View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور – مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری

عنوان :

بررسی امکان انجماد اسپرم قزل آلای رنگین کمان

مجری:

حسین مرادیان

شماره ثبت

٤٣٥٨٧

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری

عنوان پروژه : بررسی امکان انجماد اسپرم قزل آلای رنگین کمان
شماره مصوب پروژه : ۸۸۰۴۲-۱۲-۱۲-۲
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : حسین مرادیان
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : حسین مرادیان
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : عین اله گرجی پور ،محسن محمد پور، جواد مهدوی جهان آباد، احمدرضا حسینی، حبیب اله گندمکار، سید عبدالحمید حسینی، محمد میثم صلاحی، حامد کریمی ،کمیل رزمی، داود ضرغام، کیانوش کمایی، طیبه باشتی، علی نکوئی فرد، نقاش
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) :-
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : حسین عبدالحی
محل اجرا : استان کهگیلویه و بویراحمد
تاریخ شروع : ۸۸/۷/۱
مدت اجرا : ۲ سال
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال۱۳۹۳
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 مسئول / مجری»

پروژه : بررسی امکان انجماد اسپرم قزل آلای رنگین کمان

کد مصوب : ۸۸۰۴۲-۱۲-۱۲-۲

شماره ثبت (فروست) : ۴۳۵۸۷ تاریخ : ۹۲/۷/۸

با مسئولیت اجرایی جناب آقای حسین مرادیان دارای مدرک تحصیلی کارشناسی ارشد در رشته تکثیر و پرورش آبزیان می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش اصلاح نژاد و تکثیر و پرورش آبزیان در تاریخ ۹۲/۴/۱۲ مورد ارزیابی و با رتبه خوب تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده □ مرکز ■ ایستگاه □

با سمت کارشناس تکثیر و پرورش در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱- مقدمه ۲
۲- مواد و روشها ۱۱
۳- نتایج ۲۰
۴- بحث و نتیجه گیری ۲۷
۵- نتیجه گیری نهایی ۳۷
پیشنهاده ۳۸
منابع ۳۹
چکیده انگلیسی ۴۵

چکیده

امروزه اصلاح نژاد ماهیان به فعالیت هایی فراتر از تکثیر جمعیتهای تصادفی گسترش یافته است. بهبود پتانسیل های ژنتیکی می تواند از طریق فعالیتهای مانند ایجاد نژادهای خاص ژنتیکی، هیبریدگیری و دستکاری گامت ها صورت پذیرد. در این میان برخی از این فعالیتها نیازمند استفاده از تکنیک انجماد اسپرم هستند. علاوه بر این در مواقع وجود محدودیت در حمل ماهیان زنده، می توان از تکنیک انجماد اسپرم به عنوان یک ابزار کارامد در تبادل ژنی میان جمعیتها و مکان های مختلف استفاده نمود. در این پروژه در ابتدا کیفیت اسپرم در مولدین موجود در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج بررسی شد. در ادامه نسبت به پژوهش و کاربرد روشهای محافظت از اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان با سرما و انجام پژوهش های مربوطه اقدام شد. بر اساس منابع موجود ۶ ترکیب محلول انجماد انتخاب شد و در این مطالعه جهت انجماد اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان مورد بررسی قرار گرفت. جهت ارزیابی قابلیت لقاح مقدار ۲۵ گرم تخم با اسپرم منجمد شده در پایوت های ۰/۵ میلی لیتر لقاح داده شدند. علاوه بر این، دمای ذوب اسپرم های منجمد شده نیز مورد بررسی قرار گرفته شد. در آزمایش دیگر محافظت کننده های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که بهترین زمان اسپرم گیری در این ماهی در شرایط مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهر یاسوج، طی نیمه دوم آبان ماه تا انتهای بهمن ماه می باشد. همچنین از بین ترکیبات مورد استفاده بهترین نتایج لقاح حاصل از انجماد دراز مدت اسپرم بعد از ۳ ماه از ترکیب شماره ۱ (٪۵۶/۹) و ۲ (٪۵۷/۲) بدست آمد. همچنین بر اساس نتایج بررسی میزان لقاح اسپرم های ذوب شده دمای $25^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه بهترین دما جهت ذوب اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان می باشد. در ارتباط با انتخاب نوع محافظت کننده نیز استفاده از ٪۱۰ متانول همراه با محلول شماره ۱ و همچنین٪۵ DMSO و ترکیب ٪۵ DMSO و ٪۱ گلیسرول با محلول شماره ۲ بهترین نتایج لقاح را همراه داشت. در مجموع در این مطالعه انجماد اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان با استفاده از محلول های شماره ۱ و ۲ همراه با محافظت کننده های ذکر شده و ذوب اسپرم های منجمد شده در دمای $25^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه پیشنهاد می شود.

واژه‌های کلیدی : انجماد اسپرم، قزل آلای رنگین کمان، رقیق کننده، محافظت کننده.

۱- مقدمه

ماهی قزل آلای رنگین کمان یکی از مهمترین گونه‌های تجارتی آزاد ماهیان است، که به طور گسترده ای در بسیاری از کشورهای جهان پرورش داده می شود. بر اساس آمار سازمان خواروبارکشاورزی سازمان ملل متحد (FAO, 2010) میزان تولید آزادماهیان پرورشی جهان به عنوان عمده ترین ماهیان سردآبی پرورشی در سال ۲۰۰۹ بیش از ۲۳۹۵۹۱۰ تن بوده است که ایران در همین سال با ۷۳۶۴۲ تن تولید ضمن تامین ۳/۰۷ درصد از کل آزادماهیان پرورشی، بعد از کشورهای شیلی، ترکیه و نروژ مقام چهارم جهان را در زمینه تولید قزل آلا در آب شیرین به خود اختصاص داده است. این در حالی است که صنعت آبزی پروری سردآبی ایران طی ده سال اخیر رشد قابل توجهی داشته و میزان تولید از حدود ۹۰۰۰ تن در سال ۱۳۷۹ به حدود ۷۳۶۴۲ تن در سال ۱۳۸۸ رسیده است که بطور متوسط حدود ۲۰ درصد نسبت به پیش بینی های انجام شده در برنامه چهارم توسعه کشور بیشتر بوده است . این مقدار در سال ۱۳۸۹ به عنوان سال اول برنامه پنجم به ۹۱۵۱۹ تن رسید و پیش بینی شده است تا پایان این برنامه به مقدار حدود ۱۵۰۰۰۰ تن برسد (علیزاده، ۱۳۹۰).

ماهی قزل آلا به عنوان تنها گونه پرورشی سردآبی موجود کشور از اهمیت بسیار زیادی در سیاستگذاری ها و برنامه ریزی های تحقیقاتی و اجرایی برخوردار می باشد. لذا اهداف تحقیقاتی و اجرایی در مورد این ماهی ابعاد متعدد و گسترده ای داشته که هر یک نقش زیادی در فرآیند تولید در مزارع تکثیروپرورش قزل آلا ایفا می کند. هدف نهایی در مورد این محور اصلی، افزایش کارآیی تولید و کاهش هزینه های تولید است. در این خصوص بسیاری از دانشگاه‌ها و مراکز علوم شیلاتی کشور بخشی از تحقیقات خود را معطوف بهینه‌سازی شرایط تکثیر، پرورش، اصلاح نژاد، بیماری شناسی، تغذیه و فیزیولوژی این ماهی نموده اند. .با توجه به استعداد کشور ما در آب‌های داخلی استان‌هایی چون چهارمحال و بختیاری، مازندران، لرستان، کهگیلویه‌وبویر احمد، فارس، همدان، آذربایجان‌غربی و ... در زمینه توسعه پرورش ماهیان سردآبی و نیاز به تولید تخم چشم زده و بچه ماهی این استان‌ها و سایر نقاط کشور ضروری بود که مطالعات جامعی در رابطه با انجماد اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان صورت گیرد تا در آینده نزدیک بتوان با گسترش این تکنیک هزینه‌های تولید بچه ماهی را کاهش داد. از طرف دیگر با انجام طرح‌های اصلاح نژاد، اسپرم ماهیان مولد نر قزل آلای رنگین کمان را در اختیار مراکز تکثیر قرار داد. از آنجا که صفات ارثی از طریق مواد تناسلی مولدین به نسل بعد توارث می یابد، لذا برخورداری از اسپرم با کیفیت مطلوب حفظ و نگهداری آن در شرایط مناسب، از عوامل مهم موفقیت در تکثیر این ماهی محسوب می شود. در این راستا انجماد اسپرم به عنوان ابزاری کارآمد در اختیار مدیران کارگاه‌های تکثیر قرار گرفته است. انجماد بلند مدت تکنیکی است که بواسطه ی آن می توان سلول های زنده، بافت ها، اندام ها، رویان، لارو و ... را در دمای خیلی پایین (معمولا در ۱۹۶- درجه سانتی گراد) برای یک دوره‌ی زمانی نامشخص، نگهداری نمود. از این تکنیک برای نگهداری و ایجاد بانک اسپرم به منظور تکثیر مصنوعی استفاده می شود.

۱- ۱- اهمیت انجماد گامت ها

تنوع گونه ای و افزایش تولید آبزیان نیازمند توسعه تکنیکهای نوین می باشد. انجماد اسپرم ماهیان نقش مهمی را در توسعه آبزی پروری ایفا می کند و در دنیا تحقیقات زیادی بر روی این موضوع صورت گرفته است (Lahnsteiner *et al*. 1992; Tanaka *et al*. 2002). از زمان کشف گلیسرول (Pogle *et al*. 1949) و دی متیل سولفوکساید (Lovelock and Bishop 1959) به عنوان مواد نگهدارنده، انواع مختلف سلول و بافت منجمد شده اند.اغلب مطالعات مربوط به انجماد بر روی آزادماهیان که دارای ارزش آبزی پروری بالایی هستند متمرکز شده اند (Gwo, 2000).

انجماد اسپرم گامت های ماهیان به عنوان ابزار مهمی هم در حفاظت شیلاتی و هم آبزی پروری مطرح است. تعداد گونه های در حال انقراض در حال افزایش می باشد (Knapp, 2000) و انجماد اسپرم می تواند به عنوان ابزاری برای ذخیره مواد ژنتیکی و حفظ تنوع ژنتیکی عمل کند. در آبزی پروری، گامتهای منجمد شده باید به منظور نگهداری پتانسیل ژنتیکی مولدین موجود در مراکز تکثیر استفاده شود. انجماد اسپرم با کاهش تعداد مولدین نر نگهداری شده در مراکز تکثیر سبب افزایش بهره اقتصادی خواهد شد (Richardson *et al*. 1999). علاوه بر این، انجماد گامتها، باعث هم زمان سازی قابلیت دسترسی به گامت هر دو جنس، حمل و نقل آسان گامت ها و افزایش نتاج نر های بهگزینی شده می شود (Carolsfeld *et al*. 2003; Rideout *et al*. 2003).

در حال حاضر، انجماد اسپرم ماهیان راحت ترین راه برای ذخیره بلندمدت سلولهای زایا می باشد. Stoss (۱۹۸۳a) بر اساس داده‌های Ashwood-Smith و Whittingham، مدت زمان ماندگاری اسپرم در هنگام نگهداری در نیتروژن مایع را ۲۰۰ تا ۳۲۰۰۰ سال تخمین زد. بنابراین بازه زمانی مورد نیاز جهت دوره نگهداری خیلی بیشتر از زمان کافی در راستای ایجاد بانک[1] اسپرم می باشد. موفقیت های بدست آمده در انجماد اسپرم ماهیان مختلف به خوبی کاربردی بودن انجماد اسپرم را نشان می دهد و اینکه روش انجماد را می توان به طور مستقیم یا با کمی تغییر برای نگهداری جمعیت های مختلف ماهیان به کار برد. علاوه بر ایجاد بانک سلول های زایا، می توان از اسپرم های منجمد به عنوان جزئی از برنامه های تولید ذخایر عاری از بیماری و همچنین برنامه های اصلاح نژاد استفاده نمود.

در توسعه بانک اسپرم ماهیان آگاهی از دو نکته مهم باید مدنظر قرار گیرد. اول اینکه، بانک اسپرم به منظور ایجاد یک بانک ژنتیکی مطرح می باشد. حتی در صورتی که به طور مستقیم باعث افزایش تعداد ماهیان در طبیعت شود، با این حال مشکلات جمعیتی یک ذخیره از ماهیان را حل نخواهد کرد. دوم اینکه انجماد اسپرم دارای یک پتانسیل پروسه مخرب می باشد.

امروزه انجماد اسپرم آبزیان از تکنیکهای پیشرفته جهانی است و مزایای متعددی دارد که از آن جمله می توان موارد ذیل را ذکر کرد: دستکاری تخم در زمان تکامل جنین با استفاده از بانک اسپرم منجمد، مدیریت ژنتیکی

[1] - repository

تکثیر، امکان ایجاد دورگه های انتخابی، امکان استفاده از اسپرم ماهیان نر تغیر جنسیت یافته، امکان استفاده از اسپرم عاری از بیماری‌های ویروسی IHN و IPN، مدیریت تولید انبوه تخم لقاح یافته با استفاده از اسپرم در زمان دلخواه، مطالعات دورگه گیری و.... انتقال و جابه جایی اسپرم، صرفه جویی و کاهش هزینه های مربوط به خرید غذا، نگهداری و تغذیه ماهیان مولد نر قزل آلا را کاهش خواهد داد به طوریکه پرورش دهندگان می توانند در فصل تکثیر، اسپرم مورد نیاز خود رااز محل های فروش اسپرم منجمد شده خریداری نمایند.

به طور کلی.انجماد اسپرم را می تواند به عنوان یک ابزار مدیریتی قوی برای نیل به اهداف زیر استفاده شود

۱- هم زمان سازی قابلیت دسترسی به هر دو جنس: برای تکثیر دو نژاد بهاره یا پاییزه یک ماهی که امکان دسترسی به هر دو جنس در یک زمان وجود ندارد، می توان از این روش بهره برد (Blaxter,1953).

۲- استفاده از کل حجم منی موجود: برای گونه هایی که بدست آوردن اسپرم از آنها مشکل می باشد، می توان از این تکنیک استفاده کرد(مانند مارماهی ژاپنی (Izawa & Ohta,1996).همچنین برای استحصال اسپرم از گونه هایی که در شرایط اسارت اسپرم کافی تولید نمی کنند نیز می توان از این روش بهره برد(مانند فلاندر دم زرد) (Clearwter and Crim , 1995).

۳- آسان نمودن نگهداری مولدین: القاء تخم ریزی خارج از فصل تولیدمثل در بسیاری از گونه های ماهی پرورشی از طریق دستکاری دوره ی نوری و دمایی قابل اجراست(Bromage, 1995) ولی این کار پر هزینه خواهد بود(Suquet *et al*., 2000). زمانیکه اسپرم های منجمد شده در تمام سال وجود داشته باشد، دستکاری فصل تکثیر تنها به ماهیهای مولد ماده محدود می گردد.. همچنین با انجماد اسپرم کاهش تعداد مولدین نر نگهداری شده در کارگاهها را خواهیم داشت. کاهش اثرات استرس حمل و نقل بر مولدین نر و در نتیجه جلوگیری از کاهش کارایی اسپرم در نتیجه این حمل و نقل نیز از مزایای این تکنیک است.

۴- حمل ونقل آسان سلول های جنسی: در زمانی که سلول های جنسی مولدین را در محل های مختلف جمع آوری می کنند، با این روش جا به جایی آنها راحت تر انجام می گیرد، .علاوه بر این از این روش برای معرفی ژن های مختلف از محیط طبیعی به ذخایر پرورشی نیز می توان استفاده کرد.

۵- جلوگیری از کاهش کیفیت اسپرم: کاهش کیفیت اسپرم در طول فصل تولیدمثل در بسیاری از گونه های ماهی گزارش شده است(Rana, 1995). تکنیک انجماد اسپرم امکان جمع آوری اسپرم در زمانی که بالاترین کیفیت را دارا هستند، را فراهم می کند.

۶- حفاظت از تغییرپذیری ژنتیکی جمعیت های بومی: استفاده از تعداد محدودی از مولدین در کارگاه های تکثیر، کاهش هتروزیگوسیتی را در پی خواهد داشت. اسپرم های منجمد شده از نژادهای بهگزینی شده را می توان به ذخایرگونه های پرورشی معرفی نمود. همچنین از بانک ژنی موجود در اسپرم های منجمد شده می توان برای حفظ تنوع ژنتیکی جمعیت ماهیهای در معرض خطر و جلوگیری از آمیزش خویشاوندی استفاده کرد.

علاوه بر موارد ذکر شده، در ماهیهای هرمافرودیت پروتوژینوس(مانند هامور)، امکان بدست آوردن اسپرم تنها در سنین ۵ تا ۱۰ سالگی وجود دارد از این رو برای تکثیر مصنوعی این ماهیان داشتن ذخایر اسپرمی بسیار مفید و حتی ضروری می باشد(Suquet *et al*., 2000).

۷-کنترل و بهبود خزانه ژنی مولدین کارگاهی موجود و کاربردهای خاص تحقیقاتی در طول مراحل انجماد

۸- کمک به جلوگیری از انقراض نسل گونه های در معرض خطر

۹- کمک به تکثیر گونه هائی که در شرایط طبیعی، همزمانی رسیدگی جنسی در آنها کمتر دیده می شود

۱۰- کمک به در اختیار بودن اسپرم برای تمام طول سال

۱۱- جلوگیری از تلاقی خویشاوندی و ایجاد تنوع زیستی

و هدف مهم تر، تهیه بانک اسپرم بصورت بانک ژنی برای نگهداری اسپرم ها حتی پس از مرگ جانور. این روش همچنین بعنوان راهکاری موثر برای ذخیره اسپرم گونه های در معرض خطر مثلا با شیوع بیماری ناگهانی و در نتیجه از بین رفتن گونه و یا با هر گونه از بی نظمی های معمول و یا حوادث ناگهانی مثل نشت نفت و روغن می باشد که یک منبع پایدار از اسپرم را تهیه می کند.

۲-۱- تکنیک انجماد اسپرم

انجماد شامل سردکردن، ذخیره منجمد و انجمادزدایی مواد و سلول های زنده است (Tiersch and Mazik, 2000). تلفات سلولی همراه با فرایند انجماد و سرمازدایی را می توان تا اندازه ای با افزودن ترکیبات نگهدارنده نفوذ ناپذیر[1] و نفوذ پذیر آلی خنثی نمود (Bromage and Roberts, 1995). نقش این مواد حفاظت از سلول یا محتویات سلول در برابر سرمای ایجاد شده در مرحله ی انجماد است. مواد نگهدارنده نفوذ پذیر باید در طی فرایند انجماد از طریق آب زدایی سبب کاهش کریستال های یخی شوند. انتخاب نگهدارنده بر اساس نفوذپذیری[2]، حلالیت بالا در آب و سمیت سلول می باشد. بنابراین در زمان ارزیابی ماده نگدارنده هر دو عامل کارایی حفاظت کنندگی و تحمل سمیت سلول، باید مدنظر قرار گیرند (Chao and Liao, 2001). جنبه های مختلف انجماد اسپرم، شامل ترکیب شیمیایی رقیق کننده ها و تاثیرات آنها بر روی غشاء پلاسمایی اسپرم، عملکرد میتوکندریایی، دامنه تحمل اسمزی، هدایت هیدرولیک و پرمبیلیتی و سمیت ماده نگهدارنده، بیانگر این است که اسپرم هر گونه دارای خواص کرایوبیولوژیکی منحصر بفرد می باشد (Woods *et al*., 2004). هر دو عامل کیفیت گامت ها و تکنیک انجماد بر روی موفقیت لقاح گامتهای منجمد شده تاثیر گذارند.

تهیه پروتکل انجماد به تولید گامتهایی با یکپارچگی ساختاری و عملکردی مشابه با گامتهای معمولی و سالم کمک خواهد کرد. آسیب به فراساختار اسپرماتوزوآ در طی فرآیند انجماد سبب کاهش موفقیت لقاح خواهد شد (Ciereszko *et al*., 2006). اسپرم های جمع آوری شده در ابتدا و انتهای فصل تولید مثل ممکن است از کیفیت

[1] - non-permeating
[2] - permeability

پایینی برخوردار باشند (Billard and Cosson, 1992). دلیل پایین بودن کیفیت اسپرم در آغاز فصل تولید مثلی نامشخص است ولی در انتهای فصل می تواند بر اثر پیرشدن صورت پذیرد (Billard., 1986). حتی اگر کیفیت اسپرم عالی باشد، ممکن است مدفوع و اوره در اسپرم جمع آوری شده مشاهده شود، که منجر به تغییر پارامترهای کیفی اسپرم و در نهایت تاثیر بر روی موفقیت انجماد خواهد شد (Suquet *et al*., 2000). تحقیقات بر روی ترکیب مایع سمینال، اسپرماتوژنزیز و ذخیره اسپرم و ارتباط آنها با فصل تخمریزی در اجرای بهتر فرایند انجماد خیلی مهم می باشد. برای مثال، ترکیب محلول های رقیق کننده که برای جلوگیری از تحرک اسپرماتوزوآ استفاده می شود، باید طوری طراحی شود که مشابه خصوصیات مایع سمینال باشد. اسپرماتوژنزیز و ذخیره اسپرم باید بیانگر وضعیت بلوغ گامتها باشد، بنابراین زمان مناسب برای جمع آوری گامتها قبل از انجماد مشخص خواهد شد که نهایتاً منجر به تولید گامتهای باکیفیت خواهد شد. مایع سمینال از طریق حفظ خواص عملکردی اسپرماتوزوآ ها (تحرک و انسجام DNA) و پشتیبانی از متابولیسم اسپرماتوزوآها، شرایط مناسب ذخیره آنها را در سیستم تولید مثلی فراهم می سازد.

۱- ۲- ۱- رقیق کننده ها[1]

رقیق کننده یک محلول فیزیولوژیک می باشد که کنترل بهتر شرایط فیزیکوشیمیایی را در طول زمان نگهداری فراهم می کنند. رقیق کننده های مورد استفاده در محلول انجماد از لحاظ پیچیدگی از ترکیبات پیچیده مشابه ترکیب پلاسمای منی تا یک محلول گلوکزی ساده متغیر می باشند. تحقیقات نشان داده اند که ترکیب این محلول نقش مهمی در قدرت بارورسازی اسپرم بعد از انجماد دارد و به نظر نمی رسد که یک رقیق کننده تنها وجود داشته باشد که بارورسازی را در تمام گونه ها به حداکثر برساند. مطالعات مختلف نشان داده اند که ترکیبات پیچیده تر لزوماً بهتر نیستند (Cloud and Patton, 2008). نقش این مواد جلوگیری از تحرک اسپرم قبل از انجماد و جلوگیری از هدر رفتن ATP سلول است. یک رقیق کننده ی ایده آل بایستی دارای خصوصیاتی به شرح زیر باشد: ایزوتونیک باشد، ظرفیت بافری مناسب داشته باشد و حاوی مواد مغذی، آنتی اکسیدان ها وآنتی بیوتیک ها باشد. این ترکیبات یا قندی هستند یا نمکی، که رقیق کننده های قندی اغلب به دلیل نقشی که به عنوان محافظت کننده های خارجی دارند و همچنین تثبیت کنندگی غشا، موفقیت بیشتری را به همراه دارند. نسبت اسپرم به رقیق کننده، دامنه ی بین ۱:۱ تا ۱:۲۰ را در گونه های مختلف دارد. از جمله رقیق کننده ها و ترکیباتی که به همراه آن ها استفاده شده است می توان موارد زیر را نام برد: NaCl، $NaHCO_3$ ، لسیتین، مانیتول، فروکتوز، سوکروز، گلوتاتیون، $KHCO_3$، Mounib، KCl، زرده ی تخم مرغ، گلیسین، آب دریای رقیق شده، D-sorbitol، Ringer، kurokura-1، D-15، Cortland، گلوکز، روغن معدنی، بافر فسفات و... .

رقیق کننده‌ی Ringer دارای ترکیبات NaCl، KCl، $CaCl_2$ و $NaHCO_3$ است که خود به دو نوع Ringer قورباغه و ماهی تقسیم می شود. Ringer قورباغه دارای ترکیباتHEPES (بافر)، NaCl، KCl، $CaCl_2$ ، گلوکز و$MgCl_2$ است و

1 - extenders

Ringer ماهی دارای ترکیبات NaCl، KCl، $CaCl_2$، $MgSO_4$، $NaHCO_3$، NaH_2PO_4، Na_2HPO_4 و D-Glucose می باشد (Kato *et al*., 1982).

جهت انتخاب یک رقیق کننده مناسب باید معیارهایی مد نظر قرار گیرند که از آن جمله می توان به موارد زیر اشاره نمود:

۱- ترکیبات مواد شیمیایی رقیق کننده به آسانی قابل تهیه و در دسترس باشند.

۲- با دارا بودن خواص نزدیک به ترکیبات آلی و غیر آلی پلاسمای منی در حفظ اسپرم و نگهداری آن کمک کند.

۳- این رقیق کننده ها در نگهداری اسپرم گونه های مشابه آزاد ماهیان نیز موفق باشد و یا بتواند پاسخ مناسبی بدهد.

۴- بر اساس شرایط انجماد بتواند همه مراحل اعم از زمان رقت با اسپرم، بعد از هم دمایی با یخ و پس از ذوب درصد تحرک بالایی را در اسپرم سبب گردد.

۱- ۲- ۲- محافظت کننده ها[1]

نقش این مواد حفاظت از سلول یا محتویات سلول در برابر سرمای ایجاد شده در مرحله ی انجماد است. این مواد شیمیایی سرعت انتشار آب از داخل سلول به خارج سلول راکاهش داده و از سرعت رشد کریستال های یخی می کاهد. این مواد بایستی دارای سمیت پایین و قابلیت حلالیت بالا در آب و قابلیت نفوذ به داخل سلول را داشته باشند. چون بیشتر این ها برای سلول سمی هستند برای کاهش اثرات سمی این مواد باید به کندی و در دماهای پایین تر به اسپرم اضافه شوند و قبل از اضافه کردن هم باید به خوبی با رقیق کننده، رقیق شده باشند. از جمله ی این مواد که در مطالعات استفاده شده اند می توان موارد زیر را نام برد: دی متیل سولفوکسید (DMSO)، گلیسرول، اتیل گلیکول (EG)، پلی وینیل پرولیدون (PVP)، متانول، دی متیل استامید (DMA)، فرمامید، ترهالوز و... .

معمولا محافظت کننده ها را به دو گروه نفوذ پذیر و نفوذناپذیر تقسیم می کنند. اتیلن، پروفیلن گلیکول، گلیسرول، دی متیل سولفوکسید و متانول جزء محافظت کننده های نفوذ پذیر می باشند. از جمله دلایل استفاده از این نوع محافظت کننده ها سرعت نفوذ آنها به داخل اسپرم و واکنش بین آنها با فسفولیپیدهای غشاء اسپرم بیان شده است (Ogier de Baulny, 1997). دی متیل سولفوکسید رایج ترین محافظت کننده مورد استفاده در انجماد اسپرم ماهی می باشد که قابلیت نفوذ پذیری آن متاثر از دما نیست و میزان سمیت آن بین گلیسرول که حداقل سمیت و متانول که بیشترین سمیت را داراست، قرار دارد(Thomas *et al*., 2003). البته غلظت بالا دی متیل سولفوکسید سمی بوده و مدت تحرک اسپرم برخی از گونه ها در غلظت بالای این ماده کاهش یافته است

1 - cryoprotectants

(Leung, 1987; Gwo, 1993). دی متیل سولفوکسید، گلیسرول، مخلوط دی متیل سولفوکسید و گلیسرول، پروپان دیول، دی متیل استامید و پلی اتیلن گلیکول برای انجماد اسپرم آزاد ماهیان مورد استفاده قرار گرفت که در این میان مخلوط ۵ درصد دی متیل سولفوکسید و یک درصد گلیسرول مؤثرترین محافظت کننده گزارش گردید(Lahnsteiner *et al*., 1996a). در آزاد ماهیان متانول تاثیر معنی دار در انجماد اسپرم هایی دارد که نسبت اسپرم به تخم در هنگام لقاح پایین باشد(Lahnsteiner *et al*., 1997a). با وجود این، متانول در انجماد اسپرم ماهیهای دریایی بی تاثیر بوده و یا اثر اندکی دارد(Suquet *et al*., 2000).

در ماهیهای آب شیرین محافظت کننده های نفوذناپذیر ازقبیل پروتئین ها(BSA) یا لیپوپروتئین ها (زرده ی تخم مرغ)، ساکارز و گلوکز برای جلوگیری از وارد شدن آسیب به غشاء پلاسمایی رایج می باشد(Scott and Boynes, 1980). این مواد سبب افزایش مقاومت غشاء در برابر استرس های اسمزی و افزایش تحرک اسپرم ماهی قزل آلا رنگین کمان بعد از انجماد زدایی می شود(Rana *et al*., 1995).

۳-۱- سوابق تحقیق در داخل و خارج از کشور با تاکید بر نتایج آنها

با کشف این نکته که با انجماد اسپرم در دمای بسیار پایین تغییری در قابلیت باروری آن ایجاد نمی گردد امکان نگهداری اسپرم به مدت طولانی و حمل و نقل آن به تمام نقاط دنیا فراهم گردید. وقتی که Polgeو همکاران در سال ۱۹۴۸ گلیسرول را برای محافظت اسپرم گاو نر و اثرات مضر سرما و انجماد به کار برد، یک گام اساسی در جهت نگهداری و حفظ اسپرم حیوانات برداشته شد. همین دانشمند در سال ۱۹۴۹ دریافت که بعد از انجماد اسپرم ماکیان با حضور گلیسرول می توان اسپرم را متحرک نگه داشت (Stoss, 1984).

انجماد اسپرم در حجم های زیاد نخستین بار در پستانداران از جمله گاو و گوسفندگزارش شده است (Brown *et al*., 1991; Torreta *et al*., 1996). Blaxter (۱۹۵۳) اولین کسی بود که توانست اسپرم ماهی هرینگ را به مدت ۶ ماه زنده نگهدارد (Kerby, 1983). در بین ماهیان کارهای پژوهشی بسیار زیادی برای انجماد اسپرم و تخمک انجام پذیرفته است و پیشرفت‌های زیادی در طی این مطالعات به دست آمده است. با این وجود پیشرفت جالب توجهی در مقیاس تجاری صورت نگرفته است و عملی کردن این تکنیکها به صورت تجارت هنوز دارای مشکلات عملیاتی بزرگی می باشد. بزرگترین این مشکلات شامل انجماد در شرایط مزرعه پرورشی و کار با حجم زیادی از اسپرم است(Tiersch, 1995). تا به امروز اسپرم قریب به ۲۰۰ گونه ی ماهی به روش نگهداری در سرما، مورد سنجش قرار گرفته است. در شرایط دمایی صفر درجه سانتی گراد، اسپرم را می توان از چند ساعت تا چند روز، بسته به نوع گونه ی مورد آزمایش، نگهداری نمود. با توجه به یافته های تئوریک، با استفاده از تکنیک نگهداری در سرما، سلول های جنسی را می توان از ۲۰۰ تا ۳۲۰۰۰ سال ، بدون کاهش در کیفیت آنها نگهداری نمود (suquet *et al*., 2000). با وجود انجماد اسپرم در بین گونه های مختلف ماهی، تا به امروز در انجماد تجاری تخم ماهی هنوز موفقیت چندانی حاصل نشده است. اندازه ی بزرگ، ساختار پیچیده، وجود چندین غشاء با نفوذپذیری متفاوت از موانع اصلی در انجماد تخم ماهیان می باشد (Thomas, 2003).

دستورالعمل های انجماد اسپرم در حجمهای زیاد در گونه های مختلف آب شیرین از جمله قزل الای رنگین کمان (Wheeler and Thorgaard, 1991; Steinberg *et al*., 1995; Conget *et al*., 1996; Lahnsteiner *et al*., 1997a)، قزل آلای خال قرمز (*Salmo trutta fario*)، قزل آلای دریاچه ای (*Salmo trutta lacustris*)، قزل آلای قطبی (*Salvelinus alpines*)، (Brown and Mims, 1999) (*Polyodon spathula*)، (Lahnsteiner *et al*., 1997a; Richardson *et al*., 2000)، اسبله (*Silurus glanis*) (Bart *et al*., 1998) و در ماهیان دریایی نیز *Dicentrachus labrax* (Fauvel *et al*., 1998) و (*Pleuronectes ferrugineus*) (Richardson *et al*., 1999) مورد آزمایش قرار گرفته است.

در آزاد ماهیان نیز انجماد اسپرم به طور گسترده ای مورد مطالعه قرار گرفته است (Alderson and Macneil, 1984; Baynes and Scott, 1987; Holtz, 1993; Piironen, 1993 Lahnsteiner *et al*., 1995, 1997a; Babiak *et al*., 2001; Cabrita *et al*., 2001) و به این منظور رقیق کننده های مختلفی از محلول های فیزیولوژیکی پیچیده نمکی که نقش پلاسمای سمینال را دارند تا محلول های ساده قندی از جمله گلوکز ۰/۳ مول، ساکاروز ۰/۶ مول مورد استفاده قرار گرفته است (Sarvi *et al*., 2006). در بین نگهدارنده ها نیز عمدتا از دی متیل سولفوکساید به عنوان عامل محافظت کننده سرما استفاده می شود.

Truscott و Idler (۱۹۶۹) موفق گردیدند تحرک اسپرماتوزوئید های ماهی آزاد اطلس را در دمای ۴ درجه سانتیگراد با استفاده از رقیق کننده هاییکه بر اساس اجزای معدنی پلاسمای اسپرم بود به مدت ۶ روز حفظ کردند.

در مورد قزل آلای رنگین کمان نیز مطالعاتی بر روی انجماد بلند مدت اسپرم و تأ ثیر رقیق کننده های مختلف، pH و ظرفیت اسپرم بر روی انجماد توسط (Stoss and Holtz,1981a,b) انجام شد و در سال ۱۹۸۹ بررسی هایی روی تأثیر زمان اسپرم گیری در کیفیت اسپرم قابل انجماد توسط Schmidt صورت گرفت. استفاده از پایوت های بزرگ در انجماد اسپرم قزل آلای رنگین کمان تحقیقی بود که توسط Wheeler و Thorgaard در سال ۱۹۹۱ انجام گردید. در سال ۱۹۹۱ دو دانشمند به اسامی Gallant و Mcniven بر روی نگهداری کوتاه مدت و همچنین اثر دی متیل استامید به عنوان محافظت کننده در انجماد اسپرم قزل آلای رنگین کمان بررسی هایی انجام دادند.

استفاده از دستگاه کامپیوتری دارای برنامه انجماد، روی اسپرم قزل آلای رنگین کمان در سال ۱۹۹۶ توسط Conget و همکارانش صورت گرفت. استفاده از متانول به عنوان محافظت کننده و نگهداری بلند مدت اسپرم قزل آلای رنگین کمان بررسی هایی است که توسط Lahnsteiner و همکارانش (۱۹۹۷a) انجام گردید. نتایج مطالعات صورت گرفته نشان می دهد که اسپرمهای حاصله دارای محدوده های مختلف قابلیت بارورسازی هستند که دلیل این تفاوت استفاده از پروتکل های مختلف انجماد توسط این افراد می باشد و همین امر انتخاب یک روش مناسب را برای استفاده وسیع الطیف مشکل کرده است (Cabrita *et al*., 2001).

انجماد اسپرم در ایران سابقه چندانی ندارد و در سال های اخیر مطالعاتی در مورد انجماد اسپرم بعضی از ماهیان شده است. در طی دو دهه اخیر مطالعاتی روی انجماد اسپرم پنج گونه از تاسماهیان دریای خزر نظیر فیل ماهی،

شیپ، ازون برون، تاس ماهی ایرانی و چالباش صورت گرفته است و هم اکنون نیز طرح جامع انجماد اسپرم ماهیان خاویاری در فصول غیر تکثیر در قالب دو پروژه در انستیتو تحقیقات ماهیان خاویاری در حال انجام است. انجماد اسپرم ماهیان خاویاری(عابدی، ۱۳۷۵) و اسپرم ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) نیز در سال ۱۳۷۷ توسط برادران نویری گزارش گردیده است. در مورد ماهی سفید (*Rutilus frisi kutum*) نیز با همکاری انستیتو تحقیقات ماهیان خاویاری و دانشگاه گرگان در سال ۱۳۷۷ در قالب پروژه دانشجویی انجماد اسپرم این گونه مورد بررسی قرار گرفت.. نتایج این تحقیق نشان داد که رقیق کننده‌ی Kurokura ، با ترکیب کلرید کلسیم، کربنات سدیم، کلرید منیزیم، کلرید پتاسیم، کلرید و آب مقطر بهترین محلول رقیق کننده برای انجماد اسپرم این ماهی می باشد.

در مورد انجماد اسپرم روی ماهی قزل آلای رنگین کمان می توان گفت علی رغم سابقه طولانی در خارج از کشور و حتی تولید تجاری در اکثر کشورها، در ایران تنها مطالعه ای توسط شکیبی دریا کناری(۱۳۸۰) صورت گرفته است. در این مطالعه امکان نگهداری کوتاه مدت و بلند مدت اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان مورد بررسی قرار گرفت. که در نگهداری کوتاه مدت بهترین نتیجه با اسپرم ۲۴ ساعت نگهداری شده در یخ به دست آمد و برای نگهداری بلند مدت اسپرم وی از ۱۶ رقیق کننده مختلف استفاده کرد که بهترین نتایج از رقیق کننده با ترکیب Tris < 0.05 ، Egg yolk 10 cc، DMSO 9cc ، Glucose 5.4 بدست آمد. نتایج این مطالعه نشان می دهند که قابلیت باروری اسپرم در نگهداری کوتاه مدت پس از ۲۴ ساعت نگهداری در یخ خرد شده متوسط به ۶۸/۲۵ درصد و در انجماد طولانی مدت پس از ۳، ۷ و ۳۰ روز به ترتیب ۶۴/۰۴، ۶۲/۲۳ و ۳۸/۴۱ درصد به دست آمده است.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- زمان و محل انجام آزمایش

اجرای این تحقیق از تاریخ ۸۸/۱۰/۲۸ در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج وابسته به موسسه تحقیقات شیلات ایران، واقع در ۲۶ کیلو متری جنوب شهر یاسوج شروع گردید.

۲-۲- وسایل و مواد مورد نیاز

۲-۲-۱- مواد و وسایل مصرف نشدنی جهت اجماد اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان

تانک ازت در حجم های مختلف، میکروسکوپ نوری، یخچال معمولی، ترازوی معمولی با دقت ۱۰ گرم، ترازوی حساس (با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم)، دماسنج دیجیتال و جیوه ای، دستکش ضد یخ، کرنومتر، همزن، ست سمپلر، لام هموسیتومتر، تخته بیومتری، جعبه سرد کننده(یونولیت)،کلمن، قیچی، انواع بشر، انواع ارلن مایر، انواع لوله آزمایش، انواع استوانه مدرج، پی ست، پتری دیش، دماسنج، پنس، سینی، چان برزنتی، تراف و سینی، کاسه های پلاستیکی.

۲-۲-۲- مواد و وسایل مصرف شدنی جهت انجماد اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان

ازت مایع، پایوت ۰/۵، تیوب ۱، ۲ و ۵ میلی لیتر، سرسمپلر ۰/۵ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر، سرنگ در حجم های مختلف، سرنگ انسولین، دستکش ضد یخ مگنت، ماژیک ضد آب، کاغذ صافی، لام و لامل، پارافیلم، پایوت ۰/۵ میلی لیتر (IMV فرانسه) ، آب مقطر، تخم مرغ، DMSO، اتانول، اسید استیک، گلوکز و سایر مواد شیمیایی مورد نیاز

۲-۳- انتخاب مولدین مناسب و آماده سازی آنها برای اسپرم گیری

زمان رسیدن به سن بلوغ به دلایل مختلفی از جمله اختلافات ژنتیکی، تغذیه ای، میزان سطوح اکسیژن آب، وجود سایر افراد جمعیت و شرایط محیطی به طور چشمگیری متفاوت می باشد. در هنگام اسپرم گیری علاوه بر موارد ذکر شده سن ماهی و تغییر فصول نیز باید مورد نظر قرار گیرد. مولدین مورد استفاده در این پروژه پس از چند بار بهگزینی بر اساس معیارهایی از قبیل سلامت ظاهری ماهی و کیفیت گامت ها، از بین جمعیت مولدین ۳ و ۴ ساله مرکز انتخاب شدند. به منظور دقت بیشتر در اجرای آزمایش ابتدا دو میلی لیتر اسپرم از هر مولد گرفته شد و پس از آنالیز اسپرم آنها بهترین مولدین از لحاظ شاخص های کیفی اسپرم (از جمله درصد اسپرم های متحرک، غلظت اسپرم ها و حجم اسپرم) انتخاب شدند. همچنین برای تهیه مولد ماده پس از انجام بیومتری از بین مولدین، بهترین آنها (۱۲۰ عدد) بر اساس شاخص های ظاهری انتخاب شدند. سپس ماهیان به تانک های فایبر گلاس ۲۲۰ لیتری انتقال داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در این محیط نگهداری شدند. قبل از اسپرم گیری طول و وزن مولدین نر به ترتیب بر حسب سانتی متر و گرم و ثبت شد.

٤-۲- جمع آوری اسپرم و آماده سازی اولیه

بهترین زمان جمع آوری اسپرم در فصل تخمریزی طبیعی ماهی می باشد و بر همین اساس، عمل جمع‌آوری اسپرم در طول فصل تولیدمثل مولدین (نیمه دوم آبان ماه تا پایان بهمن ماه) صورت گرفت. جهت اسپرم‌گیری ابتدا ظروف ۱۰ میلی لیتری با کاغذ آلومینیوم و پارافیلم خوب پوشانده شده، سپس اسپرم هر ماهی بطور جداگانه اخذ گردید. ظروف نمونه ها در کیسه های پلاستکی قرار داده شدند و بر روی تکه های یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. از آنجا که یخ در دمای معادل دمای فریزر به صورت جامد می باشد، بنابراین منی نباید به طور مستقیم بر روی یخ قرار داده شود چون ممکن است سلول های اسپرم بر اثر کاهش دما صدمه ببینند. یک راه حل ساده جهت جلوگیری از صدمه قرار دادن یک لایه روزنامه بین یخ و نمونه های اسپرم می باشد. در اغلب ماهیان اسپرم را می توان بعد از اسپرم گیری، در دمای ۰ تا ۴ درجه سانتی گراد برای مدت زمان زیادی نگه داری کرد. معمولاً جهت انجماد، اسپرم ۴ تا ۵ عدد ماهی پس از بررسی به صورت جداگانه استفاده شد. جمع آوری اسپرم از مولدین برای حفظ کیفیت اسپرم به منظور انجماد و ذخیره سازی آنها با دقت فراوان صورت پذیرفت، و موارد زیر مد نظر قرار گرفته شد:

- جمع آوری اسپرم بدون هیچ آلودگی به ادرار، مدفوع، خون یا فلس به این منظور باید محدوده منفذ ادراری تناسلی مولدین هنگام اسپرم گیری با حوله کاملاً خشک شده (Christ *et al*, 1996) و به آرامی با ماساژ شکمی از آن ها اسپرم تهیه شد(Kurokura *et al*, 1984). نمونه های خونی با نمونه های حاوی ادرار یا مدفوع جهت انجماد مورد استفاده قرار نگرفتند(Baynes & Scott, 1987).
- نگهداری اسپرم جمع آوری شده در بهترین شرایط با فراهم نمودن هوا یا اکسیژن برای تنفس در طول انجام عمل استحصال اسپرم.
- نگهداری دمای اسپرم جمع آوری شده در ۴ درجه ی سانتی گراد در طول جمع آوری و انتقال در محیط کار.

اسپرم های استحصال شده از مولدین به لوله های سرد شده توسط یخ انتقال داده شدند. اسپرم های جمع آوری شده برای ادامه ی مراحل انجماد در یخچال نگهداری شده و قبل از آغاز مراحل بعدی، کیفیت اسپرم مورد بررسی قرار گرفته شد.

۵- ۲- بررسی و ارزیابی کیفیت اسپرم

ارزیابی کیفیت اسپرم به عنوان بخش مهمی از برنامه انجماد مطرح است. ارزیابی کیفیت به دو منظور صورت می گیرد، یکی اینکه اسپرم با کیفیت نامناسب قبل از انجماد دور ریخته شود و دوم به منظور ارزیابی قابلیت بارورسازی اسپرم بعد از ذوب شدن. پارامترهایی که بر اساس امکانات موجود جهت ارزیابی کیفیت اسپرم و قابلیت بارورسازی مورد مطالعه قرار گرفتند شامل میزان لقاح، حرکت، درصد اسپرم های متحرک، مدت زمان

تحرک و تراکم بودند. بررسی این فاکتورها در زمان های مختلف شامل پس از اسپرم گیری، پس از همدمایی با یخ، بعد از رقیق سازی و همچنین پس از ذوب اسپرم صورت گرفت.

۱-۵-۲- حرکت

پس از اسپرم‌گیری با توجه به غلظت بالای اسپرم، ابتدا اسپرم را رقیق نموده تا بتوان اسپرم ها را به صورت انفرادی مشاهده کرد و شکل و نوع فعالیت آن ها را در زیر میکروسکوپ بررسی نمود. اسپرم را با سرم فیزیولوژی ۰/۶ تا ۰/۷ درصد مخلوط کرده (به نسبت ۱:۲۰) و قطره ای از آن را روی لام ریخته و با یک لامل، مخلوط را کاملاً روی لام پخش کرده و گسترش تهیه گردید. پس از آن نمونه ها در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی۴۰۰ مورد مطالعه قرار گرفت(Geffen and Evans, 2000). در صد اسپرم های فعال از طریق مشاهده نسبت اسپرم هایی که ۱۰ ثانیه پس از فعال شدن دارای حرکت رو به جلوباشند، تخمین زده شدند (Aas *et al*., 1991).

۲-۵-۲- تراکم اسپرم

از آنجا که نسبت اسپرم به تخمک باید تعیین می شد، لذا برآورد تراکم اسپرم ضروری به نظر می رسید. تراکم اسپرم از طریق شمارش اسپرم ها بر روی لام هماسیتومتر تخمین زده شد. به منظور رسیدن اسپرم ها به تراکم قابل شمارش، نمونه ها در سرم فیزیولوژیک ۰/۶ تا ۰/۷ درصد با نسبت ۱ به ۱۰۰۰ رقیق سازی شد. تعداد متوسط اسپرم ها برای هر ماهی پس از سه بار شمارش بدست آمد. تراکم اسپرم با در نظر گرفتن میزان رقیق سازی به صورت تعداد اسپرم ها در یک میلی لیتر منی بیان شده است (Geffen and Evans, 2000). جهت رقیق سازی، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر اسپرم (۰/۱ میلی لیتر) را توسط میکروسمپلر برداشته و با ۱۰۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژیک خوب مخلوط و محلول حاصل را چند بار تکان داده تا اسپرم ها کاملاً یکنواخت شده و یک محلول همگن بدست آید. سپس توسط پیپت پاستور قطره ای از محلول ار روی لام هماسیتومتر ریخته و آن را خوب پخش می نمایند(قبل از شروع شمارش اسپرم در زیر میکروسکوپ باید ۱۰ دقیقه صبر نمود تا اسپرم ها به طور یکنواخت پراکنده گردند و اسپرم و محلول از حرکت باز ایستند). با درشت نمایی ۱۰۰ اقدام به شمارش اسپرم انجام پذیرفت. جهت شمارش اسپرم ها از بین کل خانه های موجود در لام هماسیتومتر (۴ ردیف یعنی ۱۶ خانه بزرگ که هر یک از این خانه ها به ۱۶ قسمت مساوی کوچکتر تقسیم شده اند) ۵ خانه را به صورت کاملاً تصادفی انتخاب و شمارش شد. از خانه های بزرگ هنگام شمارش دو ضلع را می توان به صورت دلخواه انتخاب نمود که اسپرم های روی آن حاشیه که ضلع مماس است را می شمارند و عدد بدست آمده حاصل از شمارش ۵ خانه بزرگ و با استفاده از فرمول زیر تعداد کل اسپرم محاسبه گردید(محمدی و براتی، ۱۳۸۸):

$$X = A\ (۴۰۰۰ \times ۱۰۰۰)/۸۰$$ (فرمول ۲-۱)

X = تعداد کل اسپرم در میلی متر مکعب

A = اسپرم های شمارش شده زیر لام هماسیتومتر در ۸۰ خانه کوچک

۴۰۰۰ = عدد ثابت (حجم مربع های کوچک به mm^3)

۱۰۰۰= ضریب رقت محلول

۸۰ = تعداد مربع های شمارش شده لام هماسیتومتر (۱۶×۵)

برای محاسبه تعداد سلول ها در یک سی سی، تعداد سلول های شمارش شده در هزار ضرب می گردد:

۱۰۰۰ * **x** = تعداد سلول ها در یک میلی لیتر

٦-۲- فرایند انجماد اسپرم

در طی فرایند انجماد اسپرم، اسپرم ها در ارتباط با یکسری فاکتور ها، عوامل و ترکیبات پیچیده و نامتعارف قرار می گیرند که در شرایط فیزیولوژیکی معمول دیده نمی شوند. به منظور انجماد اسپرم، منی به نسبت ۱ به ۳ در محلول انجماد که متشکل از دو جزء می باشد، رقیق شد. ۱) یک رقیق کننده بر پایه گلوکز که دارای خصوصیات اسموتیک پلاسمای منی می باشد و حاوی یک ماده تثبیت کننده غشاء و بافر، و ۲) یک ماده محافظت کننده که از ایجاد کریستال های یخ در طی عملیات انجماد جلوگیری می کند. تنها نمونه های دارای تحرک بالای ۸۰ درصد (Chao, 1982; Steyn and Van Vuren, 1987) و تراکم بالای $۱۰^۹$ * ۱۲ اسپرماتوزوآ در میلی لیتر در این پروژه استفاده شد (Drokin *et al*., 1998).

۱-٦-۲- انتخاب محلول انجماد مناسب

بر اساس مرور و بررسی مطالعات صورت گرفته بر روی انجماد اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان، ترکیبات زیر به عنوان ترکیبات پایه رقیق کننده مورد بررسی قرار گرفتند:

۱. ۶۰۰ میلی گرم NaCl، ۳۱۵ میلی گرم KCl، ۱۵ میلی گرم $CaCl_2.2H_2o$ ، ۲۰ میلی گرم $MgSO_4.7H_2o$ و ۴۷۰ میلی گرم Hepes ، در ۸۰ میلی لیتر آب مقطر تنظیم pH تا ۷/۸ و سپس افزودن آب مقطر تا ۱۰۰ میلی لیتر و در نهایت اضافه کردن ۱۰٪ متانول، ۱/۵٪ BSA، ۷٪ زرده تخم مرغ و ۰/۵٪ ساکاروز. تا pH = ۷/۸) Lahnsteiner *et al*., 1995; Lahnsteiner *et al*., 1996a, b, c; Lahnsteiner *et al*., 2002; Salte *et al*., 2004; Lahnsteiner and Mansour, 2008; Lahnsteiner *et al*., 2011).

۲. ۰/۱۰۲ گرم $CaCl_2.2H_2O$، ۰/۲۲ گرم $Mg(SO_4).7H_2O$، ۰/۲۶ گرم NaH_2PO_4، ۲/۶۱ گرم KCl، ۵/۸۴ گرم NaCl، ۰/۱۰ گرم اسید سیتریک، ۱۰ گرم گلوکز، ۱۰ میلی لیتر محلول KOH (۱/۲۷ g/۱۰۰ ml) و ۲۰ میلی لیتر بافر Hepes، ۷٪ DMSO و ۱۰٪ زرده تخم مرغ با pH – ۷/۸ (Erdahl *et al*., 1984; Cabrita *et al*., 1999; Cabrita *et al*., 2001; Robles *et al*., 2003; Cabrita *et al*., 2005 ; Herra´ez *et al*., 2008; Robles *et al*., 2008; Pe´rez-Cerezales *et al*., 2010).

۳. ۰/۱۸۸ گرم NaCl، ۰/۰۲۳ گرم $CaCl_2$، ۰/۷۲ گرم KCl، ۰/۰۴۱ گرم NaH_2PO_4، ۰/۱ گرم $NaHCO_3$، ۰/۰۲۳ گرم $MgSO_4.7\ H_2O$، ۰/۱ گرم گلوکز، ۱۰% گلیسرول و ۱۰٪ Tris Base. (Cortland® medium).

۴. ۵/۴ گرم گلوکز، ۱۰٪ زرده تخم مرغ و ۹٪ DMSO، ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، تریس< ۰/۰۵ (pH = 7.5) (شکیبی دریا کناری، ۱۳۷۹، Alderson and MacNeil, 1984; Scheerer and Thorgaard, 1989; Wheeler and Thogaard, 1991; Tekin *et al*. 2003a; Ninhaus-Silveira, A. *et al*., 2006; Young *et al*., 2009).

۵. ۰/۶ مول ساکاروز (۲۰/۵۴ گرم)، ۱۰% DMSO (۱۱/۷۲ گرم) و ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر (شکیبی دریا کناری، ۱۳۷۹؛ Holtz, 1993).

۶. ۰/۷۵ گرم NaCl، ۵/۴ گرم گلوکز، ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر و ۱۰ میلی لیتر DMSO، (pH = 7.5) (شکیبی دریا کناری، ۱۳۷۹).

برای آماده سازی محلول انجماد مواد شیمیایی مورد نیاز و آب مقطر استفاده شد. زرده تخم مرغ به صورت تازه و با دقت آماده گردید (سفیده تخم مرغ باعث به هم چسبیدگی و اسپرم ها می شود). محلول ها و بافرهای مورد نیاز قبلاً آماده شدند. ظروف مورد استفاده از جمله سمپلر و ارلن مایر حاوی محیط کشت جهت همدمایی در ظروف محتوی یخ $^{\circ}C$ ۴ قرار داده شدند. تمام ترکیبات در حجم ۱۰۰ میلی لیتر تهیه شدند. آماده سازی محلول انجماد در طی سه مرحله صورت گرفت:

مرحله اول: حل کردن اجزاء رقیق کننده محلول در آب مقطر

مرحله دوم: تنظیم pH توسط آب مقطر، NaOH، و HCL.

مرحله سوم: اضافه کردن مواد نگهدارنده

پس از اختلاط، محلول های انجماد به مدت ۵ دقیقه در آب و یخ $^{\circ}C$ ۴ همدما شدند. اثر این ترکیبات بر فاکتورهای تحرک اسپرم قبل و بعد از انجماد در زمانهای ۳ روز بعد از انجماد، یک ماه و سه ماه بعد از انجماد بررسی شد و بهترین رقیق کننده انتخاب شد.

۲-۶-۲- انتخاب محافظت کننده مناسب

در طی بررسی های اولیه قبل از انجماد (بعد از اختلاط اسپرم با محلول های انجماد) و بعد از انجماد ترکیبات شماره ۱، ۲ انتخاب و در آزمایشهای نهایی انجماد اسپرم و انتخاب محافظت کننده مناسب مورد استفاده قرار گرفتند.

به منظور ارزیابی محافظت کننده های مختلف تاثیر دو گروه محافظت کننده نفوذ پذیر شامل DMSO (۵٪، ۱۰٪ و ۱۵٪)، گلیسرول(۵٪، ۱۰٪ و ۱۵٪)، متانول (۵٪، ۱۰٪ و ۱۵٪)، دی متیل استامین (۵٪، ۱۰٪ و ۱۵٪) ترکیب گلیسرول (۱٪) و DMSO (۵٪) و نفوذ ناپذیر شامل زرده تخم مرغ (۰٪، ۷٪ و ۲۰٪)، BSA (۰٪، ۱۰٪ و ۱۵٪)، و ساکاروز(۵٪ و ۱۰٪)، در ترکیب با رقیق کننده های منتخب (شماره ۱ و ۲) بر روی میزان تحرک اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۳- ٦- ۲- رقیق سازی اسپرم و قرار دادن آنها در پایوت ها

جهت رقیق کردن اسپرم از نسبت ۳:۱ استفاده شد که این نسبت بر اساس مطالعات صورت گرفته بر روی انجماد اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان انتخاب شد (Stoss *et al.,* 1978; Stoss and Holtz., 1981a, b; Wheeler and Thorgaad., 1991; Holtz, W., 1993; Lubbe and Maisse., 1996; Ogier de baulny *et al.,* 1997; Lahnsteiner, 2000; Babiak *et al.,* 2001; Cabrita *et al.,* 2001; Lahnsteiner *et al.,* 2002; Ninhaus - Silveira *et al.,*. 2002; Robles *et al.,* 2003; Buzkurti *et al.,* 2005; Cabrita *et al.,* 2005; Young *et al.,* 2009). در رقیق سازی اسپرم باید غلظت اسپرم مد نظر قرار گرفته شود. غلظت اسپرم در محلول رقیق کننده باید بیشتر از $۲-۳ \times ۱۰^{۹}$ سلول اسپرماتوزوآ در میلی لیتر منی باشد (Lahnsteiner *et al*., 1996a).

جهت رقیق کردن نمونه های اسپرم، ابتدا اسپرم ها و محلول های رقیق کننده به طور جداگانه در مخلوط آب و یخ (۴ درجه سانتیگراد) به مدت ۱۰ دقیقه همدما شده و سپس مخلوط شدند (Babiak *et al*., 1997). در ادامه با استفاده از سمپلر نگهداری شده در یخ، اسپرم با محیط کشت سرد شده در دمای ۴ °C به خوبی مخلوط شدند. قبل و بعد از مخلوط کردن اسپرم با محیط کشت تحرک اسپرم مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به حساس بودن اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان کل زمان اسپرم گیری و عملیات همدمایی و مخلوط کردن با محیط کشت به سرعت صورت گرفت.

در انجماد اسپرم ماهیان از روش های مختلفی از جمله روش پلت های یخی، روش استفاده از پایوت[1] و روش استفاده از ویال یا سرنگ استفاده می شود(Thomas, 2003)، که در این پروژه از پایوت های ۰/۵ میلی لیتر ساخت شرکت IMV فرانسه استفاده شد. این روش به دلیل حفظ کیفیت اسپرم پس از انجماد زدایی و کاهش فرصت کریستالیزه شدن دوباره ی اسپرم در طول انجماد زدایی ، در سال های اخیر رواج بیشتر ی پیدا نموده است. برای پر کردن پایوت ها از سرنگ های ۵ و ۱۰ میلی لیتر استفاده شد. ثبت نمونه ها از طریق شماره های موجود بر روی پایوت ها صورت گرفت. سر پایوت ها توسط خمیر مجسمه سازی و چسب حرارتی بسته شد. در ادامه پایوت ها به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ خورد شده قرار گرفتند تا همدمایی صورت گیرد.

٤-٦-۲- انجماد

قبل از شروع فرایند انجماد ابتدا جعبه مخصوص انجماد بر اساس سانتی متر درجه بندی شد، سپس توسط نیتروژن مایع سرد می شود و تا ارتفاع ۵/۵ سانتی متری (Lahnsteiner and Mansour, 2008) از ازت مایع پر شد. حدود ۱۵ تا ۳۰ دقیقه طول خواهد کشید تا درون جعبه به خوبی سرد شود و شرایط پایدار شود. بعد از این مرحله پایوت ها بر روی قالب های یونولیتی در ۲ سانتی متری بالای سطح نیتروژن مایع شناور شدند، و در انتها بعد از گذشت ۱۰ دقیقه (نرخ انجماد ۶۳ °C در دقیقه) به درون آن انتقال داده شدند (Robles *et al*., 2003). پایوت ها تا زمان استفاده به درون تانک ازت ۴۷ لیتری موجود در مرکز انتقال داده شدند. اثر ترکیبات مختلف بر

[1] - Straw

فاکتورهای تحرک اسپرم بعد از انجماد در زمانهای ۳ روز بعد از انجماد و یک تا سه ماه بعد از انجماد بررسی شد و بهترین رقیق کننده انتخاب گردید.

لازم به ذکر است که نرخ دقیق انجماد به دلیل کمبود امکانات تعیین نشد و نرخ های انجماد ذکر شده بر اساس سایر مطالعات بیان شده است.

۵- ٦-۲- انجماد زدایی[1]

ذوب اسپرم های منجمد شده از مهم ترین مراحل فرآیند انجماد اسپرم می باشد و عدم اعمال شرایط نرمال و اپتیمال باعث کاهش معنی دار درصد لقاح تخم می شود. (Lahnsteiner, 2000). به منظور تعیین بهترین دمای ذوب، بر اساس منابع موجود دماهای ذوب ۵ °C به مدت ۹۰ ثانیه (شکیبی دریا کناری، ۱۳۷۹)، ۲۵°C به مدت ۳۰ ثانیه (Cabrita *et al.,* 2001; Robles et al., 2003; Salte *et al.,* 2004; Herra´ez *et al*., 2008; Robles *et al*., 2008; Pe´rez-Cerezales et al., 2010) و ۳۷ °C به مدت ۳۰ ثانیه (Lubbe and Maisse 1996; Ogier de baulny *et al.,* 1997) انتخاب شدند. جهت ذوب اسپرم های منجمد، ابتدا آب با درجه حرارت های مختلف آماده شد. پایوت های حاوی اسپرم های منجمد شده فوراً در حمام آب با دماهای تعیین شده قرار داده شدند و طی این مدت به آرامی تکان داده شدند. بعد از ذوب پایوت ها و خشک کردن آنها، با بریدن قسمت انتهایی پایوت ها، اسپرم جهت لقاح و یا بررسی میکروسکوپی مورد استفاده قرار گرفت.

۷- ۲- ارزیابی قدرت بارورسازی اسپرم ها

از آنجا که درصد موفقیت لقاح در ارتباط با غلظت اسپرم می باشد و از طرف دیگر تمام اسپرم های منجمد شده در طول فرآیند انجماد کیفیت اولیه خود را حفظ نمی کنند، لذا لازم است که در هنگام انجام عمل لقاح میزان تراکم اسپرم های ذوب شده بالاتر از اسپرم‌های تازه باشد. جهت ارزیابی تاثیرات اسپرمهای منجمد شده فاکتورهایی از جمله درصد لقاح، درصد چشم زدگی، میزان بازماندگی و درصد هچینگ و همچنین تاثیرات آن تا دوران لاروی مورد ارزیابی قرار گرفت.

۱-۷-۲-عملیات تکثیر

مولدین مناسب قزل آلا پس از معاینه به درون سالن تکثیر انتقال یافتند، در سالن تکثیر پس از بیهوشی با گل میخک، ابتدا بیومتری شده سپس با پارچه ای تمیز خشک نموده و توسط ماساژ شکمی اقدام به تخم کشی از ماهی ها شد. جهت تعیین تیمار و تکرار طبق طرح اولیه پروژه از کاسه های پلاستیکی استفاده گردید، بدین ترتیب که درون هر کاسه حدود ۲۵ گرم تخم ریخته شد و سپس از ذوب اسپرم های موجود در ۵ عدد پایوت (حدود ۲/۵ میلی لیتر اسپرم) جهت لقاح تخمک ها استفاده شد. مخلوط اسپرم و تخمک به مدت ۱ دقیقه به

[1] - Thawing

آرامی هم زده شدند و سپس جهت تکمیل فرایند لقاح آب تازه چشمه اضافه شد. تخمهای لقاح یافته به مدت ۵ دقیقه جهت جذب آب و سفت شدن در همین حالت نگه داشته شدند. بعد از این زمان تخم ها را به تدریج شسته تا زائدات آن خارج شده و آب حاوی تخم ها کاملا شفاف گردد. در مرحله بعد به منظور سفت شدن تخم ها مقداری از آب چشمه تامین کننده سالن انکوباسیون را اضافه کرده و اجازه داده تا حدود ۴۵ دقیقه فرآیند جذب آب طول بکشد (Nilsson and Cloud,1993). تخمهای مرده به صورت روزانه جمع آوری و ثبت شدند. برای هر دو گروه اسپرم های تازه و منجمد شده درصد لقاح در روز هشتم (اندام زایی) ارزیابی شد.

۲-۷-۲- تعیین درصد لقاح

۸ روز پس از لقاح تعداد ۳۰ عدد تخم از هر واحد آزمایشگاهی برداشته و در یک پتری دیش حاوی محلول اسید استیک، متانول و آب مقطر (با نسبت ۱:۱:۱) قرار داده و بعد از گذشت ۵ دقیقه تخم های لقاح یافته به راحتی از طریق حضور یک کمربند عصبی واضح از تخم های لقاح نیافته تشخیص داده شدند (Springate *et al*., 1984; Geffen and Evans., 2000; Ottesen *et al.,* 2009,).

(فرمول ۲-۲) تعداد کل تخم ها/۱۰۰× تعداد تخم های لقاح یافته = درصد لقاح

۲-۷-۳- تعیین درصد چشم زدگی تخم ها

تا مدت ۱۸ روز بعد از لقاح پس از چشم زدگی تخم ها، تخم های پاره و سفید شده از تخم های سالم جدا گردید (سیفون کردن) و نسبت به تمیز کردن سینی ها و تراف ها اقدام شد و سپس دوباره تخم ها در همان محل قبلی خود برگردانده شده تا تخم ها تفریخ گردند. در این مرحله درصد چشم زدگی تخم ها با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

(فرمول ۲-۳) تعداد تخم های لقاح یافته/ ۱۰۰× تعداد تخم های چشم زده= درصد چشم زدگی تخم های لقاح یافته

۲-۷-٤- تعیین درصد تفریخ

حدود ۳۲ روز پس از لقاح، تفریخ تخم ها صورت گرفت که در این مرحله لاروها با دارا بودن کیسه زرده به صورت پهلو به پهلو درون سینی ها به حالت خوابیده قرار گرفتند. برای تعیین درصد تفریخ از طریق نمونه برداری اقدام به شمارش لاروهای تفریخ شده گردید، که درصد تفریخ لاروها از رابطه زیر محاسبه گردید(Ottesen *et al*., 2009):

(فرمول ۲-۴) تعداد تخم های چشم زده/۱۰۰× تعداد لاروهای تفریخ شده= درصد تفریخ لاروها

۸-۲- طی مراحل انکوباسیون و تولید لارو

پس از انجام عملیات لقاح، هنگامی که تخم ها به خوبی آب جذب نمودند، با استفاده از پوآر اقدام به جمع آوری تخم های سفید و لقاح نیافته گردید (سیفون کردن) و تخم های لقاح یافته به سالن انکوباسیون تخم با دمای آب $^{\circ}C$ ۱± ۱۰/۸، انتقال داده شدند و در تراف های تحقیقاتی ۱۰ لیتری که هر کدام حاوی ۴ سینی بود توزیع گردیدند. در این تحقیق برای از بین بردن اثرات دوره انکوباسیون سینی های مربوط به هر تکرار در تراف های مجزا قرار داده شدند. در طول دوره انکوباسیون ضدعفونی بر اساس دستورالعمل بخش بهداشت مرکز به روش شستشو به صورت روزانه توسط مالاشیت گرین[1] با دوز ppm ۰/۵ صورت گرفت. در طول مدت انکوباسیون برای جلوگیری از اثرات نور با استفاده از پوشش کارتن پلاست تخم ها در تاریکی قرار گرفتند. همچنین جهت نمونه برداری، لاروها تا زمان شروع تغذیه فعال که حدود ۵۰ روز طول کشید نگهداری شدند.

در طی اجرای پروژه از میان پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب سه مورد اکسیژن محلول ، دما و pH (پارامتر کلیدی کیفیت آب) اندازه گیری شدند. اندازه گیری اکسیژن محلول و دمای آب به صورت روزانه و pH به صورت هفتگی بود. دبی آب نیز هر هفته یکبار اندازه گیری می شد.

۹- ۲- آنالیز آماری

آنالیز آماری با استفاده از برنامه SPSS.17 آزمون t-test جهت مقایسه تحرک اسپرمها قبل از انجماد و بعد از ذوب با دو روش مختلف انجماد و آنالیز واریانس یک طرفه و (ANOVA) آزمون تعقیبی LSD جهت مقایسه تحرک اسپرمها قبل از انجماد و بعد از ذوب با سه محیط مختلف انجام گرفت سطح معنی داری ۰/۰۵ درصد در نظر گرفته شد و میزانCSF نمونه ها قبل از انجماد و بعد از ذوب طی دو روش مختلف و با محیط های مختلف مقایسه گردید.

1 -Malachite green

۳- نتایج

۳-۱- نتایج زیست سنجی مولدین

در این پروژه قبل از اسپرم‌گیری و تکثیر ابتدا بیومتری از مولدین صورت گرفت و مشخصات طولی و وزنی آنها ثبت گردید. مولدین نر مورد استفاده دارای میانگین طول استاندارد متوسط۰/۷۶± ۴۲/۵۱ سانتی متر و میانگین وزنی ۰/۶۸± ۱/۵۸۰ کیلوگرم بودند.

۳-۲- ارزیابی کیفی اسپرم ماهیان مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج

به منظور ارزیابی کیفی اسپرم، ماهیانه ۲۰ عدد مولد نر مورد بررسی قرار گرفت. میانگین تعداد اسپرم در میلی لیتر منی ماهی قزل آلای رنگین کمان در طول شش ماه دو سال (ماههای مهر، آبان، آذر، دی، بهمن و اسفند) $۱۰^{۹} \times ۱/۰۹ \pm ۱۳/۷۹$ عدد برآورد شد (جدول ۱-۳). از آنجا که در اکثر ماههای سال ماهیان فاقد اسپرم بودند لذا متوسط تراکم اسپرم تنها در طول فصل تکثیر ارائه شده است. حداقل تعداد اسپرم در نمونه‌های ارزیابی شده $۱۰^{۹} \times ۵/۱۵$ و حداکثر آن $۱۰^{۹} \times ۲۶/۴۹$ بود. لازم به ذکر است که تنها نموهای دارای تراکم بالای $۱۰^{۹} \times ۱۲$ اسپرماتوزوآ در میلی لیتر در این پروژه استفاده شد (Drokin *et al*., 1998). میانگین تعداد اسپرم در ماههای آذر، دی و بهمن به طور چشمگیری از سایر مواقع بیشتر بود($p<۰/۰۵$)

حجم اسپرم نیز در ماههای مختلف اختلاف معنی داری را با هم نشان دادند($p<۰/۰۵$). به طوریکه بیشترین حجم اسپرم در نمونه های مورد مطالعه در آذر ماه به میزان ۰/۲۱ ± ۱۰/۱۴ میلی لیتر و کمترین آن در اسفند ماه به میزان ۰/۵۲ ± ۲/۱۲ میلی لیترمشاهده شد.

جدول ۱- ۳- تراکم (میانگین ± انحراف معیار) و حجم(میانگین ± انحراف معیار) اسپرم ماهیان نر قزل آلای رنگین کمان در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج در طول سال ۱۳۸۹

	مهر	آبان	آذر	دی	بهمن	اسفند
تراکم اسپرم $۱۰^{۹}$ Cell/ml × (متوسط ± انحراف معیار)	۷/۷۰ ±۱/۵۷^{a}	۱۱/۳۸ ±۱/۸۳^{b}	۱۸/۱۶ ± ۴/۰۲^{c}	۱۷/۷۰ ± ۴/۴۵^{c}	۱۶/۱۹ ± ۳/۳۲^{c}	۱۱/۶۱ ±۲/۱۷^{b}
حجم اسپرم (میلی لیتر)	۵/۱۲ ± ۰/۵۲^{a}	۵/۶۹ ±۱/۳۸^{b}	۷/۱۴ ± ۲/۲۱^{c}	۷/۴۹ ± ۱/۵۰^{d}	۶/۹۳ ± ۲/۳۲^{e}	۴/۴۱ ±۲/۷۱^{f}

حروف مشترک در هر ردیف نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار و حروف غیر مشترک نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار ($P<۰/۰۵$) می باشد.

جهت مقایسه تحرک اسپرم در ماههای مختلف از آزمون One-Way ANOVA و Post Hoc دانکن استفاده شد و بعد از مشاهده معنی داری، برای مشخص نمودن روند اختلاف از آزمون T نمونه های مستقل[1] استفاده شد. با

1 - Independent Samples T Test

توجه به شروع اسپرم دهی ماهیان مرکز از شهریور ماه، تحرک اسپرم تازه ماهیان قزل آلای مورد مطالعه تنها در شش ماه دوم سال مورد بررسی قرار گرفت(نمودار ۱-۳). نتایج نشان دادند که میزان تحرک در ماههای مهر و اسفند به طور معنی داری کمتر از ۴ ماه دیگر یعنی ماههای آبان، آذر، دی و بهمن بود ($p<۰/۰۵$). شایان ذکر است تنها نمونه های دارای تحرک بالای ۸۰ درصد (Chao, 1982; Steyn and Van Vuren, 1987) در این پروژه استفاده شد. بر همین اساس مراحل عملی اجرای پروژه انجماد اسپرم در طول فصل تکثیر طبیعی این ماهی یعنی از اوایل آذر ماه ۱۳۸۹ تا اواخر بهمن ۱۳۸۹ انتخاب گردید.

نمودار ۱- ۳- درصد اسپرم های متحرک ماهیان نر قزل آلای رنگین کمان در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج در طول سال ۱۳۸۹

۳-۳- تاثیر محلول های انجماد مختلف بر تحرک اسپرم قبل از انجماد

به منظور ارزیابی اثرات محلول های انجماد مختلف بر تحرک اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان تحرک اسپرم تازه پس از ترکیب با محلول های انجماد مختلف با نسبت ۱ به ۳ بررسی شد. در این مرحله پس از اختلاط ترکیبات مختلف با اسپرم، مشاهده گردید که هر شش ترکیب منجر به کاهش میزان تحرک شدند. میزان تحرک اسپرم قبل از انجماد در ترکیب شماره ۲ بیشتر از بقیه (۷۶/۵٪) و در ترکیب شماره ۶ کمتر از همه (۴۳/۹٪) بود. نتایج نشان دادند که میزان تحرک در تمام ترکیب ها به طور معنی داری کاهش داشت ($p<۰/۰۵$)، با این وجود در صد اسپرم های متحرک به جز ترکیب شماره ۶ نسبتاً خوب بود. همانطور که جدول ۲-۳ نشان می دهد بر اساس نمره دهی از صفر (فاقد تحرک) تا ۴ (تحرک خیلی شدید)، پس از اختلاط اسپرم با ۶ ترکیب مختلف میزان تحرک تنها پس از استفاده از ترکیب شماره ۶ در حد متوسط بود و در سایر موارد میزان تحرک خوب بود.

جدول ۲- ۳- تاثیر محلول های انجماد مختلف بر تحرک اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان قبل از انجماد، ۳ روز، یک ماه و ۳ ماه بعد از انجماد (اسپرم تازه با نسبت ۱: ۳ با رقیق کننده‌های زیر مخلوط شد)

محلول انجماد	تحرک اسپرم مختلط با محلول انجماد قبل از فرایند انجماد(٪)	تحرک اسپرم ۳ روز بعد از فرایند انجماد (٪)	تحرک اسپرم یک ماه بعد از فرایند انجماد (٪)	تحرک اسپرم ۳ ماه بعد از فرایند انجماد (٪)
۱	۷۳/٦ ± ۲/۵^{c}	٤۸/۱ ± ۱/۲^{g}	۵۱/۲ ± ۳/۵^{f}	٤۵/۹ ± ۲/۸^{h}
۲	۷٦/۵ ± ۲/۱^{b}	٤۱/۷ ± ۳/۷^{i}	۳۹/۱ ± ۲/٤^{k}	٤۰/۸ ± ٤/۱^{j}
۳	٦۸/۲ ± ۱/۷^{e}	۱٦/۵ ± ۵/۲^{o}	۹/۱ ± ۳/٦^{q}	۳/۵ ± ٤/۸^{s}
۴	۷۱/٦ ± ۰/۸^{d}	۳۱/۹ ±٤/٤^{l}	۲۰/۸ ±۳/۷^{m}	۱۸/٦ ±۱/٦^{n}
۵	٦۸/۳ ± ۳/٤^{e}	۷/۳ ± ٦/۲^{r}	٤/۱ ± ٤/۵^{s}	۱ < ^{t}
۶	٤۳/۹ ± ۲/٦^{i}	۹/۸ ± ٤/۵^{q}	۱۱/۳ ± ۵/۹^{p}	٦/٤ ± ۳/۵^{r}
شاهد	۹٤/۳ ± ۳/۷^{a}	-	-	-

حروف مشترک نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار و حروف غیر مشترک نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار (p<۰/۰۵) می باشد.

٤-۳- تاثیر محلول های انجماد مختلف بر تحرک اسپرم در زمان های متفاوت بعد از انجماد

اسپرم ها پس از نگهداری در ازت مایع به مدت ۳ روز، یک ماه و سه ماه، در دمای ۲۵ $^{\circ}$C به مدت ۳۰ ثانیه ذوب شده و جهت تعیین میزان تحرک و لقاح استفاده شدند. نتایج نشان دادند که میزان تحرک بعد از انجماد نسبت به زمان قبل از انجماد به طور معنی داری کاهش پیدا کرد. این کاهش در تمام تیمار ها مشاهده شد با ابن تفاوت که در تیمار اول و دوم با استفاده از ترکیبات شماره ۱ و ۲ میزان تحرک قابل قبولی جهت انجام عملیات لقاح مشاهده شد، به طوری که این میزان تحرک حتی تا ۳ ماه بعد از انجماد تغییر ناپذیر بود. میزان تحرک در نمونه های اسپرم منجمد شده با ترکیبات شماره ۳، ۴، ۵ و ۶ به طور معنی داری کاهش داشت(p<۰/۰۵). به طوری که میزان تحرک در نمونه های منجمد شده با ترکیب شماره ۵ بعد از ۳ ماه به کمتر از ۱ درصد رسید (جدول ۲-۳).

۵-۳- قدرت بارورسازی[1] اسپرم منجمد

اسپرم ها پس از نگهداری در ازت مایع به مدت ۳ روز ، در دمای ۲۵ $^{\circ}$C به مدت ۳۰ ثانیه ذوب شده و اسپرم‌های حاصل از ذوب ۵ عدد پایوت جهت لقاح با تخمک قزل آلای رنگین کمان استفاده شدند. برای ارزیابی تاثیر هر کدام از محلول های انجماد، آزمایش لقاح اسپرم های منجمد برای هر ترکیب در سه تکرار اجرا شد. نتایج نشان دادند که درصد لقاح, چشم زدگی و تفریخ حاصل از اسپرم های منجمدشده در تمامی موارد به طورمعنی داری کمتر از گروه شاهد بود(p<۰/۰۵). لازم به ذکر است که در دوره های زمانی مختلف این مطالعه، لقاح تخمک

[1] - Fertilization potential

با اسپرم معمولی و بدون استفاده از ترکیب خاصی به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد. با این حال، محلول های شماره ۱ و ۲ نتایج قابل قبولی را جهت مطالعات بعدی ارائه دادند، به طوری که درصد لقاح, چشم زدگی و تفریخ تخمهای حاصل از لقاح اسپرم شماره ۱ به ترتیب حدود ۷۸/۱٪، ۷۳/۲٪ و ۷۱/۴٪ و برای محلول شماره ۲ به ترتیب۷۶/۱٪، ۷۱/۷٪ و ۶۹/۶٪ بود. بررسی آماری نشان می دهد که پس از نگهداری اسپرم ها در ازت مایع بعد از ۳ روز، اختلاف معنی داری میان تیمارها وجود دارد، به طوری که درصد لقاح, چشم زدگی و تفریخ در محلول های شماره ۱ و ۲ نسبت به سایر محلول های انجماد (شماره ۲، ۳، ۴ و ۵) بیشتر و در مقایسه با تیمار شاهد به طور معنی داری کمتر بود ($p<۰/۰۵$).

با توجه به بالا بودن نتایج لقاح حاصل از ترکیبات شماره ۱ و ۲، این دو ترکیب جهت بررسی و انتخاب مناسب ترین دمای ذوب و همچنین انتخاب مناسبترین محافظت کننده ها مورد استفاده قرار گرفتند.

جدول ۳- ۳- تاثیر محلول های انجماد مختلف بر میزان لقاح، چشم زدگی و تفریخ ماهی قزل آلای رنگین کمان ۳ روز بعد از انجماد .

۳ روز بعد از انجماد			
محلول انجماد	درصد لقاح	درصد چشم زدگی	درصد تفریخ
۱	۷۸/۲ ± ۱/۲^{d}	۷۳/۲ ± ۰/۶^{c}	۷۱/۴ ± ۰/۳^{d}
۲	۷۶/۱ ± ۰/۱^{e}	۷۱/۷ ± ۰/۴^{c}	۶۹/۶ ± ۰/۱^{e}
۳	۲۸/۷ ±۶/۹^{l}	۲۷/۹ ±۴/۱^{i}	۲۵/۵ ±۰/۷^{k}
۴	۴۵/۳ ± ۸/۳^{i}	۴۲/۵ ± ۲/۴^{f}	۴۰/۳ ± ۳/۱^{i}
۵	۱۸/۲ ± ۵/۶^{m}	۱۷/۵ ± ۱/۰^{j}	۱۷/۰ ± ۲/۸^{m}
۶	۱۴/۶ ± ۲/۴^{o}	۱۴/۲ ± ۰/۴^{k}	۱۳/۹ ± ۱/۸^{n}
شاهد	۹۳/۱ ± ۱/۰^{b}	۹۰/۷ ± ۰/۱^{b}	۸۵/۹ ± ۱/۰^{c}
۱ ماه بعد از انجماد			
محلول انجماد	درصد لقاح	درصد چشم زدگی	درصد تفریخ
۱	۶۳/۲ ± ۱/۹^{g}	۵۷/۳ ± ۵/۶^{d}	۵۴/۱ ± ۳/۳^{g}
۲	۶۶/۱ ± ۲/۹^{f}	۵۷/۹ ± ۴/۷^{d}	۵۵/۵ ± ۳/۷^{f}
۳	۱۸/۵ ±۴/۴^{m}	۱۴/۰ ±۳/۹^{k}	۱۳/۲ ±۰/۳^{no}
۴	۳۵/۳ ± ۳/۳^{k}	۳۰/۱ ± ۲/۳^{h}	۲۹/۸ ± ۲/۵^{j}
۵	۸/۶ ± ۰/۵^{r}	۷/۲ ± ۱/۱^{n}	۷/۰ ± ۰/۸^{r}
۶	۶/۷۶ ± ۰/۴^{s}	۵/۳ ± ۰/۸^{o}	۴/۶ ± ۰/۸^{s}
شاهد	۹۶/۵ ± ۰/۸^{a}	۹۲/۸ ± ۶/۷^{a}	۹۱/۳ ± ۵/۰^{a}
۳ ماه بعد از انجماد			
محلول انجماد	درصد لقاح	درصد چشم زدگی	درصد تفریخ
۱	۵۶/۹ ± ۵/۹^{h}	۵۴/۵ ± ۱/۵^{e}	۵۳/۵ ± ۱/۹^{gh}

۲	۵۷/۲ ± ۲/۰^{h}	۵۴/۶ ± ۲/۵^{e}	۵۲/۷ ± ۳/۱^{h}
۳	۱۵/۸ ±۲/۶^{n}	۱۲/۴ ±۲/۱^{l}	۱۲/۴ ±۲/۷^{o}
۴	۳۶/۳ ± ۲/۱^{j}	۳۵/۷ ± ۲/۷^{g}	۳۳/۳ ± ۳/۱^{l}
۵	۱۰/۷ ± ۱/۵^{p}	۹/۲ ± ۰/۹^{m}	۸/۷ ± ۲/۰^{p}
۶	۹/۷۴ ± ۰/۸^{q}	۸/۹ ± ۰/۹^{m}	۷/۲ ± ۱/۲^{q}
شاهد	۹۰/۳ ± ۴/۵^{c}	۸۹/۳ ± ۳/۸^{b}	۸۸/۲ ± ۴/۷^{b}

حروف مشترک در هر ستون (ستون مرتبط با فاکتورهای مختلف لقاح، چشم زدگی و تفریخ) نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار و حروف غیر مشترک نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار (p<۰/۰۵) می باشد.

۶-۳- نتایج مربوط به تعیین بهترین درجه حرارت ذوب

تعیین مناسب ترین دمای ذوب اسپرم های منجمد شده، در دماهای ذوب ۵°C به مدت ۹۰ ثانیه، ۲۵°C به مدت ۳۰ ثانیه و ۳۷°C به مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفت. برای این منظور از محلول های انجماد شماره ۱ و ۲ که در آزمایشات اولیه به عنوان بهترین محلول های انجماد انتخاب شده بودند، استفاده شد. گروه شاهد نیز با لقاح تخمک با اسپرم مولدان مرکز و بدون اعمال شرایط دمایی در نظر گرفته شد. از تعداد ۵ عدد پایوت جهت لقاح ۲۵ گرم تخمک استفاده شد. جهت افزایش سطح اطمینان، آزمایش ذوب برای هر نمونه ۳ بار تکرار شد. کمترین میزان لقاح در زمان ذوب اسپرم ها در دمای ۳۷ °C به مدت ۳۰ ثانیه بدست آمد. استفاده از حمام آب با دمای ۲۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه جهت ذوب اسپرم های منجمد نتایج قابل قبولی را نسبت به سایر تیمارها نشان دادند.

جدول ۴-۳: تعیین مناسب ترین دمای ذوب اسپرم های منجمد بر اساس نتایج درصد لقاح

دمای ذوب	۵ °C	۲۵ °C	۳۷ °C
مدت زمان ذوب (ثانیه)	۹۰	۳۰	۳۰
محلول انجماد شماره ۱	**۳۶/۶ ± ۱/۳^{d}**	**۷۲/۹ ± ۰/۵^{b}**	**۲۹/۷ ± ۰/۳^{e}**
محلول انجماد شماره ۲	**۳۷/٤ ± ۱/٤^{d}**	**٦۱/٤ ± ۰/۷^{c}**	**۲٦/۹ ± ۰/٦^{f}**
شاهد	**۷۸/۲ ± ۰/٦^{a}**	**۷۹/٦ ± ۰/۷^{a}**	**۷۹/٤ ± ۱/۰^{a}**

حروف مشترک در جدول نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار و حروف غیر مشترک نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار (p<۰/۰۵) می باشد.

۷- ۳- تاثیر محافظت‌کننده‌های مختلف بر قابلیت بارورسازی اسپرم قبل از انجماد

به منظور ارزیابی تاثیر محافظت کننده های مختلف بر قابلیت بارورسازی اسپرم، از دو محلول انجماد شماره ۱ و ۲ استفاده شد. محلول انجماد شماره ۱ به همراه محافظت کننده های نفوذ ناپذیر شامل ٪۱/۵ BSA، ٪۷ زرده تخم مرغ و ٪۵ ساکاروز و محلول شماره ۲ به همراه ٪۱۰ زرده تخم مرغ به عنوان رقیق کننده پایه استفاده شدند. گروه

شاهد نیز بدون اعمال هر گونه تیماری بر روی اسپرم تازه مولدین ماهی قزل آلای رنگین کمان در نظر گرفته شد.

در تمام موارد میزان لقاح قبل از انجماد، دارای اختلاف معنی دار با گروه شاهد بود. با این حال، استفاده از رقیق کننده شماره ۱ همراه با ۵ و ۱۰٪ DMSO، ۵ و ۱۰٪ متانول در مقایسه با سایر تیمارها نتایج بهتری ارائه دادند و بعد از اینها ۵ و ۱۰٪ گلیسرول و ترکیب ۵٪ DMSO و ۱٪ گلیسرول منجر به حصول درصد لقاح بالایی شد. لازم به ذکر است که استفاده از دی متیل استامید ۱۵٪ (۸/۹٪) و گلیسرول ۱۵٪ (۱۷/۷٪) با کمترین میزان لقاح همراه بود.

استفاده از رقیق کننده شماره ۲ همراه با ۵ و ۱۰٪ DMSO و ترکیب ۵٪ DMSO و ۱٪ گلیسرول نیز با درصد لقاح بالایی همراه بودکه با سایر ترکیبات اختلاف معنی داری نشان داد. علاوه بر این استفاده از ۵ و ۱۰٪ گلیسرول با رقیق کننده ۲ نیز نتایج لقاح نسبتاً بالایی داشت. در نقطه مقابل استفاده از رقیق کننده شماره ۲ همراه با ۱۵٪ دی متیل استامید (۱۶/۵) دارای کمترین میزان لقاح اسپرم قبل از انجماد بودند(جدول ۳-۳).

جدول ۵-۳: تاثیر محافظت کننده های مختلف نفوذپذیر بر روی قابلیت بارورسازی اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان ۵ دقیقه بعد از رقیق سازی

تیمار	محلول شماره ۱	محلول شماره ۲
٪۵ DMSO	٦٧/١ ± ٠/١^{de}	٧٦/٥ ± ٠/٩^{b}
٪۱۰ DMSO	٦٩/٥ ± ١/٥^{cd}	٧١/٧ ± ٠/٧^{c}
٪۱۵ DMSO	٥٩/١ ± ٠/٩^{ih}	٥٦/١ ± ٣/٣^{i}
گلیسرول ۵٪	٦٤/٩ ±٢/٥^{ef}	٦٦/٧ ±٤/١^{def}
گلیسرول ۱۰٪	٦٣/٦ ± ١/٣^{fg}	٦٤/٣ ± ١/٩^{ef}
گلیسرول ۱۵٪	١٧/٧ ± ٣/٠^{l}	٣٧/٨ ± ٢/٠^{k}
متانول ۵٪	٧١/١ ± ٢/٤^{c}	٦٠/٧ ± ١/٥^{gh}
متانول ۱۰٪	٧٦/٨ ± ٢/٤^{b}	٤٦/٧ ± ١/١^{j}
متانول ۱۵٪	٤٧/٣ ± ١/٠^{j}	٣٨/٣ ± ٠/٤^{k}
دی متیل استامید ۵٪	٤٥/٣ ± ٣/٢^{j}	٥٧/٧ ± ٣/٢^{ih}
دی متیل استامید ۱۰٪	٤٨/٢ ± ٢/٥^{j}	٣٥/٦ ± ٣/٤^{k}
دی متیل استامید ۱۵٪	٨/٩ ± ١/٤^{m}	١٦/٥ ± ٠/٩^{l}
٪۵ DMSO + گلیسرول ۱٪	٥٩/٦ ± ٢/٤^{h}	٧١/٤ ± ٢/٦^{c}
شاهد (اسپرم تازه)	٩٣/٦ ± ١/٣^{a}	٩٣/٦ ± ٤/٢^{a}

حروف مشترک نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار و حروف غیر مشترک نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار (p<۰/۰۵) می باشد.

۸- ۳- تاثیر محافظت‌کننده‌های مختلف بر قابلیت بارورسازی اسپرم بعد از انجماد

فرایند انجماد در تمامی موارد منجر به کاهش معنی دار میزان بارورسازی اسپرم ها شد. با این حال، در نمونه های اسپرم منجمد شده قابلیت بارورسازی اسپرم در رقیق کننده شماره ۱ حاوی ٪۱۰ DMSO و ۵ تا ٪۱۰ متانول و همچنین رقیق کننده شماره ۲ حاوی ۵ و ۱۰٪ DMSO، ۵٪ گلیسرول و ترکیب DMSO (۵٪) و گلیسرول (۱٪) به طور معنی داری بیشتر از سایر ترکیبات بودند و خود این ترکیبات با اختلاف معنی داری را با هم نشان ندادند. از این میان استفاده از رقیق کننده شماره ۱ همراه با ۱۰٪ متانول و رقیق کننده شماره ۲ همراه با ۵٪ DMSO و ترکیب DMSO (۵٪) و گلیسرول (۱٪) دارای بالاترین میزان بارورسازی بودند (به ترتیب ٪۶۴/۶ ، ٪۶۴/۸ و ٪۶۷/۰). استفاده از رقیق کننده های شماره ۱ و ۲ همراه با ترکیبات مذکور به عنوان ترکیبات مناسبی جهت انجماد اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان می باشد (جدول ۳-۴).

در نقطه مقابل استفاده از رقیق کننده شماره ۱ همراه با ۵، ۱۰ و ۱۵٪ گلیسرول، ٪۱۵ متانول و ۵، ۱۰ و ۱۵٪ دی متیل استامید دارای کمترین میزان لقاح بعد از انجماد بودند. رقیق کننده شماره ۲ همراه با ۱۰ و ۱۵٪ گلیسرول، ۱۵٪ متانول و ۱۰ و ۱۵٪ دی متیل استامید نیز میزان لقاح پایین بود.

جدول ٦-۳: تاثیر محافظت کننده های مختلف نفوذپذیر بر روی قابلیت بارورسازی اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان یک ساعت بعد از انجماد

محلول شماره ۲	محلول شماره ۱	تیمار
٦٤/٨ ± ١/٧^{bc}	٤٣/٦ ± ١/١^{h}	٪۵ DMSO
٦٠/٤ ± ١/٧^{de}	٦١/٤ ± ٢/٢^{cde}	٪۱۰ DMSO
٤٨/٢ ± ١/٠^{g}	٤٢/٢ ± ١/٣^{h}	٪۱۵ DMSO
٦٠/١ ± ٣/٦^{e}	٣١/٧ ± ١/٠^{ij}	گلیسرول ٪۵
٢٨/٢ ± ١/٠^{j}	٨/٣ ± ١/٧^{n}	گلیسرول ۱۰٪
٤/١ ± ٣/٨^{o}	٢/١ ± ٢/١^{o}	گلیسرول ۱۵٪
٥٤/٣ ± ١/٠^{f}	٦٢/٩ ± ٢/٣^{bcde}	متانول ٪۵
٣٥/١ ± ٤/٣^{i}	٦٤/٦ ± ٢/٢^{bcd}	متانول ۱۰٪
٢١/١ ± ٣/٣^{k}	١٧/٠ ± ٢/٧^{l}	متانول ۱۵٪
٤١/٤ ± ١/٠^{h}	٢١/٨ ± ٣/٣^{k}	دی متیل استامید ٪۵
١٢/٦ ± ٢/٨^{m}	١/٨ ± ٣/١^{o}	دی متیل استامید ۱۰٪
٢/٥ ± ٢/٧^{o}	١/١ ± ١/٩^{o}	دی متیل استامید ۱۵٪
٦٧/٠ ± ١/٧^{b}	٤٨/٤ ± ٢/١^{g}	DMSO ٪۵ + گلیسرول ۱٪
٩٢/١ ± ٢/٠^{a}	٩٢/١ ± ١/٧^{a}	شاهد (اسپرم تازه)

حروف مشترک نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار و حروف غیر مشترک نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار ($P<0/05$) می باشد.

٤- بحث و نتیجه گیری

٤-١- بررسی نتایج مربوط به فاکتورهای کیفی اسپرم ماهیان مرکز

طول دوره اسپرم دهی ماهیان مرکز شهید مطهری یاسوج از مهر ماه تا فروردین ماه بود. که گزارشات مشابهی توسط Buyukhatipoglu و Holtz، (۱۹۸۴) و همچنین Munkittrich و Moccia (۱۹۸۷) در مولدین یکی از مراکز تکثیر ایالت اونتاریوی کانادا که در دمای ۴ تا ۱۲ درجه سانتی گراد نگهداری شده بودند، ارائه شده است. علاوه بر این بر اساس مشاهدات صورت گرفته در مولدین مورد مطالعه در سایر مواقع سال از جمله ماههای شهریور و اردیبهشت نیز اسپرم دهی مشاهده شد. Gjerd (۱۹۸۴) محدوده متغیری از طول دوره اسپرم دهی از ۵ هفته تا ۱۳ هفته بیان کرده است. Lahnsteiner و همکارانش (۱۹۹۵) نیز طول دوره اسپرم دهی را از مهر ماه تا بهمن (اکتبر تا فوریه) گزارش کرده است. این مطالعه موید نظر Buyukhatipoglu و Holtz، (۱۹۸۴) و همچنین Munkittrich و Moccia (۱۹۸۷) می باشد که اظهار کرده اند که برخی محققین طول دوره اسپرم دهی را کمتر تخمین می زنند.

در ابتدا مقایسه ای از پارامترهای کیفی اسپرم که در این مطالعه به دست آمده است، با سایر مطالعات انجام خواهد شد. تراکم اسپرم از $۵/۱۵ \times ۱۰^{۹}$ در مهرماه تا $۲۶/۴۹ \times ۱۰^{۹}$ متغیر بوده است. میانگین تعداد اسپرم در میلی لیتر منی ماهی قزل آلای رنگین کمان در طول شش ماه دو سال (ماههای مهر، آبان، آذر، دی، بهمن و اسفند) نیز $۱/۰۹ \times ۱۰^{۹} \pm ۱۳/۷۹$ عدد برآورد شد. در مطالعه شکیبی دریا کناری (۱۳۷۹)، غلظت اسپرم از $۴/۹۱ \times ۱۰^{۹}$ تا $۲۵/۱۵ \times ۱۰^{۹}$ متغیر بود و میانگین آن نیز $۱۴/۵ \times ۱۰^{۹}$ گزارش شده است. سیر و همکارانش (۱۳۸۵) در بررسی اسپرم قزل آلا در مرکز تکثیر نمرود تراکم اسپرم را در گروه فتوپریودیک $۲/۸ \times ۱۰^{۹}$ و در گروه تکثیر طبیعی $۸/۳۶ \times ۱۰^{۹}$ بدست آورده اند. محمدی (۱۳۸۸) در بررسی مقایسه ای نتایج تکثیر مولدین قزل آلای سازگارشده در آب لب شور بافق با آب شیرین یاسوج تراکم اسپرم را به ترتیب ۲۶ و ۱۸ میلیارد در میلی لیتر اسپرم بدست آورده است. شمس پور و همکاران (۱۳۸۸) تراکم را در سنین مختلف از ۵/۰۶ تا ۱۲/۱۸ میلیارد در میلی لیتر اسپرم برآورد کردند. Rainis و همکارانش در سال ۲۰۰۵ میزان این فاکتور را $۱/۷۶ \times ۱۰^{۹}$ بدست آورده اند.Buyukhatipoglu و Holtz، (۱۹۸۴) با بررسی تراکم اسپرم در نرهای ۲ و ۳ ساله که با فواصل متناوب ۱، ۲ و ۴ هفته بررسی شده اند، مقادیر $۷/۷ \times ۱۰^{۹}$ تا $۳۵/۴ \times ۱۰^{۹}$ را تخمین زده اند. Aral و همکارانش (۲۰۰۷) در بررسی کیفیت اسپرم قزل آلا در سد دریاچه آتاترک در ترکیه تراکم اسپرم را به طور متوسط $۶/۰۶ \times ۱۰^{۹}$ ارزیابی کرده اند. Geffen و Evans (۲۰۰۰) نیزتراکم سلول اسپرم در میلی لیتر منی $۳/۸ \pm ۸/۹$ میلیارد بدست آورده اند. در ماهی قزل آلای رنگین کمان مقدار $۱۱/۸ \times ۱۰^{۹}$ اسپرم در میلی لیتر مایع منی برای تراکم اسپرماتوزوآ توسط Ciereszko و Dabrowski در سال ۱۹۹۳ گزارش گردید. در سال ۲۰۰۸ نیز Canyurt و Akhan تراکم اسپرم را در ماهی قزل آلا $۹/۸۷ \times ۱۰^{۹}$ برآورد کردند.

اختلاف در برآورد تراکم اسپرم در مطالعات مختلف می تواند دلایل متفاوت داشته باشد که از آن جمله می توان به نوع پیپت کردن (Tvedt *et al*., 2001)، نوع روش و دستگاه مورد استفاده برای ارزیابی (Rurangwa *et al*.,

2004) اشاره کرد. همچنین تراکم در بین گونه های همنوع و در طول فصل تولید مثلی متغیر است (Rurangwa *et al*., 2004)، برای مثال در ماهی قزل آلای رنگین کمان (Buyukhatipoglu and Holtz, 1984) و کپورمعمولی (; Christ *et al*., 1996; Lubzens *et al*., 1997) با نزدیک شدن به انتهای فصل تولید تراکم اسپرماتوزآ کاهش پیدا می کند. همیشه اسپرم هایی که دارای تراکم بالا هستند بیشترین تحرک و یا بالاترین میزان بارور سازی را نخواهند داشت (Geffen and Evans., 2000; Williot *et al*., 2000). بنابراین تراکم اسپرم را نمی توان به عنوان یک مقیاس ویژه و حساس قدرت بارورسازی اسپرم محسوب کرد و ممکن است در درون یک گونه مشخص ماهی نیز دارا ی اختلافات فاحش باشد. در مطالعه حاضر نیز محدوده های به دست آمده قابل مقایسه و مطابق با سایر مطالعات بوده است.

حجم اسپرم نیز در ماههای مختلف اختلاف معنی داری را با هم نشان دادند(p<۰/۰۵). به طوریکه بیشترین حجم اسپرم در نمونه های مورد مطالعه در آذر ماه به میزان ۰/۲۱ ± ۱۰/۱۴ میلی لیتر و کمترین آن در اسفند ماه به میزان ۰/۵۲ ± ۲/۱۲ میلی لیتر مشاهده شد. بر اساس نتایج بدست آمده متوسط حجم اسپرم استحصالی در این مطالعه ۰/۵۲± ۶/۴۹ میلی لیتر بوده است. حجم و کیفیت اسپرم در ماهیان مولد بستگی به سن، شرایط نگهداری، کیفیت آب، تغذیه مولدین و حتی ساختار ژنتیکی آنها دارد. از آنجا که کیفیت اسپرم با پیشرفت فصل تولید و مثل نزول خواهد کرد (Billard, 1992) لذا در انتهای فصل باید از حجم بیشتر اسپرم جهت لقاح استفاده نمود.

در مطالعه حاضر درصد اسپرم های متحرک از ۱۴ درصد تحرک در مهرماه تا ۱۰۰ درصد در ماههای آبان، آذر، دی و بهمن متغیر بود. متوسط درصد اسپرم های متحرک در این مطالعه در طول دوره شش ماه تولید و مثل حدود ۷۸/۲۶ براورد شد. Rainis و همکارانش در سال ۲۰۰۵ در مطالعه ای به بررسی پارامترهای کیفی ۳ گونه از ماهیان پرورشی مزارع ایتالیا پرداخته اند که درصد اسپرم های متحرک در ماهی قزل آلای رنگین کمان ۱۰۰ درصد بوده است. در تحقیق Lahnsteiner و همکارانش در سال ۲۰۰۵ درصد اسپرم های متحرک ۶۶/۱ بدست آمده است که دلیل کم بودن این میزان درصد تحرک دقت زیاد در بررسی بوده بطوری که اسپرم های دارای حرکت موضعی در گروه اسپرم های متحرک محسوب نشده است. Wagner و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۲ درصد اسپرم های متحرک را در ماهی قزل آلای رنگین کمان ۶±۸۳ بدست آورده اند. Aral و همکارانش (۲۰۰۷) در بررسی کیفیت اسپرم قزل آلا در سد دریاچه آتاترک در ترکیه درصد اسپرم های متحرک را ۷۳/۲۵ درصد تخمین زده است. Geffen و Evans (۲۰۰۰) درصد اسپرم های متحرک را در ماهی قزل آلا۱۰۰ درصد بدست آورده اند.

بررسی نتایج بیان شده و مقایسه آن با نتایج تحقیق حاضر موید این مطلب است که معمولا درصد اسپرم های متحرک به عنوان یک فاکتور ظاهری ارزیابی کیفی اسپرم مطرح است، یعنی این که افراد مختلف با در نظر گرفتن معیارهای مختلفی این فاکتور را تخمین می زنند. در طبقه بندی ظاهری کیفیت اسپرم معمولا اسپرم های دارای درصد تحرک بالاتر از ۷۰ الی ۷۵ درصد در زمره اسپرم های دارای تحرک فوق العاده طبقه بندی می

شوند (Guest *et al*., 1976). در تحقیق حاضر درصد اسپرم های متحرک در ماههای آبان تا بهمن بالا بوده است که بر اساس نمره بندی همگی جزء اسپرم های دارای تحرک شدید طبقه بندی می شوند.

۲-٤- بررسی محلول های انجماد مختلف قبل و بعد از انجماد

رقیق کننده یک محلول فیزیولوژیک می باشد که کنترل بهتر شرایط فیزیکوشیمیایی را در طول زمان نگهداری فراهم می کنند. رقیق کننده های مورد استفاده در محلول انجماد از لحاظ پیچیدگی از ترکیبات پیچیده مشابه ترکیب پلاسمای منی تا یک محلول گلوکزی ساده متغیر می باشند. تحقیقات نشان داده اند که ترکیب این محلول نقش مهمی در قدرت بارورسازی اسپرم بعد از انجماد دارد و به نظر نمی رسد که یک رقیق کننده تنها وجود داشته باشد که بارورسازی را در تمام گونه ها به حداکثر برساند. مطالعات مختلف نشان داده اند که ترکیبات پیچیده تر لزوماً بهتر نیستند (Cloud and Patton, 2008).

بررسی نتایج درصد تحرک اسپرم‌های رقیق‌شده در محلول‌های انجماد مختلف پس از همدمایی به مدت ۵ دقیقه در آب و یخ $4^{\circ}C$ نشان می دهند که میزان تحرک اسپرم ها پس از اختلاط با تمام محلول های انجماد مورد مطالعه در مقایسه با درصد تحرک در نمونه های شاهد (۹۴/۳)، به طور معنی داری کاهش داشت. از جمله دلایلی که برای کاهش درصد تحرک در مرحله همدمایی ذکر شده است می توان به از دست رفتن انرژی اسپرم در این مرحله اشاره کرد، یعنی اینکه در ابتدا اسپرم ها دارای درصد تحرک بالایی هستند ولی در زمان همدمایی، اسپرم ها توان خود را به جهت سرمای ناشی از یخ از دست می دهند و از بین می روند.

با وجود مشاهده اختلاف معنی دار میان محلول های انجماد مورد استفاده قبل از انجماد، با این حال اسپرم در همه محلول ها از خود تحرک خوبی را از خود نشان دادند به طوری که میزان تحرک در اسپرم رقیق شده در محلول شماره ۶ کمتر از بقیه و به حدود ۴۳/۹ درصد رسید و در بقیه موارد از ۶۸/۲ در محلول شماره ۳ تا ۷۶/۵ در محلول شماره ۲ متغیر بود. یک دلیل مناسب جهت توجیه حفظ کیفیت در تمام این محلول ها به تاریخچه استفاده موفقیت آمیز ابن محلول ها در مطالعات قبلی بر می‌گردد. محلول شماره یک توسط Lahnsteiner *et al*., 1995; Lahnsteiner *et al*., 1996a; Lahnsteiner *et al*., 2002; Salte *et al*., 2004; Lahnsteiner and Mansour, 2008; Lahnsteiner *et al*., 2011، به طور موفقیت آمیزی مورد استفاده قرار گرفته شده است. محلول شماره ۲ توسط Erdahl *et al*., 1984; Cabrita *et al*., 1999; Cabrita *et al*., 2001a, b; Robles *et al*., 2003; Cabrita *et al*., 2005 ; Herra´ez *et al*., 2008; Robles *et al*., 2008; Pe´rez-Cerezales *et al*., 2010 جهت انجماد اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان به کار گرفته شده است. محلول شماره ۳ محلول معروف کورتلند می باشد که در اغلب مطالعات مورد استفاده قرار گرفته شده است. محلول شماره ۴ نیز در مطالعات متعدد انجماد اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان استفاده شده است (شکیبی دریا کناری، ۱۳۷۹، Alderson and MacNeil, 1984; Scheerer and Thorgaard, 1989; Wheeler and Thogaard, 1991; Tekin *et al*. 2003a; Ninhaus-Silveira, A. *et al*., 2008; Young *et al*., 2009). ترکیب های شماره ۵ و ۶ نیز توسط شکیبی دریا کناری، ۱۳۷۹ و Holtz, 1993 مورد استفاده قرار گرفته شده است.

اسپرم ها پس از نگهداری در ازت مایع به مدت ۳ روز، یک ماه و سه ماه، در دمای C °۲۵ به مدت ۳۰ ثانیه ذوب شده و جهت تعیین میزان تحرک و لقاح استفاده شدند. نتایج نشان دادند که میزان تحرک بعد از انجماد نسبت به زمان قبل از انجماد به طور معنی داری کاهش پیدا کرد. این کاهش در تمام تیمار ها مشاهده شد با ابن تفاوت که در تیمار اول و دوم با استفاده از ترکیبات شماره ۱ و ۲ میزان تحرک قابل قبولی جهت انجام عملیات لقاح مشاهده شد، به طوری که تغییر محسوسی در میزان تحرک حتی تا ۳ ماه بعد از انجماد مشاهده نشد. میزان تحرک در نمونه های اسپرم منجمد شده با ترکیبات شماره ۳، ۴، ۵ و ۶ به طور معنی داری کاهش داشت (p<۰/۰۵). به طوری که میزان تحرک در نمونه های منجمد شده با ترکیب شماره ۵ بعد از ۳ ماه به کمتر از ۱ درصد رسید (جدول ۲-۳).

لذا بر اساس نتایج حاصله در این مرحله دلایل برتری ترکیبات شماره ۱ و ۲ را می توان به مواردی از جمله مشابهت ترکیب این محلول ها با ترکیب پلاسمای منی اشاره کرد. علاوه بر این، سایر ترکیب ها نیز محیط مناسب جهت انجماد اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان را دارند. Babiak و همکارانش در سال ۲۰۰۱ در بررسی تاثیرات ترکیب رقیق کننده و همدمایی بر روی قابلیت بارورسازی اسپرم منجمد شده نتایج جالبی بدست آوردند. در تمام موارد بررسی واکنش های متقابل میان فاکتورهای رقیق کننده، نوع محافظت کننده و حضور زرده تخم مرغ، اثرات افزایشی شدید مشاهده گردید، که بیانگر عملکرد چندفاکتوری رقیق کننده بر روی مقاومت اسپرماتوزوآ در مقابل صدمات ناشی از انجماد می باشد. در نتیجه وقتی که هر کدام از این فاکتورها به تنهایی مورد بررسی قرار گیرند، ممکن است اطلاعات کلی در مورد تاثیرشان بر روی موفقیت انجماد ارائه ندهند. احتمالاً برهم کنش های میان فاکتورهای مختلف، توجیه مناسبی جهت توضیح اختلافات مشاهده شده در مفید بودن اجزاء رقیق کننده های گزارش شده توسط محققین مختلف و همچنین رقیق کننده های استفاده شده در این بررسی باشد. برای مثال، تاثیر اضافه کردن ۱۰٪ زرده تخم مرغ به رقیق کننده بر روی قابلیت بارورسازی اسپرم منجمد شدیداً تحت تاثیر نوع رقیق کننده مورد استفاده می باشد. در زمان استفاده از ۰/۳ مول گلوکز کاملاً مضر بوده در حالی که در صورت استفاده از رقیق کننده Erdahl and Graham موثر و مفید می باشد. در مجموع می توان اذعان نمود که به کارگیری محلول های انجماد مختلف مستلزم بررسی این محلول ها در نواحی جغرافیایی مختلف و بر اساس یک پروتکل واحد جهت فرایند های دخیل در انجماد اسپرم (از جمله مولدین مورد استفاده، خصوصیات کیفی و کمی اسپرم، همدمایی یا عدم همدمایی، روش انجماد استاندارد و ثابت، روش ذوب و لقاح یکسان و مناسب) و در نهایت توسعه یک پروتکل واحد در این زمینه می باشد. بر اساس نتایج مطالعه Babiak و همکارانش (۲۰۰۱) و همچنین داده های سایر محققین (Babiak *et al*., 1999; Holtz, 1993; Lahnsteiner *et al*., 1995; Lahnsteiner *et al*., 1997) می توان نتیجه گرفت که ارزیابی و نوع رقیق کننده بدون در نظر گرفتن برهم کنش های میان سایر فاکتورها اطلاعات مفیدی ارائه نخواهند کرد. به طور کلی بر اساس نظر Babiak و همکارانش (۲۰۰۱) نوع رقیق کننده در انجماد اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان به عنوان فاکتور حیاتی مطرح نیست. به طوریکه حتی اسپرم های منجمد شده در ترکیب ۱۰٪ DMSO و آب شیر نیز نتایج لقاح

بالای ۴۰٪ بدست آمده است. لذا بر این اساس هیچ گونه تعبیر مناسبی را نمی توان از نوع رقیق کننده مورد استفاده ارائه داد. در این مطالعه بر اساس آنالیز برهم کنش ها و نتایج اولیه میزان تحرک و لقاح بدست آمده از بین محلول های مختلف ۲ محلول به عنوان رقیق کننده های برتر انتخاب شد.

۳-٤- تعیین بهترین درجه حرارت ذوب

به طور کلی به منظور جلوگیری از تشکیل دوباره بلورهای یخی، نرخ یا سرعت ذوب باید بالا باشد (Lahnsteiner., 2000). پایوت ها در آب گرم (Baynes & Scott 1987; Wheeler and Thogaard, 1991) و پلت ها مستقیماً در محلول لقاح ذوب می شوند(Lahnsteiner., 2000). در حالیکه شرایط انجماد در گونه های مختلف آزادماهیان متفاوت است، با این حال ذوب خاص گونه نیست (Lahnsteiner., 2000). Lahnsteiner (۲۰۰۰) اذعان دارد که ذوب حساسترین پارامتر در طی مراحل انجماد اسپرم آزادماهیان می باشد و انحراف خفیف از شرایط اپتیمم به طور معنی داری درصد لقاح را کاهش خواهد داد. هنگامی که زمان ذوب برای ۵ ثانیه و یا دمای ذوب به میزان$5^{\circ}C$ تغییر کند، تحرک و بارورسازی اسپرم به طور معنی داری کاهش پیدا خواهد کرد. حساسیت اسپرم به شرایط ذوب منجر به پیچیدگی کار جهت دستکاری تعداد زیاد پایوت ها می شود و در نتیجه از آنجا که تمام پایوت ها باید در شرایط یکسان و ثابت نگهداری شوند لذا تلقیح تعداد زیاد تخمک با مشکل روبرو خواهد شد. علاوه بر این، نگهداری اسپرم منجمد شده حتی برای مدت زمان بسیار کوتاه در حدود ۲۰ ثانیه در دمای$10^{\circ}C$–۸ منجر به کاهش معنی دار میزان بارورسازی خوهد شد. این عدم ثبات در کیفیت اسپرم می تواند ناشی از تغییرات در ساختار، فیزیولوژی و متابولیسم سلول های اسپرم باشد.

در مطالعه حاضر، کمترین میزان لقاح در زمان ذوب اسپرم ها در دمای $37^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه بدست آمد. استفاده از حمام آب با دمای$25^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه جهت ذوب اسپرم های منجمد نتایج مشابهی را با گروه شاهد نشان داد.

در مطالعات مختلف انجماد اسپرم ماهی قزل آلا دماهای ذوب مختلفی به کار گرفته شده است. که از صفر درجه سانتی گراد تا ۸۰ درجه متغیر بوده است. در تشابه با این مطالعه Lahnsteiner و همکارانش (۲۰۱۱)، Pe´rez-Cerezales و همکارانش (۲۰۱۰)، Herra´ez و همکارانش (۲۰۰۸)، Lahnsteiner and mansour (۲۰۰۸)، Robles و همکارانش (۲۰۰۸)، Salte و همکارانش (۲۰۰۴)،Robles و همکارانش (۲۰۰۳)، Cabrita و همکارانش (a, b ۲۰۰۱)، Lahnsteiner و همکارانش (۱۹۹۵) بهترین دما جهت ذوب اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان را دمای$25^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه بدست آورده اند. در مطالعه Wheeler و Thogaard نتایج مشابهی در دماهای ۵ تا ۳۰ درجه سانتی گراد بدست آوردند و آزمون t-test دوطرفه هیچ گونه اختلاف معنی داری را میان این دما ها نشان نداد. تنها اسپرم های ذوب شده در دمای $0^{\circ}C$ به طور معنی داری از سایر دما ها متفاوت بود و میزان لقاح پایینی را ارائه داد. این محققین با توجه به نتایج کار خود دمای $5^{\circ}C$ را با توجه به کاهش میزان خطا در این دما جهت ادامه کار خود انتخاب نمودند. شکیبی دریا کناری (۱۳۷۹) بهترین دما و زمان ذوب اسپرم ماهی قزل آلا را

دمای C° ۵ به مدت ۹۰ ثانیه بدست آورد. در مجموع می توان به این نتیجه رسید که در مطالعه حاضر بر اساس نتایج و بررسی میزان فعالیت اسپرم های ذوب شده دمای C° ۲۵ به مدت ۳۰ ثانیه بهترین دما جهت ذوب اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان می باشد که در تطابق با اکثر مطالعات انجماد اسپرم صورت گرفته شده در این ماهی می باشد.

جدول ۱-٤ : دماهای ذوب مختلف استفاده شده در انجماد اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان

دمای ذوب (C°)	مدت زمان ذوب (ثانیه)	منبع
۲۵	۳۰	Lahnsteiner *et al*., 2011, Pe´rez-Cerezales *et al*., 2010, Herra´ez *et al*. 2008, Robles *et al*., 2008, Salte *et al*., 2004, Robles *et al*., 2003, Cabrita *et al*., 2001a, b
۱۰	۲۰ + ۱۰	Young *et al*., 2009
۷۰	۳	Ninhaus-Silveira, A. *et al*., 2006, Ninhaus-Silveira, A. *et al*., 2002
۵۰	۱۰	Cabrita *et al*., 2005
۳۰	۳۰	Bozkurt *et al*., 2005, Lahnsteiner *et al*., 2002,
۳۷	۳۰	Ogier De Baulny *et al*., 1997, Labbe and Maisse 1996

٤-٤- بررسی تاثیر محافظت‌کننده‌های مختلف در ترکیب با رقیق کننده شماره ۱

در مطالعه حاضر استفاده از انواع مختلف محافظت کننده در تمام موارد منجر به کاهش معنی دار میزان لقاح اسپرم ها قبل از انجماد در مقایسه با گروه شاهد شدند ($p<$ ۰/۰۵). با این حال، در نمونه های اسپرم منجمد شده قابلیت بارورسازی اسپرم در رقیق کننده شماره ۱ حاوی ۱۰٪ DMSO و ۵ تا ۱۰٪ متانول به طور معنی داری بیشتر از سایر ترکیبات بود. از این میان استفاده از رقیق کننده شماره ۱ همراه با ۱۰٪ متانول دارای بالاترین میزان بارورسازی بودند (۶۴/۶٪).

نتایج بدست آمده از قدرت بارورسازی اسپرم ها قبل و بعد از انجماد بیانگر تاثیر ویژه ترکیبات محافظت کننده در حفظ کیفیت اسپرم منجمد شده می باشد. همان طور که نتایج نشان می دهند با وجود حفظ کیفیت اسپرم ها قبل از انجماد، در اغلب موارد ترکیبات محافظت کننده منجر به حفظ کیفیت اسپرم های منجمد نشدند. به عنوان مثال، اضافه کردن DMSO به میزان ۵٪ و ۱۰٪ دارای نتایج متفاوتی بودند. اضافه کردن ۵٪ DMSO باعث کاهش ۲۴ درصدی میزان لقاح شد (از ٪۶۷/۱ قبل از انجماد به ٪۴۳/۶ بعد از انجماد)، در حالیکه ۱۰٪ DMSO منجر به کاهش ۸ درصد لقاح بعد از انجماد شد (از ٪۶۹/۵ به ٪۶۱/۴). از سوی دیگر استفاده از ۵ و ۱۰٪ متانول نتایج لقاح بهتری را ارائه دادند و ٪۱۵ متانول باعث کاهش چشمگیر درصد لقاح به ٪۱۷ شد.

Lahnsteiner و همکارانش (۱۹۹۶a، ۱۹۹۵) بر اساس آنالیز میزان تحرک و رنگ آمیزی حیاتی اسپرم، ترکیب DMSO و گلیسرول را به عنوان یک محافظت کننده خیلی موثر جهت انجماد اسپرم ماهیان قزل آلای رنگین

کمان، قزل آلای قهوه ای، قزل آلای دریاچه ای، قزل آلای جویباری و ماهی سفید معرفی کردند. این محققین در ادامه مطالعات خود (Lahnsteiner *et al*. 1997a) نشان دادند که متانول در مقایسه با DMA و DMSO نتایج بهتری را به عنوان حفاظت کنندگی اسپرم منجمد آزاد ماهیان ارائه داد. مطالعهLahnsteiner و همکارانش (۱۹۹۷a) نشان داد که استفاده از متانول به عنوان محافظت کننده منجر به افزایش بیشتر کیفیت اسپرم ماهیان قزل آلای رنگین کمان، قزل آلای دریاچه ای، قزل آلای قهوه ای و ماهی چار بعد از انجماد می شود. در مجموع نتایج مطالعه این محققین حاکی از کاربرد متانول به عنوان موثرترین ماده محافظت کننده اسپرم آزاد ماهیان می باشد. Lahnsteiner در مطالعه مروری داده های موجود در ارتباط با انجماد اسپرم آزاد ماهیان (۲۰۰۰) به این نتیجه رسید که در مطالعات قبلی از ترکیب ۱۰٪ DMSO و ۱٪ گلیسرول به عنوان محافظت کننده داخلی استفاده می شد (Lahnsteiner et al. 1995 1996b)، در حالی که در مطالعات اخیر ۱۰٪ متانول جایگزین ترکیب قبلی شده است. این جایگزینی به خاطر افزایش معنی دار نرخ لقاح توسط این محافظت کننده می باشد(Lahnsteiner *et al*. 1996a. 1997a). در مطالعه حاضر در تطابق با مطالعه ذکرشده استفاده از ۱۰٪ DMSO و ۵ و ۱۰٪ متانول نتایج لقاح بالایی را نشان دادند و اختلاف معنی داری را با هم نشان ندادند.

در تضاد با نتایج مطالعه حاضر و همچنین نتایج Lahnsteiner (۲۰۰۰) که گزارش داد در آزادماهیان متانول در مقایسه با DMA و DMSO موثرترین محافظت کننده در زمان استفاده از رقیق کننده Lahnsteiner است. در مطالعه Richardson و همکارانش (۲۰۰۰) با استفاده از رقیق کننده Lahnsteiner، اسپرم منجمد شده با DMA دارای تحرک بیشتری نسبت به اسپرم های منجمد شده با متانول و DMSO بود. این اختلاف می تواند به این حقیقت برگردد که این محقق تاثیرگذاری محافظت کننده را تنها از طریق اندازه گیری پارامترهای تحرک اسپرم مورد آزمایش قرار داد و قابلیت بارورسازی را مد نظر قرار نداد. بر خلاف نظر سایر محققین(McNiven, *et al*., 1993; Richardson *et al*. 2000; Babiak, *et al*., 2001)که اذعان داشته اند DMA به عنوان یک محافظت کننده موفق در حفاظت از اسپرم آزادماهیان در طی فرایند انجماد در زمان استفاده از هر دو نوع رقیق کننده نمکی و گلوکزی می باشد.، در مطالعه حاضر استفاده از این محافظت کننده به همراه محلول شماره ۱ نتایج ضعیفی را به همراه داشت.

در مجموع نتایج حاصل از استفاده ترکیبات محافظت کننده مختلف همراه با محلول شماره ۱ (محلول نمکی) در این مطالعه، بیانگر موثر بودن ۱۰٪DMSO و ۵ و ۱۰٪ متانول و عدم کارایی گلیسرول و DMA در نسبت های مختلف می باشد.

۵-٤- بررسی تاثیر محافظت‌کننده‌های مختلف در ترکیب با رقیق کننده شماره ۲

استفاده از محلول شماره ۲ همراه با ۵ و ۱۰٪ DMSO، ۵٪ گلیسرول و همچنین ترکیب ۵٪ DMSO و ۱٪ گلیسرول نتایج لقاح بالایی را نشان داد. نتایج مطالعات Babiak و همکارانش (۲۰۰۱) با استفاده از رقیق کننده گلوکزی نیز تاییدکننده امکان کاربرد دی متیل سولفوکساید جهت انجماد اسپرم ماهی قزل آلا بصورت پلت می باشد. درصد بالای لاروهای دارای شنای فعال (۷۲/۹٪) بعد از لقاح با اسپرم منجمد شده در محلول Erdahl and Graham +

۱۰٪ DMA + ۱۰٪ زرده تخم مرغ نشان دهنده موفقیت بسیار بالای این پروتکل می باشد. McNiven و همکارانش (۱۹۹۳) نیز اذعان داشته که در آزاد ماهیان DMSO در مقایسه با سایر محافظت کننده ها از جمله گلیسرول، متانول، اتیلن گلیکول و پروپیلن گلیکول بیشتر مورد استفاده قرار می گیرد. این نتایج بیانگر انعطاف پذیری DMSO در محلول گلوکز و حفظ غشاء سلول می باشد.

بر خلاف مطالعه حاضر که استفاده از متانول نتایج ضعیفی را به همراه داشت، اسپرم منجمد شده ماهی چار قطبی در رقیق کننده گلوکزی، در زمان استفاده از متانول در مقایسه با استفاده از DMA و DMSO دارای درصد بالاتری تحرک و لقاح و چشم زدگی بودند.

در ارتباط با گلیسرول نیز برخلاف مطالعه حاضر، McNiven و همکارانش (۱۹۹۳) اظهار کرده اند که با وجود اینکه گلیسرول در انجماد اسپرم پستانداران به طور گسترده ای استفاده می شود، با این حال به خاطر عدم توانایی در حفظ انسجام غشاء سلول آزاد ماهیان در انجماد اسپرم آزاد ماهیان موثر نمی باشد. Babiak و همکارانش (۲۰۰۱) در تطابق با مطالعه حاضر با استفاده از رقیق کننده گلوکزی به این نتیجه رسیدند که گلیسرول نیز بعد از ترکیب با ۰/۳ مول گلوکز در انجماد اسپرم مفید واقع بود.

٦-٤- مقایسه محافظت کننده های مختلف در ترکیب با رقیق کننده های شماره ۱ و ۲

در مطالعات مختلف DMSO (Legendre and Billard, 1980; Stoss and Holtz, 1983b, c; Boyens and Scott, 1987; Holtz, 1993)، گلیسرول (Piironen, 1993)، ترکیب DMSO و گلیسرول (Lahnsteiner *et al*. 1995 1996a)، پروپان دیول (Lahnsteiner *et al*. 1996a)، دی متیل استامید(McNiven *et al*., 1993) جهت انجماد اسپرم آزاد ماهیان مورد استفاده قرار گرفته شده اند. با این وجود تاکنون پروتکل یکسانی جهت انجماد اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان منشر نشده است. مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از ٪۱۰ متانول همراه با ترکیب شماره۲ و ٪DMSO۵ و همچنین ترکیب ٪۵ DMSO و ٪۱ گلوکز همراه با ترکیب شماره ۲ بهترین نتایج را به همراه داشتند.

Mansour و همکاران (۲۰۰۶a, b) در مطالعه خود نشان دادند که میزان تحرک و بارورسازی اسپرمهای منجمد شده در رقیق کننده گلوکزی (مشابه محلول شماره ۲ مطالعه حاضر) حاوی متانول در مقایسه با اسپرم های منجمد شده در رقیق کننده پیچیده تر Lahnsteiner (مشابه محلول شماره ۱ در مطالعه حاضر) همراه با متانول به طور معنی داری بیشتری می باشد. این نتایج مطابق با نتایج بدست آمده حاصل از مطالعه Tekin و همکارانش در سال ۲۰۰۳ در ماهی قزل آلای رنگین کمان می باشد که این محققین ۳ رقیق کننده اسپرم را با هم مقایسه کردند. این ۳ رقیق کننده شامل گلوکز، رقیق کننده Lahnsteiner و رقیق کننده Monib همراه با DMSO به عنوان محافظت کننده بود. این محققین دریافتند که بیشترین میزان تحرک و قدرت بارورسازی اسپرم منجمد شده هنگامی حاصل شد که از رقیق کننده گلوکزی استفاده شد. گلوکز می تواند به عنوان رقیق کننده اسپرم، حفاظت از صدمات حاصل از تغییرات اسمولاریته و همچنین دارای تاثیر حفاظت کنندگی خارجی است(Leung & Jamieson, 1991).

Babiak و همکارانش در سال ۲۰۰۱ در بررسی تاثیرات ترکیب رقیق کننده و همدمایی بر روی قابلیت بارورسازی اسپرم منجمد شده نتایج جالبی بدست آوردند. اثرات افزایشی شدید نوع رقیق کننده، نوع محافظت کننده و حضور زرده تخم مرغ، در تمام موارد بررسی واکنش های متقابل درجه اول این فاکتورها مشاهده گردید که بیانگر عملکرد چندفاکتوری رقیق کننده بر روی مقاومت اسپرماتوزوآ در مقابل صدمات ناشی از انجماد می باشد. در نتیجه وقتی که هر کدام از این فاکتورها به تنهایی مورد بررسی قرار گیرند، ممکن است اطلاعات کلی در مورد تاثیرشان بر روی موفقیت انجماد ارائه ندهند. احتمالاً برهم کنش های میان فاکتورهای مختلف، توجیه مناسبی جهت توضیح اختلافات مشاهده شده در مفید بودن اجزاء رقیق کننده های گزارش شده توسط محققین مختلف باشد. برای مثال، تاثیر اضافه کردن ۱۰٪ زرده تخم مرغ به رقیق کننده بر روی قابلیت بارورسازی اسپرم منجمد شدیداً تحت تاثیر نوع رقیق کننده مورد استفاده می باشد. در زمان استفاده از ۰/۳ مول گلوکز کاملاً مضر بوده در حالی که در صورت استفاده از رقیق کننده Erdahl and Graham موثر و مفید می باشد. انجماد موفقیت آمیز انجماد اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان با استفاده از محافظت کننده های نفوذپذیر از جمله DMSO (Stoss and Holtz, 1981a, b)، متانول (Lahnsteiner *et al*., 1997a) و ترکیب DMSO و گلیسرول (Lahnsteiner *et al*., 1995) صورت گرفته شده است. McNiven و همکارانش(۱۹۹۳) ثابت کردند که دی متیل استامید جهت انجماد اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان مفید می باشد، اما این محققین تمام رقیق کننده ها را در pH برابر ۷/۵ تنظیم کردند و درنتیجه مقایسه با سایر مطالعات را محدود کردند. نتایج مطالعات Babiak و همکارانش (۲۰۰۱) نیز تایید کننده امکان کاربرد دی متیل سولفوکساید جهت انجماد اسپرم ماهی قزل آلا بصورت پلت می باشد. درصد بالای لاروهای دارای شنای فعال (۷۲/۹٪) بعد از لقاح با اسپرم منجمد شده نشان دهنده موفقیت بسیار بالای این پروتکل می باشد. گلیسرول نیز بعد از ترکیب با ۰/۳ مول گلوکز در انجماد اسپرم مفید واقع بود. Babiak و همکارانش (۲۰۰۱) در آزمایش دیگری بعد از اضافه کردن زرده تخم مرغ به این نتیجه رسیدند که اضافه کردن زرده تخم مرغ جهت انجماد اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان مفید می باشد که در راستای نتایج بدست آمده توسط Boynes و Scott (۱۹۸۷) می باشد.

هیچ گونه تعبیر مناسبی را نمی توان از نوع رقیق کننده مورد استفاده ارائه داد. بر اساس نتایج مطالعه Babiak و همکارانش (۲۰۰۱) و همچنین داده های سایر محققین (Babiak *et al*., 1999; Holtz, 1993; Lahnsteiner *et al*., 1995; Lahnsteiner *et al*., 1997a) می توان نتیجه گرفت که ارزیابی ونوع رقیق کننده بدون در نظر گرفتن برهم کنش های میان سایر فاکتورها اطلاعات مفیدی ارائه نخواهند کرد. به طور کلی نوع رقیق کننده در انجماد اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان به عنوان فاکتور حیاتی مطرح نیست. به طوریکه حتی اسپرم های منجمد شده در ترکیب ۱۰٪ DMSO و آب شیر نیز نتایج لقاح بالای ۴۰٪ بدست آمده است.

با وجود اعمال دقت در گزارشات انجماد اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان، با این حال در هیچکدام از این مطالعات نتایج مشابهی به دست نیامده است. در نتیجه به نظر می رسد که مشاهده و گزارش افزایش معنی دار عملکرد اسپرم منجمد به تغییرات ایجاد شده در روش اعمال شده مربوط نباشد. احتمال دارد که اغلب این

تناقضات موجود در نتایج لقاح بدست آمده از اسپرم های منجمد حاصل تغییرات بیولوژیکی مواد مورد استفاده باشند. Legendre و Billard (۱۹۸۰) به وجود اختلاف در کیفیت اسپرم منجمد شده در نرهای مختلف اشاره کرده اند و بیان کرده اند که اسپرم های منجمد شده در اواخر فصل تولید و مثل نتایج ضعیفتری نسبت به ابتدای فصل دارند.

۵- نتیجه گیری نهایی

از بین محلول های مختلف محلول های شماره ۱و ۲ به عنوان رقیق کننده های برتر انتخاب شد. انتخاب و یا حذف رقیق کننده به دلایل زیر بوده است:

۱- بررسی کیفیت اسپرم و ارزیابی آن در لحظهٔ ترکیب با رقیق کننده.

۲- بررسی کیفیت اسپرم بعد از هم دمای با یخ.

۳- بررسی کیفیت اسپرم پس از ذوب بعد از گذشت یکساعت از انجماد.

تاثیر محلول های شماره ۱و ۲ در کاهش میزان تحرک نسبت به زمان بعد از انجماد در مقایسه با سایر محلول ها کمتر بود، به طوری که محلول های شماره ۳، ۴، ۵ و ۶ بعضاً نتایج خیلی پایینی را ارائه دادند. لذا در ادامه مطالعه از ترکیبات شماره ۱و ۲ استفاده شد. علاوه بر این ترکیبات شماره ۱ و ۲ بر اساس ارائه بهترین نتایج لقاح در زمانهای مختلف بعد از انجماد جهت ادامه کار انتخاب شدند. بر اساس نتایج حاصل از میزان لقاح ترکیب های شماره ۱ و ۲ در این مطالعه، بهترین درجه حرارت ذوب استفاده از حمام آب با دمای$25^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه جهت ذوب اسپرم های منجمد قزل آلای رنگین کمان به دست آمد، که در ادامه تحقیق از این دما جهت ذوب اسپرم ها استفاده شد. به منظور ارزیابی تاثیر محافظت کننده های مختلف بر قابلیت بارورسازی اسپرم، از دو محلول انجماد شماره ۱ و ۲ استفاده شد. محلول انجماد شماره ۱ به همراه محافظت کننده های نفوذ ناپذیر شامل٪۱/۵ BSA، ٪۷ زرده تخم مرغ و ٪۵ ساکاروز و محلول شماره ۲ به همراه ٪۱۰ زرده تخم مرغ به عنوان رقیق کننده پایه استفاده شدند.

به طور کلی، نتایج حاصل از لقاح ترکیب های شماره ۱ و ۲ همراه با محافظت کننده های مختلف نیز منجر به ارائه ۳ ترکیب جهت استفاده در انجماد اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان شد. ترکیب اول مربوط به محلول شماره ۱ و دو ترکیب دیگر مربوط به محلول رقیق کننده شماره ۲ می باشند.

۱. ۶۰۰ میلی گرم NaCl، ۳۱۵ میلی گرم KCl، ۱۵ میلی گرم $CaCl_2.2H_2o$ ، ۲۰ میلی گرم $MgSO_4.7H_2o$ و ۴۷۰ میلی گرم Hepes ، در ۸۰ میلی لیتر آب مقطر تنظیم pH تا ۷/۸ و سپس افزودن آب مقطر تا ۱۰۰ میلی لیتر و در نهایت اضافه کردن ٪۱/۵ BSA، ٪۷ زرده تخم مرغ و ٪۰/۵ ساکاروز. تا pH = ۷/۸ همراه با ٪۱۰ متانول

۲. ۰/۱۰۲ گرم $CaCl_2.2H_2O$، ۰/۲۲ گرم Mg(SO4).7H2O، ۰/۲۶ گرم NaH_2PO_4، ۲/۶۱ گرم KCl، ۵/۸۴ گرم NaCl، ۰/۱۰ گرم اسید سیتریک، ۱۰ گرم گلوکز، ۱۰ میلی لیتر محلول KOH (۱/۲۷ g/۱۰۰ ml) و ۲۰ میلی لیتر بافر Hepes و ٪۱۰ زرده تخم مرغ با pH – ۷/۸ همراه با ٪۵ DMSO.

۳. ۰/۱۰۲ گرم $CaCl_2.2H_2O$، ۰/۲۲ گرم Mg(SO4).7H2O، ۰/۲۶ گرم NaH_2PO_4، ۲/۶۱ گرم KCl، ۵/۸۴ گرم NaCl، ۰/۱۰ گرم اسید سیتریک، ۱۰ گرم گلوکز، ۱۰ میلی لیتر محلول KOH (۱/۲۷ g/۱۰۰ ml) و ۲۰ میلی لیتر بافر Hepes و ٪۱۰ زرده تخم مرغ با pH – ۷/۸ همراه با ترکیب ٪۵ DMSO و ٪۱ گلیسرول.

پیشنهادها

۱-در حال حاضر مراکز تکثیرماهی مولد قزل آلای رنگین کمان مبادرت به نگهداری مولدین نر می کنند که این امر هزینه زیادی از قبیل غذا، استخر، آب و هزینه های جاری دیگر برای استحصال اسپرم (که فقط برای فصل تکثیر مورد نیاز می باشد) در بر خواهد داشت. بنابراین، برای کاهش هزینه های تولید بچه ماهی و افزایش میزان درآمد مراکز تکثیر با برنامه ریزیهای لازم، می توان اسپرم ماهی قزل آلا منجمد را تهیه و در اختیار آنها قرار داد.

۲- با توجه به اختلاف کیفیت اسپرم در بین مولدین در طول سال و حتی در یک دوره مشخص، بر اساس مطالعات متعدد صورت گرفته در ارتباط با کیفیت و کمیت اسپرم ماهی قزل آلا، برنامه بهگزینی و اصلاح نژاد مولدین نر قزل آلا تدوین و اجرایی شود. به نظر می رسد که با حجم اطلاعات مرتبط با کیفیت اسپرم این ماهی، تنها یک مطالعه مروری جامع و کاربردی کردن این مطالعات در سطح کشور مکفی باشد.

۴- بر اساس برنامه ملی اصلاح نژاد ماهی قزل آلا در سطح کشور و ضرورت انجام این کار در مورد مولدین نر، در حال حاضر تمام ارزیابی ها از شاخص های کمی و کیفی اسپرم با استفاده از روش های ظاهری و غیرعلمی صورت می گیرد. بنابراین تجهیز مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی یاسوج به دستگاه کامپیوتری اسپرم آنالیزر و سایر دستگاههای مرتبط ضروری به نظر می رسد.

با توجه به اجرای دستی این پروژه در مراحل مختلف، خطاهای زیادی در کار ایجاد شد. بنابراین پیشنهاد می گردد دستگاه کامپیوتر مجهز به برنامه های انجماد اسپرم خریداری و این امر مهم بصورت صنعتی مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

- برادران نویری، شهروز، ۱۳۷۷، انجماد اسپرم ماهی کپور، پایان نامه کارشناسی ارشد، شهید چمران اهواز، دانشکده علوم دریایی، ۱۰۲ صفحه.
- برادران نویری، شهروز.، پورکاظمی، محمد.، کوچینین، پریتا و یاوی وحید.،(۱۳۸۱). اثر مراحل انجماد بر چگونگی تحرک اسپرم ماهی کپور(*Cyprinus carpio*) .پژوهش و سازندگی، شماره ۵۵،
- برادران نویری، ش .، علیپور، ع .، و پورکاظمی، م .، ۱۳۸۲ . انجماد اسپرم ۵ گونه از تاس ماهیان دریای خزر . ویژه نامه اولین سمپوزیوم ملی ماهیان خاویاری. مجله علمی شیلات ایران، پاییز ۱۳۸۲ . صفحات ۲۳ تا ۲۸
- برادران نویری، ش .، ۱۳۸۶ . 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 بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان،برنامه محیط زیست دریای خزر. ۱۶ صفحه.
- سیر، ل.، آذری تاکامی، ق و شهیدی، ر. ۱۳۸۵. ارزیابی اسپرم قزل آلا در مرکز تکثیر نمرود. مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۷۲، صفحات ۳۰-۳۵.
- شکیبی دریا کناری، علی، ۱۳۷۹، بررسی امکان انجماد و نگهداری اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، پایان نامه دانشجویی، دانشگاه تربیت مدرس نور.
- شمس پور، س.، نظامی، ش.، خارا، ح و گلشاهی، ح. ۱۳۸۷ . بررسی اثر توان باروری مولدین نر بر روی درصد لقاح، درصد چشم زدگی، درصد تفریخ و درشد بازماندگی لارو تا مرحله تغذیه نفعال در ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1972). نخستسن همایش ملی منابع شیلاتی دریای خزر، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
- عابدی ، ۱۳۷۵ . بررسی امکان انجماد اسپرم در ماهیان خاویاری .پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد
- . لاهیجان . ۷۰ و ۶۸.
- علیزاده، م. خلاصه گزارشی از نقشه راه توسعه آبزی پروری سردآبی کشور، اولین همایش ملی آبزی پروری ایران، ۹-۸ آذر ۱۳۹۰ بندر انزلی ایران.
- محمدی، ق.ا.، براتی، ف. ۱۳۸۸. تلقیح مصنوعی در حیوانات اهلی، *انتشارات دانشگاه شهید چمران اهواز*، ۳۰۷ صفحه.
- محمدی، م. ۱۳۸۸. بررسی مقایسه ای نتایج تکثیر مولدین قزل آلای رنگین کمان، *Oncorhynchus mykiss* بالغ سازگارشده در آب شور با شیرین. گزارش نهایی طرحهای تحقیقاتی، *موسسه تحقیقات شیلات ایران*، ۶۱ صفحه.
- مهرابی، ی . ۱۳۸۱. بیهوشی و روش عمل تکثیر دو بار در سال ماهی قزل آلای رنگین کمان، *انتشارات اصلانی*، ۱۰۰ صفحه.

- Aas, G.H., Refstie, T., Gjerde, B., 1991. Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. *Aquaculture*, 95 (1–2), 125–132.
- Alderson, R. and MacNeil, A.J., 1984. Preliminary investigations of cryopreservation of milt of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and its application to commercial farming. *Aquaculture*, 43: 35 l-354.
- Aral, F., Şahinöz, E., Dogu, Z., 2007. A Study on the Milt Quality of *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1972) and *Carasobarbus luteus* (Heckel, 1843) in Atatürk Dam Lake, Southeastern Turkey. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 7: 41-44.
- Babiak I, Frascr L, Dobosz S, Goryczko K, Kuzminski H, Strzezek J. 1999. Computer-controlled freezing of rainbow trout Oncorhynchus mykiss (Walbaum) spermatozoa for routine programmes. *Aquaculture Res*; 30:707-710.
- Babiak, I., Glogowski, J., Goryczko, K., Dobosz, S., Kuzminski, H., Strzezek, J., Demianowicz, W., 2001. Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa. *Theriogenology* 56, 177–192.

- Bart, A.N., Wolfe, D.F., and Dunham, R.A., 1998. Cryopreservation of blue catfish spermatozoa and subsequent fertilization of channel catfish eggs, *Trans. Am. Fish. Soc*., 127, 819.
- Baynes, S.M. and Scott, A.P., 1987. Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: the influence of sperm quality, egg quality and extender composition on post-thaw fertility. *Aquaculture*, 66: 53-67.
- Billard, R., Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species, *Reprod Nutr Develop*, 26, 877, 1986.
- Billard, R., 1992. Reproduction in rainbow trout: sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. *Aquaculture* 100, 263–298.
- Billard, R. and Cosson, M.P., Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish, *J. Exp. Zool*. 261, 122, 1992.
- Blaxter, J.H.S., Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring, *Nature*, 172, 1189, 1953.
- Bromage, N., 1995. Broodstock management and seed quality - general considerations, in: Broodstock Management and Egg and Larval Quality, Bromage, N.R. and Roberts R.J., Eds., Blackwell Science, Oxford, UK, 1995, 1.
- Bromage, N.R. and Roberts R.J., Eds., 1995. Broodstock Management and Egg and Larval Quality, Blackwell Science, Oxford, UK, 1995, 94.
- Brown, G.G. and Mims, S.D., 1995. Storage, transportation, and fertility of undiluted and diluted paddlefish milt, Prog Fish Cult, 57, 64.
- Brown Jr., D.W., Senger, P.L., Becker, W.C., 1991. Effect of group thawing on post-thaw viability of bovine spermatozoa packaged in 5 ml French straws. J. Anim. Sci. 69 Ž6., 2303–2309.
- Buyukhatipoglu, S. and Holtz, W., 1984. Sperm output in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) -effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females, *Aquaculture*, 37, 63.
- Buzkurt, Y., Akçay, E., Tekin, N., Seçer, S. 2005. Effect of freezing techniques, extenders and cryoprotectants on the fertilization rate of frozen rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm. *The Israeli Journal of Aquaculture- Bamidgeh*, 57 (2) 125-130.
- Cabrita, E., Martinez, F., Real, M., Alvarez, R., Herra'ez, M.P., 1999. Effect of different external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreservation of rainbow trout sperm. 36th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, 12–15 July, Marseille, p. 43.
- Cabrita, E., Ane1, L., Herra'ez, M., 2001a. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. *Theriogenology* 56, 623–635.
- Cabrita, E., Robles, V., Alvarez, R., Herraez, M.P., 2001b. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. Aquaculture 201, 301–314.
- Cabrita E, Robles V, Rebordinos L, Sarasquete C and Herra'ez MP, 2005. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology* 50 144–153.
- Canyurt, M. A., and Akh, S., 2008. An Effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*), Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 8 ,171–175.
- Carolsfeld, J., Godinho, H.G., Zaniboni Filho, E., and Harvey, B.J., Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation, J Fish Biol, 63, 472, 2003.
- Chao, N. H., 1982. New approaches for cryopreservation of sperm of grey mullet, Mugil cephalus. Intern. Symp. Reprod. Physiol. Fish, Wagenigen, The Netherlands, p 132-133.
- Chao, N.H. and Liao, I.C., 2001. Cryopreservation or finfish and shellfish gametes and embryos, Aquaculture, 197, 161,1.
- Christ, S.A., Toth, G.P., McCarthy, H.W., Torsella, J.A., 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.
- Ciereszko, A. and Dabrowski, K., 1993. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. *Aquaculture*, 109: 367-373.
- Ciereszko, A., Dabrowski, K., Froschauer, J. and T.D. Wolfe. 2006. Cryopreservation of semen from Lake Sturgeon. Transactions of the American Fisheries Society 135 (1): 232-240.
- Clearwater S.J. and Crim L.W. (1995) Milt quality and quantity produced by yellowtail flounder (Pleuronectes ferrugineus) following GnRH-analogue treatment by microspheres or pellet. In Proceedings of the Fifth International Symposium, Reproductive Physiology of Fish (ed. by F.W. Goetz & P. Thomas), p. 113, Austin
- Cloud, J., and S. Patton, S., 2008. Basic principles of fish spermatozoa cryopreservation. In: Cabrita , E., Robles, R , and Herraez, P., (Eds), Methods in Reproductive Aquaculture, Marine and Freshwater Species. CRC Press.

- Conget, P., Fernandez, M., Herrera, G., Minguell, J.J., 1996. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa using programmable freezing. *Aquaculture* 144, 319–329.
- Drokin, S., Stein, H., Bartscherer, H., 1998. Effect of cryopreservation on the fine structure of spermatozoa of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) and brown trout (Salmo trutta F. fario). Cryobiology 37, 263–270.
- Erdahl, A. W., Erdahl, D. A., and Graham, E. F., 1984. Some factors affecting the preservation of salmonid spermatozoa. *Aquaculture* 43, 341–350.
- FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics. 2008/FAO annuaire. 2010. 72p.
- Fauvel, C., Suquet, M., Dreanno, C., Zonno, V., and Menu, B., 1. Cryopreservation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa in experimental and production simulating conditions, Aquat Living Resour, 11, 387, 1998.
- Gallant, R. K. and McNiven, M. A. 1991. Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa. Bull. Aqua. Assoc. Can. 3,25-27.
- Geffen, A.J., Evans, J. 2000. Sperm traits and fertilization success of male and sex reversed female rainbow trout., *Aquaculture*, 182 : 61-72.
- Gjerde, B., 1984. Variation in semen production of farmed Atlantic salmon and rainbow trout. *Aquaculture* 40, 109–114.
- Guest, W.C., Avault, J.W., Roussel, J.D., 1976. Preservation of channel catfish sperm. Trans. Am. Fish. Soc. 3, 469–474.
- Gwo, J.C., 2000. Cryopreservation of sperm of some marine fishes, in: Cryopreservation in Aquatic Species, Tiersch, T.R. and P.M. Mazik, Ed., Advances in World Aquaculture, 7, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 2000, 138.
- Gwo, J.C., Kurokura, H., and Hirano, R., 1993. Cryopreservation of Spermatozoa from Rainbow Trout, Carp and Marine Puffer, *Nippon Suisan Gakk*, 59, 777.
- Herra´ez MP, Robles V and Cabrita E 2008. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm cryopreservation. In Methods in Reproductive Aquaculture. Marine and Freshwater Species, pp 385–389. Eds E Cabrita, V Robles and MP Herra´ez. London: Taylor and Francis.
- Holtz, W., 1993. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm: practical recommendations. *Aquaculture* 110, 97–100.
- Izawa T. and Ohta H. 1996 Diluent for cool storage of the Japanese eel (Anguilla japonica(spermatozoa. Aquaculture 142, 107-118.
- Kato S., Teranishi T., Kuo C.H., and Negishi K., 1982. 5-Hydroxytryptamine Stimulates ['H]Dopamine Release from the Fish Retina, J. Neurochem. 39: 493-498.
- Kerby, J.H., 1983. Cryogenic preservation of sperm from striped bass. Trans. Am. Fish. Soc. 112, 86– 94.
- Knapp, W.E. 2000. Foreword. In Cryopreservation in Aquatic Species. Tiersch, T.R. and M. Mazik (EDS). The World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana. 439 pp.
- Kurokura, H., Hirano, R., Tomita, M., and Iwahashi, M., 1984. Cryopreservation of carp sperm, Aquaculture, 37, 267.
- Labbé, C. and Maisse, G., 1996. Influence of rainbow trout thermal acclimation on sperm cryopreservation: relation to change in the lipid composition of the plasma membrane, *Aquaculture*, 145, 281.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T., and Patzner, R.A., 1992. Fine structural changes in spermatozoa of the grayling, Thymallus thymallus (Pisces: Teleostei), during routine cryopreservation, *Aquaculture*, 103, 73.
- Lahnsteiner F, Weismann T, Patzner RA., 1995. A uniform method for cryopreservation of semen of the salmonid fishes *Oncorhvnchus mykiss* (Walbaum), *Salmo trutta f. fario L.*, *Salmo trutta f. lacustris L., Coregonus s*_12. *Aquaculture Res*; 26:801-807.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., and Patzner, R., 1996a. The influence of various cryoprotectant on semen quality of the rainbow trout before and after cryopreservation, *J Appl Ichthyol*, 12, 99.
- Lahnsteiner F., Weismann, T., and Patzner, R.A., 1996b. Semen cryopreservation of salmonid fishes. Influence of handling parameters on the post thaw fertilization rate, *Aquac Res*, 27, 659.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T., Patzner, R.A., 1996c. Changes in morphology, physiology, metabolism and fertilization capacity of semen of rainbow trout followed cryopreservation. *Prog. Fish-Cult*. 58, 149– 159.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T., Patzner, R.A., 1997a. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. *Aquacult. Res*. 28, 471–479.
- Lahnsteiner, F., 2000. Semen cryopreservation in the Salmonidae and in the northern pike. *Aquacult. Res*. 31, 245–258.
- Lahnsteiner, F., Mansour, N., and Weismann, T., 2002. A new technique for insemination of large egg batches with cryopreserved semen in the rainbow trout, *Aquaculture*, 209, 359.

- Lahnsteiner, F and Mansour, N., 2008. Protocols for the cryopreservation of Salmonidae semen, Lota lota (*Gadidae*) and Esox lucius (*Esocidae*). In: Cabrita , E., Robles, R , and Herraez, P., (Eds), Methods in Reproductive Aquaculture, Marine and Freshwater Species. CRC Press 2008.
- Lahnsteiner, F., Mansour, N., Kunz, F. A., 2011. The effect of antioxidants on the quality of cryopreserved semen in two salmonid fish, the brook trout (Salvelinus fontinalis) and the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Theriogenology 76 (2011) 882–890.
- Legendre, M. and Billard, R., 1980. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep freezing. *Reprod. Nutr. Dev*., 20: 859- 868.
- Leung, L., 1987. Cryopreservation of the spermatozoa of the barramundi, Lates calcarifer (Telostei: Centropomidae), Aquaculture, 64, 243.
- Leung, L.K.P. and B.G.M. Jamieson 1991. Live preservation of fish gametes, p. 245-269. In: Jamieson, B.G.M. (Ed.), 5. Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Lovelock, J.E. and Bishop, M.W.H., 1959. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide, Nature, 183, 1394.
- Lubzens, E., Daube, N., Pekarsky, I., Magnus, Y., Cohen, A., Yusefovich, F., Feigin, P., 1997. Carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa cryobanks—strategies in research and application. Aquaculture 155, 13–30.
- Maisse, G., 1996. Cryopreservation of fish semen: a review. In: Proceedings of Refrigeration and Aquaculture , Bordeaux, France, March, pp. 443–466.
- Mansour, N., M. A. McNiven, and G. F. Richardson. 2006a. The effect of dietary supplementation with blueberry, atocopherol or astaxanthin on oxidative stability of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) semen. Theriogenology 66:373–382.
- Mansour, N., G. F. Richardson, and M. A. McNiven. 2006b. Effect of extender composition and freezing rate on postthaw motility and fertility of Arctic char spermatozoa. Aquaculture Research 37:862–868.
- McNiven, M.A., Gallant, R.K., Richardson, G.F. 1993. Dimethyl-acetamide as a cryoprotectant for rainbow trout spermatozoa. *Theriogenology*, 40: 943-948.
- Munkittrick, K.R., Moccia, R.D. 1987. Seasonal changes in the quality of rainbow trout (Salmo gairdneri) sperm: effect of a delay in stripping on spermatocrit, motility, volume and seminal plasma constituents. *Aquaculture*, 64: 147-156.
- Nilsson, E.E. and Cloud, J.G., 1993. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorrhynchus mykiss*) blastomeres, *Aquat Living Resour*, 6, 77.
- Ninhaus-Silveira, A., Foresti, F., Tabata, Y.A., Rigolino, M.G. & Ver´ıssimo-Silveira, R. 2002. Cryopreservation of rainbow trout semen: diluent, straw and the vapour column. Boletim do Instituto de Pesca 28(2), 135–9.
- Ninhaus-Silveira A. F. F., Tabata Y.A., Rigolino M. G.e, Veríssimo-Silveira R., 2006. Cryopreservation of semen from functional sex-reversed genotypic females of the rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Braz. arch. biol. technol 49(1): 73-77.
- Ogier de Baulny, B., Le Vern, Y., Derboeuf, D., Maisse, G., 1997. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout spermatozoa. *Cryobiology* 34 (2), 141–149.
- Ottesen, O.H., Babiak, I., Dahle, G., 2009. Sperm competition and fertilization success of Atlantic halibut (Hippoglossus hippoglossus L.). Aquaculture 286, 240-245.
- Pe´rez-Cerezales S, Martı´nez-Pa´ramo S, Beira˜o J and Herra´ez MP 2010. Evaluation of DNA damage as a quality marker for rainbow trout sperm cryopreservation an use of LDL as cryoprotectant. *Theriogenology* [in press]. DOI:10.1016/j.theriogenology.2010.02.012.
- Piironen J. 1993. Cryopreservation of spermfromthe brown trout (Salmo trutta m. lacustris L.) and Arctic charr (Salvelinus alpinus L.). Aquaculture 116, 275-285.
- Pogle, C.E., Smith, A.U. and Parkers, A.S., 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature 164: 166.
- Rainis, S., Gasco, L., Ballestrazzi, R., 2005. Comparative study on milt quality features of different finfish species. Italian Journal of Animal Science 4, 355 -363.
- Rana, K. 1995. Preservation of gametes. In. Broodstock management and egg and larval quality. Bromage, N.R. AND Roberts, R.J., (EDS). Blackwell Science, Oxford, UK. 424 pp.
- Richardson, G.F., Wilson, C.E., Crim, L.W. and Yao, Z., 1999. Cryopreservation of yellowtail flounder (Pleuronectes ferrugineus) semen in large straws. Aquaculture 174: 89-94.
- Richardson, G.F., Miller, T.L., McNiven, M.A., 2000. Cryopreservation of Arctic charr Salvelinus alpinus semen in various extenders and in three sizes of straw. Aquacult. Res. 31, 307–315.

- Rideout, R.M., Litvak, M.K., and Trippel, E.A., The development of a sperm cryopreservation protocol for winter flounder Pseudopleuronectes americanus (Walbaum): evaluation of cryoprotectants and diluents, Aquac Res, 34, 653, 2003.
- Robles, V., Cabrita, E., Cuñado, S., and Herráez, M.P., 2003. Sperm cryopreservation of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): parameters that affect its ability for freezing, *Aquaculture*, 224, 212.
- Robles, V., Cabrita, E., and Herráez, M.P., 2008. In: Cabrita , E., Robles, R , and Herraez, P., (Eds), Methods in Reproductive Aquaculture, Marine and Freshwater Species. CRC Press 2008.
- Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollevier, F., Nash, J.P., 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquaculture 234, 1–28.
- Salte, R., Galli, A., Falaschi, U., Fjalestad, K.T., Aleandri, R., 2004. A protocol for the on site use of frozen milt from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) applied to the production of progeny groups: comparing males from different populations. *Aquaculture* 231, 337–345.
- Sarvi, K., Hiksirat, H., Mojazi-Amiri, B., Mirtorabi, S.M., Rafiee, G.R., and Bakhtiyari M., Cryopreservation of semen from the endangered Caspian brown trout (Salmo trutta caspius), Aquaculture, 256, 564, 2006.
- Scheerer, P.D. and Thorgaard, G.H., 1989. Improved fertilization by cryopreserved rainbow trout semen with theophylline. *Prog. Fish-Cult*., 5 1: 179- 182.
- Scott, A.P., Baynes, S.M., 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *J. Fish. Biol*. 17, 707–739.
- Scheerer, P.D. and Thorgaard, G.H., 1989. Improved fertilization by cryopreserved rainbow trout semen with theophylline. Prog. Fish-Cult., 5 1: 179- 182.
- Springate, J.R.C., Bromage, N.R., Elliot, J.A.K., Hudson, D.L., 1984. The timing of ovulation and stripping and their effects on fertilization and survival to eyeing, hatching and swim-up in the rainbow trout (*Salmo gairdneri R*.). *Aquaculture* 43, 313–322.
- Suquet, M., Dreanno, C., Fauvel, C., Cosson, J., and Billard, R., 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish, Aquac Res, 31, 231.
- Steinberg, H., Hedder, A., Baulain, R., Holtz, W., 1995. Cryopreservation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. semen in straws. Proceeding of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. University of Texas, Austin. 2–8 July, 146 pp.
- Steyn, G.J. and Van Vuren, J.H.J. 1987. The fertilizing capacity of cryopreserved sharptooth catfish (Clarias gariepinus) sperm, Aquaculture, 63, 187.
- Stoss, J.; Büyükhatipoglu, S. and Holtz, W. 1978. Short-term and cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri, Richardson*) sperm. *Biol. Anim. Biochem. Biophys*., 18, 1077-1082.
- Stoss, J. and Holtz, W., 1981a. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. I. Effect of thawing solution, sperm density and interval between thawing and insemination. *Aquaculture*, 22: 97 104.
- Stoss, J. and Holtz, W., 1981b. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. II. Effect of pH and presence of a buffer in the diluent, *Aquaculture*, 25, 217, 1981.
- Stoss, J. and Holtz, W., 1983a. Successful storage of chilled rainbow trout (*Sulmo guirdneri*) spermatozoa for up to 34 days. *Aquaculture*, 3 1: 269-274.
- Stoss. J. and Holtz, W., 1983b. Cryopreservation of rainbow trout (*Sulmo guirdneri*) sperm. III. Effect of proteins in the diluent, sperm from different males and interval between sperm collection and freezing. *Aquaculture*; 1: 275-282.
- Stoss. J. and Holtz, W., 1983c. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo guirdneri*) sperm. IV. The effect of DMSO concentration and equilibration time on sperm survival, sucrose and KC1 as extender components and the osmolality of the thawing solution. *Aquaculture*, 32: 32 l-330.
- Stoss J. 1984. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In Fish Physiology
- Volume IX, Part B, Behavior and Fertility Control (eds. W.S. Hoar, D.J. Randall and E.m.
- Donaldson.),. Academic Press, New York. pp. 305-350
- Tanaka, S., Zhang, H., Horie, N., Yamada, Y., Okamura, A., Utoh, T., Mikawa, N., Oka, H.P., and Kurokura, H., 2002. Long-term cryopreservation of sperm of Japanese eel, J Fish Biol, 60, 139.
- Tekin, N., Seçer, S., Akçay, E., Bozkurt, Y. 2003a. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 55 (3) 208-212.
- Thomas, P.C., Rath, S.C., Mohapatra, D.K., 2003. Breeding and seed production of Fin fish and Sellfish. Daya puplishing house.
- Tiersch, T.R., 1995. Cryopreservation of fish sperm: laboratory, hatchery and field studies of twenty species. Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. University of Texas, Austin. 2–8 July, 147 pp.
- Tiersch, T.R., Mazik, P.M. (Eds.), 2000. Cryopreservation in Aquatic Species. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.

- Torreta, M.E., Wevar, C.A., Forchetti, O.D., Moschetti, E., 1996. Effect of freezing at different levels above liquid nitrogen, with or without a thawing diluent, on the post thawing quality of boar semen frozen in large straws. Av. Prod. Anim. 21, 179–184.
- Truscott, B. and Idler, D.R., 1969. An improved extender for freezing Atlantic salmon spermatozoa. J. Fish. Res. Board Can., 26: 3254-3258.
- Tvedt, H.B., Benfey, T.J., Martin-Robichaud, D.J., Power, J., 2001. The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilisation success in Atlantic halibut, Hippoglossus hippoglossus. Aquaculture 194, 191–200.
- Wagner, E., Arndta, R., Hilton, B., 2002. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. Aquaculture 211, 353–366.
- Wheeler, P.A., Thorgaard, G.H., 1991. Cryopreservation of rainbow trout semen in large straws. *Aquaculture* 93, 95–100.
- Williot, P., Kopeika, E.F., Goncharo, B.F., 2000. Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baeri Brandt*). Aquaculture 189, 53–61.
- Woods, E.J., Benson, J.D., Agca, Y., and Critser, J.K., 2004. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues, Cryobiology, 48, 146.
- Young, W. P., Frenyea, K., Wheeler, P.A., Thorgaard, G. H., 2009. No increase in developmental deformities or fluctuating asymmetry in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) produced with cryopreserved sperm. Aquaculture 289, 13–18.

Abstract:

breeding has moved beyond the point of simply propagating random stock. Genetic potential can be improved by establishing and crossing genetically defined strains, crossing species and manipulating gametes. Some of these activities require cryopreservation of semen. Cryopreserved sperm could also be a means of exchange of genetic material between locations and populations when transportation of live fish is restricted. In this study we had a survey on rainbow trout sperm quality in Genetic and Breeding Center for Coldwatwr Fishes, Shahid Motahari, Yasouj. Then Cryopreservation trials on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm were carried out using six basic extenders. Egg batches of 25 g were inseminated with semen frozen in five 0.5-ml straws. Thowing temperature of cryopreserved sperm also was tested. In anather trial we investigate different cryoprotectant. The result showd that the best period for sperm collection in this center was from Novamber to January. The best extender based on sperm motility parameters were extender 2 and 1 with 57.2 and 56.9% fertilisatin rates, respectively. So this two extender were used in the further experiments. The best thowing temperathre was 25°C in 30s. Testing different cryoprotectant, adding 10% methanol to extender 1 gave the highest fertilization rate (64.6%) among cryoprotectant that used with this extender. In the other extender (2) adding 5% DMSO and mixture of 5% DMSO and 1% glycerol gave the highest fertilization rates (64.8% and 67.0%, respectively). In conclusion using extender 1 and 2 with mentioned cryoprotectant and thowing rate of 25°C in 30 s was recammended for rainbow trout sperm cryopreservation.

Key words: Sperm Cryopreservation, Rainbow trout, Extender, Cryoprotectant.

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION – Cold water Fishes Genetic Research Center

---

Project Title : Cryopreservation of Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) semen

Approved Number: 2-12-12-88042
Author: Hossein Moradyan
Project Researcher : Hossein Moradyan
Collaborator(s) *:* Mohammadpour M, Mahdavi Jahanabad J, Hosseini A R, Gandomkar H A, Hosseini S A H. ,Gorjipour A A, M.Salahi, H.Karimi, K.Razmi, D.Zargham, K.Komaei, T.Bashti, Naghash, A.Nekoeifard
Advisor(s): -
Supervisor: H.A.Abdolhai
Location of execution : Kohgilooyeh & Boyer Ahmad province
Date of Beginning : 2010
Period of execution : 2 Years
Publisher : ***Iranian Fisheries Research Organization***
Date of publishing : ***2014***

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 & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION -
Cold water Fishes Genetic Research Center

Project Title :

Cryopreservation of Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) semen

Project Researcher :

Hossein Moradyan

Register NO.

43587