeon conservation and fisheries: Past, present and future. J.Appl. Ichthyol., 22(1): 12-16.
65. Rakithin,A.; Ferguson,M.M. and Trippel, E.A. (1999) Spermatozoa density in Atlantic Cod (*Gadus morhua*): correlation and variation during the spawning season. Aquaculture, 170: 349-358.
66. Raymarkers, C.(2002) Conservation and broodstock management. International trade in sturgeon and paddlefish species, The effect of CITES listing. Intern. Rev. Hydrobiol., 87(5-6): 525-537.
67. Russel, P.J. (1996) Genetics. 4th ed. Harper Collins College Publications. pp: 719-725.
68. Sarosiek,B.; Ciereszko,A.; Rzemieniecki,A.; Domagata,J. and Glogoeski,J.(2004) The influence of semen cryopreservation on the release of some enzymes from Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa. Arch.Pol.Fish., 12(1): 13-21.
69. Shin,D.H.; Wu,Q.; Kwon,O.; Ijiri,S.; Yamaha,E.; Adachi,S.; Arai,K and Yamauchi,K.(2007) Cryopreservation of sperm in the hybrid sturgeon, Bester *Huso huso* – *Acipenser ruthenus*. World Aquaculture Society, Meeting Abstract book, p: 215.
70. Sokolov,L.I. & Berdichevskii,L.S. (1989)Acipenseriformes. In: The freshwater fishes of Europe. General introduction to fishes, Acipenseriformes, (Ed: Holcik, J.) , AULA-Verlag, Wiesbaden, pp:148-149.
71. Stoss, J. (1983) Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In : Fish physiologist, Vol IX. Reproduction, Part B. : Behaviour and fertility control. (Eds: W.S.Hoar ,W.S; Randall, P.J and Donaldson, D.M.) Academic Press. pp: 305-341.
72. Tvedt,H.B.; Benfey, T.J.; Martin-Robichaud, D.J. and Power,J. (2001) The relationship between sperm density, spermatozoa density, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. Aquaculture, 194: 191-200.

73. Tsvetkova,L.I., Cosson,J., Linhart,O., Billard, R., (1996) Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawed spermatozoa in sturgeons, *Acipenser baerii* and *A. ruthenus*. J. Appl. Ichthyol. 12,107-112.
74. Urbanyi,B.; Horvath, A. & Kovacs,B. (2003) Successful hybridization of *Acipenser* species using cryopreserved sperm. Aquac. Int., 12:47-56.
75. Williot,p.; Arlati,G.; Chebanov, M.; Gulyas,T.; Kasimov,R.; Kirschbaum, F.; Patriche,N.; Pavlovskaya,L.P.; Poliakova, L.; Pourkazemi,M.; Kim,Y.; Zhaung,P. & Zholdasova,I.M. (2002) Conservation and broodstock management, Status and management of Eurasian sturgeons: An overview. Intern. Rev. Hydrobiol., 87(5-6): 483-506.
76. Williot,P.; Brun, R.; Rouault,T.; Pelard,M.; Mercier,D. & Ludwig.A. (2005) Artificial spawning in cultured starlet sturgeon, *Acipenser ruthenus* L., with special emphasis on hermaphrodites. Aquaculture, 246: 263-273.

Abstract

Sturgeon stocks are drastically decreasing in Caspian Sea during recent decades. This project has been proposed to collect the excess sperm of Caspian Sea Southern part sturgeon breeders, to cryopreserve and hold them for further use.

During two spawning seasons (2006-2007), sperm quality and quantity analysis were conducted on 34 different male sturgeons of which 12 Persian sturgeon, 4 stellate sturgeon, 1 beluga and 1 ship sturgeon with better quality were chosen to cryopreserve.

After dilution of fresh sperm with sturgeon sperm diluent (115 mM Tris, 23.4 mM sucrose and 15% DMSO) at the ratio of 1:1, the 0.5 ml straws were filled using special filling and sealing apparatus and frozen with a multi step freezing rate. To access the further quality and fertilization test, samples were thawed at 40 °C for 20 seconds.

During the project performance, 1010 ml of Persian sturgeon sperm , 110 ml of ship sturgeon sperm , 90 ml of stellate and 80 ml of beluga sperm were cryopreserved. The reduction of frozen-thawed sperm motility in comparison with fresh samples showed 10-52.3 % decrease, but there was not any significant differences between samples after 7 months preservation in liquid Nitrogen ($P < 0.005$).

River caught Persian sturgeon samples showed higher sperm density in comparison with nonriverine breeders ($P < 0.05$). Data showed that stellate sturgeon sperm showed better resistance to freezing condition in comparison with Persian sturgeon spermatozoa.

Fertilization tests (4 hours after fertilization) showed 27.4% and 58.2% fertilization rate in frozen-thawed stellate and Persian sturgeon spermatozoa, respectively.

Key Words: spermatozoa, cryopreservation, percentage of motility, sperm bank, sturgeon, Caspian Sea

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION – International Sturgeon Research Institute

Title : Creating a sperm bank from sturgeon brood stocks in the South Caspian Sea

Apprpved Number: 4-86-12-88085

Author: Shahrouz Baradaran Noveiri

Executor : Shahrouz Baradaran Noveiri

Collaborator : A.R.Alipoor,M.Mohseni,M.Pordehghani,F.Chakmedooz,A.Halajiyani

Advisor(s): M.Porkazemi

Supervisor: -

Location of execution : Guilan province

Date of Beginning : 2011

Period of execution : *1 Year & 1 Month*

Publisher : *Iranian Fisheries Research Organization*

Circulation : *20*

Date of publishing : 2012

**All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted
without indicating the Original Reference**

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION- International Sturgeon Research Institute

Title:

**Creating a sperm bank from sturgeon brood
stocks in the South Caspian Sea**

Executor :

Shahrouz Baradaran Noveiri

Registration Number

40607