وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور – پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

عنوان :

ایجاد بانک انجماد اسپرم ماهیان استخوانی

مجری :
محمد بینایی

شماره ثبت
٤٨٣٨٢

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

عنوان پروژه : ایجاد بانک انجماد اسپرم ماهیان استخوانی
شماره مصوب پروژه : ۸۹۱۶۲ – ۸۹۱٤ – ۱۲ – ۷٦ - ۱٤
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : محمد بینایی
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : محمد بینایی
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : احمد غرقی، رضا پور غلام، محمود قانعی تهرانی، مریم قیاسی،محمود بهمنی،شهریار بهروزی، فرامرز لالویی، مهدی نادری جلودار، علی اصغر سعیدی، شهروز برادران نویری، علیرضا علی‌پور، محمدرضا نوروز فشخامی، علی مکرمی رستمی، حسین طالشیان، فرامرز باقرزاده، حسن ملایی
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : سهراب رضوانی گیل کلایی
محل اجرا : استان مازندران
تاریخ شروع : ۸۹/۱۰/۱
مدت اجرا : ٤ سال و ۹ ماه
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال ۱۳۹٤
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 : ایجاد بانک انجماد اسپرم ماهیان استخوانی

کد مصوب : ۸۹۱٦۲ – ۸۹۱٤ – ۱۲ – ۷٦ - ۱٤

شماره ثبت (فروست) : ٤۸۳۸۲ تاریخ : ۹٤/۱۰/۲

با مسئولیت اجرایی جناب آقای محمد بینایی دارای مدرک تحصیلی کارشناسی ارشددر رشته زیست شناسی (بیوفیزیک) می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست فنآوری و فرآوری آبزیان در تاریخ ۹۴/۶/۱۵ مورد ارزیابی و با رتبه خوب تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه □

با سمت کارشناس ارشد در پژوهشکده اکولوژی دریای خزرمشغول بوده است.

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱ – مقدمه ۲
۱ – ۱ -کلیات ۲
۲ – ۱ – خصوصیات اسپرم ماهیان ۳
۳ – ۱ – ویژگیهای منی ماهیان ۵
۴ – ۱ – آشنایی با اصول اولیه انجماد اسپرم ۱۰
۵ – ۱- تحقیقات انجام شده در خصوص انجماد اسپرم در صنعت آبزی پروری ۱۳
۲ – مواد و روشها ۱۵
۱ – ۲ – نمونه برداری و انجام انجماد اسپرم ماهی آزاد دریای خزر ۱۵
۱ – ۱ – ۲ - مواد مورد نیاز جهت انجماد اسپرم ماهیان آزاد و سفید دریای خزر ۱۵
۲ – ۱ – ۲ – محل انجام آزمایش ۱۶
۳ – ۱ – ۲ - انتخاب مولدین نر ۱۶
۴ – ۱ – ۲ – بیومتری و اسپرم گیری ۱۶
۵– ۱ – ۲ - ارزیابی نمونه های اسپرم ۱۷
۶ – ۱ – ۲ – انجام انجماد اسپرم ۱۷
۲ – ۲ – نمونه برداری و انجام انجماد اسپرم ماهی سفید دریای خزر ۱۷
۱ – ۲ – ۲ – مکان نمونه برداری ۱۷
۲ – ۲ – ۲ - انتخاب مولدین نر ۱۸
۳ – ۲ – ۲ - بیومتری و اسپرم گیری ۱۹
۴– ۲ – ۲ - ارزیابی نمونه های اسپرم ۱۹
۵ – ۲ – ۲ – انجام انجماد اسپرم ۱۹
۶ – ۲ – ۲ – آنالیز آماری ۲۰
۳ - نتایج ۲۱
۱ – ۳ – نتایج خصوصیات مولدین و ارزیابی نمونه های اسپرم تازه ۲۱
۲ – ۳ - نتایج بررسی اسپرمهای منجمد شده ۲۱
۴ – بحث ۲۵
منابع ۲۸
چکیده انگلیسی ۳۲

چکیده

در این بررسی ۱۱ ماهی نر آزاد با متوسط طول و وزن ۵/۳ ± ۳۷/۸ سانتیمتر و ۲۴/۷ ± ۵۲۳/۳ گرم و ۲۳ ماهی نر سفید با متوسط طول و وزن ۷/۱ ± ۳۶/۱ سانتیمتر و ۲۱/۶ ± ۶۳۱/۳ گرم مورد ارزیابی قرار گرفت . تمام این ماهیان در معاینه اولیه از رسیدگی جنسی مناسب برخوردار بودند. در ابتدا پس از تهیه نمونه اسپرم، کیفیت آن مورد ارزیابی قرار گرفت. در این بخش فاکتورهایی چون درصد تحرک، مدت تحرک، تراکم، اسمولالیته و pH اندازه‌گیری شد. پس از این مرحله نمونه های اسپرم ماهیان آزاد به نسبت ۱ : ۳ با محلول رقیق کننده حاوی ترکیبات (0.3M Glucose, 10% Methanol,10% egg yolk) رقیق شده و با روش دستی فرآیند انجماد صورت گرفت و در نهایت اسپرم منجمد شده به ازت مایع انتقال داده شد.

نمونه های اسپرم ماهیان سفید نیز به نسبت ۱ : ۳ با دو محلول رقیق کننده شامل ترکیبات (350 mM glucose, 30 mM Tris and 4% Polyethylene glycol) و (350 mM glucose, 30 mM Tris and 2% Glycerol) رقیق شد و با استفاده از دستگاه Planner Kryo به روش اتوماتیک منجمد و در نهایت در ازت مایع قرار داده شد. اسپرم ماهیان ۱ تا ۳ ماه بعد از اولین تاریخ انجماد، از انجماد خارج شده و کیفیت آن با اندازه گیری مدت و درصد تحرک مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج بررسیها نشان داد که حجم منی استحصالی در ماهیان آزاد بیشتر از ماهیان سفید بود. همچنین درصد تحرک، مدت تحرک و میزان تراکم اسپرم در منی ماهیان آزاد بیشتر از ماهیان سفید بود لیکن میزان اسمولالیته و pH اسپرم ماهیان آزاد کمتر از ماهیان سفید بود. در ارزیابی اسپرم منجمد شده نیز معلوم گردید، با گذشت زمان میزان درصد تحرک و مدت تحرک اسپرم هر دو گونه ماهی در مقایسه با نمونه تازه آن کاهش یافته است. همچنین درصد تحرک و مدت تحرک نیز در اسپرم ماهیان سفید از انجماد خارج شده کمتر از این فاکتورها در نمونه آزاد بود.

نتایج نشان داد نمونه اسپرم ماهی سفید که به آنها اتیلن گلیگول اضافه شده بود بعد از خارج شدن از انجماد تحرک نداشته و همگی مرده بودند. در حالیکه نمونه هایی که به آنها گلیسرول اضافه شده بود، ماندگاری اسپرم کاملا در آنها حفظ شده بود و سلولهای اسپرم تحرک داشتند.

با توجه به نتایج بدست آمده، به نظر می‌رسد تفاوتهای گونه ای امری بسیار مهم است که باید در روند فرآیند انجماد اسپرم کاملا مد نظر قرار گیرد. همچنین با توجه به نتایج، استفاده از یک پروتکل منفرد و واحد جهت موفقیت در این امر شدنی نیست زیرا واکنش سلولهای اسپرم در برابر عوامل شیمیایی که بعنوان رقیق کننده به آنها افزوده میشود متفاوت است.

لذا ضروری است جهت دستیابی به اطلاعات مناسب جهت حفظ سلولهای جنسی ماهیان ارزشمند دریای خزر با استفاده از روش انجماد، مطالعات تکمیلی در خصوص خصوصیات اسپرم هر گونه، رقیق کننده های مناسب و نیز فرآیند انجماد انجام گیرد.

۱ – مقدمه

۱ – ۱ -کلیات

فکر نگهداری اسپرم برای نخستین بار در سال ۱۸۵۳ میلادی بوجود آمد. مطالعات اولیه در مورد افزایش طول عمر اسپرم در شرایط غیر انجماد[1] انجام گرفت و بعدها تحقیقات در مورد دستیابی به تکنیکهای جدید گسترش یافت. این سبب شد که بعد از آن چندین روش نگهداری اسپرم ماهیان مورد بررسی و استفاده قرار گیرد که شامل نگهداری در محیط مغذی با گازهای اشباع، نگهداری در حرارت زیر صفر و منجمد کردن به همراه خشک نمودن بود. Polge و همکاران(۱۹۴۹) گزارش کردند که ترکیبات خاصی وجود دارد که می تواند از ایجاد کریستال یخ در سیتوپلاسم سلول ممانعت به عمل آورد. همین مسئله سبب شد تا روش نگهداری در حرارت پایین بیشتر مورد توجه قرار گیرد. در این زمینه تحقیقات ادامه یافت تا اینکه اولین بار Blaxter در سال ۱۹۵۳ توانست با روش نگهداری در حرارت پایین اسپرم شگ ماهی (*Clupea harengus*) را به مدت ۶ ماه زنده نگه دارد(Kerby, 1983; Kopeika et al. 2007).

بنابراین نگهداری در سرما[2] یا انجماد اسپرم تکنیکی است که به عنوان بهترین ابزار برای نگهداری طولانی مدت اسپرم ماهی پیشنهاد میگرد. تاکنون انجماد اسپرم بطور موفقیت آمیزی در جهت نگهداری اسپرم در بیش از ۲۰۰ گونه از ماهیان آب شیرین و ۴۰ گونه از ماهیان دریایی در دنیا گزارش شده است (Gwo, 2000).

انجماد اسپرم نه تنها بخاطرصنعت تکثیر و پرورش مورد توجه است بلکه از نظر حفظ و بهبود بخشی ژنتیکی ذخایر نیز بسیار با اهمیت است. فواید این تکنیک را میتوان بدین ترتیب نام برد:

۱ – هم زمان سازی قابلیت دسترسی به هر دو جنس (در مواردی که تاخیر رسیدگی جنسی بین نر و ماده وجود دارد)

۲ – استفاده از کل حجم اسپرم موجود

۳ – تهیه به صرفه اسپرم در هر زمان و مکان

۴ – ساده نمودن مدیریت گله مولدین

۵ – نقل و انتقال سلولهای جنسی در بین مراکز تکثیر و پرورش ماهیان

۶ – ایجاد یک ذخیره یا بانک سلولی جهت برنامه به گزینی و حفظ گونه ها(Cabrita et al. 2010).

اصولا سلولهای جنسی نر ماهیان بسیار متفاوت از سلولهای جنسی پستانداران است زیرا گامتهای نر در طیف وسیعی از ماهیان نه تنها قابلیت بارور سازی را فقط در محیط بیرونی داشته بلکه نیاز به یک عامل فعال سازی دارند به این معنی که اسپرم ماهیان تا هنگامیکه در مواجهه با آب قرار نگیرد تحرک نخواهد داشت و بعد از این مرحله تحرک خود را تنها در مدت زمان بسیار کمی حفظ می نماید(Day and Stacey, 2007). ماهیان تقریبا در

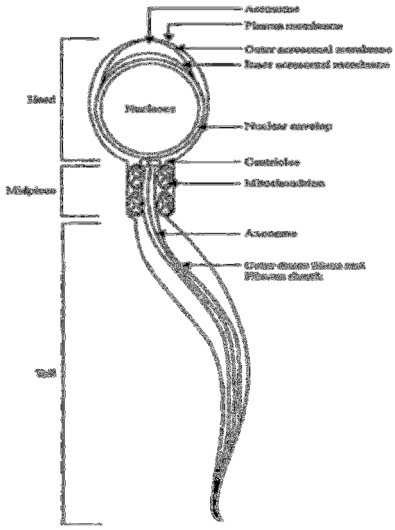
[1] - non-freezing state
[2] - cryopreservation

تمام اکوسیستم آبی کره زمین که شامل دامنه ای از آب شیرین تا آب دریاچه های بسیار شور و از آبهای مناطق قطبی تا آبهای داغ صحرای کالیفرنیا زندگی میکنند. با توجه به تنوعی که در شرایط محیط زندگی ماهیان وجود دارد، این مسئله سبب تفاوتهای اساسی در خصوصیات شکلی و عملی آنها شده و در نتیجه آنها را مجبور نموده تا مکانیسمهای ادبتاسیون خود با شرایط محیطی را توسعه دهند و به این ترتیب بتوانند در شرایط محیطی مختلف بقا خود را حفظ کنند. همین مسئله سبب شده تا اسپرم گونه های مختلف ماهیان واکنشهای متفاوتی را به پروتکلهای انجماد اسپرم نشان دهند. (Day and Stacey, 2007).

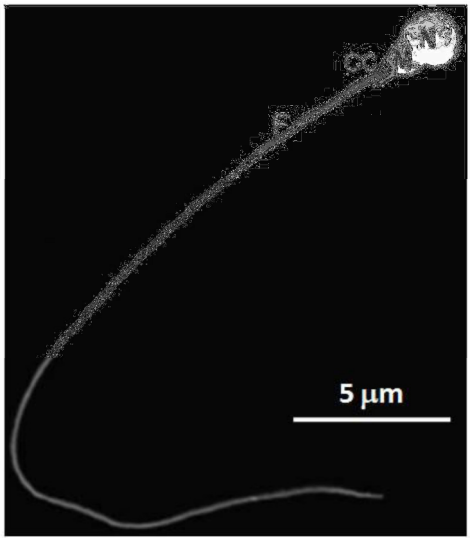
با توجه به آنچه گفته شد، اگرچه موفقیتهای زیادی در تهیه دستورالعملهای انجماد اسپرم ماهیان بدست آمده است، لیکن تهیه یک روش استاندارد معین که بتوان از آن برای تمام گونه های ماهیان آب شیرین و دریا استفاده نمود بسیار سخت است و این مسئله مربوط به این واقعیت است که انجماد اسپرم هر گونه ماهی شرایط خاص خود را دارا است. بطور مثال دستورالعمل کلی که برای انجماد اسپرم ماهیان توسط Kopeika و همکاران(۲۰۰۷) معرفی گردید هنگامیکه برای گونه های مختلف ماهی مورد استفاده قرار گرفت دچار دستکارهای متعددی خصوصا در ترکیب محیط مصرفی نگهداری اسپرم تحت شرایط انجماد گردید(Chewand Zulkafli, 2012).

۲ – ۱ – خصوصیات اسپرم ماهیان

شکل و ساختار اسپرم در ماهیان بسیار متنوع است. به همین دلیل امکان ایجاد یک گروهبندی مشخص برای ساختار اسپرم آنها نظیر آنچه که در پستانداران موجود است، وجود ندارد. تعداد تاژک اسپرم در ماهیان از یک تا دو تاژک متغییر است. طیف وسیعی از شکل و اندازه در آنها دیده شده و از نظر ساختار، تعداد و اندام محل نگهداری نیز بسیار متفاوت هستند. اصولا ساختار اسپرم در ماهیان متاثر از روش تولید مثل آنها است(Sadiqul Islam and Akhter, 2011). اسپرمها سلولهای بسیار کوچکی هستند و تقریبا یک شکل کلی مشابه در تمام گونه های ماهی دارند. این سلول از سه بخش سر، بخش میانی و دم(تاژک) تشکیل شده است(شکل ۱ – ۱).



شکل ۱ – ۱ - نمایی شماتیک از اسپرم شامل سر، بخش میانی و دم



شکل ۲ – ۱ - نمایی از میکروسکوپ الکترونی اسپرم لای ماهی(*Tinca tinca*)

الف- سر: قطر سر اسپرم در ماهیان مختلف اندازه ای متفاوتی دارد. این بخش از هسته(شامل کروموزومها و اطلاعات ژنتیکی که بخش وسیعی از سر را اشغال میکند) و در بعضی گونه ها آکروزوم تشکیل شده است. آکروزوم یک ساختار غشایی است که بر روی هسته در بخش قدامی سر اسپرم قرار می‌گیرد(شکل ۱ – ۱) . اندازه و شکل سر اسپرم تابعی از اندازه قطر میکروپیل تخمک می باشد(Ginsburg, 1968). معمولا سر اسپرم ماهیان در مقایسه با اندازه کلی اسپرم بسیار کوچک است(µm ۴ – ۲). لیکن موارد استثنا نیز وجود دارد مانند اسپرم مار ماهی اروپایی(Gibson et al., 1983)، ماهیان خاویاری و پهن ماهی(*Polyodon spathula*) که اسپرم آنها سر کشیده ای داشته و طول و قطر آن به ترتیب به ۱۰µm و ۲µm می‌رسد که می‌توانند با یا بدون آکروزم باشند(Cherr and Clark, 1984; Xu and Xiong, 1988; Dilauro et al., 1998, 1999, 2000, 2001).

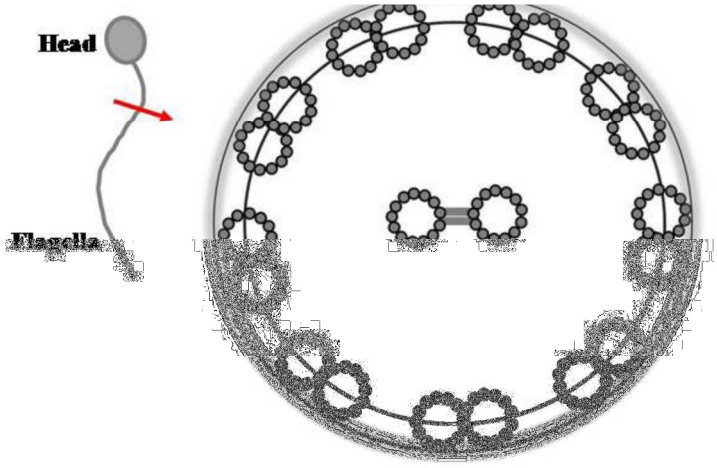
ب – بخش میانی: قسمت میانی حاوی سنتریول و میتوکندری است که به بخش سر الحاق شده است(شکل ۱ – ۱). میتوکندریها در قاعده دم قرار گرفته اند و انرژی لازم برای حرکت دم را فراهم میکنند. بخش میانی اسپرم ماهیان مشابه بخش میانی اسپرم پستانداران است با این تفاوت که اسپرم ماهی از میتوکندری کمتری نسبت به اسپرم پستانداران برخوردار است و تاژک نیز از بخش میانی توسط یک کانال سیتوپلاسمی جدا می شود(2003 Lahnsteiner). تعداد میتوکندری در این بخش نیز در بین ماهیان مختلف متفاوت است. برای مثال ماهی سوف رودخانه ای (*Perca fluviatilis*) تنها یک میتوکندری دارد در حالیکه ماهی *Idud melanotus* بیش از ۲۰ میتوکندری در بخش میانی اسپرم خود دارد و تعداد میتوکندریها در اسپرم کپور ماهیان از ۲ تا ۱۰ عدد متغییر است(Sadiqul Islam and Akhter, 2011). در قسمت میانی اسپرم ماهیان خاویاری و استخوانی بخش میتوکندریایی

کاملا قابل تشخیص است در حالیکه بخش سنتریولی چندان واضح نیست و به آن کانال داخل هسته ای[3] گفته می‌شود(Ginsberg 1968).

ج – تاژک: بعنوان دم اسپرم، تاژک اندام حرکتی بسیار ضروری برای حرکت و نفوذ اسپرم به تخمک جهت ایجاد تخم بارور است. بسته به نوع گونه و محتویات آکسونم، طول تاژک متغییر است(شکل ۱ – ۱) .

طول تاژک در ماهی آزاد کوهو(*Oncorhynchus kisuth*) حدود ۲/۶ µm، در گربه ماهی اروپایی (*Silurus glanis*) حدود ۹۴ µm و در گونه های کپور ماهی از ۶۰ µm – ۳۶ متغییر است. تاژک خود ترکیبی از ۲ جفت میکروتیوب مرکزی و ۹ جفت میکروتیوب محیطی است که تحت عنوان ساختار ۲ + ۹ نیز شناخته می-شود(شکل ۳). این ساختار ۲ + ۹ و ترکیب مولکولی آکسونم به خوبی در بین سلولهای یوکاریوت مژک دار و تاژک دار از تک یاخته گان گرفته تا انسان حفظ شده است. ۹ جفت میکروتیوب از داخل بهم اتصال دارند و دو جفت میکروتیوب مرکزی نیز بهم مرتبط هستند(شکل ۳ – ۱).

این خصوصیت، یعنی ساختار۲ + ۹ در تاژک اسپرم گربه ماهی اروپایی، ماهی آزاد کوهو و کپور معمولی وجود دارد. لیکن در مارماهی شکلان ساختار ۰ + ۹ وجود دارد و دو میکروتیوب مرکزی در تاژک اسپرم آنها دیده نمی‌شود(Sadiqul Islam and Akhter 2011).



شکل ۳ – ۱ – نمایی شماتیک از مقطع عرضی تاژک اسپرم ماهی

۳ – ۱ – ویژگیهای منی ماهیان

منی در واقع مجموعه ای از سلولهای جنسی(اسپرم) و مایع سمینال است. مایع سمینال(پلاسما سمینال) دارای ترکیبی منحصر بفرد از مجموعه ترکیباتی است که بخشی ازآنها نقش حمایت از اسپرم را به عهده دارند وبخشی دیگر موجب بهبود عملکرد سیستم تولید مثلی و اسپرم می‌شوند. مطالعات بر روی خصوصیا منی جهت فهم

[3] - interanuclear channel

فرآیندهای بیوشیمیایی اصلی که در حرکت اسپرم و طی روند باروری اتفاق می‌افتند امری بسیار ضروری است. با این اطلاعات توانایی تولید مثلی گونه‌های مختلف ماهیان ارزیابی شده و روشهای نگهداری کوتاه و بلند مدت منی ماهیان تصحیح میگردد(Kowalski et al., 2003; Itoh et al., 2003; Ingermann et al.,2002). از مهمترین خصوصیات اسپرم جهت قابلیت باروری تحرک است. برخلاف اسپرم خزندگان و پستانداران، اسپرم ماهیان در مجرای سمینال[۴] بدون تحرک است. خاصیت اسمزی و ترکیبات مایع سمینال معمولا مانع از تحرک اسپرم در مجرای اسپرم[۵] میگردد(Billard 1986).این مایع توسط مجرای اسپرم تولید می‌شود و حاوی یونهایی است که موجب حفظ و بقا اسپرم بعد از آزاد شدن از بافت بیضه می‌گردد (Ciereszko 2008). مطالعات مختلف ارتباطات متعددی را بین ترکیب مایع سمینال و حرکت اسپرم در بعضی از گونه‌های ماهیان مانند ماهی آزاد اقیانوس اطلس، کپور معمولی، ماهی سیم، قزل آلای رنگین کمان، قره برون و ماهی آزاد چینوک نشان داده است(Sadiqul Islam and Akhter 2011).

حرکت اسپرم معیاری مهم در تعیین کیفیت و قابلیت باروری منی است و پارامترهای مختلفی در این ارزیابی مورد استفاده قرار می‌گیرند. رایج‌ترین معیار مورد استفاده در این خصوص مدت زمان مورد نیاز برای فعال شدن حرکت اسپرم تا رسیدن به توقف نسبی حرکت است که به آن دوره تحرک[۶] نیز گفته می‌شود(Stoss 1983). در حرکت اسپرم ماهی چهار عامل کلیدی دخالت دارندکه شامل فشار اسمزی(اسمولالیتی)، pH، درجه حرارت و غلظت یونهای سدیم، پتاسیم، کلسیم و منیزیوم است که در بین آنها یونهای پتاسیم و کلسیم از اهمیت بیشتری برخوردار هستند. این عوامل موجب دپلاریزه شدن غشا سلول اسپرم شده و قابلیت تحرک تاژک و در نهایت حرکت اسپرم را تحت تاثیر قرار می‌دهند(Morisawa et al., 1983).

الف – تاثیر درجه حرارت: دوره تحرک، قابلیت باروری و سرعت اسپرم بستگی به درجه حرارت محیط فعال سازی اسپرم و به تبع آن به درجه حرارت تانک نگه داری گله مولدین نر دارد(Williot etbal., 2000). از آنجایی که منابع انرژی اسپرم ماهیان بسیار محدود می‌باشد، افزایش حرارت محیطی منجر به کوتاه شدن دوره تحرک و افزایش سرعت شده و برعکس کاهش حرارت محیط موجب طولانیتر شدن دوره تحرک و کاهش سرعت اسپرم میگردد (Stoss 1983). این مسئله کاملا تایید شده است که اسپرم ماهی کپور معمولی در حرارت ۲۰ درجه سانتیگراد نسبت به درجه حرارت ۲۶ یا ۳۰ درجه سانتیگراد دوره تحرک طولانیتری دارد. در کپور علفخوار دوره تحرک در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد به مراتب طولانیتر از زمانی است که اسپرم در حرارت ۳۰ درجه سانتیگراد قرار گرفته است(Jezierska and Witeska 1999) در ماهیان خاویاری سیبری دیده شده که دوره

[4] - seminal tract
[5] - sperm duct
[6] - motility duration

تحرک اسپرم هنگامیکه حرارت از ۱۰ به ۱۷ درجه سانتیگراد افزایش می‌یابد بطور محسوسی دوره تحرک اسپرم کاهش می‌یابد(Williot et al., 2000).

ب – تاثیر pH: این موضوع کاملا به اثبات رسیده است که pH خارج و داخل سلولی به اندازه ترکیب یونی محلول فعال سازی در شروع و طول دوره تحرک اسپرم موثر است(Márián et al.,1997). pH محیط خارج احتمالا غلظت پروتون داخل سلولی را تحت تاثیر قرار داده که در نتیجه پتانسیل غشایی و در نهایت نحوه تحرک اسپرم را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Boitano and Omoto 1991, 1992). در قزل آلای رنگین کمان pH مایع سمینال معمولا ۸/۵ – ۷/۵ است. حرکت اسپرم ماهی کپور معمولی می‌تواند در محیطی با pH ۹ – ۶ آغاز شود. به عبارت دیگر pH داخلی اسپرم حدود یک واحد کمتر از pH خارجی آن است(Gatti et al., 1990; Redondo-Muller et al., 1991; Perchec-Poupard et al., 1997).

ج – تاثیر یونها

I – یون پتاسیم: در بین عواملی که قبلا از آنها یاد شد، غلظت یون پتاسیم در ترکیب با فشار اسمزی فاکتور کلیدی است که حرکت اسپرم را کنترل می‌کند و اجازه میدهد که اسپرم در آزاد ماهیان، ماهیان خاویاری و پهن ماهیان (paddle fish) حرکت خود را آغاز کنند(Linhart et al 2003a,b,c; Alavi and Cosson 2005; Krasznai et al 1995, 2000). از ۱۹۳۸ مشخص شده است که مقدار میلی مولار غلظت یون پتاسیم خارج سلولی در مجرای سمینال عامل اولیه جهت بی تحرک ماندن اسپرم آزاد ماهیان است. این نظریه بعدا توسط محققین دیگر مورد بررسی قرار گرفت و آنها نشان دادند که حرکت اسپرم آزاد ماهیان می‌تواند در محیط فاقد یون پتاسیم آغاز شود و غنی سازی محیط با یون پتاسیم مانع از تحرک اسپرم شده و شرایطی مشابه مایع سمینال ایجاد کند. این گروه از محققین همچنین نشان دادند بعد از قرار گرفتن اسپرم در محیط فاقد یون پتاسیم میزان cAMP در آنها سریعا افزایش یافته و بعد از چند ثانیه به یک میزان ثابت می‌رسد. هرچن غلظت خارج سلولی یون پتاسیم و cAMP به عنوان یک عامل موثر در حرکت اسپرم شناخته شده است لیکن چگونگی ارتباط آن دو هنوز نامشخص است. استفاده از مسدودد کننده ای کانالهای پتاسیمی مانند Tetraethylammonium ، nonyltriethylammonium، یون باریم و سزیم می‌توانند از شروع تحرک در اسپرم ماهیان ممانعت به عمل آورند (Alavi and Cosson 2006). بنابراین، از نتایج ذکر شده در بالا در خصوص القا حرکت به اسپرم با تغییر غلظت یون پتاسیم، این نظریه که ممانعت از حرکت اسپرم آزاد ماهیان کاملا مرتبط با یون پتاسیم است تایید میگردد. به عبارت دیگر هیپرپلاریزاسیون غشا مستقیما با انتقال بین غشایی یون پتاسیم ایجاد شده و موجب آغاز حرکت در اسپرم آزاد ماهیان می‌شود(Kho et al., 2001).

در کپور ماهیان نیز یون پتاسیم حرکت و سرعت اسپرم را افزایش میدهد و بلوکه کننده‌های کانالهای پتاسیمی بطور قابل توجهی مانع تحرک تاژک اسپرم می‌شوند. قابلیت اثرات یون پتاسیم بر روی تاژک بدون غشا نیز بررسی شده است و مشخص گردید که حرکت آکسونم مستقیما با غلظت این یون کنترل می‌شود. تحقیقات نشان داده است که غلظت یون پتاسیم در رقتهای مورد استفاده برای انجماد اسپرم به شدت توانایی حرکت اسپرم کپور ماهیان را تحت تاثیر قرار می‌دهد(Alavi and Cosson 2006).

تاکنون مکانیسم تنظیم کننده حرکت در اسپرم ماهیان خاویاری و پهن ماهیان(paddle fish)کاملا شناسایی نشده است اما مشخص است که شباهت بسیار زیادی به مکانیسمهای موثر در حرکت اسپرم آزاد ماهیان دارد. در مطالعه‌ای Alavi و همکاران(۲۰۰۴) نشان داده اندکه غلظت پتاسیم مایع سمینال اصلی ترین مهار کننده حرکت اسپرم ماهی قره برون است.

II – یون کلسیم:تحرک اسپرم می‌تواند با تغییر غلظت یون کلسیم در بعضی گونه‌ها مانند کپور ماهیان تحریک شود زیرا غلظت سلولی خارج سلولی یون کلسیم شرط لازم برای آغاز حرکت اسپرم زنده است. Krasznai و همکاران (۲۰۰۰) متوجه شدند که حرکت اسپرم ۳۰ ثانیه بعد از افزودن $۱۰^{-۴}$ مول کلرید کلسیم به محلول شناوری حرکت خود را آغاز می‌کند. همچنین وقتی غشا اسپرم با افزودن ۱۰۰ – Triton X از بین می‌رودآنها تحرک شدیدی را در برابر $۱۰^{-۶}$ و $۱۰^{-۵}$ مول یون کلسیم نشان دادند. ورامپیل[۷] یک بلوکه کننده کانالهای کلسیمی است که با افزوده شدن به اسپرم بالغ نیمه رقیق شده کپور با محلول فیزیولوژیکی(۱۴۰ میلی مول NaCl، ۱۰ میلی مول KCl، ا میلی مول CaCl2 و ۲۰ میلی مولHEPES) مانع تحرک اسپرم شده استو این ممانعت با افزایش غلظت داخل سلولی یون کلسیم کامل میگردد. Krasznai و همکاران (۲۰۰۰) همچنین نشان دادند که سرازیر شدن یون کلسیم داخل سلولی از خلال کانالهای اختصاصی منجر به القا آزاد سازی یون کلسیم داخل سلولی از منابع ذخیره آن شده و تحرک اسپرم را از طریق سیستم کالمودولین[۸] فعال می‌کند. به غیر از ورامپیل دیگر بلوکه کننده های اختصاصی کانالهای کلسیمی (مانند فلوناریزین[۹] و خانواده کنوتوکسین[۱۰]) نیز مانع از افزایش یون کلسیم داخل سلولی در کپور معمولی شده و در نتیجه مانع آغز تحرک اسپرم می‌شود(Krasznai et al. 2003). در تیلاپیا[۱۱] نیز معلوم شده است که یون کلسیم داخل سلولی برای فعال سازی حرکت اسپرم مورد نیاز استو می‌تواند طول دوره تحرک آن را نیز طولانی نماید(Morita et al. 2003). پروبهای فلورسنت حساس شده یه یون کلسیم نشان داده است که افزایش غلظت یون کلسیم داخل سلولی یک اسپرم و یا گروهی از اسپرمها می‌تواند منجر به آغاز تحرک اسپرم شود. مشارکت یون کلسیم داخل سلولی و منابع داخلی آن سبب افزایش غلظت یون کلسیم داخل سلولی میگردد این موضوع سبب می‌گردد که وقتی حرکت اسپرم آغاز شد، این

7 - Verapamil
8 - Calmodulin
9 - Flunarizine
10 - Conotoxin family
11 - *Oreochromis mossambicus*

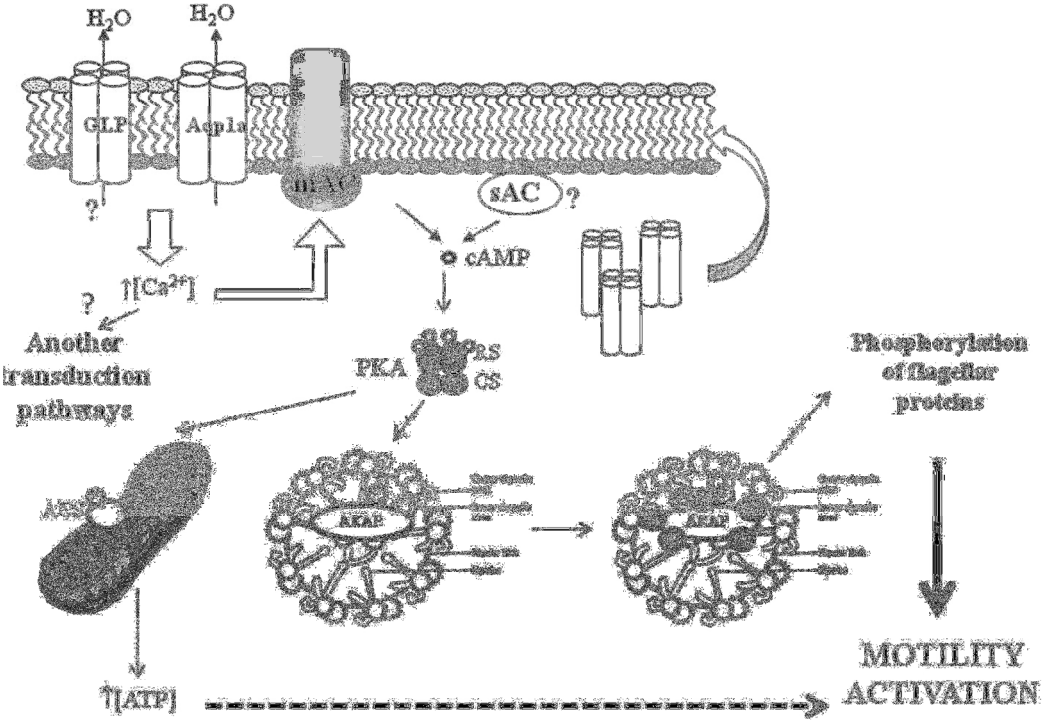
حرکت تثبیت شده و پایدار باقی بماند. آب رودخانه ای که اسپرم به آن وارد می‌شود حاوی ۰/۴ – ۰/۳ میلی مول یون کلسیم است که این مقدار برای سرازیر شدن کلسیم از خلال کانالهای کلسیمی موجود در غشا پلاسمایی اسپرم در شرایط طبیعی و معمول کافی است(Sadiqul Islam and Aktar, 2011).

د – اثر فشار اسمزی بر تحرک اسپرم:

قرار گرفتن اسپرم در معرض محیطی با فشار اسمزی پایین[۱۲] یا بالا[۱۳]موجب تحریک حرکت در اسپرم می-شود(شکل ۴). اسپرم ماهیان آب شیرین هنگامیکه با یک محلول هیپواسموتیک رقیق می‌شوند تحرکشان آغاز می‌شود. اسپرم کپور ماهیان(ماهی حوض، کپور معمولی و ماهی قنات[۱۴])، هنگامیکه منی آنها با محلولهای NaCl، KaCl ، مانیتول یا گلوکز با فشار اسمزی یکسان با منی($OsmKg^{-1}$ ۳۰۰) رقیق می‌شوندهمچنان بدون تحرک باقی می‌مانند. در حالیکه اسپرم در محیط حاوی همین ترکیبات ولی با فشار اسمزی کمتر از مایع سمینال ($OsmKg^{-1}$ ۲۰۰>) رقیق شود شروع به حرکت میکند. این مسئله نشان می‌دهد که اسپرم تحت فشار اسمزی مایع سمینال است که در مجرای اسپرم بدون تحرک باقی می‌ماند و در شروع تخمریزی به داخل آب شیرین که همراه با کاهش اسمولالیته است، حرکت خود را آغاز میکند(Morisawa et al. 1983). مواجهه اسپرم با آب دریا که هیپراسموتیک است نیز موجب تحریک حرکت در اسپرم ماهیان دریایی می‌گردد (Oda and Morisawa, 1993; Takai and Morisawa, 1995).

اسپرم پفک ماهی دریایی در مایع سمینالی با فشار اسمزی در حدود OsmKg-1 ۳۰۰ بدون تحرک است، لیکن هنگامیکه اسپرم در مواجهه با افزایش اسمولالیته محیط پیرامون خود قرار می‌گیرد(OsmKg-1 ۱۲۰۰) شروع به حرکت میکند(Takai and Morisawa, 1995). این شوک هیپراسموتیک می‌تواند بخاطر افزایش غلظت داخل سلولی یونهای پتاسیم و کلسیم و کاهش pH داخل سلولی باشد(Oda and Morisawa, 1993; Takai and Morisawa, 1995). این موارد مجموعهای از تفاوتها را در بین ماهیان مختلف جهت آغاز تحرک اسپرم نشان می‌دهد. اخیرا مشخص شده است که تحرک اسپرم ماهی مداکا۱۵ که برای زندگی عادت به آبهای بسیار شور دارد در طیف وسیعی از تغییرات فشار اسمزی شامل آب دیونیزه(OsmKg-1۲۵)، HBSS هیپوتونیک، ایزوتونیک و هیپرتونیک با اسمولیته هایی شامل OsmKg-1 ۶۸۶ – ۹۲ اتفاق می‌افتد(Yang and Tiersch, 2009). در تیلاپیا نیز که عادت به زندگی درآبهای شور، تحرک اسپرم تابع همین شرایط است منتها دامنه فشار اسمزی محدودتر است(Morisawa and et al. 1983).

12 - Hypo- osmotic
13 - Hyper - osmotic
14 - Crucian carp
15 - *Oryzias latipes*



شکل٤ – ۱ – نمایی شماتیک از چگونگی تاثیر شوک اسمزی بر روند آغاز تحرک در اسپرم ماهی سیم دریایی (Zilli *et al*., 2012)

٤ – ۱ – آشنایی با اصول اولیه انجماد اسپرم

مهمترین اصل در انجماد اسپرم ایجاد دهیدراتاسیون سلولی و به حداقل رساندن ضایعات ناشی از کریستالهای یخ در سیتوپلاسم و دیواره سلول اسپرم است. بیشترین آسیب ناشی از انجماد می‌تواند در ارتباط با فرآیند فریز شدن و از فریز درآمدن سلول طی روند انجماد اسپرم رخ دهد، زیرا طی مرحله فریز شدن شوک سرمایی و طی از فریز درآمدن شوک گرمایی ایجاد شده میتواند به سلول اسپرم آسیب بزند. آسیب ناشی از سرما طی مرحله قبل از فریز[۱۶] و مرحله پس از درآمدن از فریز[۱۷]که در دامنه حرارتی بین ۴۰- تا صفر درجه سانتیگراد است رخ می-دهد، ایجاد میگردد(Muchlisin, 2005). با توجه به آنچه گفته شد در روند انجام انجماد اسپرم برای به حداقل رساندن آسیب به اسپرم نیاز به ترکیباتی است که استفاده از آنها در این فرآیند امری ضروری است. این ترکیبات را تحت عنوان رقیق کننده‌ها[۱۸] و ماده محافظ از سرما[۱۹] می‌نامند.

16 - Pre - freezing
17 - Post - thawing
18 - Extender
19 - Cryoprotectants

الف – رقیق کننده ها: رقیق کننده ها در فرآیند انجماد اسپرم بسیار مورد بررسی و تحقیق قرار گرفته‌اند زیرا فرآیند انجماد بدون آنها تقریبا غیرممکن است. یک رقیق کننده ماده‌ای است که غلظت اسپرم را کم نموده و موجب می‌شود حجم بیشتری از اسپرم جهت انجام تکثیر مصنوعی و یا سایر فعالیتهای تحقیقاتی بدست آید (Muchlisin, 2004). اصولا منی ماهی از ویسکوزیته بالایی برخوردار است و در مواردی تنها بخش کوچکی از آن جهت انجام تکثیر مصنوعی مورد نیاز است. رقیق کننده‌ها نقش حیاتی در انجماد بازی می‌کنند. آنها نه تنها برای رقیق نمودن اسپرم مورد نیاز هستندبلکه معمولا موجب القا تحرک اولیه در اسپرم شده و قدرت باروری اسپرم منجمد را افزایش می‌دهند(Muchlisin, 2005).

ب: ماده محافظ از سرما: مانند رقیق کننده‌ها، مواد محافظ در برابر سرما نیز نقش بسیار مهمی در انجماد اسپرم خصوصا در انجمادهای طولانی مدت بازی می‌کنند. در واقع این مواد کمک می‌کنند تا سلول اسپرم از شوکهای حرارتی سرد و گرم در طی فرآیند انجماد محافظت شده و نیز از دهیدراتاسیون حاد ممانعت به عمل می‌آورند. این مواد ممانعت از عملکرد برخی آنزیمها مانند کاتالاز نموده و در عین حال موجب پایداری پروتئینها در محلولهای آبی میشوند. همچنین می‌توانند مانع شکل‌گیری یخ طی مرحله قبل از فریز شوند اما در همین حال میتوانند برای سلولی که فریز نشده است کشنده و سمی باشند(Chao, 1996). باید در نظر داشت که این مواد می‌توانند اثرات مضرداشته و در حراتهای بالا سبب دناتوره شدن پروتئینها شده و در نهایت موجب مرگ سلولی شوند. متاسفانه سمیت این ترکیبات یکی از عوامل محدود کننده اصلی در موفقیت آمیز بودن انجماد اسپرم در ماهیان است (Muchlisin, 2005). از آنجایی که سلولهای اسپرم بسیار حساس بوده و به راحتی تحت تاثیر رقیق کننده ها و مواد محافظ سرما قرار می‌گیرند، مطالعات زیادی در این خصوص صورت گرفته تا بهترین رقیق کننده و ماده محافظ معرفی گردد. مطالعات نشان داده است که طی فرآیند انجماد چنانچه از مواد محافظ سرما استفاده نشود میزان بازمتندگی اسپرمهای زنده به شدت کاهش می‌یابد.در هنگامیکه روند انجماد اسپرم بسیار کند و آرام صورت می‌گیرد افزودن این مواد به منی موجب محافظت سلولهای اسپرم در برابر سرما میگردد(Chao, 1996; Muchlisin, 2005). در جدول ۱ نمونه هایی از مواد رقیق کننده که در ماهیان مختلف مورد استفاده قرار گرفته ودر جدول ۲ موادی که به عنوان محافظ سرما مورد استفاده است، آورده شده است.

جدول۱ - ۱ - نمونه‌ای از رقیق کننده‌های استفاده شده جهت انجماد اسپرم در گونه‌های مختلف ماهی (Day and Stacy, 2007).

Fish species	Medium ingredients	Quantity
Carp (Cuprinus Carpio	NaCl	42 mg
	KCl	6 mg
	CaCl2·6H2O	18 mg
	MgSO4·7H2O	62 mg
	NaHCO3	280 mg
	Sucrose	137 mg
	D-Mannitol	1.5 g
	Tris-oxymethyl- aminomethane basis	1.697 g
	Glutathione red	56 mg
	Polyvinyl alcohol	5 mg
	Hen egg yolk	12.0 mL
	HCl	Adjust pH 8.1
	H2O	up to 100 mL
	Ethylene glycol	19.6 mL
Sturgeon fish	Tris-HCl buffer	0.05 M
	Egg yolk	20%
	DMSO	25% (after dilution 1:1final 12.5%) concentration
Salmonid fish	NaCl	600 mg
	KCl	315 mg
	CaCl2·2H2O	15 mg
	MgSO4·7H2O	20 mg
	HEPES	470 mg
	H2O	Up to 100 mL
	Methanol	Methanol
	Bovine serum albumin	1.5 g
	Sucrose	0.5 g
	Hen egg yolk	7 mL

جدول ۲ – ۱ - انواع مواد استفاده شده به عنوان محافظ سرما در مطالعات مختلف در گونه‌های مختلف ماهی (Muchlisin, 2005)

Acetamide	Dimethyl acetamide	Glycerol monoacetate	Maltose	Phenol	Ribose	Sucrose
Aline(L)	Dimethyl formamide	Glycine	Mannitol	Pluronic polyols	Serine	Triethylene glycol
Albumin	Dimethyl sulphoxide	Hydroxyethyl starch	Mannose	Polyethylene glycol	Sodium bromide	Trimethylamine acetate
Ammonium acetate	Erythritol	Inositol	Methanol	Polyvinyl pyrrolidone	Sodium iodide	Urea
Chloroform	Ethanol	Lactose	Methyl acetamide	Proline	Sodium nitrate	Valine
Choline	Ethylene glycol	Magnesium chloride	Methyl formamide	Propylene glycol	Sodium sulfate	Xylose
Dextrans	Formamide	Magnesium sulfate	Methyl urea	Pyridine-N-Oxide	Sorbitol	

ج – کیفیت اسپرم اولیه: پروسه انجماد اسپرم موفقیت خود را تا حدود زیادی مدیون کیفیت اسپرم اولیه است. بطورکلی یک اسپرم باکیفیت در میانه فصل تکثیر از ماهیان مولد بدست می‌آید و کیفیت آن با نزدیک شدن به پایان فصل تکثیر کاهش می‌یابد. این موضوع در قزل آلا، شگ ماهیان و سایر گونه ها به اثبات رسیده است. مهمترین ابزار جهت شناسایی کیفیت اسپرم ارزیابی قدرت تحرک آن است. مطالعات نشان داده است که حداقل میزان تحرک در ارزیابی مناسب بودن اسپرم جهت انجماد ۸۰٪ است. برای مثال در ماهیان خاویاری استفاده از اسپرمی که دامنه تحرک آن کمتر از ۴۰٪ است به هیچ عنوان مناسب انجماد نیست(Kopeika, 1999 and Cherepanov).

موضوع مهم دیگر در حفظ کیفیت اسپرم ممانعت از آلوده شدن آن با آب، ادرار و مدفوع ماهی در زمان گرفتن اسپرم است. نشان داده شده که بی دقتی درگرفتن اسپرم از ماهی آزاد سالمون که با فشار دادن ناحیه شکمی انجام شده موجب گردیده که اسپرم تا ۸۰٪ با ادرار ماهی رقیق گردد. آلودگی اسپرم با ادرار موجب تغییر در اسمولالیته، کاهش در غلظت یون پتاسیم و در نهایت تحرک اسپرم میگردد. آلودگی ادرار با اسپرم به نسبت ۲۵٪ موجب تقلیل تحرک اسپرم تا یک سوم بعد از انجماد اسپرم در مقایسه با اسپرم عاری از ادرار شده است(Lahnsteiner, 2000). آلودگی اسپرم با خون و مدفوع نیز موجب کاهش کیفیت اسپرم میگردد و این امر زمان ماندگاری اسپرم تحت شرایط انجماد را کاهش می‌دهد. وجود آلودگیهای باکتریایی نیز تاثیر مستقیمی بر کیفیت اسپرم میگذارد و در مواردی آنتی بیوتیک تراپی در این خصوص توصیه شده است(Day and Stacy, 2007).

۵ – ۱- تحقیقات انجام شده در خصوص انجماد اسپرم در صنعت آبزی پروری

انجماد اسپرم در ماهیان تکنیکی است که بدون شک در بخشهای مختلف تحقیقاتی و تولیدی بسیار کاربردی است. در این زمینه دستورالعملهای اختصاصی برای بعضی از ماهیان آب شیرین که عمدتا شامل آزاد ماهیان، ماهیان خاویاری، کپور ماهیان و گربه ماهیان هستند، تهیه شده است و در دهه های اخیر نیز تحقیقات قابل ملاحظه ای در ماهیان دریایی صورت گرفته است. اخیرا بسیاری از این دستورالعملها تکمیل شده و به عنوان دانش فنی پایه جهت ایجاد پروتکل های اختصاصی برای دیگر گونه های ماهیان آب شیرین و دریایی مورد استفاده قرار گرفته است(Cabrita *et al*., 2008).

بیشترین تحقیقات در آزاد ماهیان در ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، قزل آلای قهوه ای(*Salmo trutta*)، قزل الای نهری(*Salvelinus fontinalis*)، و ماهی چار(*S. alpinus*) انجام شده است (Lahnsteiner et al.,1996; Cabrita *et al*., 1998; Martínez- Parámo *et al*., 2009). بیشترین دستورالعملهای تهیه شده در خصوص تکنیک انجماد اسپرم در ماهیان خاویاری مربوط به گونه های تجاری و در حال انقراض مانند فیل ماهی (*Huso huso*)، ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*)، ماهی خاویاری رنگ پریده(*Scaphirhynchus albus*)، ماهی خاویاری

سیبری(*A. baeri*)، ماهی خاویاری اروپایی(*A. sturio*)، تاس ماهی روسی(*A. gueldenstaedii*) و ماهی ازون برون(*A. brevirostrum*) بوده است. (Horva´th *et al*., 2008). در این زمینه فعالیتهای انجام شده در گربه ماهیان عمدتا مربوط به دو گربه ماهی آفریقایی(*Clarias gariepinus*) و اروپایی(*Silurus glanis*) بوده و این دو گونه مورد توجه خاص بوده اند(Cabrin *et al*., 2010).

در گروه کپور ماهیان بیشترین تحقیقات در خصوص تکنیکهای انجماد اسپرم بر روی گونه های کپور معمولی(*Cyprinus carpio*) و کپور نقره ای(*Hypophtalmichthys militrix*) صورت گرفته است(Horváth and Urbanyi, 2000; Alvarez *et al*., 2008; Maisse *et al*., 2008; Viverious and Komen, 2008).

تحقیقات موفقیت آمیزی در خصوص انجماد اسپرم ماهیان پرورشی دریایی صورت گرفته است که مهمترین گونه های مورد تحقیق شامل ماهی توربوت (Scophthalmus maximus) (Suquet et al., 1998; Chereguini et al., 2003) ماهی سیم دریایی سرطلایی (Sparus aurata) باس دریایی اروپایی(*Dicentrachus labrax*) (Fabbrocini et al., 2000; Cabrita et al., 2005; Fauvel et al., 1998) ماهی ژاپنی(*A. japonica*) (Sansone et al.,2002)، مار ماهی اروپایی(*Anguilla Anguilla*)، مار ماهی (Tanaka et al., 2002; Asturiano et al., 2003)، ماهی باس راه راه(*Morone saxatilis*) (He and Woods, 2003)، سیم دریایی پوزه باریک(*Diplodus puntazzo*) (Taddei et al., 2001)، ماهی کفشک(*Hippoglossus hippoglossus*) (Babiak *et al.*, 2006)، ماهی فلاندر زمستانی(*Pleuronectes americanus*) (Rideout *et al*., 2003)، ماهی گروپر سیاه(*Epinephelus marginatus*)، گروپر مالابا(*E. malabaricus*) (Gwo, 1993; Cabrita *et al*., 2009) و ماهیان روغنی کاد (*Gadus morhua*) و هادوک(*Melanogrammus aeglefinus*) (Rideout *et al*., 2004) میباشند.

۲ – مواد و روشها

۱ – ۲ – نمونه برداری و انجام انجماد اسپرم ماهی آزاد دریای خزر(*Salmon trutta caspius*)

۱ – ۱ – ۲ – مواد مورد نیاز جهت انجماد اسپرم ماهیان آزاد و سفید دریای خزر

– سرنگ های ۵/۲، ۵، ۱۰، ۲۰ میلی لیتری

– سر سمپلر

– لام ولامل

– ازت مایع

– سرم فیزیولوژی

– زرده تخم مرغ

–DMA(Dimethyl-acetamid)

– گلیسرول

NaCl -
CaCl2,2H2o-

-BSA(Bovine Serum Albomine)

– گلوکز

Glycine-
HCl

– پلیت پلاستیکی

– میکروسکوپ نوری

– تانک ازت مایع ۸ لیتری

– ترازوی دیجیتال با دقت 3-10×1 و 2-10×1

– سمپلر 0.5 و 10 و 100 لاندا

– هماتوسیتومتر

– دماسنج جیوه ایی

– یخچال

– قیچی

– جعبه یونولیتی

– کرنومتر

– سیستم میکروسکوپ Hamilton thrown

– کاغذ صافی

– پایوت

– آب مقطر

– یخ

– DMSO(Dimethyl-sulphoxide)

– متانول

–هپس

Tris-Hcl -
MgSo4,7H2o-

– ساکارز

– NaHCo3

Na2HPo4 -
NaoH-

–عصاره گل میخک

– تانک ازت مایع ۴۰ لیتری

– ترازوی معمولی با دقت ۱۰ گرم

– دستگاه Planer Kryo

– PHمتر

– پیپت ۲۵ میلی لیتری

– بشر شیشه ایی

– پنس

– اسمومتر

–بن ماری

– نرم افزار Casa

۲ – ۱ – ۲ – محل انجام آزمایش

محل انجام آزمایش مرکز تکثیر وپرورش آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت بود. هدف اصلی ازاحداث این مرکز،تکثیر وپرورش ورها سازی بچه ماهی آزاد دریای خزر در اندازه اسمولت به منظور حفظ وبازسازی ذخایر این گونه با ارزش دریای خزر بوده است. دربرنامه اولیه مرکز،تولید ورها سازی ۱۰۰۰۰۰قطعه بچه ماهی ۲۰ گرمی ماهی آزاد در هر سال ودر رودخانه های مناسب منتهی به دریای خزر مورد نظر بوده است که در سال های بعد با افزایش امکانات کارگاه ،این رقم به بیش از ۳ بربر برنامه مدرن اولیه ارتقائ یافته است .آب مورد نیاز این مجتمع از دو منبع رودخانه وچشمه مجاور کارگاه تامین می گردد. دبی ورودی از رودخانه در فصول مختلف سال ۳۰۰ تا ۵۰۰ لیتر در ثانیه ومقدار آب ورودی از چشمه نیز ۵۰ لیتر در ثانیه می باشد. دمای آب رودخانه در فصول مختلف بین صفر تا ۱۷درجه سانتی گرادودمای آب چشمه نیز بین ۱۱تا ۱۲ درجه سانتی گراد متغیر است ، دمای آب انکوباسیون نیز ۱۰–۱۷درجه سانتی گراد می باشد(سروی مغانلو ۱۳۸۴).

۳ – ۱ – ۲ - انتخاب مولدین نر

تعداد ۲۴ عدد ماهی آزاد مولد نر منتقل شده به مرکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی کلاردشت (مولدین وحشی تازه صید شده) انتخاب و مورد ارزیابی اولیه قرار گرفتند. پس از بررسی آمادگی جهت اسپرم دهی ، ۱۱ ماهی نر جهت نمونه برداری انتخاب شدند.

٤ – ۱ – ۲ – بیومتری و اسپرم گیری

ابتدا ماهیان با استفاده از عصاره گل میخک به مدت حدود ۱۰ دقیقه ، در دمای آب ۹/۴ – ۹/۱ درجه سانتیگراد بیهوش شدند. پس از بیهوشی ماهیان فوق ابتدا بیومتری شده و منطقه تناسلی آنها با یک پارچه تمیز کاملا خشک گردید. جهت تهیه نمونه اسپرم (به میزان ۲ میلی‌لیتر) ناحیه شکمی ماهیان به آرامی ماساژ داده شد. در حین کار کاملا دقت گردید تا نمونه های اسپرم با ادرار و یا مدفوع ماهی آلوده نگردد. نمونه های استحصال شده تا زمان بررسی های کمی و کیفی (شمارش سلولی، بررسی درصد تحرک، شدت تحرک و pH) در دمای ۳-۱ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

شکل ۱ – ۲ – نمایی از جمع آوری اسپرم

۵ – ۱ – ۲ - ارزیابی نمونه های اسپرم

ارزیابی درصد تحرک نمونه اسپرم با بررسی چشمی (X ۴۰۰) زیر میکروسکوپ معمولی و با رقت ۱:۱۰ در آزمایشگاه انجام شد . تعیین تراکم با شمارش مستقیم (لام هماسیتومتر) پس از رقیق سازی به نسبت ۱:۳۰۰۰ با آب رودخانه و با استفاده از لام توما انجام شد. مدت زمان تحرک نیز پس از القای تحرک از لحظه تماس با آب رودخانه تا بی تحرکی بیش از ۹۰٪ اسپرمها با کرونومتر محاسبه شد. اندازه گیری فشار اسمزی مایع سمینال با استفاده از اسمومتر Vapor Pressure 5520 انجام گردید. در نهایت میانگین اعداد بدست آمده از هر نمونه به عنوان مبنای فشار اسمزی در نمونه ها در نظر گرفته شد(Sarvi et al., 2006; Tuset et al. 2008).

٦ – ۱ - ۲ – انجام انجماد اسپرم

ابتدا دمای نمونه اسپرم و ماده رقیق کننده تا دمای ۴ درجه سانتیگراد پایین آورده شد. هر نمونه اسپرم به نسبت ۳: ۱ (رقیق کننده : اسپرم) با محلول رقیق کننده(0.3M Glucose, 10% Methanol and 10% egg yolk) که pH آن بر حسب pH نمونه تنظیم شده بود مخلوط گردید(Sarvi et al., 2006). نمونه های فوق سپس به نی های انجماد ۰/۵ میلی لیتری منتقل شدند(Ninhaus-Silveria et al., 2006). پس از هم دمایی نمونه ها اقدام به انجماد به روش دستی و با رعایت فاصله ۲ سانتی متر از سطح ازت مایع به مدت ۱۰ دقیقه گردید. نرخ سرمادهی با استفاده از بخار ازت مایع معادل $^{-1}$ 30 ºC min~ بود. در نهایت نمونه های منجمد شده در ازت مایع (۱۹۶ – درجه سانتی گراد) قرار گرفتند.انجماد زدایی نمونه ها جهت بررسی های بعدی در حمام آب با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفت. برای تحریک فعالیت اسپرمها از محلولNaCl 0.3% استفاده گردید (Sarvi et al., 2006).

۲ – ۲ – نمونه برداری و انجام انجماد اسپرم ماهی سفید دریای خزر(*Rutilus frisii kutum*)

۱ -۲ – ۲ – مکان نمونه برداری

رودخانه شیرود یکی از مهمترین رودخانه های غرب مازندران جهت صید مولدین ماهی سفید در شهرستان تنکابن واقع است. رودخانه های منطقه تنکابن عمدتا از دامنه کوه های البرز که در جنوب تنکابن واقع است سرچشمه گرفته که پس از طی مسیر، به دریای خزر می ریزد. رودخانه شیرود بطول ۳۶ کیلومتر در ۷ کلیو متری غرب شهرستان تنکابن جریان دارد. منبع تامین آب این رودخانه برف و چشمه های متعدد موجود در نواحی کوهستانی منطقه است. شیب متوسط این رودخانه در مناطق کوهستانی ۱۲٪ و در مناطق جلگه ای ۱٪ است. بستر این رودخانه در نواحب بالا دست تخته سنگ و قلوه سنگهای بزرگ و در ناحیه مصب قلوه سنگ و سنگ ریزه است. متوسط دبی سالانه این رودخانه ۳/۹۴ میلیون متر مکعب بوده و کمترین و بیشترین دبی آن طی یک دوره پنج ساله به ترتیب ۲/۸ و ۶/۸ متر مکعب بر ثانیه بوده است(صفری و یعقوب زاده ۱۳۹۱)

شکل ۲ – ۲ – موقعیت جغرافیایی رودخانه تنکابن

۲ – ۲ – ۲ – انتخاب مولدین نر

تعداد ۵۶ عدد ماهی سفید نر از رودخانه های شیرود تنکابن تهیه گردید(شکل ۳ – ۲). ماهیان مورد ارزیابی اولیه قرار گرفتند و پس از بررسی آمادگی جهت اسپرم دهی ، ۳۲ ماهی نر (شکل ۳ – ۲) جهت نمونه برداری انتخاب شدند.

شکل ۳ – ۲ – صید مولدین ماهی سفید در مصب رودخانه شیرود واقع در حاشیه جنوبی دریای خزر

شکل٤ – ۲ – تکمه های لذت (Epithelial tubercles) در ماهی سفید نر دریای خزر

۳ – ۲ – ۲ - بیومتری و اسپرم گیری

ابتدا ماهیان با استفاده از عصاره گل میخک به مدت حدود ۷ دقیقه ، در دمای آب ۱۴/۱ – ۱۳/۵ درجه سانتیگراد بیهوش شدند. پس از بیهوشی ماهیان فوق ابتدا بیومتری شده و منطقه تناسلی آنها با یک پارچه تمیز کاملا خشک گردید. جهت تهیه نمونه اسپرم (به میزان ۳ میلی‌لیتر) ناحیه شکمی ماهیان به آرامی ماساژ داده شد. در حین کار کاملا دقت گردید تا نمونه های اسپرم با ادرار، مدفوع و خون آلوده نگردد. نمونه های استحصال شده تا زمان بررسی های کمی و کیفی (شمارش سلولی، بررسی درصد تحرک، شدت تحرک و pH) در دمای ۳-۱ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

٤ – ۲ – ۲ - ارزیابی نمونه های اسپرم

نمونه های فوق در کنار یخ جهت انجام ادامه کار به آزمایشگاه انجماد اسپرم مرکز تحقیقات اصلاح نژاد دام کشور انتقال داده شد. ارزیابی درصد تحرک نمونه اسپرم با استفاده از سیستم میکروسکوپ Hamilton thrown (Hamilton, USA) که مجهز به سیستم نرم افزاری به نامCasa و با رقت ۱:۱۰ انجام شد. تعیین تراکم با شمارش مستقیم پس از رقیق سازی به نسبت ۱۰۰۰ :۱ و با استفاده از لام توما انجام شد. مدت زمان تحرک نیز پس از القای تحرک از لحظه تماس با آب رودخانه تا بی تحرکی بیش از ۹۰٪ اسپرمها با کرونومتر محاسبه شد. اندازه گیری فشار اسمزی مایع سمینال با استفاده از اسمومتر Vapor Pressure 5520 انجام گردید. در نهایت میانگین اعداد بدست آمده از هر نمونه به عنوان مبنای فشار اسمزی در نمونه ها در نظر گرفته شد (Yavas and Bozkurt, 2011; Tuset et al, 2008).

۵– ۲ – ۲ – انجام انجماد اسپرم

ابتدا دمای نمونه اسپرم و ماده رقیق کننده تا دمای ۴ درجه سانتیگراد پایین آورده شد. هر نمونه اسپرم به نسبت ۳: ۱ (رقیق کننده : اسپرم) با دو محلول رقیق کننده(350 mM glucose, 30 mM Tris and 4% Polyethylene glycol) و (350 mM glucose, 30 mM Tris and 2% Glycerol) که pH آن بر حسب pH نمونه تنظیم شده بود مخلوط گردید. نمونه های فوق سپس به نی های انجماد ۰/۵ میلی لیتری منتقل شدند. پس از هم دمایی نمونه ها اقدام به انجماد در دستگاه Planer Kryo گردید. نی‌های حاوی نمونه ها در رک مخصوص دستگاه قرار داده شد. کاهش دامنه حرارتی دستگاه از ۲۰ تا ۲۰– درجه سانتیگراد $5\ ^{\circ}C\ min^{-1}$ و از ۲۰– تا ۴۰– درجه سانتیگراداین دامنه $^{\circ}C\ 10\ min^{-1}$ بود. سپس نمونه ها به مدت ۵ دقیق در دمای ۴۰– درجه سانتیگراد نگهداری شده و در نهایت داخل ازت مایع(۱۹۶ – درجه سانتی گراد) قرار گرفتند. نمونه ها جهت بررسی های بعدی در حمام آب با دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه قرارگرفت. برای تحریک فعالیت اسپرمها از محلولNaCl 0.3%استفاده گردید (Yavas and Bozkurt, 2011; Rani and Munuswamy 2014).

٦ – ۲ – ۲ - آنالیز آماری

داده های بدست آمده از درصد تحرک و مدت زمان تحرک سلولهای اسپرم در نرم افزار SPSS وارد و برای آنالیز داده ها از آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و برای مقایسه میانگین‌ها از تست Duncan استفاده شده و در نهایت داده ها بصورت انحراف معیار ± میانگین گزارش شد(Zar, 1994).

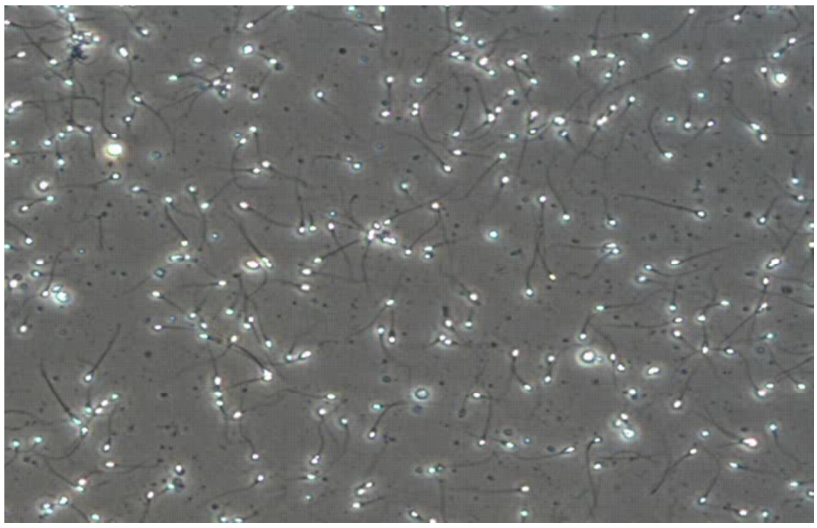
۳ - نتایج

۱ – ۳ – نتایج خصوصیات مولدین و ارزیابی نمونه های اسپرم تازه

در این بررسی طول و وزن ماهیان آزاد نربه ترتیب ۵/۳± ۳۷/۸ سانتیمتر و۲۴/۷± ۵۲۳/۳ گرم و طول و وزن ماهیان سفید نر به ترتیب ۷± ۳۶/۱ سانتیمتر ۲۱/۶± ۶۳۱/۳ گرم بود. نتایج ارزیابی اسپرم تازه مولدین نر آزاد و سفید در جدول ۱ – ۱ – ۳ آمده است.

جدول ۱ – ۱ – ۳ – نتایج خصوصیات مولدین نر آزاد و سفید و اسپرم استحصالی از آنها

مولد	اسپرم (mlاستحصالی)	درصد تحرک(٪)	مدت تحرک (ثانیه)	تراکم (10^9/mL)	اسمولالیته ($OsmKg^{-1}$)	pH
آزاد	۴/۵ ±۳/۴	۳۹/۵ ±۲۸	۳۷/۳ ±۶/۷	۳/۶ ±۰/۸	۲۸۲/۶ ±۱۳/۸	۷/۳۵ ±۰/۳
سفید	۳/۵±۰/۹	۳۶/۷±۲۴	۳۳/۵±۷/۸	۱/۹±۰/۶	۳۴۱/۶ ±۱۵/۸	۷/۶۵ ±۰/۵



شکل ۱ – ۳ – نمایی از اسپرم تازه ماهی سفید مورد ارزیابی با برنامه Casa

۲ – ۳ - نتایج بررسی اسپرمهای منجمد شده

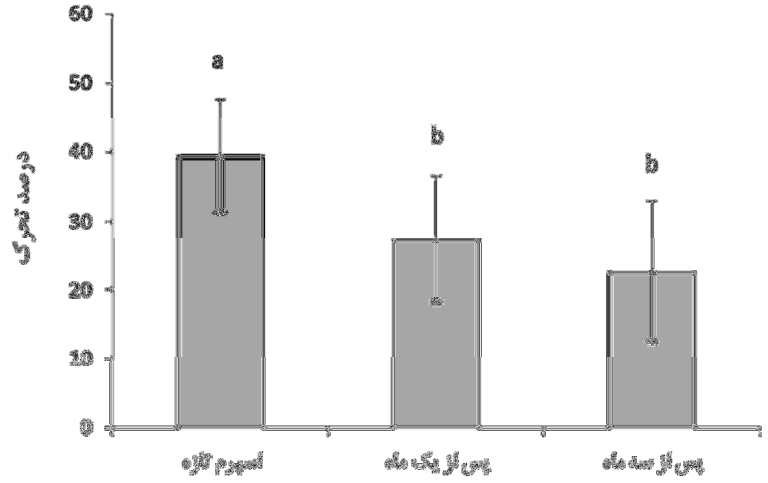
بررسی درصد تحرک و مدت زمان تحرک اسپرمها پس از انجماد زدایی طی مدت ۱و۳ ماه پس از انجماد مورد سنجش و ارزیابی قرار گرفت که نتایج آن در جدول ۱ – ۲ – ۳ – آمده است. نتایج نشان داد که درصد تحرک در نمونه های اسپرم یک و سه ماه بعد از انجماد نسبت به اسپرم تازه بطور معنی‌داری کمتر شده بود(شکل ۱ – ۳). لیکن مدت تحرک علی رغم کاهش عددی تفاوت معنی داری بین نمونه‌های منجمد شده و تازه وجود نداشت(شکل ۲ – ۳). لیکن در ماهیان سفید درصد تحرک و مدت زمان تحرک در نمونه های اسپرم یک و سه ماه بعد از انجماد نسبت به اسپرم تازه بطور معنی‌داری کمتر شده بود(شکل ۳ – ۳ و ۴ – ۳). همچنین درصد

تحرک و مدت زمان تحرک نمونه‌های اسپرم ماهی سفید بعد از سه ماه انجماد بطور معنی داری کمتر از نمونه هایی بود که تنها یک ماه در شرایط انجماد نگهداری شده بودند.

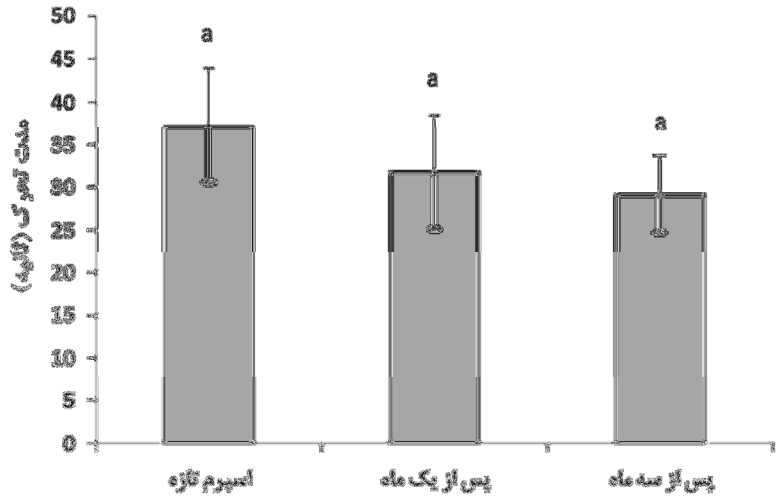
جدول ۱ – ۲ – ۳ – مقایسه خصوصیات تحرک اسپرم انجمادزدایی شده با اسپرم تازه در ماهیان آزاد و سفید دریای خزر

مولد	گذشت زمان (ماه)	درصد تحرک(٪)	مدت تحرک (ثانیه)
ماهی آزاد	اسپرم تازه	۳۹/۵ ±۲۸ [a]	۳۷/۳ ±۶/۷[a]
	پس از یک ماه	۲۷/۴ ± ۹/۲[b]	۳۱/۸ ± ۶/۷[a]
	پس از ۳ ماه	۲۲/۷ ± ۱۰/۲[b]	۲۹/۲ ± ۴/۵[a]
ماهی سفید	اسپرم تازه	۳۶/۷±۲/۴ [a]	۳۳/۵±۷/۸ [a]
	پس از یک ماه	۲۶/۱ ± ۳/۵ [b]	۲۵/۱ ± ۹/۳ [b]
	پس از ۳ ماه	۱۶/۷ ± ۵/۲۳ [c]	۱۹/۹ ± ۳/۷ [c]

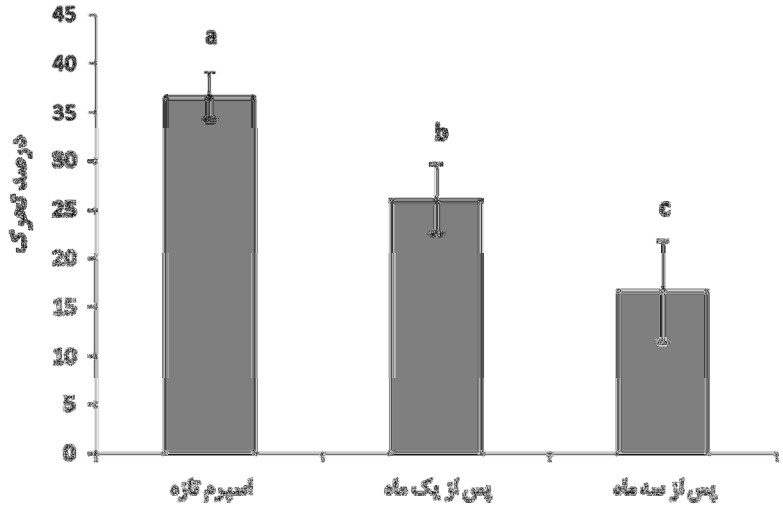
وجود علائم نامتشابه در هر ستون نشانه تفاوت معنی دار می‌باشد($P < 0.05$).



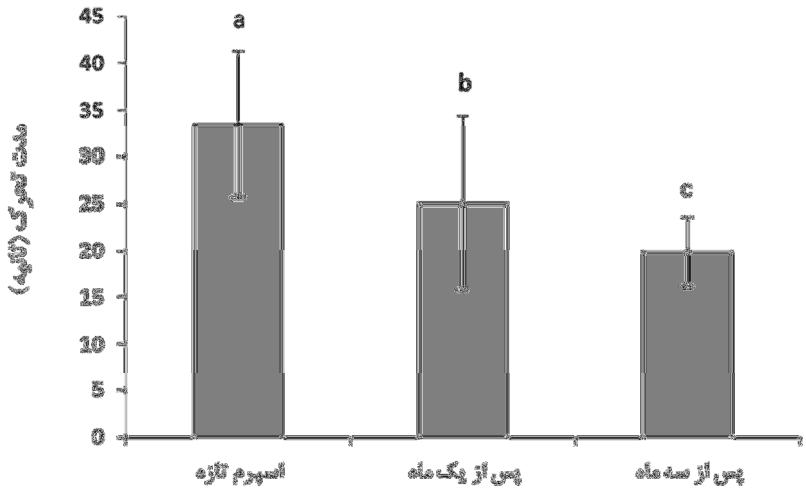
نمودار ۱ – ۳ – مقایسه درصد تحرک اسپرم ماهی آزاد در نمونه تازه، یک و دو ماه بعد از انجماد



نمودار ۲ – ۳ – مقایسه مدت زمان تحرک اسپرم ماهی آزاد در نمونه تازه، یک و دو ماه بعد از انجماد



نمودار ۳ – ۳ – مقایسه درصد تحرک اسپرم ماهی سفید در نمونه تازه، یک و دو ماه بعد از انجماد



نمودار ٤ – ۳ – مقایسه مدت زمان تحرک اسپرم ماهی آزاد در نمونه تازه، یک و دو ماه بعد از انجماد

در ارزیابی ماندگاری اسپرم ماهی سفید از دو ماده محافظ سرما شامل گلیسرول با غلظت ۲٪ و اتیلن گلی کول با غلظت ۴٪ استفاده شد. نتایج نشان داد که نمونه اسپرمهایی که به آنها اتیلن گلی کول اضافه شده بود بعد از خارج شدن از انجماد همگی مرده بودند و تحرکی در این اسپرمها مشاهده نشد. این در حالی بود که در نمونه هایی که گلیسرول استفاده شده بود ماندگاری اسپرم کاملا حفظ شده بود.

٤ – بحث

کیفیت اسپرم منجمد شده بستگی به عوامل مختلفی دارد که در درجه اول مرتبط به خود مایع منی(درجه رسیدگی جنسی و کیفیت اولیه اسپرم) و در درجه دوم مرتبط به فاکتورهای دخیل در روند انجماد(تغییر دامنه حرارتی، رقیق کننده و مواد محافظ از سرما) هستند. از مهمترین عوامل در این مسیر باید به رقیق کننده ها اشاره نمود. در این بررسی در هر دو ماهی از رقیق کننده‌ای برپایه گلوکز استفاده شد. از رقیق کننده های برپایه گلوکز در بسیاری از ماهیان مانند کپور معمولی، گربه ماهی آفریقایی(*Clarias gariepinus*)، ماهی آزاد دریای خز بطور موفقیت آمیزی استفاده شده است. موفقیت رقیق کننده بر پایه گلوکز را میتوان به نقش آنها به عنوان یک ماده خوب محافظ سرما و نیز کمک کننده به حفظ پایداری غشا اسپرم نسبت داد(Horváth et al. 2003; Sarvi et al., 2006).

در این بررسی در ماده رقیق کننده اسپرم ماهی آزاد از متانول و زرده تخم مرغ استفاده شد. گزارش شده است که زرده تخم مرغ پوششی در سطح دیواره سلولی اسپرم ایجاد میکند و به این ترتیب موجب کاهش لیز سلولی طی فرآیند انجماد میگردد. عملکرد اختصاصی زرده تخم مرغ کاملا مشخص نشده است لیکن عنوان شده که این ماده واجد لیپوپروتئنی با دانسیته کم است که به غشا سلول اسپرم می‌چسبد و یا واجد چربیهایی است که اسپرم را در ترمیم دیواره آسیب دیده اش کمک میکند. اما این تاثیر زرده تخم مرغ بسیار اختصاصی است و در همه گونه های آزاد ماهیان به یک میزان تاثیر بر کیفیت اسپرم ندارد. متانول متداول ترین محافظ سرمایی است که در بسیاری از گونه های آزاد ماهیان بطور موفقیت آمیزی مورد استفاده قرار گرفته است. مطالعات نشان داده استفاده از متانول اثرات سمی بسیار اندکی در مقایسه با دی متیل سولفوکساید(DMSO) بر اسپرم دارد و در مقایسه با DMSO ، اسپرمهای رقیق شده با متانول بطور معنی داری قابلیت تحرک و باروری بیشتری داشته‌اند. این امر شاید مربوط به کم نمودن آب سلول توسط متانول باشد که به این ترتیب موجب افزایش مقاومت سلول اسپرم در برابر انجماد میگردد(Jodun et al, 2006).

در این مطالعه مشخص شد نمونه های اسپرم ماهی سفید که با پلی اتیلن گلی کول رقیق شده بودند همگی از بین رفتند در حالیکه نمونه هایی که با گلیسرول رقیق شده بودند زنده ماندند. مطالعات نشان داده است که گلیسرول یکی از نفوذپذیرترین ترکیبات محافظ سرما به داخل سلول با کمترین تاثیر سمی است. بدلیل نفوذ عالی که این ماده به داخل سلول دارد موجب پایداری دیواره سلولی شده و نیز ممانعت از تشکیل کریستالهای یخ در سیتوپلاسم اسپرم به عمل می‌آورد(Yavas and Bozkurt, 2011).

آنچه که در این بررسی برای القا تحرک در اسپرم ماهیان از آب رودخانه در نمونه های تازه و از محلول ۰/۳٪ NaCl در بعد از مرحله خارج شدن از انجماد استفاده شد. اصولا تحرک اسپرم خارج از ساختار اندام تولید مثلی(بیضه‌ها) با استفاده از محلول ممانعت کننده از تحرک که فشار اسمزی مشابه مایع سمینال دارد صورت می-گیرد(Billard et al. 1995). مطالعات نشان داده است که فشار اسمزی مایع سمینال در ماهیان آب شیرین و یا

رودکوچ $OsmKg^{-1}$ ۳۴۶ – ۲۳۰ است(Alavi and Cosson, 2006). بنابراین جهت تحریک اسپرم در این گروه از ماهیان نیاز به ایجاد یک شوک هیپواسموتیک است یا در آزاد ماهیان این کار را با کاهش غلظت یون پتاسیم انجام میدهند. بنابراین استفاده از آب رودخانه و یا محلول ۰/۳٪ NaCl که فشار اسمزی در حد $OsmKg^{-1}$ ۹۶ دارد و یک محلول هیپواسموتیک است میتواند به عنوان بهترین محیط فعال سازی جهت اسپرم تازه و یا ایجاد تحرک در اسپرمی که از انجماد خارج شده است استفاده نمود(Nahidozzaman et al. 2012).

در این بررسی از دو روش دستی و اتوماتیک(استفاده از دستگاه) برای منجمد نمودن نمونهها استفاده گردید. در روش دستی دامنه کاهش حرارتدر اسپرم ماهی آزاد $^{\circ}C\ min^{-1}$ ۳۰- بود در حالیکه در روش اتوماتیک(با استفاده از دستگاه) که برای نمونه ماهی سفید استفاده شد، دامنه کاهش درجه حرارت از ۴ تا ۲۰- در جه سانتیگراد $^{\circ}C$ min^{-1} ۵ و از ۲۰- تا ۴۰- در جه سانتیگراد این دامنه $^{\circ}C\ min^{-1}$ ۱۰ بود. مطالعات نشان داده است که مهمترین مرحله در روند انجماد، حرارتهای بیشتر از ۴۰- درجه سانتیگراد است. زیرا معمولا ایجاد کریستالهای یخ در این مرحله صورت می‌گیرد و زمانی که دمای نمونه به به ۴۰- درجه سانتیگراد رسید، می‌توان سلولها را بدون کمترین آسیب در ازت مایع قرار داد. اصولا موفقیت یک روند مناسب کاهش دما بستگی به عوامل مختلفی مانند نوع سلول، سایز سلول، ترکیب غشا سلولی، نوع ماده محافظ از سرما و غلظت آن، مدت زمان هم دما سازی و تداخلات بین این فاکتورها دارد (Friedler et al. 1988; Yao et al. 2000). به غیر از تاثیر تغییرات دمایی در زمان انجام روند انجماد، نحوه خارج نمودن نمونه ها از انجماد نیز عامل موثر دیگری بر ماندگاری سلولهای اسپرم است. در این بررسی برای خارج نمودن نمونه اسپرم ماهی آزاد از انجماد از حمام آب با دمای ۲۵درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و برای از انجماد خارج نمودن نمونه های اسپرم ماهی سفید از حمام آب با دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه استفاده گردید.

مطالعات نشان داده است که بهترین دما برای ذوب اسپرم منجمد شده آزاد ماهیان حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد در مدت ۳۰ ثانیه است و در این حالت نمونه اسپرم در مقایسه با نمونه ای که در حرات ۳۰ درجه سانتیگراد و به مدت ۲۵ ثانیه قرار گرفته است بطور معنی داری میزان تحرک و لقاح آن بیشتر بوده است(Lahnsteiner 2000). براساس مطالعات مشخص شده که موفقیت آمیز بودن نتیجه از انجماد خارج نمودن اسپرم کپور ماهیان با استفاده از دامنه حرارتی ۴۰ – ۳۰ درجه سانتیگراد بدست می‌آید. استفاده از زمان و دمای مناسب در مرحله ذوب از شکل گیری مجدد کریستالهای یخ تا حدود زیادی ممانعت نموده و در عین حال موجب میگردد تا فعالیتهای آنزیمی سلول اسپرم در بهترین حالت خود حفظ گردد(Yavas and Bozkur, 2011).

نتایج این بررسی نشان داد که با افزایش زمان انجماد میزان درصد تحرک و مدت زمان آن در مقایسه با نمونه اسپرم تازه کاهش می‌یابد. مطالعات پیشین نشان داده است که کیفیت اسپرم پس از انجماد در مقایسه با نمونه تازه از کیفیت کمتری برخوردار است و این مسئله با بررسی میزان تحرک اسپرم، درصد لقاح و مطالعات ریز ساختاری سلول اسپرم به اثبات رسیده است(Ogier de Baulny et al. 1997; Cabrita et al. 2005; Li et al 2010).

مطالعات فلوسیتومتری بر روی اسپرم ماهی قزل آلا نشان داد که تنها بخش اندکی از سلولهای اسپرم بعد از خارج شدن از انجماد (در بهترین حالت حدود ۱۸٪) دارای غشا سلولی سالم و فعالیت طبیعی میتوکندری هستند(Ogier de Baulny et al. 1997). در اولین قدم باید توجه داشت که فرآیند انجماد و استفاده از رقیق کننده ها موجب وارد آوردن استرس اسمزی و اکسیداتیو به اسپرم میگردد. رادیکالهای آزاد اکسیژنی که طی این فرآیند بوجود می-آیند سبب پراکسیداسیون چربی دیواره سلول، آسیب دیدن قطعه میانی و ساختار آکسونمی تاژک می‌شوند. همچنین وجود رادیکالهای آزاد اکسیژن اختلال در عملکرد میتوکندری ایجاد نموده، تولید ATP را کاهش می-دهند.در نهایت مجموعه مشکلاتی که به آنها اشاره شد سبب کاهش درصدتحرک و کوتاه شدن زمان آن شده و در آخر کاهش باروری و لقاح موفق با اسپرم منجمد شده را بدنبال دارند(Cabrita et al. 2005; Li et al 2010).

با توجه به آنچه گفته شد به نظر می‌رسد تهیه یک روش استاندارد انجماد اسپرم که بتوان از آن برای تمام ماهیان آب شیرین و دریا استفاده نمود بسیار سخت است، زیرا موفقیت آمیز بودن این فرآیند بر اساس نوع مواد رقیق کننده، روند انجماد و سیستم خارج ساختن از انجماد در هر گونه ماهی و حتی از یک ماهی نر تا ماهی نر دیگر در همان گونه متفاوت است و در انجام این کار ضروری است شرایط هر گونه بطور خاص مورد مطالعه و بررسی قرار گیرد. لذا ضروری است تا مطالعات تکمیلی در جهت شناسایی رقیق کننده‌های مناسب برای ماهیان ارزشمند دریای خزر و نیز ارزیابی ماندگاری و کیفی بودن اسپرم آنها بعد از بازه‌های زمانی طولانیتر تحت شرایط انجماد مورد بررسی و تحقیق قرار گیرد.

منابع

- سروی مقانلو، ک.، ۱۳۸۴، بررسی امکان انجماد اسپرم ماهی آزاد دریای خزر(*Salmo trutta caspius*) و مطالعه بارور کنندگی، پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۱۱۳ صفحه
- صفری، ر.، یعقوب زاده، ز.،۱۳۹۱، ارزیابی بیواندیکاتورهای میکروبی رودخانه شیروددر استان مازندران، مجله علوم پزشکی مازندران، دوره بیست و دوم، شماره ۹۸، ۲۹۹ - ۲۸۹
- Alavi, S. M. H., Cosson, J., 2005, Sperm motility in fishes: (I) effects of temperature and pH. Cell Biology International, 29:101-110.
- Alavi, S. M.H., Cosson, J., 2006, Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. Cell Biology International. 30:1-14
- Alavi, S.M.H., Cosson, J., Karami, M., Abdolhay, H., Mojazi Amiri, B., 2004, Chemical composition and osmolality of seminal fluid of *Acipenser persicus*; their physiological relationship with sperm motility. Aquaculture Research. 35:1238–1243
- Alvarez, B., Arenal, A., Fuentes, R., Pimentel, R., Abad, Z., Pimentel,E., 2008, Use of post-thaw silver carp (*Hypophtalmichthys molitrix*) spermatozoa to increase hatchery productions. Methods in Reproductive Aquaculture, Marine and Freshwater Species. Biology series, CRC Press (Taylor and Francis group), pp 345–349
- Asturiano, J. F., Pe´ rez, L., Marco-Jime´nez, F., Olivares, L., Vicente, J. S.; Jover, M., 2003, Media and methods for the cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm. Fish Physiology and Biochemistry. 28: 501–502.
- Babiak, I., Ottesen, O., Rudolfsen, G., Johnsen, S., 2006, Chilled storage of semen from Halibut, *Hippoglossus hippoglossus*: optimizing the protocol. Theriogenology 66: 2025–2035.
- Billard, R., 1986, Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species, Reproduction Nutrition Development, 26: 877 – 920
- Billard, R., Cosson, J., Crim, L.W., Suquet, M., 1995, Sperm physiology and quality. In: Bromage, N.R., Roberts, R.J. (Eds.), Broodstock nagementm and Egg and Larval Quality. Blackwell Science, Oxford, pp. 25–52.
- Boitano, S., Omoto, C. K., 1992, Trout sperm swimming pat-terns and role of intracellular Ca^{2+}, Cell Motil Cytoskeleton. 21:74–82.
- Boitano, S., Omoto, C.K., 1991, Membrane hyperpolarization activates trout sperm without an increase in intracellular pH. Journal of Cell Science 98:343-349.
- Cabrita, E., Alvarez, R., Anel, L., Rana, K. J., Herra´ ez, M. P., 1998, Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm. Cryobiology 37: 245–253.
- Cabrita, E., Engrola, S., Conceição, L.E.C.,S., Pousão-Ferreira, P., Dinis, M. T., 2009, Successful cryopreservation of sperm from sex-reversed dusky grouper, *Epinephelus marginatus*. Aquaculture 287, 152–157.
- Cabrita, E., Robles, V., Cuñado, S., Wallace, J. C., Sarasquete, C.,Herráez, M. P., 2005, Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5 ml macrotubes. Cryobiology 50: 273–284.
- Cabrita, E.; Robles, V.; Herráez, M. P., 2008: Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species. Biology series, CRCPress (Taylor and Francis group), pp: 547.
- Chao, N.H. 1996. Cryopreservation of finfish and shellfish sperms. Taiwan Fisheries Research. 4: 157 - 170
- Chereguini, O., García de la Banda, I., Herrera, M., Martinez, C., De la Hera, M., 2003, Cryopreservation of turbot *Scophthalmus maximus* (L.) sperm: fertilization and hatching rates. Aquaculture Research.34:739–747.
- Cherepanov, V.V., Kopeika, E.F., 1999, Cryopreservation and low temperature storage of sturgeon sperm. Journal of Applied Ichthyology. 15: 310–311
- Ciereszko, A., 2008, Chemical composition of seminal plas-ma and its physiological relationship with sperm motility, fertilizing capacity and cryopreservation success in fish. In: Alavi SMH, Cosson J, Coward R, Rafiee G (eds) Fish Sper-matology. Alpha Science Ltd, Oxford, pp 215–240.
- Fabbrocini, A., Lavadera, L.,Rispoli, S., Sansone, G., 2000, Cryopreservation of sea bream (*Sparus aurata*) spermatozoa. Cryobiology. 40: 46–53.

- Fausto, A. M., Mazzini, M., 2001, Is cryopreservation a homogeneous process? Ultrastructure and motility of untreated, prefreezing, and postthawed spermatozoa of *Diplodus puntazzo* (Cetti). Cryobiology 42, 244–255.
- Fauvel, C., Suquet, M., Dreanno, C., Zonno, V., Menu, B., 1998, Cryopreservation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa in experimental and production simulating conditions. Aquatic Living Resources. 11: 387–394.
- Friedler, S., Giudice, L., Lamb, E., 1988. Cryopreservation of embryos and ova. Fertility and Sterility. 49, 743–764
- Gwo, J. C., 1993,Cryopreservation of black grouper (*Epinephelus malabaricus*). Theriogenology. 39:1331–1342.
- Gwo, J.C., 2000, Cryopreservation of sperm of some marine fishes. In Tiersch, T.R. and Mazik, P.M. (Eds.), Cryopreservation in Aquatic Species. World Aquaculture Society, Baton Rouge, L.A. pp: 138-160.
- He, S. Y., Woods, L. C., III, 2003, Effects of glycine and alanine on short-term storage and cryopreservation of striped bass (*Morone saxatilis*) spermatozoa. Cryobiology 46:17–25.
- Horváth, A., Urbányi, B., 2000, The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) sperm. Aquaculture Research, 31: 317–324.
- Horváth, A., Miskolczi, E., Urbányi, B.,2003, Cryopreservation of common carp sperm, Aquatic Living Resources. 16:457–460
- Horváth, A.; Wayman, W. R., Dean, J. C., Urbányi, B., Tiersch, T. R., Mims, S. D., Johnson, D., Jenkins, J. A., 2008, Viability and fertilizing capacity of cryopreserved sperm from three North American Acipenseriform species: a retrospective study. Journal of Applied Ichthyology. 24:443–449
- Ingermann R, Holcomb M, Robinson ML et al. (2002). Car-bon dioxide and pH affect sperm motility of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). The Journal of Experimental Biology. 205:2885-2890.
- Itoh, A., Inaba, K., Ohtake, H., Fujinoki, M., Morisawa, M., 2003, Characterization of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit from rainbow trout spermatozoa, Biochemical and Biophysical Research Communications. 305:855-861
- Jezierska, B., Witeska, M., 1999, The effect of time and temperature on motility of spermatozoa of common and grass carp. Electronic Journal Polish Agriculture Universities 2:1-8. http://www.ejpau.media.pl/series/volume2/issue2/fisheries/art-04.html
- Jodun, W., King, K., Farrell, P., 2006, Methanol and Egg Yolk as Cryoprotectants for Atlantic Salmon Spermatozoa, North American Journal of Aquaculture69:36–40
- Kahnsteiner, F., 2000, Semen cryopreservation salmonide and in the Northern pike, Aquaculture Research. 31: 245 – 258
- Kerby, J.H., 1983, Cryogenic Preservation of Sperm from Striped Bass. Transactions of the American Fisheries Society. 112: 86-94
- Kho, K. H., Tanimoto, S., Inaba, K., Oka, Y., Morisava, M., 2001, Transmembrane cell signaling for the initiation of trout sperm motility: roles of ion channels and membrane hyperpolarization for cyclic AMP synthesis. Zoological Science. 18:919-928.
- Kopeika, E., Kopeika, J. , Zhang, T., 2007, Cryopreservation of fish sperm. In: Day, J.G. and Stacey, G.N. (Eds) Methods Mol. Biol. Vol. 368: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, 2nd edition. Humana Press Inc., Totowa, NJ. pp. 203 -217.
- Kowalski, R., Wojtczak, M., Glogowski, J., Ciereszko, A., 2003, Gelati-nolytic and antitrypsin activities in seminal plasma of com-mon carp: relationship to blood, skin mucus and spermatozoa. Aquatic Living Resources. 16:438-444
- Krasznai, Z., Márián, T., Balkay, L., Gáspár Jr, R., Trónet, L., 1995, Potassium channels regulate hypo-osmotic shock-induced motility of Common Carp, *Cyprinus carpio*, sperm, Aquaculture. 129:123-128.
- Krasznai, Z., Marian, T., Izumi, H., Damjanovich, S., Balkay, L., Tron, L., Morisawa, M., 2000, Membrane hyper polarization removes inactivation of Ca2+ channels leading to Ca2+ influx and initiation of sperm motility in the common carp. Biophysics. 97:2052-2067
- Krasznai, Z., Morisawa, M., Morisawa, S., 2003, Role of ion channels and membrane potential in the initiation of carp sperm motility. Aquatic Living Resources 16:445-44
- Lahnsteiner, F., Berger, F., Weismann, T., Patzner, R., 1996, The influence of various cryoprotectants on semen quality of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) before and after cryopreservation. Journal of Applied Ichthyology. 12: 99–106.
- Lahnsteiner, F., 2000, Semen cryopreservation in the salmonide and in the Northern pike, Aquaculture Research, 31:245 – 258

- Li,P., Li, Z. H., Dzyuba, B., Hulak, M., Rodina, M., Linhart, O., 2010, Evaluating the Impacts of Osmotic and Oxidative Stress on Common Carp (*Cyprinus carpio*, L.) Sperm Caused by Cryopreservation Techniques, Biology of Reproduction, 83:852–858
- Linhart, O., Cosson, J., Mims, S.D., 2003a, Effects of ions on the motility of fresh and demembranated sperm of common carp (*Cyprinus carpio*) and paddlefish (*Polyodon spathula*). Fish Physiology and Biochemistry. 28:203-205.
- Linhart, O., Mims, S.D., Boris, G.B., 2003b, Ionic composition and osmolality of paddlefish (*Polyodon spathula*, Acipense-riformes) seminal fluid. Aquaculture International.11:357-368.
- Linhart, O., Rodina, M., Bastl, J., Cosson, J., 2003c, Urinary blad-der, ionic composition of seminal fluid and urine with cha-racterization of sperm motility in tench (*Tinca tinca* L.). Journal of Applied Ichthyology.19:177-181.
- Maisse, G., Ogier de Balny, B., Labbe´, C., 2008, Cryopreservation of testicular sperm from European catfish (*Silurus glanis*). In: Methods in Reproductive quaculture: Marine and reshwater Species Biology Series. E. Cabrita, V. Robles, M. P.; Herráez (Eds), CRCPress (Taylor and Francis group), pp. 397–401.
- Márián, T., Kraszna,i Z., Balkay, L., Emri, M., Tron, L., 1997, Role of extracellular and intracellular pH in carp sperm motility and modifications by hyperosmosis of regulation of the Na+/H+ exchanger. Cytometry 27:374–382.
- Martínez-Páramo, S., Pérez-Cerezales, S., Gómez-Romano, F., Blanco, G., Sánchez, J. A., Herráez, M. P., 2009, Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential. Theriogenology. 71:594–604.
- Morisawa, M., Suzuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S., Yasuda, K., 1983, Effect of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from fresh-water cyprinid fishes. Journal of Experimental Biology.107:95–103.
- Morita, M., Takemura, A., Okuno, M., 2003, Requirement of Ca2+ on activation of sperm motility in euryhaline tilapia *Oreochromis mossambicus* Journal of Experimental Biology. 206:913–921.
- Muchlisin, Z.A., 2004, Preliminary study on spermatozoa cryopreservation of bagrid catfish spermatozoa: Effect different extender and cryoprotectants on motility after short-time storage. Theriogenology. 62: 25 - 37
- Muchlisin, Z.A., 2005, Review: current status of extenders and cryoprotectants on fish spermatozoa cryopreservation, Biodiversitas.6:12 – 15
- Nahiduzzamana, Md., Hassan, M., Roy, P.K., , A., Hossain, M.A.R., Tiersch, T.R., 2012, Sperm cryopreservation of the Indian major carp, *Labeo calbasu*: Effects of cryoprotectants, cooling rates and thawing rates on egg fertilization, Animal Reproduction Science. 136:133– 138
- Ninhaus-Silveira,A.: Foresti,F.; Tabata,Y.A.; Rigolino, M.G. and Veríssimo-Silveira, R. 2006. Cryopreservation of semen from functional sex-reversed genotypic females of the rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Brazilian Archives of Biology and Technology. 49(1) : pp. 73-77.
- Oda, S., Morisawa, M., 1993, Rises of intracellular Ca2+ and pH mediate the initiation of sperm motility by hyperosmolality in marine teleosts. Cell Motility and the Cytoskeleton .25:171-178
- Ogier de Baulny, B., Le Vern, Y., Kerboeup, D., Maisse, G., 1997, Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity infresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa, Cryobiology, 34:141–149
- Rani, K.U., Munuswamy, N., 2014, Preliminary studies on the cryopreservation of spermatozoa in the fresh water fish common carp (*Cyprinus carpio* L.), Journal of Coastal Life Medicine. 2: 181-186
- Rideout, R. M., Litvak, M. K., Trippel, E. A., 2003, The development of a sperm cryopreservation protocol for winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum): evaluation of cryoprotectants and diluents. Aquaculture Research. 34, 653–659.
- Rideout, R. M.; Trippel, E. A.; Litvak, M. K., 2004: The development of haddock and Atlantic cod sperm cryopreservation techniques and the effect of sperm age on cryopreservation success. Journal of Fish Biology. 65: 299–311.
- Sadiqul Islam, M., Akhter, T., 2011, Tale of fish sperm and factors affecting sperm motility: a review, Advances in Life Sciences. 1(1): 11-19
- Sansone, G., Fabbrocini, A., Ieropoli, S., Langellotti, A., Occidente, M., Matassino, D., 2002, Effects of extender composition, cooling rate, and freezing on the motility of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) spermatozoa after thawing. Cryobiology. 44: 229–239.
- Sarvi , K., Niksirat ,H., Mojazi Amiri ,B., Mirtorabi ,S.M., Rafiee ,G.R., Bakhtiyari, M., 2006, Cryopreservation of semen from the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) Aquaculture, 256 : 564–569.
- Suquet, M., Dreanno, C., Petton, B., Normant, Y., Omnes, M. H., Billard, R., 1998, Long-term effects of the cryopreservation of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa. Aquatic Living Resources. 11:45–48.

- Takai, H., Morisawa, M., 1995, Change in intracellular K+ concentration caused by external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater teleosts. Journal of Cell Science.108:1175-1181.
- Tanaka, S., Zhang, H., Horie, N., Yamada, Y., Okamura, A., Utoh, T., Mikawa, N., Oka, H. P., Kurokura, H., 2002, Long-term cryopreservation of sperm of Japanese eel. Journal of Fish Biology. 60: 139–146.
- Tuset, V. M., Dietrich, G. J., Wojtczak, M., Słowin´ska, M., de Monserrat, J., Ciereszko, A., 2008, Relationships between morphology, motility and fertilization capacity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa, Journal of Applied Ichthyology. 24: 393–397
- Viveiros, A. T. M.; Komen, J., 2008: Semen cryopreservation of the African catfish, *Clarias gariepinus*. In: Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species. Biology. Series. E.Cabrita, V. Robles, M. P.; Herráez (Eds), CRCPress (Taylor and Francis group), pp. 403–407.
- Williot. P., Kopeika, E.F., Goncharov, 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.
- Yang, H., Tiersch, T.R., 2009, Sperm motility initiation and duration in a euryhaline fish, medaka (*Oryzias latipes*). Theriogenology. 72:386–392.
- Yavas, I., Bozkurt, Y., 2011, Effect of different thawing rates on motility and fertilizing capacity of cryopreserved grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) sperm, Biotechnology & Biotechnological Equipment. 25: 2254-2257
- Yao, Z., Crim, L.W., Richardson, G.F., Emerson, C.J., 2000. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (Macrozoarces americanus L.) sperm after cryopreservation. Aquaculture 181, 361–375.
- Zar, J.H., 1994,.Biostatistical analysis. New Jersey: Prentice-Hall; p:662.
- Zilli, L., Schiavone, R., Storelli, C., Vilella, S, 2012, Molecular mechanism regulating axoneme activation in marine fish: a review, International Aquatic Research. 4:2 -11

Abstract

In this study, 11 male of Caspian trout (*Salmo truta caspius*) (with mean length and weight 37/8 ± 5/3 cm and 523/3 ± 24/7 respectively) and 23 male of Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*) (with mean length and weight 36/1 ± 7/1 cm and 631/3 ± 21/6 g respectively) were evaluated. All the fish were good at the initial examination of sexual maturity. After sperm sampling, their quality were tested. In this step, the parameters such as motility, duration of mobility, density, pH and osmolality were measured. After this stage, the sperm samples of Caspian trout in the ratio 1: 3 were diluted with the aqueous solution containing compounds (0.3M Glucose, 10% Methanol, 10% egg yolk) and the freezing process was done manually and the sperm was frozen in liquid nitrogen. The sperm samples of Caspian kutums were diluted (ratio of 1: 3) with two soluble diluent containing compounds (350 mM glucose, 30 mM Tris and 4% Polyethylene glycol) and (350 mM glucose, 30 mM Tris and 2% Glycerol) and were frizzed automatically by Planner Kryo instrument and placed in liquid nitrogen. The sperm samples were thawed 1 to 3 months after the date of first freezing and their quality were assessed by measuring percent and timing motility.

The results showed that the obtained semen volume of Caspian trout was more than Caspian kutum. Moreover, percentage of motile sperm, timing motility and sperm density of Caspian trout were higher than those of Caspian kutum but osmolality and pH of Caspian trout were lower than those of Caspian kutum. Over time, the percentage of sperm motility and mobility for both species declined compared with fresh samples. After thawing, percentage of motile sperm and timing motility of Caspian kutum were lower than those factors Caspian trout. The results showed that the sample of Caspian kutum sperm that were diluted by ethylene glycol after thawing and were immotile ll of them. However, the samples were diluted by glycerol, after thawing, were alive and motile. According to the results, it seems very important species differences that must be fully considered in the process of freezing sperm. The use of a single protocol would not be successful in cryopreservation because the reaction of sperm against to chemical agents is variable. Therefore, it is essential to get the right information to protect valuable Caspian fish by using cryopreservation. Further studies on the characteristics of each species, as well as the freezing process take appropriate diluent.

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute – Caspian Sea Ecology Research Center

---

Project Title : Create of Cryopreservation Bank of bony fish
Approved Number: 14- 76 – 12 – 8914 - 89162
Author: Mohammad Binaii
Project Researcher : Mohammad Binaii
Collaborator(s) : Pourgholam. R., Ghaneii Tehrani, M., Ghiasi, M., Bahmani, M., Naderi Jelodar, M., Ghoroghi, A., Saeidii, A.A., Baradarn Noveiri, S., Alipour, A.R., Noroz Fashkhami, M.R., Mokarami, A., Taleshiyan, H., Bagherzadeh, F., Molaeii, H.Laloei,f.Sh.Behrozi
Advisor(s): -
Supervisor: Sohrab Rezvani Gilkolaeii
Location of execution : Mazandaran province
Date of Beginning : 2011
Period of execution : 4 Years & 9 Months
Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute
Date of publishing : 2016

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 Science Research Institute - Caspian Sea Ecology Research Center

Project Title :

Create of Cryopreservation Bank of bony fish

Project Researcher :

Mohammad Binaii

Register NO.

48382