

اثر افزودن محافظت کننده‌های نفوذناپذیر بر انجماد و شاخص‌های کیفی اسپریم ماهی قره‌برون (*Acipenser persicus*)

سلیمه قوچانیان^۱، محمدرضا کلباسی^{۲*}، محسن شرفی^۳

تاریخ پذیرش: اسفند ۹۸

تاریخ دریافت: بهمن ۹۸

چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر محافظت کننده‌های نفوذناپذیر آلبومین سرم گاوی (BSA)، لسیتین و ترهالوز بر شاخص‌های کیفی در انجماد اسپریم ماهی قره‌برون انجام شد. در این راستا، از ۵ قطعه مولد نر ماهی قره‌برون نمونه اسپریم تهیه شد و پس از رقیق‌سازی با ترکیب‌های مختلف محافظت کننده، انجماد صورت گرفت. پس از گذشت ۳ ماه، شاخص‌های کیفی اسپریم‌های یخ‌گشایی شده توسط نرم‌افزار Image J و فعالیت میتوکندری به روش رنگ‌آمیزی فلورسنت JC-1 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه برآیند حرکت اسپریم‌ها، مسیر حرکت چرخشی را در تیمار BSA و مسیر حرکت خطی را در تیمار «BSA + ترهالوز» نشان داد. در بررسی شاخص‌های حرکتی، بالاترین سرعت قوس‌دار در اسپریم‌های یخ‌گشایی شده در تیمار «BSA + ترهالوز» (۱/۷۴ میکرومتر بر ثانیه)، بالاترین میزان سرعت خطی در تیمار BSA و تیمار ترهالوز (۰/۳۰ میکرومتر بر ثانیه) و بالاترین درصد حرکت خطی در تیمار حاوی ترهالوز و تیمار «لسیتین + ترهالوز» (به ترتیب ۲۳/۸۷ و ۲۵/۴۸ درصد) ثبت شد. بالاترین تاثیر محافظت کننده‌ها بر میزان تحرک اسپریم‌های یخ‌گشایی شده در تیمار «BSA + ترهالوز» (۳/۴۹ درصد) و بیشترین تاثیر آن‌ها بر فعالیت میتوکندری در تیمار ترهالوز (۱۰/۵۸ درصد) ملاحظه شد. از این رو، استفاده از BSA به همراه ترهالوز می‌تواند تاثیر بالقوه‌ای در کاهش آسیب‌های سلولی در طی انجماد اسپریم این گونه ارزشمند دریای خزر و حفاظت و توسعه تکثیر مصنوعی آن داشته باشد.

واژگان کلیدی: انجماد طولانی مدت، BSA، لسیتین، ترهالوز، ماهی قره‌برون.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و مهندسی شیلات، گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.

۲- استاد گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.

۳- استادیار گروه علوم طیور، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: kalbassi_m@modares.ac.ir

مقدمه

ارزشمند شده است. به طوری که در سال ۲۰۱۵ در فهرست گونه‌های در معرض خطر انقراض اتحادیه بین المللی حفاظت از طبیعت IUCN قرار گرفتند. با وجود این مشکلات، توانایی ایجاد بانک انجماد اسپرم، تکثیر مصنوعی و پرورش ماهیان یکی از بهترین روش‌های تسهیل کننده در حفاظت گونه‌ای است (پورکاظمی، ۱۳۸۷؛ مکنث‌خواه و همکاران، ۱۳۹۴؛ Alavi and Cosson, 2006; Shaluei et al., 2017). در این راستا، تکنیک استاندارد برای انجماد اسپرم تمام گونه‌های ماهی وجود ندارد. مهم‌ترین چالش در انجماد اسپرم متوقف کردن فعالیت‌های متابولیکی اسپرم در طی انجماد است، به گونه‌ای که تحرک اسپرم تا زمان یخ‌گشایی و فرآیند لقاح به تعویق بیفتد. با توجه به تنش‌های اسمزی، شیمیایی و مکانیکی که در طی فرآیند انجماد اسپرم اتفاق می‌افتد بر زنده‌مانی، یکپارچگی غشای میتوکندری و تکه‌تکه شدن DNA اسپرم اثر منفی خواهد گذاشت (Aboagla and Terada, 2004; Figueroa et al., 2013). از این رو، با هدف کاهش این نوع آسیب‌های سلولی از انواع رقیق کننده‌ها و نیز محافظت کننده‌های نفوذی و غیرنفوذی به همراه افزودنی‌هایی مثل قند و

در چند دهه گذشته، صنعت آبی‌پروری به ویژه پرورش ماهی رشد چشمگیری داشته است. با توجه به مشکلات حفاظت از برخی گونه‌های ماهی، انجماد نقش مهمی در حفاظت از ماهی‌های با ارزش بالای زیستی و اقتصادی ایفا کرده است (Magnotti et al., 2018). انجماد شاخه‌ای از علم کرایوبیولوژی (Cryobiology) است که به واسطه آن می‌توان سلول‌های زنده، بافت‌ها، لارو و غیره را در دماهای پایین (معمولاً در ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) به مدت‌های طولانی، بدون کاهش در کیفیت نگهداری کرد. به طوری که استفاده از این تکنیک به عنوان یک روش جهانی ایمن برای انتقال اسپرم، برنامه‌های دوره‌گیری، مطالعات ژنتیکی یا حفاظت گونه‌های در معرض خطر معرفی شده است (Shaluei et al., 2017).

دریای خزر با داشتن ذخایر با ارزش آبزیان، به ویژه ماهیان خاویاری از اهمیت تجاری، اکولوژیکی و تنوع زیستی خاصی برخوردار است. ماهیان خاویاری دارای ۲۵ گونه از ۴ جنس هستند که عمدتاً به دلیل داشتن خاویار از باارزش‌ترین گونه‌های تجاری محسوب می‌شوند. در سال‌های اخیر صید بی‌رویه و تخریب محیط زیست آن‌ها، منجر به کاهش ذخایر این ماهی

آنتی‌اکسیدان‌ها، در محیط انجمادی استفاده می‌شود (Hezavehei et al., 2018).

در سال‌های اخیر محافظت‌کننده‌های گیاهی بر پایه لسیتین سویا (Soybean Lecithin) و لیپوپروتئین‌هایی با چگالی کم کشف شده است که می‌توانند به طور مستقیم با گونه فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species: ROS) مبارزه کنند (Bousseau et al., 1998; Forouzanfar et al., 2010). در این راستا استفاده از یک کمک محافظت‌کننده در کنار لسیتین سویا می‌تواند باعث تقویت اثرات محافظتی آن شود که می‌تواند آنتی‌اکسیدان‌ها، قندهای مرکب و یا حتی عصاره‌های گیاهی باشد (Yildiz et al., 2013). در مطالعه‌ای به تاثیر لسیتین سویا در جایگزینی زرده تخم مرغ در انجماد اسپرم ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) پرداخته شد. در این مطالعه، رقیق‌کننده در غلظت‌های متفاوت (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد) به ترکیب حاوی ۳۰۰ میلی‌مولار گلوکز، ۱۰ درصد زرده تخم مرغ و DMSO (Dimethyl Sulfoxide) اضافه شد و اثر محافظتی بهتری در تحرک اسپرم و طول مدت تحرک در غلظت ۱۰ درصد لسیتین سویا نسبت به غلظت‌های دیگر گزارش شد (Yildiz et al., 2013). آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin: BSA) از محافظت‌کننده‌های آنتی‌اکسیدانی در انجماد اسپرم است که به عنوان پروتئین‌های درون پلاسما به شمار می‌رود و تاثیر به سزایی در میزان تحرک اسپرم دارد (Cabrita et al., 2001). در این راستا، Figueroa و همکاران (۲۰۱۶) انجماد اسپرم ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) را با هدف انتخاب بهترین غلظت پلاسمای سمینال با روش انجماد ویتریفیکیشن (Vitrification) انجام دادند و در این مطالعه از بافر استاندارد Cortland[®] Medium، ۱۰ درصد DMSO، ۲ درصد BSA، ۰/۱۳ مولار ساکاروز و پلاسمای سمینال با غلظت‌های ۳۰، ۴۰ و ۵۰ درصد استفاده کردند. پس از انجماد و یخ‌گشایی شاخص‌های کیفی اسپرم مانند شکسته شدن DNA، پتانسیل غشای میتوکندری و تحرک اسپرم را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج به دست آمده از بهترین غلظت در پلاسمای سمینال ۵۰ درصد با شکست DNA ۹/۲ درصد، یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم ۹۸/۶ درصد، پتانسیل غشای میتوکندری ۴۷/۲ درصد و تحرک ۴۴/۱ درصد را گزارش کردند (Figueroa et al., 2016).

ترهالوز یک دی‌ساکارید غیر احیا کننده و قندی طبیعی است که به دلیل داشتن وزن

از این رو، هدف مطالعه حاضر بررسی اثر BSA و لسیتین سویا به همراه ترهالوز بر شاخص‌های کیفی در انجماد اسپرم ماهی قره‌برون است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در فصل تکثیر ماهیان خاویاری (فروردین ۱۳۹۷) در آزمایشگاه دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس و با همکاری مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید رجایی ساری انجام شد.

القای رسیدگی جنسی مولدین

به منظور القای رسیدگی جنسی، مولدین نر ماهی قره‌برون (*Acipenser persicus*) نگهداری شده در مرکز شهید رجایی به میزان ۲-۳ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن مورد تزریق عضلانی هورمون LHRH-A2 (Ningbo Sansheng، چین) قرار گرفتند (Nazari et al., 2010). پس از بررسی آمادگی جنسی برای اسپرم‌دهی، استحصال اسپرم از ۵ قطعه ماهی نر با رعایت شرایط بهداشتی صورت گرفت. نمونه استحصال شده تا زمان بررسی‌های کیفی در لوله آزمایش جمع‌آوری، کدبندی و در جعبه فومی حاوی یخ خشک (۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری و بلافاصله به آزمایشگاه دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور برای

مولکولی بالا، قادر به عبور از غشا نیست و نقش برون سلولی ایفا می‌کند (Bucak and Tekin, 2007; Hu et al., 2010; Solocinski et al., 2017). در همین راستا، Gheller و همکاران (۲۰۱۹) از ترهالوز در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار در انجماد اسپرم گربه‌ماهی آمازون (*Amazonian Catfish*، *Leiarius marmoratus*) استفاده کردند و گزارش کردند که تفاوت آماری معنی‌داری در غلظت‌های متفاوت ترهالوز پس از یخ‌گشایی در آزمایش یکپارچگی غشای اسپرم، یکپارچگی DNA، عملکرد میتوکندری و مدت تحرک اسپرم وجود نداشت. اما تحرک رو به جلو تیمارهای حاوی غلظت‌های بالاتر ترهالوز، نتایج برتری را در مقایسه با موارد دیگر نشان داد (Gheller et al., 2019).

با توجه به اهمیت حفظ ذخایر ژنتیکی ماهی قره‌برون (*Acipenser persicus*)، لزوم توسعه بانک اسپرم برای ماهیان خاویاری دریای خزر، تسهیل تکثیر مصنوعی آن‌ها و همچنین گزارش‌های منتشر شده مبنی بر اثرات مثبت BSA، لسیتین سویا و ترهالوز در رقیق‌کننده‌های انجمادی نفوذناپذیر، انجام پژوهشی برای امکان‌سنجی بهبود کیفیت اسپرم ماهی قره‌برون در روند انجماد، ضروری به نظر می‌رسد.

زیر ۷۰ درصد اسپرم‌های متحرک داشتند، حذف و بقیه جمع‌آوری شدند و برای آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. در هر مولد ۳ بار سنجش دوره تحرک اسپرم صورت پذیرفت (جدول ۱) (Dzuba et al., 1999; Rurangwa et al., 2004).

افزودن محافظت‌کننده‌ها به اسپرم
در این آزمایش از رقیق‌کننده گلوکز ۰/۲ مولار و متانول ۱۰ درصد (pH ۸/۰) استفاده شد (Aramli et al., 2015) و همچنین ترکیب‌های مختلفی از BSA، ترهالوز و لسیتین سویا به میزان ۱ درصد حجم نهایی رقیق‌کننده به عنوان محافظت‌کننده نفوذناپذیر در تیمارهای مختلف اضافه شدند (جدول ۲). سپس رقیق‌کننده با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با اسپرم به نسبت ۱:۳ مخلوط شد.

انجام آزمایش‌ها انتقال داده شد (Sarvi et al., 2006).

ارزیابی کیفی اسپرم

به منظور ارزیابی کیفی اسپرم ماهیان از روش سنتی و به صورت انفرادی برای هر مولد استفاده شد. برای این منظور، ۱ میلی‌لیتر اسپرم هر مولد بر روی لام قرار داده شد و میزان ۱۰ میکرولیتر از ترکیب NaCl ۳/۵ میلی‌مولار و Tris-HCl ۱۲ میلی‌مولار به عنوان محلول فعال‌کننده اسپرم ماهی قره‌برون به آن اضافه شد. سپس طول دوره حرکت رو به جلوی اسپرم (از لحظه شروع تحرک تا پایان حرکت رو به جلو) و طول کل دوره تحرک اسپرم‌ها (از لحظه شروع تا توقف ۹۹ درصد از سلول‌های اسپرم) با مشاهده زیر میکروسکوپ نوری (B-393، OPTIKA، ایتالیا) ارزیابی شد. نمونه‌هایی که

جدول ۱: ویژگی‌های نرهای مولد انتخاب شده برای انجام آزمایش (میانگین ± انحراف معیار)

شاخص‌ها	طول کل (cm)	وزن بدن (kg)	میزان تحرک (%)	تراکم اسپرم (×۱۰ ^۹ mL)
مقدار	۱۵۸/±۵۲/۷	۱۶/۶±۱/۳۶	۸۶/۱۷±۳	۱/۵۲±۰/۰۷

جدول ۲: ترکیب رقیق کننده‌ها و محافظت کننده‌های مورد استفاده برای تیمارهای مختلف آزمایش

تیمارها	گلوکز (مولار)	متانول (%)	BSA (%)	ترهالوز (%)	لسیتین سویا (%)
تیمار ۱	۰/۲	۱۰	-	-	-
تیمار ۲	۰/۲	۱۰	۱	-	-
تیمار ۳	۰/۲	۱۰	۱	-	۱
تیمار ۴	۰/۲	۱۰	۱	۱	-
تیمار ۵	۰/۲	۱۰	-	۱	-
تیمار ۶	۰/۲	۱۰	۱	۱	۱
تیمار ۷	۰/۲	۱۰	-	-	۱
تیمار ۸	۰/۲	۱۰	-	۱	۱

انجماد اسپرم

ترکیب اسپرم و رقیق کننده پس از گذراندن ۱۵ دقیقه زمان تعادل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به وسیله میکروسمپلر به پایوت‌های انجماد ۰/۵ میلی‌لیتری منتقل و توسط خمیر هماتوکریت بسته شدند. پس از هم‌دمایی پایوت‌های پر شده، اقدام به انجماد به روش دستی (فورگاسون) با رعایت فاصله ۲ سانتی‌متر سطح ازت مایع به مدت ۱۰ دقیقه و با نرخ انجماد ۳۰ درجه سانتی‌گراد در دقیقه منجمد شد (Cabrita et al., 2001). در نهایت پایوت‌ها به داخل ازت مایع (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) انتقال و برای نگهداری تا مدت ۳ ماه در تانک ازت مایع ذخیره شدند.

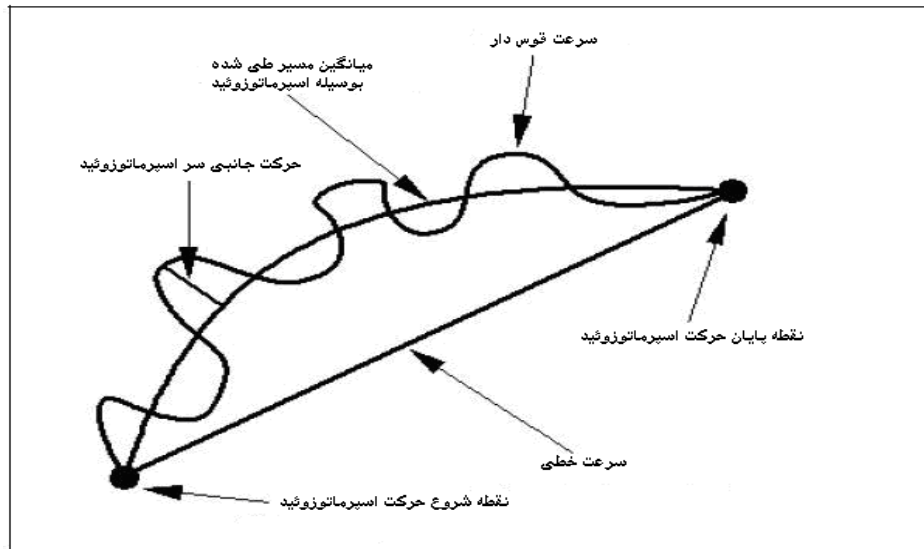
ذوب و یخ‌گشایی

برای بررسی کیفیت اسپرم‌های منجمد، پس از گذشت ۳ ماه اسپرم‌ها از حالت انجماد خارج شدند. برای این امر، پایوت‌ها در حمام آب گرم (۲۰ ثانیه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد) غوطه‌ور و بلافاصله مورد ارزیابی قرار گرفتند (Alipour et al., 2009). برای شروع حرکت اسپرم‌های یخ‌گشایی شده محلول فعال کننده اسپرم ماهی قره‌برون (۳/۵ میلی‌مولار، Tris-HCl ۱۲ میلی‌مولار) اضافه شد. سپس تصویربرداری با میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین فیلم‌برداری (DS126371، Canon، ژاپن) انجام شد.

به هر سلول اسپرم، یک کد اختصاصی داده شد و موقعیت تمامی سلول‌های اسپرم از یک فرم به فرم بعدی دنبال شد. در ادامه کار، شاخص‌های حرکتی اسپرم‌ها شامل سرعت قوس‌دار (میکرومتر بر ثانیه)، سرعت خطی (میکرومتر بر ثانیه)، حرکت خطی (درصد) طبق شکل ۱ توسط نرم افزار Image J مورد محاسبه و ارزیابی قرار گرفت (Lahnsteiner et al., 1996; Pavlov, 2006; Wilson-Leedy et al., 2009; Fauvel et al., 2010).

ارزیابی شاخص‌های تحرک توسط نرم‌افزار Image J

قطعات ویدئویی تهیه شده، توسط نرم‌افزار Total Video Converter به فرمت AVI تبدیل شدند. در ادامه ۱ دقیقه اول از تمامی قطعات ویدئویی تهیه شده با استفاده از نرم‌افزار Video CD Cutter به قطعات ۳ ثانیه‌ای، برای آنالیز در ثانیه‌های متفاوت پس از فعال‌سازی، تبدیل شد و سپس قطعات ویدئویی به دست آمده، توسط نرم‌افزار Image J به فرم‌های متوالی تبدیل شد. توسط این نرم‌افزار



شکل ۱: شاخص‌های قابل سنجش توسط نرم‌افزار Image J

ارزیابی فعالیت میتوکندری

برای ارزیابی فعالیت میتوکندری از روش رنگ‌آمیزی فلورسنت JC-1 استفاده شد. برای تهیه محلول رنگ‌آمیزی ابتدا ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از JC-1 (Sigma، آمریکا) در دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) حل شد. محلول رنگ‌آمیزی شامل ۱۰ میکروگرم محلول JC-1 در ۹۹۸ میلی‌لیتر محلول PBS بود. ۲ میکرولیتر از اسپرم یخ‌گشایی شده با محلول رنگ‌آمیزی مخلوط شد و در دمای اتاق و محیط تاریک به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. بعد از طی این مدت زمان، نمونه‌ها دو بار با بافر رنگ‌آمیزی JC-1 شسته شد. سپس بازتاب رنگ در پتانسیل غشای میتوکندری اسپرم‌های رنگ‌آمیزی شده در دستگاه فلوسیتومتر (Becton Dickinson، آمریکا) خوانده شد (Asturiano et al., 2006).

تجزیه و تحلیل آماری

برای انجام بررسی‌های آماری از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و پس‌آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. از نرم‌افزارهای SPSS 16 برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و Microsoft Excel 2013 برای رسم نمودار استفاده شد. کلیه آزمایش‌ها در سه تکرار

انجام و داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شد.

نتایج

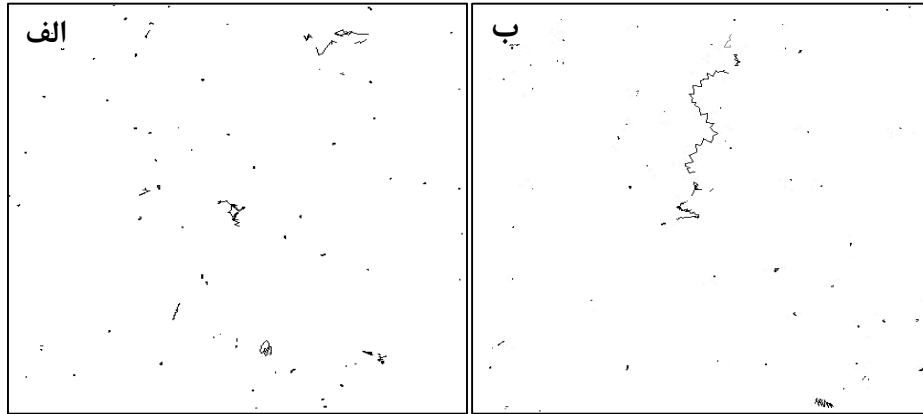
بررسی محافظت‌کننده‌های اسپرم ماهی قره‌برون توسط نرم‌افزار Image J

برآیند حرکت اسپرم‌های ماهی قره‌برون پس از انجماد و یخ‌گشایی در دوره زمانی ۳ ثانیه با محافظت‌کننده‌های متفاوت توسط نرم‌افزار Image J مورد بررسی قرار گرفت. طبق شکل ۱- الف مسیر حرکت چرخشی وجود داشت که مربوط به اسپرم‌های حاوی محافظت‌کننده تیمار ۲ (BSA) بود. همان‌طور که در شکل ۱- ب دیده می‌شود، حرکت خطی در اسپرم‌های حاوی محافظت‌کننده تیمار ۴ (BSA) + ترهالوز) نشان داده است.

ارزیابی اثر محافظت‌کننده‌ها بر شاخص‌های حرکتی اسپرم

بر اساس نتایج به دست آمده طبق جدول ۳ بالاترین سرعت قوس‌دار اسپرم‌های یخ‌گشایی شده ماهی قره‌برون در تیمار ۴ و برابر ۱/۷۴ میکرومتر بر ثانیه بود. اما در تیمارهای ۱، ۲، ۳، ۵، ۶، ۷ و ۸ به ترتیب برابر ۰، ۱/۴۶، ۰، ۱/۲۸، ۰، ۰ و ۰/۶۴ میکرومتر بر ثانیه بود. تیمار ۴ با

هفت تیمار دیگر اختلاف معنی‌دار داشت اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$).
 اما بین تیمارهای ۱، ۳، ۶ و ۷ ($P < 0.05$).



شکل ۲: مسیر حرکت اسپرم. الف) مسیر حرکت اسپرم در تیمار BSA. ب) مسیر حرکت اسپرم در تیمار BSA + ترهالوز

جدول ۳: اثر محلول‌های محافظت‌کننده غیرنفوذی بر شاخص‌های حرکتی اسپرم ماهی قره‌برون (میانگین \pm انحراف معیار)

تیمارها	شاخص‌ها	سرعت قوس‌دار (میکرومتر بر ثانیه)	سرعت خطی (میکرومتر بر ثانیه)	حرکت خطی اسپرم‌ها (درصد)
تیمار ۱	0.00 ± 0.00^e	0.00 ± 0.00^c	0.00 ± 0.00^d	
تیمار ۲	1.46 ± 0.10^b	0.30 ± 0.14^a	20.86 ± 0.67^b	
تیمار ۳	0.00 ± 0.00^e	0.00 ± 0.00^c	0.00 ± 0.00^d	
تیمار ۴	1.74 ± 0.47^a	0.18 ± 0.37^b	10.87 ± 2.58^c	
تیمار ۵	1.28 ± 0.00^c	0.30 ± 0.24^a	23.87 ± 1.73^a	
تیمار ۶	0.00 ± 0.00^e	0.00 ± 0.00^c	0.00 ± 0.00^d	
تیمار ۷	0.00 ± 0.00^e	0.00 ± 0.00^c	0.00 ± 0.00^d	
تیمار ۸	0.64 ± 0.00^d	0.16 ± 0.01^b	25.48 ± 2.31^a	

حروف لاتین غیرمشترک در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P < 0.05$).

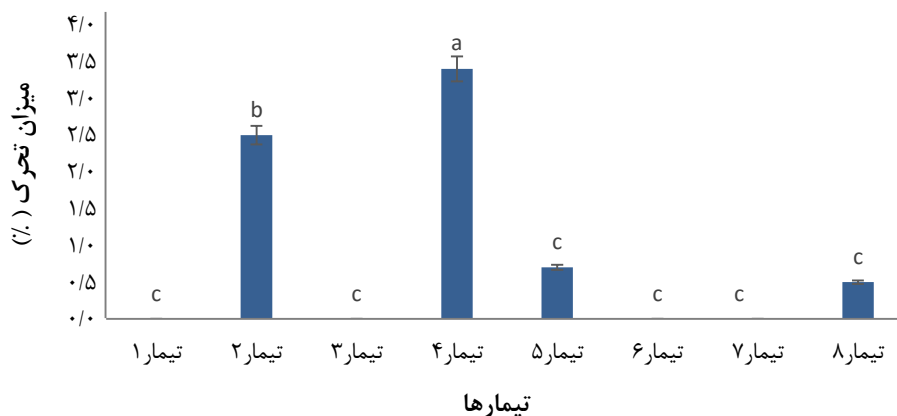
بین تیمارهای ۱، ۳، ۶ و ۷ برابر صفر بود و اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد.

اثر محلول‌های محافظت‌کننده بر درصد تحرک اسپرم ماهی قره‌برون

بر اساس نتایج به دست آمده، طبق شکل ۱ بالاترین درصد تحرک اسپرم‌های یخ‌گشایی شده در تیمار ۴ برابر ۳/۴۹ درصد بود و این تیمار با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌دار داشت ($P < 0.05$). پایین‌ترین درصد تحرک نیز در تیمارهای ۱، ۳، ۵، ۶، ۷ و ۸ مشاهده شد که با تیمارهای ۲ و ۴ اختلاف معنی‌داری داشتند ($P < 0.05$).

بالاترین میزان سرعت خطی اسپرم‌های یخ‌گشایی شده در تیمارهای ۲ و ۵ برابر با ۰/۳۰ میکرومتر بر ثانیه بود که با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌دار داشت ($P < 0.05$). در حالی که پایین‌ترین سرعت خطی در تیمارهای ۱، ۳، ۶ و ۷ برابر صفر و با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌دار داشت ($P < 0.05$).

بر اساس نتایج به دست آمده طبق جدول ۳ بالاترین درصد حرکت خطی اسپرم‌های یخ‌گشایی شده نیز در تیمارهای ۵ و ۸ به ترتیب برابر ۲۳/۸۷ و ۲۵/۴۸ درصد بود که با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌دار داشت ($P < 0.05$)، اما



شکل ۱: اثر محلول‌های محافظت‌کننده بر درصد تحرک اسپرم ماهی قره‌برون (میانگین \pm انحراف معیار). حروف لاتین غیرمشترک روی نمودار نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P < 0.05$).

اثر محلول‌های محافظت‌کننده بر فعالیت میتوکندری ماهی قره‌برون

بر اساس نتایج به دست آمده طبق جدول ۴ فعالیت میتوکندری توسط رنگ‌آمیزی فلورسنت JC-1 اندازه‌گیری شد. بالاترین فعالیت میتوکندری (۱۰/۵۸ درصد) در تیمار ۵ مشاهده شد. پایین‌ترین فعالیت میتوکندری (۵/۳ درصد) نیز در تیمار ۳ مشاهده شد که با تیمار ۱ اختلاف معنی‌دار داشت ($P < 0/05$)، ولی فاقد اختلاف معنی‌دار با تیمارهای ۱، ۲، ۴ و ۶ بود.

جدول ۴: اثر محلول‌های محافظت‌کننده بر فعالیت میتوکندری در ماهی قره‌برون (میانگین \pm انحراف معیار)

تیمارها	فعالیت میتوکندری (درصد)
تیمار ۱	۶/۳ \pm ۰/۳۵ ^{bc}
تیمار ۲	۷/۵ \pm ۰/۳۸ ^{abc}
تیمار ۳	۵/۳ \pm ۱/۶۱ ^c
تیمار ۴	۸/۷ \pm ۰/۶۴ ^{abc}
تیمار ۵	۱۰/۶ \pm ۰/۵۴ ^a
تیمار ۶	۷/۳ \pm ۱/۵۳ ^{abc}
تیمار ۷	۱۰/۰ \pm ۱/۱۳ ^{ab}
تیمار ۸	۱۰/۲ \pm ۰/۲۹ ^{ab}

حروف لاتین غیرمشترک نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P < 0/05$).

انجماد اسپرم روش مهمی برای حفظ پلاسمای جانوران و گیاهان است. این روش کاربرد گسترده‌ای در حفظ اسپرم ماهی دارد. با این حال انجماد اسپرم به دلیل شوک دمایی طی انجماد و یخ‌گشایی باعث آسیب‌های سلولی می‌شود (Muchlisin et al., 2020). تحرک اسپرم یکی از شاخص‌هایی است که به طور جدی تحت تاثیر انجماد قرار می‌گیرد و در نهایت نسبت عملکرد اسپرم در نمونه‌های منجمد و یخ‌گشایی شده به اسپرم تازه به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد (Butts et al., 2011). بنابراین مطالعات بر روی کارایی و سمیت محافظت‌کننده‌های مختلف و انتخاب محافظت‌کننده با کمترین سمیت اولین گام برای توسعه تکنیک انجماد اسپرم در گونه‌های مختلف است (Holt, 1997). از این رو، در مطالعه حاضر سعی شد تا با افزودن BSA (آلبومین سرم گاوی)، لسیتین سویا و ترهالوز به محلول رقیق‌کننده به حداقل رساندن آسیب به سلول‌ها در طی انجماد و بهبود شاخص‌های کیفی اسپرم ماهی قره‌برون کمک شود.

با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش مشخص شد از بین BSA، لسیتین سویا و ترهالوز، بهترین ماده محافظت‌کننده

آن‌ها نشان داد ترهالوز کارایی بالایی در محافظت از سلول‌های اسپرم در برابر آسیب‌های انجمادی در این گونه ماهی دارد.

کیفیت اولیه اسپرم نقش اساسی در موفقیت انجماد دارد. ترکیبات پلاسما سمینال اغلب نشان دهنده تغییرات محیط زندگی و شرایط دستکاری است. محتوای این مایع در رابطه با عوامل محیطی مانند فصل، دما، شوری آب و تغذیه مولدین متفاوت است (Alavi et al., 2008). از این رو، در این مطالعه از اسپرم ۳ مولد نر قره‌برون که دارای تحرک اسپرم بالای ۸۰ درصد بودند، استفاده شد. بر اساس مشاهدات به عمل آمده، اسپرم‌های تازه استحصال شده با تحرک بالا، پس از رقیق‌سازی در محلول فعال‌کننده در ۲-۳ دقیقه اول دارای بیشترین درصد تحرک و پس از سپری شدن این مدت، به سرعت، حرکت و درصد تحرک اسپرم‌ها کاهش یافت. چنین امری در مورد اسپرم‌های یخ‌گشایی شده نیز صادق است. Jun و همکاران (۲۰۰۶) و Aramli و همکاران (۲۰۱۳) اثرات انجماد را در اسپرم ماهی ارزیابی کردند و عنوان کردند که انجماد باعث کاهش تحرک اسپرم، کاهش سرعت و اختلال در عملکرد میتوکندری می‌شود که با توجه به نتایج به دست آمده، در مجموع درصد تحرک

برای انجماد اسپرم ماهی قره‌برون، BSA به همراه ترهالوز است. این نتیجه مشابه نتایج به دست آمده توسط Cabrita و همکاران در سال ۲۰۰۸ بود. این پژوهشگران، BSA را با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به عنوان محافظت‌کننده مناسب در انجماد اسپرم ماهی هامور (*Epinephelus marginatus*) عنوان کردند (Cabrita et al., 2008). همچنین Merino و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعاتی که بر روی انجماد اسپرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) انجام دادند، بالاترین میزان تحرک اسپرم را پس از یخ‌گشایی با BSA اعلام کردند. در بررسی دیگری که توسط Shalvei و همکاران در سال ۲۰۱۷ انجام پذیرفت، بهترین شرایط در انجماد اسپرم ماهی قره‌برون را با ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BSA گزارش دادند. از سوی دیگر، Miyaki و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعاتی که بر روی انجماد اسپرم ماهی هامور (*Epinephelus moara*) انجام دادند، بیشترین درصد تحرک اسپرم (۴۲ درصد) را با ترهالوز ۱۳ درصد اعلام کردند. در همین راستا، Gheller و همکاران (۲۰۱۹) از ترهالوز در انجماد اسپرم گربه‌ماهی آمازون (*Leiaris Amazonian Catfish marmoratus*) استفاده کردند و نتایج مطالعه

اسپرم‌های یخ‌گشایی شده ($1.0/58 \pm 0.54$) نیز در تیماری که حاوی محلول محافظت‌کننده ترهالوز بود، دیده شد. با وجود اختلاف نتایج به دست آمده از فعالیت میتوکندری و شاخص‌های تحرک اسپرم، مشخص شد که شاخص‌های تحرک معیار قطعی برای تعیین زنده‌مانی و سلامت سلول اسپرم نیستند، بر این اساس که سلول‌های اسپرم شاخص‌های تحرک را نشان ندادند، اما از میتوکندری سالمی برخوردار بودند و زنده‌مانی داشتند که این تفاوت می‌تواند به سبب آسیب در ساختار اسپرم باشد.

جمع‌بندی نتایج پژوهش حاضر موید آن است که استفاده از BSA به همراه ترهالوز می‌تواند تاثیر بالقوه‌ای در کاهش آسیب‌های سلولی در طی انجماد اسپرم ماهی قره‌برون، این گونه ارزشمند دریای خزر و حفاظت و توسعه تکثیر مصنوعی آن داشته باشد.

تشکر و قدردانی

از مسئولین پژوهشگاه رویان به دلیل در اختیار قرار دادن امکانات لازم برای انجام آزمایش JC-1 نهایت تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

اسپرم‌های یخ‌گشایی شده نسبت به اسپرم‌های تازه استحصال شده به طور قابل مشهودی کمتر بود. نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر بیان‌کننده یک مسیر کاهشی بود و نشان داد افزایش زمان نگهداری اسپرم منجمد شده بر روی کیفیت آن‌ها از ساعات اولیه تا ۳ ماه تاثیر منفی داشت.

در تمامی گونه‌های ماهی، عملکرد طبیعی میتوکندری عامل کلیدی در باروری اسپرم شناخته شده است، زیرا تحرک اسپرم ماهیان معمولاً ۳۰ ثانیه تا چند دقیقه طول می‌کشد. تحرک اسپرم تا حدودی وابسته به عملکرد میتوکندری است. میتوکندری در اطراف قطعه میانی حضور دارد تا انرژی قابل دسترس برای حرکت دم را فراهم کند. میتوکندری منبع اصلی انرژی اکسیداسیون سلول است که از طریق تولید ATP و انتقال زنجیره الکترونی تولید می‌شود (Holt, 1997; O'connell et al., 2002; Merino et al., 2012). از آنجا که این شاخص حساس به سرما است، از این رو ارزیابی فعالیت میتوکندری می‌تواند شاخص با ارزشی برای تعیین سلامت و عملکرد سلول اسپرم باشد. با توجه به نتایج به دست آمده در آزمایش مشخص شد که بالاترین فعالیت میتوکندری

منابع

- استروئیدهای جنسی و ترکیب لاشه در بچه ماهیان ازون‌برون (*Acipenser stellatus*) تغذیه شده با هورمون ۱۷-بتا استرادیول. مجله علمی شیلات ایران، ۲۴(۱): ۷۵-۵۹.
- Aboagla E.M.E. and Terada T. 2004.** Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, 62(6): 1160–1172.
- Alavi S.M.H. and Cosson J. 2006.** Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biology International*, 30(1): 1–14.
- Alavi S.M.H., Cosson J., Coward K. and Rafiee G. 2008.** Fish Spermatology: Implications for aquaculture management. *Fish Spermatology*, 397-460.
- Alavi S.M.H., Linhart O., Coward K. and Rodina M. 2008.** Fish spermatology: Implications for aquaculture management. P: 397–460. In: Alavi S.M.H., Cosson J.J., Coward K. and Rafiee G. (Eds.). *Fish Spermatology*. Alpha Science International Ltd, UK.
- Alipour A., Baradaran Noveiri S., Nowruzfashkhami M.R. and Pourkazemi M. 2009.** Fertilizing ability of cryopreserved spermatozoa in the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) and stellate sturgeon (*A. stellatus*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 8(1): 1–12.
- Aramli M.S., Golshahi K., Nazari R.M., Aramli S. and Banan A. 2015.** Effectiveness of glucose-methanol extender for cryopreservation of *Huso huso* spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 162: 37–42.
- Aramli M.S., Kalbassi M.R., Nazari R.M. and Aramli S. 2013.** Effects of short-term storage on the motility, oxidative stress, and ATP content of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) sperm. *Animal Reproduction Science*, 143(1-4): 112–117.
- Asturiano J.F., Marco-Jimenez F., Perez L., Balasch S., Garzon D.L., Penaranda D.S., Vicente J.S., Viudes-De-Castro M.P. and Jover M. 2006.** Effects of hCG as spermiation inducer on European eel semen quality. *Theriogenology*, 66(4): 1012–1020.
- پورکاظمی م. ۱۳۸۷. منابع زنده دریای خزر و کنوانسیون محیط زیست. مطالعات اوراسیای مرکزی، ۱(۱): ۲۰-۱.
- مکنت خواه ب.، فلاحتکار ب.، خارا ح. و عفت پناه ا. ۱۳۹۴. تغییرات بیوشیمی،

- Bousseau S., Brillard J.P., Marquant-Le Guienne B., Guerin B., Camus A. and Lechat M. 1998.** Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*, 50(5): 699–706.
- Bucak M.N. and Tekin N. 2007.** Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research*, 73(1): 103–108.
- Butts I.A., Feindel N., Neil S., Kovacs E., Urbanyi B. and Trippel E.A. 2011.** Cryopreservation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) sperm in large-volume straws: Applications for commercial production and gene banking. *Aquaculture Research*, 42(11): 1714–1722.
- Cabrita E., Robles V., Alvarez R. and Herraiz M.P. 2001.** Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. *Aquaculture*, 201(3-4): 301–314.
- Cabrita E., Robles V., Sarasquete C. and Herraiz P. 2008.** Basic principles of fish spermatozoa cryopreservation. P: 237–249. In: Cabrita E., Robles V. and Herraiz M.P. (Eds.). *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. CRC Press, USA.
- Dzuba B.B., Kopeika F.F., Cherepanov V.V. and Drokin S.L. 1999.** Sturgeon sperm quality after 6 years of cryopreservation. *Journal of Applied Ichthyology*, 15: 312–322.
- Fauvel C., Suquet M. and Cosson J. 2010.** Evaluation of fish sperm quality. *Journal of Applied Ichthyology*, 26: 636–643.
- Figueroa E., Risopatron J., Sanchez R., Isachenko E., Merino O., Isachenko V. and Valdebenito I. 2013.** Spermatozoa vitrification of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effect of seminal plasma on physiological parameters. *Aquaculture*, 372: 119–126.
- Figueroa E., Valdebenito I., Merino O., Ubilla A., Risopatron J. and Farias J.G. 2016.** Cryopreservation of Atlantic salmon *Salmo salar* sperm: Effects on sperm physiology. *Journal of Fish Biology*, 89(3): 1537–1550.
- Forouzanfar M., Sharafi M., Hosseini S.M., Ostadhosseini S., Hajian M., Hosseini L., Abedi P., Nili N., Rahmani H.R. and Nasr-Esfahani M.H. 2010.** In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, 73(4): 480–487.

- Gheller S.M.M., Corcini C.D., De Brito C.R., Acosta I.B., Tavares G.C., Soares S.L., Silva A.C., Pires D.M. and Junior A.S.V. 2019.** Use of trehalose in the semen cryopreservation of Amazonian catfish *Leiarius marmoratus*. *Cryobiology*, 87: 74–77.
- Hezavehei M., Sharafi M., Kouchesfahani H.M., Henkel R., Agarwal A., Esmaili V. and Shahverdi A. 2018.** Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive Biomedicine Online*, 37(3): 327–339.
- Holt W.V. 1997.** Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, 9(3): 309–320.
- Hu J.H., Zan L.S., Zhao X.L., Li Q.W., Jiang Z.L., Li Y.K. and Li X. 2010.** Effects of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress variables in frozen-thawed bovine semen. *Journal of Animal Science*, 88(5): 1657–1662.
- Jun L., Qinghua L. and Shicui Z. 2006.** Evaluation of the damage in fish spermatozoa cryopreservation. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 24(4): 370–377.
- Lahnsteiner F., Berger B., Weismann T. and Patzner R.A. 1996.** Motility of spermatozoa of *Alburnus alburnus* (Cyprinidae) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism. *Fish Physiology and Biochemistry*, 15(2): 167–179.
- Magnotti C., Cerqueira V., Lee-Estevez M., Farias J.G., Valdebenito I. and Figueroa E. 2018.** Cryopreservation and vitrification of fish semen: A review with special emphasis on marine species. *Reviews in Aquaculture*, 10(1): 15–25.
- Merino O., Sanchez R., Risopatron J., Isachenko E., Katkov I.I., Figueroa E., Valdebenito I., Mallmann P. and Isachenko V. 2012.** Cryoprotectant-free vitrification of fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa: First report. *Andrologia*, 44: 390–395.
- Miyaki K., Nakano S., Ohta H. and Kurokura H. 2005.** Cryopreservation of kelp grouper *Epinephelus moara* sperm using only a trehalose solution. *Fisheries Science*, 71(2): 457–458.
- Muchlisin Z.A., Sarah P.I., Aldila D.F., Eriani K., Hasri I., Batubara A.S., Nur F.M., Mustaqim M., Muthmainnah C.R., Abinawanto A. and Wilkes M. 2020.** Effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) and egg yolk on sperm motility, fertility and hatching rates of depik *Rasbora tawarensis* (Pisces: Cyprinidae) eggs after short-term

- cryopreservation. *Aquaculture Research*, 51(4): 1700–1705.
- Nazari R.M., Modanloo M., Ghomi M.R. and Ovissipor M.R. 2010.** Application of synthetic hormone LHRH-A 2 on the artificial propagation of Persian sturgeon *Acipenser persicus*. *Aquaculture International*, 18(5): 837–841.
- O'connell M., McClure N. and Lewis S.E.M. 2002.** The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction*, 17(3): 704–709.
- Pavlov D.A. 2006.** A method for the assessment of sperm quality in fish. *Journal of Ichthyology*, 46(5): 391–398.
- Rurangwa E., Kime D.E., Ollevier F. and Nash J.P. 2004.** The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured. *Aquaculture*, 234(1-4): 1–28.
- Sarvi K., Niksirat H., Amiri B.M., Mirtorabi S.M., Rafiee G.R. and Bakhtiyari M. 2006.** Cryopreservation of semen from the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). *Aquaculture*, 256(1-4): 564–569.
- Shaluei F., Sadeghi A. and Zadmajid V. 2017.** Cryopreservation of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) sperm: Effects of cryoprotectants, antioxidant, membrane stabilizer, equilibration time and dilution ratio on sperm motility and fertility. *Aquaculture Research*, 48(3): 1031–1040.
- Solocinski J., Osgood Q., Wang M., Connolly A., Menze M.A. and Chakraborty N. 2017.** Effect of trehalose as an additive to dimethyl sulfoxide solutions on ice formation, cellular viability, and metabolism. *Cryobiology*, 75: 134–143.
- Wilson-Leedy J.G., Kanuga M.K. and Ingermann R.L. 2009.** Influence of osmolality and ions on the activation and characteristics of zebrafish sperm motility. *Theriogenology*, 71: 1054–1062.
- Yildiz C., Bozkurt Y. and Yavas I. 2013.** An evaluation of soybean lecithin as an alternative to avian egg yolk in the cryopreservation of fish sperm. *Cryobiology*, 67(1): 91–94.



Research Paper

Effect of impermeable protectant addition on cryopreservation and quality indices of *Acipenser persicus* sperm

Salimeh Ghoochanian¹, Mohammad Reza Kalbasi^{2*}, Mohsen Sharafi³

Received: February 2020

Accepted: March 2020

Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of bovine serum albumin (BSA), lecithin and trehalose on qualitative indices of freeze-thawed *Acipenser persicus* sperm. In this regard, sperm samples prepared from 5 male *A. persicus* and the samples were frozen after dilution with various extenders. After 3 months of freezing, the freeze-thawed sperm quality indices were evaluated by Image J software and mitochondrial activity by using the fluorescent staining JC-1 method. Results of sperm motility showed rotational motions in treatment BSA and linear motions in treatment “BSA + trehalose”. Analysis of motion parameters in freeze-thawed sperm showed that the treatment “BSA + trehalose” had the highest arc velocity (1.74 μ M/s), highest linear velocity was in BSA and trehalose treatments (0.30 μ M/s) and the highest linear movement was seen in trehalose and trehalose + lecithin treatments (23.87 and 25.48%, respectively). Results of the effect of preservatives on sperm motility showed the highest percentage in treatment “BSA + trehalose” (3.49%) and the highest mitochondrial activity in trehalose treatment (10.58%). Therefore, the use of BSA with trehalose can have a potential impact on reducing cell damage during cryopreservation, the protection and development of this valuable species of Caspian species.

Key words: *Cryopreservation, BSA, Lecithin, Trehalose, Acipenser persicus.*

1- M.Sc. Student in Fisheries, Department of Aquaculture, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

2- Professor in Department of Aquaculture, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

3- Assistant Professor in Department of Poultry Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

*Corresponding Author: kalbassi_m@modares.ac.ir