فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال پنجم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۶

اثر گلیسرول، اتیلن‌گلیکول و استامید به عنوان مواد ضد انجماد بر میزان تفریخ جنین ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

محمد سوداگر[۱]، سعیده کیوانلو[۲]*، محمد مازندرانی[۳]

تاریخ دریافت: آبان ۹۵ تاریخ پذیرش: دی ۹۵

چکیده

انجماد جنین ماهیان با جایگزین کردن مواد مقاوم در برابر یخ زدگی با آب درون جنین امکان پذیر است. آگاهی از سمیت و آثار منفی مواد ضد انجماد یکی از ضروری‌ترین پیش‌نیازها در طراحی دستورالعمل انجماد جنین است. در این پژوهش جنین ماهی کپور معمولی در دو مرحله تکوین جنینی شامل روخزیدگی ناقص (۸ ساعت پس از لقاح) و ضربان قلب (۳۲ ساعت پس از لقاح) طی مدت ۵ دقیقه در معرض آنزیم پروناز نوع XIV از *Streptomyces griseus* قرار گرفتند. سپس جنین‌های نفوذپذیر شده در مواد ضد انجماد شامل گلیسرول، اتیلن‌گلیکول و استامید در غلظت‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ مولار به مدت ۵ و ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شدند. پس از آن، جنین‌ها آبکشی شده و تا زمان تفریخ انکوباسیون شدند. بررسی سمیت مواد ضد انجماد از طریق محاسبه درصد تفریخ صورت گرفت. نتایج نشان داد گلیسرول نسبت به اتیلن‌گلیکول و استامید، سمیت کمتری برای جنین کپور معمولی داشت و جنین‌ها توانستند غلظت‌های مختلف این ماده را به خوبی تحمل کنند. استامید بیشترین اثرات سمی را روی جنین ماهی گذاشت. با افزایش غلظت مواد ضد انجماد، درصد تفریخ کاهش یافت که علت آن می‌تواند اثر شوک اسمزی، عدم تعادل یونی و یا اثر سمی مواد ضد انجماد باشد. همچنین، افزایش زمان غوطه‌وری (از ۵ به ۱۵ دقیقه) موجب کاهش درصد تفریخ شد. با پیشرفت روند تکوینی، حساسیت جنین‌ها نسبت به مواد ضد انجماد کاهش یافت. نتایج پژوهش حاضر نشان داد گلیسرول و اتیلن‌گلیکول می‌توانند مواد ضد انجماد مناسبی برای آزمایش انجماد جنین ماهی کپور معمولی در مرحله ضربان قلب باشند.

واژگان کلیدی: *ضد انجماد، جنین، کپور معمولی، سمیت، درصد تفریخ.*

۱- دانشیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۲- دکتری شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۳- استادیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
* نویسنده مسئول: Skeivanloo@yahoo.com

مقدمه

اهمیت علم آبزی‌پروری به عنوان ابزاری برای تولید مقادیر زیادی از غذا با کیفیت بالا به سرعت در حال پیشرفت و توسعه است (Donaldson, 1996). امکان محافظت طولانی مدت از سلول‌های جنسی ماهیان می‌تواند نقش مهمی در توسعه آبزی‌پروری داشته باشد (Rail, 1993). انجماد اسپرم ماهیان به طور موفقیت‌آمیزی در چندین گونه انجام شده است (McAndrew et al., 1995). با وجود موفقیت‌های قابل توجه در زمینه انجماد و محافظت جنین پستانداران (O'Neil et al., 1998; Otoi et al., 1998) و برخی بی‌مهرگان دریایی (Chao et al., 1997) به دست آمده است، تاکنون پژوهش‌های انجام شده در زمینه انجماد جنین ماهیان با موفقیت‌های اندکی همراه بوده است (Chen and Tian, 2005; Tian et al., 2015; Keivanloo and Sudagar, 2016). جنین ماهیان نسبت به پستانداران حساسیت بسیار بیشتری نسبت به مواد ضدانجماد و کاهش دما دارند و ساختار آن‌ها بسیار پیچیده‌تر است. آن‌ها دارای ساختار چند لایه‌ای هستند که به صورت خارجی و بدون حفاظت بدن مادر تکامل پیدا می‌کنند (Cabrita et al., 2008). عوامل گوناگونی در موفقیت انجماد جنین ماهیان تاثیرگذار هستند. یکی از عوامل اساسی، ورود و توزیع همگن مواد ضد انجماد در قسمت‌های مختلف جنین است. در گام نخست این مواد باید وارد جنین شوند تا فرآیند انجماد به طور موفقیت‌آمیز انجام شود. در حالت عادی موانعی وجود دارند که از ورود محلول‌های ضد انجماد به درون پیکره جنین جلوگیری می‌کنند. همچنین حساسیت به سرما، تشکیل کریستال‌های یخ و عدم توزیع همگن مواد ضد انجماد در داخل بخش‌های مختلف جنین از عوامل اصلی هستند که موجب دشواری انجماد موفقیت‌آمیز جنین ماهیان می‌شوند (Cabrita et al., 2008). دستیابی به تکنیک انجماد موفقیت‌آمیز جنین به طور بالقوه فواید بسیار زیادی به دنبال خواهد داشت، به طوری که به کمک انجماد می‌توان جنین یک ماهی را برای مدت زمان دلخواه به صورت زنده و دست نخورده در سرما نگاه داشت. از آنجا که خطر انقراض بعضی از گونه‌های ماهیان وجود دارد، به کمک انجماد می‌توان اقدام به ذخیره و حفظ ذخایر ژنتیکی این ماهیان کرد و در نتیجه بقای این‌گونه ماهیان را امکان‌پذیر ساخت. همچنین این

روش امکان می دهد تا زاده‌های یک نسل از ماهیان را برای مطالعات مستمر و طولانی برای مدت زمان دلخواه نگهداری کند. از کاربردهای دیگر این روش می‌توان به استفاده از آن در بازسازی ذخایر، دورگه‌گیری‌ها و تهیه بانک ژنتیکی اشاره کرد. همچنین، واضح است که حمل جنین در مسافت‌های طولانی به صورت منجمد بسیار آسان‌تر بوده، سبب افزایش بازدهی خواهد شد (سوداگر و کیوانلو، ۱۳۹۱).

به طور کلی یکی از عوامل اساسی در محافظت سرمایی و انجماد جنین ورود و توزیع همگن مواد ضد انجماد (محافظت کننده در برابر سرما) در درون قسمت‌های مختلف جنین است. به عبارت دیگر، ابتدا این مواد باید وارد جنین شوند، سپس اقدام به انجماد جنین کرد. این مواد در دماهای پایین از جنین محافظت می‌کنند و مانع مرگ آن می‌شوند (Cabrita et al., 2006). از سوی دیگر، این مواد در غلظت‌های بالا می‌توانند سبب ایجاد مسمومیت، کاهش درصد تفریخ، کاهش نرخ رشد و افزایش تلفات شوند. از این رو توجه به غلظت مواد مورد استفاده و نیز مدت زمان قرار گرفتن جنین در معرض این مواد بسیار حائز اهمیت است (کیوانلو و همکاران، ۱۳۹۰).

مواد ضد انجماد نقطه انجماد محلول‌ها را کاهش می‌دهند و از تشکیل کریستال‌های یخ در محلول‌های داخل و خارج سلولی جلوگیری می‌کنند. این مواد خود به دو دسته مواد ضد انجماد نفوذپذیر و نفوذناپذیر تقسیم می‌شوند. مواد ضد انجماد نفوذپذیر به دلیل وزن مولکولی پایین خود می‌توانند از غشای سلول عبور کنند و کاهش قابل ملاحظه‌ای را در دمای انجماد محلول‌های درون سلولی ایجاد کنند (Cabrita et al., 2008). مواد ضد انجماد نفوذناپذیر وزن مولکولی بالایی داشته، توانایی ورود به سلول را ندارند و اساس کار آن‌ها بر پایه آبگیری از سلول قبل از انجماد است که موجب کاهش شکل‌گیری کریستال-های یخ در داخل سلول و در طول روند انجماد می‌شود. برخی از این مواد نیز شکل کریستال‌ها را به شکلی بی‌ضرر تبدیل می‌کنند (Cabrita et al., 2008). سمیت این مواد ممکن است کم یا زیاد باشد که با عواملی از جمله دما، غلظت و مدت زمان تماس سلول با مواد ضد انجماد رابطه مستقیم دارد (Dinnyes et al., 1998; Vuthiphandchai et al., 2005; Cabrita et al., 2006). آگاهی از سمیت مواد ضد انجماد یکی از ضروری‌ترین پیش‌نیازها در طراحی دستورالعمل انجماد جنین است. از

طرفی نتایج متفاوتی که از بررسی سمیت مواد ضد انجماد در جنین ماهیان به دست آمده است، نشان دهنده ضرورت و اهمیت مطالعات اختصاصی سمیت این مواد برای هر یک از گونه‌های آبزیان است (کیوانلو و سوداگر، ۱۳۹۱).

کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) یکی از مهم‌ترین گونه‌های خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) است که پراکنش وسیعی در حوضه دریای خزر، رودخانه تجن و تمام حوضه‌های آبریز ایران دارد (ستاری و همکاران، ۱۳۸۳). این گونه که یکی از عمده‌ترین گونه‌های پرورشی آب شیرین در آسیا و اروپا است، در مزارع پرورشی تنها یک بار در سال تولیدمثل می‌کند (Dinnyes et al., 1998). کپور معمولی از جمله مهم‌ترین ماهیان پرورشی در کشور ایران است که به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد مانند رشد سریع، امکان تکثیر مصنوعی، تغذیه و نگهداری به صورت متراکم و مقاومت بالا در برابر عوامل فیزیکی و شیمیایی آب، حتی در استخرهای ذخیره آب کشاورزی و استخرهای بتنی نیز پرورش می‌یابد. اطلاعات در زمینه اثر مواد ضدانجماد روی جنین ماهی کپور معمولی بسیار محدود و عمدتا قدیمی هستند (Zhang et al., 1989; Urbanyi et al., 1997, 1998; Dinnyes et al., 1998). تا کنون در ایران، هیچ تلاشی در زمینه بررسی اثر مواد ضد انجماد و امکان انجماد جنین ماهی کپور معمولی صورت نگرفته است. دسترسی به جنین این گونه در تمام طول سال می‌تواند کمک شایانی به توسعه صنعت آبزی‌پروری این ماهی کند. بقا و زنده‌مانی جنین کپور معمولی در سرما برای چند هفته، پرورش‌دهندگان ماهی را قادر می‌سازد تا جنین‌ها را پس از فصل تکثیر و تولیدمثل نیز نگهداری و ذخیره-سازی کنند (Ahammad et al., 2002). انجماد جنین، امکان تولید ماهیان جوان را در سرتاسر طول سال فراهم کرده، در نتیجه موجب رشد و توسعه صنعت آبزی‌پروری خواهد شد (Ahammad et al., 1998). انجام آن می‌تواند اثر چشمگیری در ذخیره‌سازی و پرورش این گونه اقتصادی در خارج از فصل تکثیر و تولیدمثل داشته باشد. علاوه بر آن، جنین‌های حفاظت شده می‌توانند با استفاده از ابزار و تجهیزات نگهداری با بازدهی بالاتر و تلفات کمتر به مکان‌های دیگری انتقال یابند (Ahammad et al., 2003).

هدف این پژوهش، دستیابی به اطلاعات بنیادی و پایه در زمینه واکنش جنین ماهی

کپور معمولی نسبت به مواد ضدانجماد بود و به همین دلیل آزمایش‌هایی برای تعیین اثرات چند ماده ضدانجماد نفوذپذیر بر درصد تفریخ و میزان بقا در جنین این گونه انجام شد تا بر اساس آن بتوان در مطالعات آینده دستور العمل مناسبی برای انجماد جنین ماهی کپور معمولی طراحی کرد.

مواد و روش‌ها

زمان و مکان انجام طرح

این پژوهش طی ۳ هفته در اردیبهشت ماه ۱۳۹۵ در مرکز بازسازی ذخایر ماهیان استخوانی گلستان (مرکز سیجوال) و آزمایشگاه شیمی دانشکده شیلات و محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد.

تهیه جنین

برای تهیه جنین، سه مولد نر و پنج مولد ماده کپور معمولی ۳ تا ۴ ساله با میانگین وزن ۱۴۰۰- ۱۰۰۰ گرم در مرکز بازسازی ذخایر ماهیان استخوانی گلستان (مرکز سیجوال) در نظر گرفته شد. برای القاء رسیدگی جنسی از هورمون اوالین (Shijiazhuang، چین) به میزان ۰/۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم برای ماهیان ماده و ۰/۲ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم برای ماهیان نر استفاده شد. تخمک و اسپرم با ماساژ شکمی استحصال شد و پس از لقاح خشک برای فعال‌سازی اسپرم و افزایش کارایی لقاح، آب اضافه شد. سپس، تخم‌های لقاح یافته ماهی کپور معمولی در دمای ۱±۲۴ درجه سانتی‌گراد مراحل تکوین جنینی خود را طی کردند. پس از گذشت ۸ و ۳۲ ساعت از زمان لقاح، جنین‌ها به ترتیب در دو مرحله روخزیدگی ناقص[1] و ضربان قلب[2] (Okada, 1960) برای انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند.

مواد شیمیایی مصرفی

در این پژوهش به منظور یافتن غلظت‌های مجاز از محلول‌های محافظت‌کننده در برابر سرما از سه ماده ضد انجماد گلیسرول، اتیلن‌گلیکول و استامید (مرک، آلمان) در غلظت‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ مولار استفاده شد (Cabrita et al., 2003a, 2006; Beirao et al., 2006; Keivanloo and Sudagar, 2013). غلظت‌های مختلف با استفاده از محلول رینگر (۲/۹۹ گرم کلرید پتاسیم، ۶/۴۹ گرم کلرید سدیم، ۰/۲۹ گرم کلرید کلسیم و

1- Half-Epiboly
2- Heart beat

۰/۲ گرم بی‌کربنات سدیم در یک لیتر آب) تهیه شدند. برای نفوذپذیر کردن لایه کوریون، بر اساس دستورالعمل توصیه شده در دیگر گونه‌های ماهیان، از آنزیم پروناز (نوع XIV *Streptomyces griseus*؛ سیگما، اسپانیا) استفاده شد (Cabrita et al., 2003a; Beirao et al., 2006; Keivanloo and Sudagar, 2013).

آزمایش سمیت مواد ضد انجماد

قبل از آنکه جنین‌ها در معرض مواد ضد انجماد قرار گیرند، لایه کوریون تخم‌ها با استفاده از آنزیم پروناز با غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به مدت ۵ دقیقه نفوذ پذیر شد (Cabrita et al., 2003a, 2006; Keivanloo and Sudagar, 2013, 2016). سپس ۳۵ عدد تخم لقاح یافته ماهی کپور معمولی در دو مرحله تکوینی (روخزیدگی ناقص و ضربان قلب) در ۶۰ میلی‌لیتر از هر یک از غلظت‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ مولار از مواد ضد انجماد برای زمان‌های ۵ و ۱۵ دقیقه در دمای ۱±۲۴ درجه سانتی‌گراد (شرایط کارگاه) غوطه‌ور شدند. سپس، جنین‌ها آبکشی شدند و ادامه مراحل تکوین خود را در انکوباتورها طی کردند. جنین‌ها در گروه شاهد نیز در همان زمان پس از غوطه‌وری در آنزیم پروناز بدون آن که در معرض مواد ضد انجماد قرار بگیرند، در آب کارگاه مراحل انکوباسیون خود را طی کردند. برای هر تیمار، سه تکرار در نظر گرفته شد. بررسی سمیت مواد ضد انجماد با تعیین درصد تفریخ لارو بر اساس رابطه ۱ صورت گرفت.

رابطه ۱:

$$H(\%) = (N_L / N_E) \times 100$$

H: درصد تفریخ لارو؛ N_L: تعداد لاروهای تفریخ شده؛ N_E: تعداد کل تخم‌های مورد آزمایش.

تجزیه و تحلیل آماری

نمونه‌برداری در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. داده‌های به دست آمده از این آزمایش به کمک آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA One Way) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همچنین برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه دانکن (Duncan) استفاده شد (سطح اطمینان ٪۹۵).

نتایج

تمامی عوامل مورد بررسی اعم از غلظت مواد ضد انجماد، مرحله تکوین جنینی و مدت زمان غوطه‌وری در مواد ضد انجماد ، درصد

تفریخ جنین ماهی کپور معمولی را به طور معنی‌داری تحت تاثیر قرار دادند. افزایش مدت زمان غوطه‌وری (از ۵ به ۱۵ دقیقه) سبب کاهش معنی‌داری در درصد تفریخ شد (جدول ۱). با افزایش غلظت مواد ضد انجماد در مقایسه با گروه شاهد، درصد تفریخ به طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵). نتایج نشان داد جنین ماهی کپور معمولی در مرحله روخزیدگی ناقص (۸ ساعت پس از لقاح) حساسیت بیشتری نسبت به مواد ضد انجماد داشت و در مرحله ضربان قلب (۳۲ ساعت پس از لقاح) مقاومت بیشتری برای تحمل غلظت‌های مختلف مواد ضد انجماد مورد آزمایش از خود نشان داد (جدول ۱).

جدول ۱: درصد تفریخ جنین‌های ماهی کپور معمولی در مرحله‌های تکوینی روخزیدگی ناقص و ضربان قلب پس از غوطه‌وری در غلظت‌های مختلف مواد ضد انجماد (میانگین ± انحراف معیار)

مواد ضد انجماد	زمان \ غلظت	درصد تفریخ				
		شاهد	۱ مولار	۲ مولار	۳ مولار	۴ مولار
مرحله تکوینی روخزیدگی ناقص						
گلیسرول	۵ دقیقه	۸۱/۹۰±۴/۳۶ a	۳۶/۱۹±۶/۵۹ b	۲۰/۰۰±۵/۷۱ c	۲۳/۸۰± ۸/۷۲ c	۵/۷۱±۲/۸۵ d
	۱۵ دقیقه	۸۴/۷۶±۶/۵۹ a	۳۲/۳۸±۵/۹۴ b	۲۷/۶۱±۷/۱۹ b	۱۵/۲۳±۴/۳۶ c	۳/۸۰±۱/۶۴ d
اتیلن گلیکول	۵ دقیقه	۸۳/۸۰±۱۰/۸۱ a	۲۹/۵۲±۵/۹۴ b	۲۲/۸۵ ±۱۰/۳۰ bc	۲۷/۶۱± ۹/۱۸ bc	۱۱/۴۲±۵/۷۱ c
	۱۵ دقیقه	۸۳/۸۰±۱/۶۴ a	۳۲/۳۸±۳/۲۹ b	۲۲/۸۵±۵/۷۱ c	۱۹/۰۴±۴/۳۶ c	۹/۵۲± ۳/۲۹ d
استامید	۵ دقیقه	۸۵/۷۱±۲/۸۵ a	۱۹/۰۴±۴/۳۶ b	۱۷/۱۴ ±۴/۹۴ b	۵/۷۱±۲/۸۵ c	۰ c
	۱۵ دقیقه	۸۲/۸۵±۵/۷۱ a	۲۲/۸۵±۲/۸۵ b	۱۵/۲۳±۵/۹۴ c	۳/۸۰±۱/۶۴ d	۰ d
مرحله تکوینی ضربان قلب						
گلیسرول	۵ دقیقه	۸۰/۹۵±۵/۹۴ a	۴۵/۷۱±۸/۵۷ b	۳۶/۱۹±۷/۱۹ b	۹/۵۲±۱/۶۴ c	۴/۷۶±۱/۶۴ c
	۱۵ دقیقه	۸۳/۸۰± ۱/۶۴ a	۴۰/۰۰±۲/۸۵ b	۳۱/۴۲±۹/۸۹ b	۱۲/۳۸±۴/۳۶ c	۵/۷۱±۰/۰۰ c
اتیلن گلیکول	۵ دقیقه	۸۴/۷۶±۳/۲۹ a	۳۴/۲۸±۴/۹۴ b	۲۳/۸۰±۴/۳۶ c	۱۲/۳۸± ۷/۱۹ d	۸/۵۷± ۲/۸۵ d
	۱۵ دقیقه	۸۲/۸۵±۰/۰۰ a	۳۷/۱۴±۷/۵۵ b	۱۸/۰۹± ۷/۱۹ c	۱۵/۲۳± ۴/۳۶ cd	۶/۶۶± ۱/۶۴ d
استامید	۵ دقیقه	۸۱/۹۰±۷/۱۹ a	۲۶/۶۶±۱۱/۸۹ b	۱۲/۳۸±۱/۶۴ c	۵/۷۱±۲/۸۵ c	۷/۶۱±۱/۶۴ c
	۱۵ دقیقه	۸۱/۹۰±۱۰/۰۳ a	۲۵/۷۱±۰/۰۰ b	۱۴/۲۸±۵/۷۱ c	۵/۷۱±۲/۸۵ cd	۰ d

در هر ردیف میانگین‌هایی که دارای حروف متفاوت هستند با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند ($P<0.05$)

از میان مواد ضدانجماد ،جنین ماهی کپور معمولی غلظت‌های مختلف گلیسرول را بهتر تحمل کرد به طوری‌که درصد تفریخ به دست آمده برای غلظت‌های مختلف این ماده به طور معنی‌داری بالاتر از دیگر مواد ضد انجماد بود. استامید بیشترین اثرات منفی را در جنین کپور معمولی بر جای گذاشت به طوری که در غلظت‌های بالاتر از ۲ مولار (در هر دو مرحله تکوینی و در هر دو مدت زمان غوطه‌وری ۵ و ۱۵ دقیقه) کاهش چشمگیر و معنی‌داری را در درصد تفریخ نشان داد (جدول ۱).

در بین جنین‌های غوطه‌ور شده در مواد ضد انجماد بالاترین درصد تفریخ (۴۵/۷۱ درصد) در غلظت ۱ مولار گلیسرول در مرحله ضربان قلب و در مدت زمان غوطه‌وری ۵ دقیقه به ثبت رسید (جدول ۱).

بحث

در بررسی‌های صورت گرفته در زمینه انجماد جنین موجودات، اطلاعات مربوط به سمیت مواد ضد انجماد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. اثرات هر ماده ضد انجماد علاوه بر ویژگی و خاصیت شیمیایی آن، به مرحله تکوینی و نوع گونه نیز بستگی دارد (Suzuki et al., 1995). بررسی‌ها نشان می‌دهند عوامل متعددی در دستیابی به یک روش و دستورالعمل مناسب برای انجماد جنین ماهیان، نقش دارند و یکی از مهم‌ترین عوامل، سمیت مواد ضد انجماد است (Liu et al., 1998; Cabrita et al., 2003b, 2006; Robles et al., 2003). سطوح سمیت مواد ضد انجماد در گونه‌های متنوع ماهیان و طی مراحل مختلف تکوین جنینی متفاوت است و نیازمند آن است که سمیت این محلول‌ها در مراحل تکوینی و در گونه‌های متنوع ماهیان مورد بررسی قرار گیرد (Cabrita et al., 2006).

در پژوهش حاضر، در میان مواد ضد انجماد مورد بررسی، کمترین سمیت پس از غوطه‌وری در گلیسرول مشاهده شد و پس از آن، اتیلن‌گلیکول قرار داشت. در این میان بالاترین سمیت را استامید نشان داد که در برخی غلظت‌ها، درصد تفریخ را به صفر رساند.

کیفیت بالای گلیسرول به عنوان یک ماده ضدانجماد مناسب برای انجماد جنین آبزیان در جنین میگوی ببری سیاه (*Penaeus monodon*) مشاهده شد (Vuthiphandchai et al., 2005). با این وجود استفاده از گلیسرول

در جنین بسیاری از گونه‌های آبزی مانند ماهی گورخری (Zhang et al., 1993)، میگوی پنائیده (Alfaro et al., 2001)، ماهی کفشک فلاندر *Paralichthys olivaceus* (Zhang et al., 2005)، سیم دریایی قرمز *Pagrus major* (Xiao et al., 2008)، ماهی سفید ژاپنی *Sillago japonica* (Rahman et al., 2008)، تاس‌ماهی ایرانی *Acipenser persicus* (Keivanloo and Sudagar, 2013) و ماهی قرمز *Carassius auratus* (Shaluei et al., 2013) نتایج مناسبی را به همراه نداشت و جنین این گونه‌ها نتوانستند غلظت‌های مختلف این ماده را تحمل کنند.

اتیلن‌گلیکول نیز یکی دیگر از موادضد انجمادی است که کاربرد گسترده‌ای در زمینه انجماد جنین آبزیان دارد. نتایج بررسی جنین سیم دریایی سرطلایی *Sparus aurata* نشان داد جنین این گونه به خوبی توانست غلظت‌های مختلف این ماده را تحمل کند (Cabrita et al., 2006) اما، جنین‌های توربوت (Cabrita et al., 2003b) و کفشک ماهی (Zhang et al., 2005) نسبت به این ماده حساس بودند و به دنبال غوطه‌وری در این ماده درصد تفریخ در آن‌ها به طور معنی-داری کاهش یافت. نتایج بررسی‌های صورت گرفته بر جنین ماهی فلاندر نیز نشان داد، اتیلن‌گلیکول در تمامی غلظت‌ها برای جنین این گونه سمی بود (Chen andTian, 2005). در جنین ماهی درام قرمز *Sciaenops ocellatus*، اتیلن‌گلیکول حتی در پایین‌ترین غلظت‌ها هم اثرات سمی داشت (Robertson et al., 1988). جنین تاس‌ماهی ایرانی نیز نتوانست غلظت‌های مختلف این ماده را تحمل کند (Keivanloo and Sudagar, 2013). مشابه نتایج گزارش شده، در این پژوهش، در جنین ماهی کپور معمولی نیز اثرات سمی اتیلن‌گلیکول، کاهش درصد تفریخ را به دنبال داشت.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد جنین ماهی کپور معمولی نیز همانند تاس‌ماهی ایرانی (Keivanloo and Sudagar, 2013)، حساسیت بالایی نسبت به غلظت‌های مختلف استامید داشت به طوری که در غلظت‌های بالاتر از ۲ مولار استامید، درصد تفریخ به طور معنی‌داری کاهش یافت و در غلظت ۴ مولار این ماده هیچ یک از جنین‌ها تفریخ نشد و درصد بقا به صفر رسید.

اثر هر ماده ضد انجماد نه تنها به ویژگی‌ها و خواص شیمیایی آن، بلکه به مدت زمان غوطه‌وری در آن نیز بستگی دارد. بررسی‌های

صورت گرفته بر لارو میگوی آب شیرین *Macrobrachium rosenbergii* (Pillai et al., 2001) و جنین ماهی‌های توربوت (Cabrita et al., 2003b)، سیم دریایی سرطلایی (Cabrita et al., 2006)، سیم دریایی قرمز (Xiao et al., 2008) و ماهی قرمز (Shaluei et al., 2013) نشان داد، افزایش زمان غوطه‌وری در مواد ضد انجماد سبب شد سمیت این مواد نیز افزایش یابد. در جنین ماهی کپور معمولی نیز افزایش مدت زمان غوطه‌وری (از ۵ به ۱۵ دقیقه) سبب شد غلظت قابل تحمل مواد ضد انجماد در جنین به طور معنی‌داری کاهش یابد. با وجود آن که علت اصلی و نحوه بروز این صدمات هنوز ناشناخته است اما، این احتمال وجود دارد که مواد ضد انجماد سبب ایجاد صدمات و اثرات زیان‌آوری در همه یا بخشی از پیکره موجود شده باشند و از این رو درصد تفریخ را کاهش دهند. به نظر می‌رسد مدت زمان غوطه‌وری در معرض مواد ضد انجماد ، عامل مهمی است به ویژه هنگامی که غلظت این مواد بالا باشد. با این حال، توجه به این نکته ضروری است که برای دستیابی به انجماد موفقیت‌آمیز جنین، باید مقداری کافی از مواد ضد انجماد به درون پیکره جنین وارد شود و این مستلزم استفاده از غلظت‌های بالای مواد ضد انجماد است. نتایج بررسی‌های صورت گرفته در این زمینه نیز حاکی از آن است که ارتباط مستقیمی بین غلظت‌های بالای این مواد و موفقیت در امر انجماد جنین وجود دارد (Cabrita et al., 2006).

جنین ماهیان در مراحل اولیه تکوین جنینی از نفوذپذیری و تراوایی نسبتا بالایی برخوردار هستند، اما نسبت به ورود مواد ضد انجماد و تغییرات غلظت مایعات درون و برون سلولی بسیار حساس بوده، خطر مرگ جنین وجود دارد (Vuthiphandchai et al., 2005). در طی مراحل تکوین جنینی آبزیان از جمله ماهی، بی‌مهرگان دریایی و سخت‌پوستان، حساسیت نسبت به مواد ضد انجماد کاهش یافته و مقاومت در برابر سمیت مواد ضد انجماد افزایش می‌یابد (Simon et al., 1994; Newton and Subramoniam, 1996; Urbanyi et al., 1997; Dinnyes et al., 1998; Liu et al., 1998). نتایج بررسی‌ها در جنین ماهی درام قرمز نشان داد این گونه در مرحله ظهور دم نسبت به مرحله مورولا، حساسیت کمتری نسبت به غلظت‌های مختلف مواد ضد انجماد دارد. علت این امر می‌تواند افزایش تحمل نسبت به دستکاری،

تغییر در تراوایی و نفوذپذیری غشای سلولی و توانایی تنظیم اسمزی باشد (Robertson et al., 1988). در جنین تاس‌ماهی ایرانی نیز با پیشرفت روند تکوین جنین از ۲۴ به ۴۸ ساعت، حساسیت جنین نسبت به مواد ضد انجماد کاهش یافت (Keivanloo and Sudagar, 2013). نتایج بررسی صورت گرفته در ماهی قرمز (Shalueiet al., 2013) و کپور معمولی (Dinnyes et al., 1998) نشان داد این گونه‌ها در مرحله ضربان قلب حداقل حساسیت را نسبت به سمیت مواد ضد انجماد و کاهش دما داشتند. در این پژوهش در جنین ماهی کپور معمولی نیز با پیشرفت روند تکاملی از مرحله روخزیدگی ناقص به مرحله ضربان قلب، حساسیت جنین نسبت به مواد ضد انجماد کاهش یافت. علت این امر می‌تواند افزایش تحمل نسبت به دستکاری، تغییر در تراوایی و نفوذپذیری غشای سلولی و توانایی تنظیم اسمزی باشد (Dinnyes et al.,1998). این مشاهده با نتایج چندین مطالعه دیگر بر جنین ماهی کپور معمولی (Dinnyes et al., 1998)، ماهی قرمز (Liu et al., 1993; Shaluei et al., 2013) و ماهی سر ماری *Channa striata* (Sharifuddin and Azizah, 2014) مطابقت داشت.

در مرحله ضربان قلب، سیستم گردش خون به طور کامل در حال فعالیت است و می‌تواند موجب ممانعت یا کاهش صدمات شود و از سوی دیگر کارایی مکانیسم‌های ترمیم و بازسازی را افزایش دهد (Dinnyes et al., 1998). همچنین بررسی‌ها نشان داد افزایش تحمل نسبت به سمیت مواد ضد انجماد با پیشرفت روند تکوین جنینی، ممکن است به علت کاهش سرعت تقسیمات سلولی و عدم همزمانی چرخه‌های تقسیم سلول در مراحل پایانی تکوین باشد (Roubaud et al., 1985).

نتایج به دست آمده از این بررسی، بیانگر اهمیت مطالعات اختصاصی سمیت مواد ضد انجماد در هر گونه برای تعیین غلظت‌های مناسب هر یک از این مواد است. در این مطالعه مکانیسم سمیت مواد ضد انجماد مورد ارزیابی قرار نگرفت اما مواردی از جمله دناتوره شدن آنزیم‌ها، اختلال در عملکرد پمپ‌های یونی تراغشایی، از هم گسیختگی و ایجاد اختلال در سیستم حمل و نقل میتوکندری و انحلال و متلاشی شدن ساختار DNA به عنوان اثرات مخرب مواد ضد انجماد بر سلول‌ها مطرح شده‌اند (Bonner and Klibanov, 2000; Mande and Sobhia, 2000; Spikings et al., 2012).

در مجموع به نظر می‌رسد با توجه به آن که اولین گام ضروری در مطالعات انجماد جنین ماهیان، آزمایش سمیت مواد ضد انجماد و تعیین غلظت‌های قابل تحمل مواد ضد انجماد است، آگاهی از اطلاعات پایه در زمینه اثر سمیت مواد ضد انجماد، مدت زمان مناسب برای غوطه‌وری جنین در این مواد و یافتن مرحله جنینی مناسب نکات کلیدی در طراحی یک دستورالعمل مناسب برای انجماد و نگهداری جنین ماهیان است. همان طور که نتایج پژوهش حاضر نشان داد گلیسرول و اتیلن‌گلیکول می‌توانند مواد ضد انجماد مناسبی برای انجماد جنین ماهی کپور معمولی در مرحله ضربان قلب باشند.

منابع

ستاری م.، شاهسونی د. و شفیعی ش. ۱۳۸۳. ماهی‌شناسی ۲ (سیستماتیک). نشر حق‌شناس. ۵۰۲ص.

سوداگر م. و کیوانلو س. ۱۳۹۱. کاربردهای انجماد جنین در آبزیان. دومین همایش ملی منابع شیلاتی دریای خزر. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. گرگان. ص: ۴-۱.

کیوانلو س. و سوداگر م. ۱۳۹۱. تاثیر عوامل موثر در سمیت مواد ضدانجماد در جنین ماهیان. مجله حفاظت و بهره‌برداری از منابع طبیعی، ۱(۲): ۸۴-۷۳.

کیوانلو س.، حاجی‌بگلو ع.ع. و سوداگر م. ۱۳۹۰. مطالعات اولیه بر روی انجماد (محافظت در برابر سرما) در جنین ماهیان. دومین کنفرانس ملی علوم شیلات و آبزیان ایران. دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان. لاهیجان. ص: ۲۳۳-۲۲۹.

Ahammad M.M., Bhattacharyya D. and Jana B.B. 1998. Effect of different concentrations of cryo-protectant and extender on the hatching of Indian major carp embryos (*Labeo rohita*, *Catla catla*, and *Cirrhinus mrigala*) stored at low temperature. Cryobiology, 37(4): 318–324.

Ahammad M.M., Bhattacharyya D. and Jana B.B. 2002. The hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos in response to exposure to different concentrations of cryo-protectant at low temperatures. Cryobiology, 44(2): 114–121.

Ahammad M.M., Bhattacharyya D. and Jana B.B. 2003. Hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos stored at 4 and -2ºC in different concentrations of methanol and sucrose. Theriogenology. 60(8): 1409–1422.

Alfaro J., Komen J. and Huisman E.A. 2001. Cooling, cryoprotectant and hypersaline sensitivity of penaeid shrimp embryos and nauplius larvae. Aquaculture, 195: 353–366.

Beirao J., Robles V., Herraez M.P., Sarasquete C., Dinis M.T. and Cabrita E. 2006. Cryoprotectant microinjection toxicity and chilling sensitivity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. Aquaculture, 261: 897–903.

Bonner G. and Klibanov A.M. 2000. Structural stability of DNA in non-aqueous solvents. Biotechnology Bioengineering, 68: 339–344.

Cabrita E., Chereguini O., Luna M., De Paz P. and Herraez M.P. 2003a. Effect of different treatments on the chorin permeability to DMSO of turbot

embryos (*Scophtalmus maximus*). Aquaculture, 221: 593–604.

Cabrita E., Robles V. and Herraez M.P. 2008. Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species. CRC Press. 572P.

Cabrita E., Robles V., Chereguini O., Wallace J.C. and Herraez M.P. 2003b. Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). Cryobiology, 47: 204–213.

Cabrita E., Robles V., Wallace J.C., Sarasquete M.C. and Herraez M.P. 2006. Preliminary studies on the cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. Aquaculture, 251: 245–255.

Chao N.H., Lin T.T., Chen Y.J., Hsu H.W. and Liao I.C. 1997. Cryopreservation of late embryos and early larvae in the oyster and hard clam. Aquaculture, 155: 31–44.

Chen S.L. and Tian Y.S. 2005. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. Theriogenology, 63: 1207–1219.

Dinnyes A., Urbanyi B., Baranyai B. and Magyary I. 1998. Chiling sensivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the presence of cryoprotectants: Work in progress. Theriogenology, 50: 1–13.

Donaldson E. 1996. Manipulation of reproduction in fanned fish. Animal Reproduction Science, 42: 381–392.

Keivanloo S. and Sudagar M. 2013. Preliminary studies on the cryo-preservation of Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) embryos. Open Access Scientific Reports, 2(3): 1–6.

Keivanloo S. and Sudagar M. 2016. Cryopreservation of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) embryos by DMSO-based vitrificant solutions. Theriogenology, 85: 1013–1018.

Liu K., Chou T. and Lin H.D. 1993. Cryosurvival of goldfish embryo after subzero freezing. Aquatic Living Resources, 6(1): 63–66.

Liu X.H., Zhang T. and Rawson D.M. 1998. Feasibility of vitrification of zebrafish (*Danio rerio*) embryos using methanol. Cryo Letters, 19: 309–318.

Mande S.C. and Sobhia M.E. 2000. Structural characterization of proteindenaturant interactions: Crystal structures of hen egg-white lysozyme in complex with DMSO and guanidinium chloride. Protein Engineering, 13: 133–141.

McAndrew B., Rana K. and Penman D. 1995. Conservation and preservation of genetic variation in aquatic organisms. P:

295–336. In: Muir J.F. and Roberts R.J. (Eds.). Recent Advances in Aquaculture IV. Blackwell Scientific Publications, London.

Newton S.S. and Subramoniam T. 1996. Cryoprotectant toxicity in penaeid prawn embryos. Cryobiology, 33(1): 172–177.

O'Neil L., Paynter S.J., Fuller B.J. and Shaw R.W. 1998. Vitrification of mature mouse oocytes in a 6 M DMSO solution supplemented with antifreeze glycolproteins. Cryobiology, 37: 59– 66.

Okada Y. 1960. Studies on the freshwater fishes of Japan. Prefectural University of Mie Tsu, Mie Prefecture, Japan. 860P.

Otoi T., Yamamoto K., Koyama N., Tachikama S. and Suzuki T. 1998. Cryopreservation of mature bovine oocytes by vitrification in straws. Cryobiology, 37: 77–85.

Pillai B.R., Rao K.J. and Mohanty J. 2001. Toxicity of selected cryoprotectants to the first zoeal stages of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Asian Fisheries Science, 14: 1–8.

Rahman S.M., Majhi S.K., Suzuki T., Matsukawa S., Strussmann C.A. and Takai R. 2008. Suitability of cryoprotectants and impregnation protocols for embryos of Japanese whiting *Sillago japonica*. Cryobiology, 57: 170–174.

Rail W.F. 1993. Advances in the cryopreservation of embryos and prospects for application to the conservation of salmonid fishes. P: 137–158. In: Cloud J.G. and Thorgaard G.H. (Eds.). Genetic Conservation of Salmonid Fishes. Plenum Press, New York, USA.

Robertson S.N., Lawrence A.L., Neil W.H., Arnold C.R. and McCarty G. 1988. Toxicity of the cryoprotectants glycerol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, methanol, sucrose, and sea salt solution to the embryos of red drum. Progressive Fish Culturist, 50: 148–154.

Robles V., Cabrita E., Real M., Alvarez R. and Herraez M.P. 2003. Vitrification of turbot embryos: Preliminar assays. Cryobiology, 47: 30–39.

Roubaud P., Chaillou C. and Sjafei D. 1985. Variations cycliques de la toldrance a un choc thermique froid appliqu6 au cours de la segmentation de l'embryon de la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.). Canadian Journal of Zoology, 63(3): 657–663.

Shaluei F., Imanpoor M.R., Shabani A. and Nasr-Esfahani M.H. 2013. Effect of different concentrations of permeable and non-permeable cryoprotectants on the hatching rate of goldfish (*Carassius*

auratus) embryos. Asian Pacific Journal of Reproduction, 2: 185–188.

Sharifuddin M.M and Azizah S.M.N. 2014. Preliminary studies on cryopreservation of snakehead (*Channa striata*) embryos. Cryobiology, 69(1): 1–9.

Simon C., Dumont P., Cuende F.X. and Diter A. 1994. Determination of suitable freezing media for cryopreservation of *Penaeus indicus* embryos. Cryobiology, 31: 245–253.

Spikings E., Zampolla T., Rawson D., Wang Y. and Zhang T. 2012. Effect of methanol on mitochondrial organization in zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles. Theriogenology, 77: 28–38.

Suzuki T., Komada H., Takai R., Arii K. and Kozima T.T. 1995. Relation between toxicity of cryoprotectant DMSO and its concentration in several fish embryos. Fisheries Science, 61: 193–197.

Tian Y., Jiang J., Song L., Chen Z., Zhai J., Liu J., Wang N. and Chen S. 2015. Effects of cryopreservation on the survival rate of the seven-band grouper (*Epinephelus septemfasciatus*) embryos. Cryobiology, 71: 499–506.

Urbanyi B., Baranyai B. and Dinnyes A. 1998. Chilling sensitivity of non-activated carp (*Cyprinus carpio*) eggs. Theriogenology, 49(1): 172.

Urbanyi B., Baranyai B., Magyary I. and Dinnyes A. 1997. Toxicity of methanol, DMSO and glycerol on carp (*Cyprinus carpio*) embryos in different development stages. Theriogenology, 47: 408.

Vuthiphandchai V., Pengpun B. and Nimrat S. 2005. Effects of cryoprotectant toxicity and temperature sensitivity on the embryos of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture, 246: 275–284.

Xiao Z.Z., Zhang L.L., Xu X.Z., Liu Q.H., Liu Q.H. and Li J. 2008. Effect of cryoprotectants on hatching rate of red seabream (*Pagrus major*) embryos. Theriogenology, 70: 1086–1092.

Zhang T., Rawson D.M. and Morris G.J. 1993. Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebrafish (*Brachydanio rerio*). Aquatic Living Resources, 6(2): 145–153.

Zhang X.S., Zhao L., Hua T.C. and Zhu H.Y. 1989. A study on cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) embryos. Cryo Letters, 10: 271–278.

Zhang Y.Z., Zhang S.C., Liu X.Y., Xu Y.J., Hu J.H., Xu Y.Y., Li J. and Chen S.L. 2005. Toxicity and protective efficency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. Theriogenology, 63: 765–773.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 5, No. 2, Summer 2017

Effect of the cryoprotectants glycerol, ethylene glycol and acetamide on hatching rate of common carp (*Cyprinus carpio*) embryos

Mohammad Sudagar[1], Saeide Keivanloo[2]*, Mohammad Mazandarani[3]

Received: October 2016 Accepted: December 2016

Abstract

Fish embryo cryopreservation means substitution of the body water with a cryoprotectant. Knowledge of cryoprotectants toxicity is one of the prerequisites for the design of embryo cryopreservation protocols. In the present study common carps (*Cyprinus carpio*) in two stages of embryonic development, half-epiboly (8 h post-fertilization) and heartbeat (32 h post-fertilization) stage, were exposed to pronase, type XIV of *Streptomyces griseus*, for 5 min. Permeabilized embryos were immersed in various cryoprotectants including glycerol, ethylene glycol and acetamide in concentrations of 1, 2, 3 and 4M for a period of 5 and 15min. Embryos were then washed and incubated until hatching. The toxicity of the cryoprotectant was assessed by the hatching rate. The results indicated that glycerol had less toxicity compared to ethylene glycol and acetamide. Moreover, embryos could tolerate glycerol in high concentrations. Acetamide was found to be the most toxic cryoprotectant. Reduced hatching rate may be a result of osmotic shock, ionic imbalance or consequence of cryoprotectant toxicity. As concentrations were increased, hatching rate decreased. Similarly, hatching rates of embryos were decreased as the exposure time increased (5 to 15 min). With the increasing of the embryonic development sensitivity to cryoprotectant were decreased. Results suggest that glycerol and ethylene glycol would be good options for cryopreservation of common carp embryos at heartbeat stage.

Key words: *Cryoprotectants*, *Embryo*, Cyprinus carpio, *Toxicity*, *Hatching Rate*.

1- Associate Professor in Department of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
2- Ph.D. in Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
3- Assistant Professor in Department of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
*Corresponding Author: Skeivanloo@yahoo.com