



اثر دو نوع رقیق کننده بر شاخص‌های تحرک اسپرم ماهی بستر (*Huso huso* ♀ × *Acipenser ruthenus* ♂) طی نگهداری بلندمدت

شهرزاد برادران نویری¹، احمد نوری^{2*}، محمود بهمنی³، محمد علی یزدانی ساداتی⁴،
آرش اکبرزاده²

تاریخ دریافت: دی 95

تاریخ پذیرش: اسفند 95

چکیده

نگهداری طولانی مدت اسپرم از جمله راهکارهای مدیریتی استفاده از سلول‌های جنسی در تکثیر مصنوعی ماهیان است. ماهی بستر یکی از بهترین گزینه‌های آبی‌پروری ماهیان خاویاری است که تاکنون بر روی انجماد اسپرم آن مطالعه‌ای صورت نگرفته است. در مطالعه حاضر، تغییرات ویژگی‌های تحرک اسپرم ماهی خاویاری بستر پس یک سال نگهداری با دو رقیق کننده، مورد بررسی قرار گرفت. میانگین درصد تحرک، مدت زمان تحرک و VSL برای رقیق کننده E1 به ترتیب $47/57 \pm 4/7$ درصد، $96/77 \pm 6/61$ ثانیه و $125/39 \pm 40/81$ میکرومتر بر ثانیه و پس از یک سال به ترتیب $33/71 \pm 5/36$ درصد، $102/5 \pm 5/24$ ثانیه و $60/84 \pm 24/55$ میکرومتر بر ثانیه بود. میانگین همین شاخص‌ها برای رقیق کننده E2 به ترتیب $41/47 \pm 3/06$ درصد، $102 \pm 9/01$ ثانیه و $110/26 \pm 31/19$ میکرومتر بر ثانیه و پس از یک سال به ترتیب $28/51 \pm 4/55$ درصد، $82/67 \pm 10/11$ ثانیه و $52/77 \pm 27/6$ میکرومتر بر ثانیه بود. نتایج نشان داد که تفاوتی در شاخص‌های بررسی شده بین دو رقیق کننده وجود نداشت ($P > 0/05$). یافته‌های این پژوهش می‌تواند به عنوان اطلاعات پایه در زمینه نگهداری بلندمدت اسپرم این ماهی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: رقیق کننده اسپرم، شاخص‌های تحرک، بستر، نگهداری بلند مدت.

- 1- دانشجوی دکتری شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
 - 2- استادیار گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
 - 3- استاد گروه فیزیولوژی، موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج جهاد کشاورزی، رشت، ایران.
 - 4- دانشیار گروه تکثیر و پرورش، موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج جهاد کشاورزی، رشت، ایران.
- * نویسنده مسئول: nooryahmad@gmail.com

مقدمه

گوشت ماهیان خاویاری از 2,706 تن در 12 کشور، به بیش از 65,600 تن در 43 کشور افزایش یافته است (Bronzi and Rosenthal, 2014). در بین انواع دورگه‌های ماهیان خاویاری در جهان، ماهی خاویاری دورگه بستر (حاصل تلاقی فیل‌ماهی *Huso* *Acipenser ruthenus* ماده و استرلیاد *rus* نر)، از گزینه‌های بسیار مستعد آبی‌پروری این ماهیان برای تولید گوشت و خاویار به شمار می‌رود. این دورگه قابلیت پرورش در آب‌های شیرین و لب‌شور را با شیوه‌های پرورش تک‌گونه‌ای و چندگونه‌ای (Chebanov and Billard, 2001)، همراه با رشد سریع، زایا بودن نسل‌های اول و دوم (Omoto et al., 2001) و سازش‌پذیری به غذای دستی (Chebanov and Billard, 2001) دارد.

از مزیت‌های مختلف انجماد و نگهداری بلند مدت اسپرم ماهیان خاویاری، می‌توان به دسترسی به سلول‌های جنسی نر (اسپرم) در طول سال و پوشش عدم همزمانی رسیدگی جنسی مولدین (Billard et al., 2004)، حمل و نقل آسان‌تر و با استرس کمتر نمونه اسپرم به جای مولدین نر، امکان استفاده از تمام پتانسیل اسپرم‌های موجود در آینده به ویژه در

صید ماهیان خاویاری دریای خزر طی سه دهه اخیر به شدت کاهش یافته است. این کاهش صید به دلایل مختلف از جمله صید بی‌رویه، تخریب زیستگاه‌های طبیعی و ورود آلاینده‌های مختلف به دریا بوده است (Bronzi and Rosenthal, 2014). تخریب ذخایر این ماهیان به حدی بوده که طبق نظر سازمان جهانی حفاظت از طبیعت (IUCN)¹ کلیه گونه‌های خانواده تاسماهیان (Acipenseridae) در فهرست گونه‌های در معرض خطر این سازمان دسته‌بندی شده‌اند (IUCN, 2016). این در حالی است که طی این سال‌ها تقاضای جهانی برای گوشت و خاویار این ماهیان رو به افزایش نهاده است (Bronzi et al., 2011; Bronzi and Rosenthal, 2014).

رویگرد پرورش تاسماهیان، یکی از مهم‌ترین راهکارهایی است که به منظور کاستن از فشار صید بر جمعیت‌های وحشی و پاسخ به نیازهای مصرف، در بسیاری از نقاط جهان مورد نظر قرار گرفته است، به طوری که در فاصله زمانی 1999-2013، میزان تولید

1- International Union for Conservation of Nature (IUCN)

نگهداری بلند مدت آن پرداخته شده است. محلول‌های رقیق کننده، ترکیباتی هستند که با حفظ خصوصیات بیوشیمیایی نمونه اسپرم، با کاهش تراکم نسبی سلول‌ها، به مواد محافظت کننده اجازه حفاظت‌های لازم را می‌دهند (Cosson, 2008). رقیق کننده‌های به کار رفته در این مطالعه قبلاً برای انجماد اسپرم تاسماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) (Urbanyi et al., 2004) و فیل ماهی (*Huso huso*) برادران نویری و همکاران، (1386) کارایی خود را نشان داده بودند. نتایج این بررسی می‌تواند در انتخاب مناسب‌ترین محلول رقیق کننده برای اسپرم این ماهی در نگهداری طولانی‌مدت موثر باشد و عدم همزمانی استحصال گامت را در فعالیتهای آینده تکثیر مصنوعی این ماهی، یا نیاز به اسپرم را در فعالیتهای دورگه‌گیری آن با سایر ماهیان خاویاری، جبران کند.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در فصل تکثیر ماهیان خاویاری (فروردین و اسفند 1394) در موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر (رشت) انجام شد. به منظور اجرای این مطالعه تعداد 6 عدد مولد بستر (*Huso huso*♀×*Acipenser*)

گونه‌های به شدت در معرض خطر انقراض (Cabrita et al., 2010) و کاربرد آن در آزمایش‌های دستکاری‌های ژنتیکی و تولید ماهیان تمام ماده خاویاری (Hassanzadeh, 2014) اشاره کرد. (Saber et al., 2014)

بررسی شاخص‌های تحرک از جمله موارد کلیدی در ارزیابی کیفیت اسپرم پس از انجمادزدایی است (Billard et al., 2004; Aramli et al., 2014). از بین شاخص‌های تحرک اسپرم که در لقاح تاثیرگذار هستند، ارزیابی سرعت حرکت، درصد سلول‌های متحرک و مدت زمان تحرک آن‌ها توسط بسیاری از پژوهشگران مورد تاکید قرار گرفته است (Cabrita et al., 2010; Alavi et al., 2014; Aramli et al., 2014).

اثر نگهداری اسپرم در ازت مایع بر شاخص‌های تحرک اسپرم تعدادی از ماهیان خاویاری بررسی شده است (جدول 1). نگهداری اسپرم این گونه‌ها از نظر فعالیتهای آبی‌پروری و همچنین حفظ گونه حایز اهمیت فراوان است. از آنجایی که اسپرم ماهی خاویاری دورگه بستر تاکنون مورد نگهداری بلند مدت قرار نگرفته است، در این پژوهش به بررسی تاثیر دو رقیق کننده مختلف بر شاخص‌های تحرک اسپرم این ماهی طی

نگهداری شدند. القای رسیدگی جنسی در نرها
 ترتیب 8600 ± 2170 گرم و 121 ± 13 سانتی متر
 مورد استفاده قرار گرفتند.
 مولدین نر سه ماه قبل از تزریق هورمون به
 میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن صورت
 گرفت (Nazari et al., 2010).
 طول جداگانه از ماده‌ها، در وان‌های فایبرگلاس

جدول 1: مقایسه درصد تحرک اسپرم منجمد شده و شاهد در گونه‌های مختلف ماهیان خاویاری

منبع	مدت زمان نگهداری در فاز انجماد	درصد تحرک		نام علمی گونه
		شاهد	پس از انجمادزدایی	
Tsvetkova et al., 1996	یک سال	88	23	<i>Acipenser baerii</i>
Horvath et al., 2008	24-36 ساعت	77	2-16	<i>A. brevirostrum</i>
Ciereszko et al., 2006	یک ساعت	73	19	<i>A. fulvescens</i>
Dzuba et al., 1999	شش سال	-	20-40	<i>A. gueldenstaedtii</i>
برادران نویری و همکاران، 1382	6 ماه	50	35	<i>A. nudiventris</i>
عابدی، 1375	45 روز	-	50	<i>A. persicus</i>
برادران نویری و همکاران، 1382	7 ماه	82	20	<i>A. persicus</i>
Alipour et al., 2009	یک هفته	86	32	<i>A. persicus</i>
Tsvetkova et al., 1996	یک سال	68	15	<i>A. ruthenus</i>
Boryshpolets et al., 2011	اشاره نشده	97	6-47	<i>A. ruthenus</i>
برادران نویری و همکاران، 1382	18 ماه	78	33	<i>A. stellatus</i>
Alipour et al., 2009	یک هفته	73	37	<i>A. stellatus</i>
برادران نویری و همکاران، 1382	7 ماه	80	30	<i>Huso huso</i>
Aramli et al., 2015	یک ساعت	90	48	<i>H. huso</i>
Dzuba et al., 1999	شش سال	-	25-40	<i>H. huso</i>
Linhart et al., 2006	یک روز	96	72	<i>Polyodon spathula</i>

دستگاه پرکننده (3 IMV, MRS, فرانسه) به نی‌های انجماد 0/5 میلی‌لیتری منتقل شدند. سپس نی‌های پر شده با رعایت فاصله از سطح ازت مایع (سه سانتی‌متر به مدت 10 دقیقه) منجمد شدند (Urbanyi et al., 2004) و در نهایت به داخل ازت مایع (196- درجه سانتی‌گراد) انتقال یافتند. ارزیابی مجدد شاخص‌های مورد نظر، در اسفند 1394 (357 روز بعد از استحصال) پس از انجام‌زدایی با حمام آب 40 درجه سانتی‌گراد به مدت 20 ثانیه صورت گرفت (Alipour et al., 2009). برای ارزیابی شاخص‌های تحرک، ابتدا 5 میکرولیتر از اسپرم اولیه به 50 میکرولیتر آب (به عنوان فعال‌کننده) که از قبل بر روی لام از پیش تنظیم شده قرار گرفته بود، اضافه شد و پس از اختلاط (حدود 5 ثانیه بعد)، عمل تصویربرداری با دوربین فیلمبرداری دیجیتال (091218, OCTAX, آلمان) متصل به میکروسکوپ (Nikon, Eclipse 50i, ژاپن) با بزرگنمایی 200 برابر انجام شد. مدت زمان تحرک اسپرم در هر نمونه نیز پس از اختلاط با آب، به کمک کرومومتر آزمایشگاهی دیجیتالی (3, Hanhart, Labor, آلمان) و تا زمان توقف حرکت بیش از 95 درصد سلول‌ها مورد سنجش قرار گرفت.

استحصال اسپرم از مولدین، 36 ساعت بعد از تزریق هورمون و با استفاده از کاتتر پلاستیکی استریل و سرنگ 50 میلی‌لیتری پس از خشک کردن ناحیه ادراری تناسلی انجام گرفت (Alipour et al., 2009). بررسی شاخص‌های تحرک (درصد تحرک، مدت زمان تحرک و سرعت تحرک) برای نمونه اسپرم‌های شاهد طی پنج دقیقه پس از نمونه‌برداری و برای تیمارهای رقیق کننده، پنج دقیقه پس از افزودن هر یک از رقیق کننده‌ها، انجام گرفت. از آنجا که تاکنون رقیق کننده انحصاری برای نگهداری و انجماد اسپرم ماهی بستر ارایه نشده است، برای نگهداری بلند مدت، از دو رقیق کننده به شرح زیر استفاده شد. رقیق کننده اسپرم استرلیاد (گونه پدری) (E1) شامل 23/4 میلی‌مول سوکروز، 30 میلی‌مول تریس، 0/25 میلی‌مول کلرید پتاسیم، 10 درصد متانول، با pH برابر با 8 (Urbanyi et al., 2004) و رقیق کننده اسپرم فیل‌ماهی (گونه مادری) (E2) شامل 23/4 میلی‌مول سوکروز، 118 میلی‌مول تریس، 20 درصد زرده تخم‌مرغ، 10 درصد دی‌متیل‌سولفوکساید، با pH برابر با 8 (Billard et al., 2004). هر یک از نمونه‌های اسپرم پس از رقیق‌سازی به نسبت 1:1 با محلول‌های رقیق کننده فوق‌الذکر، به کمک

پس از آزمون توکی³ در سطح اطمینان 95 درصد استفاده شد.

نتایج

نتایج مقایسه‌ای سنجش‌های درصد تحرک اسپرم، مدت زمان تحرک و VSL نمونه‌های اسپرم در روز نمونه‌برداری و پس از یک سال نگهداری در ازت مایع به ترتیب در شکل‌های 1 تا 3 آمده است. مقایسه میانگین درصد تحرک بین تیمارها در روز نمونه‌برداری نشان داد که استفاده از هر یک از دو رقیق کننده E1 ($41/47 \pm 3/06$) درصد و E2 ($47/57 \pm 4/7$) درصد در مقایسه با شاهد ($81/25 \pm 20/9$) درصد، تاثیر کاهشی معنی‌داری بر این شاخص داشت ($P < 0/05$) اما بین دو رقیق کننده تفاوت معنی‌داری دیده نشد ($P > 0/05$). همچنین درصد تحرک اسپرم بین دو رقیق کننده E1 ($33/71 \pm 5/36$) درصد و E2 ($28/51 \pm 4/55$) درصد پس از یک سال نیز تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشت ($P > 0/05$ ؛ شکل 1).

چگونگی کاهش مدت زمان تحرک اسپرم در تیمارهای مختلف، در شکل 2 آمده است.

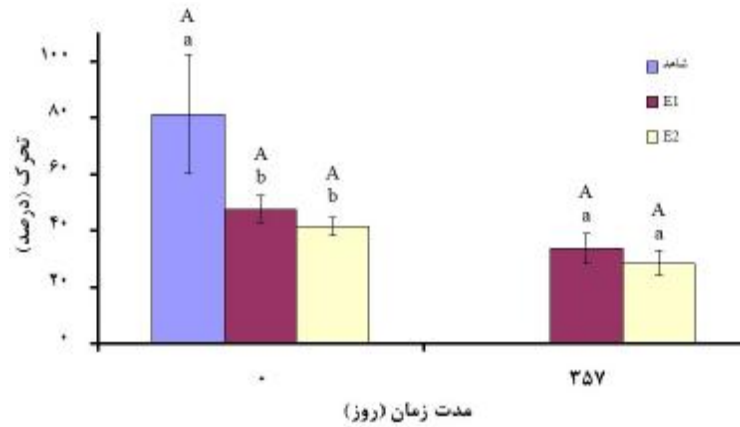
به منظور تعیین درصد سلول‌های متحرک، از هر زمینه از فیلم‌های تهیه شده، تعداد 10 تا 25 تصویر متوالی مورد بررسی قرار گرفت (Alavi et al., 2012a). سنجش میانگین سرعت اسپرم (VSL)¹ در زمینه مورد مطالعه (نقطه اول و آخر) نیز با مشخص کردن نقطه سر هر اسپرم و با استفاده از نرم‌افزار Image J (Ver 1.41، NIH، آمریکا) صورت گرفت (Kalbassi et al., 2013). این شاخص برای 40 تا 60 اسپرماتوزوا از هر نمونه سنجش شد و میانگین آن‌ها با واحد میکرومتر بر ثانیه ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$) ارائه شد.

نتایج به دست آمده از بررسی شاخص‌های تحرک (سه تکرار برای هر تیمار) پس از محاسبه به صورت میانگین \pm خطای استاندارد ارائه شد. برای بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون شاپیرو-ویلک² استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل میانگین موارد بررسی شده در بین تیمارها از نرم‌افزار SPSS نسخه 20 و آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA)، بین دو تیمار روزهای صفر و 357 از آزمون t-test و برای بررسی وجود و یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین تیمارها، از

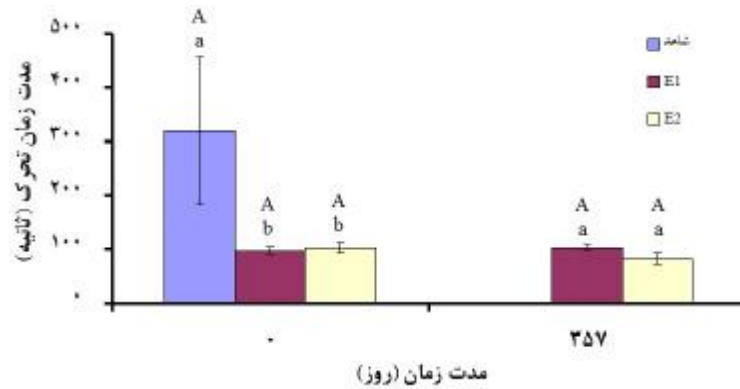
1- Straight Line Velocity (VSL)

2- Shapiro-Wilk

3- Tukey's Multiple Range Test



شکل 1: مقایسه میانگین درصد تحرک نمونه‌های اسپرم دورگه بستر پس از 357 روز نگهداری در ازت مایع (میانگین \pm خطای استاندارد؛ $n=6$). حروف یکسان کوچک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در هر روز ($P>0/05$) و حروف یکسان بزرگ بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار طی مدت زمان یک ساله ($P>0/05$) است.

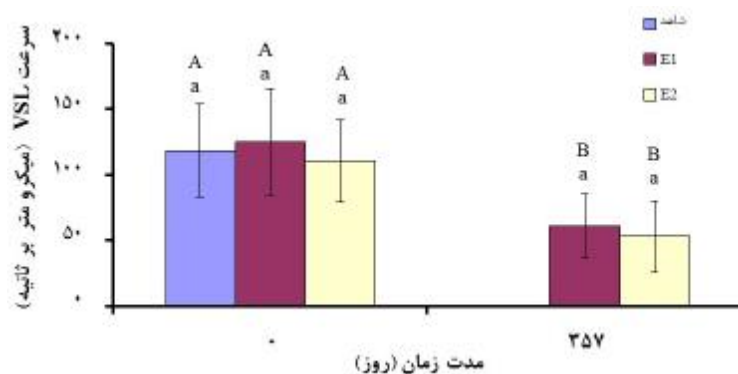


شکل 2: مقایسه میانگین مدت زمان تحرک نمونه‌های اسپرم دورگه بستر پس از 357 روز نگهداری در ازت مایع (میانگین \pm خطای استاندارد؛ $n=6$). حروف یکسان کوچک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در هر روز ($P>0/05$) و حروف یکسان بزرگ بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار طی مدت زمان یک ساله ($P>0/05$) است.

مقایسه میانگین مدت زمان تحرک بین استفاده از هر یک از دو رقیق کننده E1 تیمارها در روز نمونه‌برداری نشان داد که $96/77 \pm 6/61$ ثانیه) و E2 $102 \pm 9/01$ ثانیه)

در مقایسه با شاهد (318/61±135/94 ثانیه)، تاثیر کاهش معنی‌داری بر این شاخص داشت (P<0/05) اما بین دو رقیق کننده به کار رفته تفاوت معنی‌داری دیده نشد (P>0/05؛ شکل 2). مدت زمان تحرک اسپرم دو رقیق کننده E1 (102/5±5/24 ثانیه) و E2 (82/67±10/11 ثانیه) پس از این مدت نیز تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نشان نداد (P>0/05).

مقایسه سرعت حرکت اسپرم (VSL) در نمونه شاهد و تیمارهای مختلف در شکل 3 نشان داده شده است. این نتایج حاکی از آن است که سرعت حرکت اسپرم‌ها در روز نمونه‌برداری، در سه تیمار شاهد (118/71±35/28 میکرومتر بر ثانیه)، رقیق کننده E1 (125/39±40/81 میکرومتر بر ثانیه) و رقیق کننده E2 (110/26±31/19 میکرومتر بر ثانیه) با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نداشتند (P>0/05). همچنین سرعت حرکت اسپرم در دو رقیق کننده E1 (60/84±24/55 میکرومتر بر ثانیه) و E2 (52/77±27/6 میکرومتر بر ثانیه) در ازت مایع، با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نشان نداد (P>0/05).



شکل 3: مقایسه میانگین VSL نمونه‌های اسپرم دورگه بستر پس از 357 روز نگهداری در ازت مایع (میانگین ± خطای استاندارد؛ n=6). حروف یکسان کوچک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در هر روز (P>0/05) و حروف یکسان بزرگ بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار طی مدت زمان یک ساله (P>0/05) است.

بحث

تکثیر سال‌های بعد است (Boryshpolets et al., 2011)، برخی از این مطالعات ارزش کاربردی خود را از دست می‌دهند. از طرفی نگهداری بلندمدت اسپرم در ازت مایع می‌تواند سبب افزایش اثر رادیکال‌های آزاد اکسید کننده (ROS)¹ شود که این امر صدمات زیادی بر ساختار غشایی اسپرم‌ها وارد می‌کند و در نهایت باعث کاهش شدید قابلیت تحرک اسپرم‌ها در طی زمان می‌شود (Shaliutina-Kolesova et al., 2015). در فرآیند نگهداری کوتاه‌مدت در ازت مایع، اثر تخریبی رادیکال‌های آزاد اکسید کننده که طی نگهداری طولانی مدت سبب کاهش کیفیت تحرک می‌شود، مورد توجه قرار نمی‌گیرد. به عبارت دیگر نمی‌توان انتظار داشت که شدت تخریب یک روش کار یکسان در انجماد اسپرم ماهیان خاویاری، در کوتاه‌مدت و بلندمدت مشابه باشد. به همین دلیل چنانچه هدف از انجماد و نگهداری بلندمدت، ایجاد بانک اسپرم از این ماهیان با ارزش باشد، باید نتایج مطالعات نگهداری در بلندمدت مورد توجه بیشتری قرار گیرد (برادران نویری و همکاران، 1386).

انجماد و حفظ بلند مدت اسپرم ماهیان خاویاری می‌تواند نقش مهمی در گسترش فعالیت‌های آبی‌پروری این ماهیان داشته باشد (Shaliutina-Kolesova et al., 2015). چگونگی تاثیر انجماد و نگهداری بلند مدت بر ویژگی‌های تحرک اسپرم ماهی بستر تاکنون گزارش نشده بود. یافته‌های حاضر نشان داد که انجماد و نگهداری اسپرم ماهی خاویاری بستر با هر یک از دو رقیق کننده به کار رفته تا یک سال امکان‌پذیر است. نتایج به دست آمده از انجماد اسپرم انواع ماهیان خاویاری حاکی از کاهش قابلیت تحرک اسپرم‌های انجمادزدایی شده نسبت به اسپرم شاهد است. همان‌گونه که از جدول 1 مشخص می‌شود، مدت زمان نگهداری نمونه اسپرم در فاز انجماد در مطالعات پیشین بسیار متنوع است. اگرچه نگهداری کوتاه مدت اسپرم در ماهیان خاویاری، نیازهای همزمانی رسیدگی جنسی نرها و ماده‌ها، سهولت جابه‌جایی اسپرم و کمبود اسپرم مورد نیاز را در برهه کوتاهی از زمان پوشش می‌دهد (Aramli et al., 2017)، اما از آنجا که یکی از مهم‌ترین اهداف کاربردی انجماد اسپرم در ماهیان خاویاری، حفظ ژنوم موجود و استفاده از نمونه‌های حفظ شده در

1- Reactive Oxygen Species (ROS)

شاخص‌های بررسی شده نشان داد که نگهداری نمونه‌ها در ازت مایع پس از 357 روز، سبب کاهش معنی‌داری در مدت زما ت تحرک اسپرم و درصد اسپرم‌های متحرک نشد ($P>0/05$)، اما کاهش VSL طی این مدت برای هر دو رقیق کننده معنی‌دار بود ($P<0/05$).

در مطالعه حاضر، رقیق کننده E1 که حاوی 10 درصد متانول بود، در روز نمونه‌برداری باعث افزایش مدت زمان تحرک اسپرم از 118/71 ثانیه (شاهد)، به 125/39 ثانیه شد اما این تفاوت معنی‌دار نبود ($P>0/05$). کاربرد متانول در روش کار انجماد اسپرم تاس‌ماهی رودخانه‌ای (*A. fulvescens*) سبب افزایش سرعت تحرک از 302 میکرومتر بر ثانیه (شاهد) به 328 میکرومتر بر ثانیه شد (Ciereszko et al., 1996). در مطالعه دیگری که بر روی انجماد اسپرم تاس‌ماهی استرلیاد (*A. ruthenus*) انجام شد، استفاده از متانول در رقیق کننده سبب افزایش مدت زمان تحرک اسپرم از 160 ثانیه (شاهد) به 182 ثانیه شد اما درصد تحرک اسپرم‌ها در مقایسه با رقیق کننده حاوی DMSO مشابه بود (Boryshpolets et al., 2011). از طرفی در انجماد اسپرم تاس‌ماهی پاروپوزه (*Polyodon spathula*)، به کارگیری متانول

هرچند تنوع مدت زمان نگهداری اسپرم انواع مورد مطالعه از یک ساعت تا شش سال (جدول 1)، امکان مقایسه نتایج گزارش شده را مشکل می‌کند، اما می‌توان اظهار داشت که کاهش درصد تحرک در نمونه اسپرم‌های انجمادزدایی شده دورگه بستر طی نگهداری بلندمدت در فاز انجماد به مدت یک سال، به میزان 28/51-33/71 درصد (81/25 درصد در تیمار بدون رقیق کننده در روز نمونه‌برداری)، در محدوده گزارش‌های آرایه شده قبلی است (Tsvetkova et al., 1996; Horvath et al., 2008).

مطالعات اسپرم‌شناختی ماهیان در سال‌های اخیر با پیشرفت‌های زیادی همراه بوده است. هر چند ارزیابی درصد تحرک اسپرم با بررسی چشمی و دسته‌بندی اختیاری تحرک، دورنمای کلی از وضعیت نمونه در اختیار قرار می‌دهد، اما چنین ارزیابی در بهترین شرایط نیز عاری از خطای کاربر نیست (Cosson, 2008). با استفاده از روش به کار رفته در این مطالعه، مدت زما ت تحرک اسپرم، درصد اسپرم‌های متحرک و VSL در روزهای صفر و 357، بین رقیق کننده‌های E1 و E2 با یکدیگر اختلاف نشان نداد ($P>0/05$). همچنین بررسی اثر گذشت زمان بر هر یک از تیمارها در

بدون رقیق کننده در روز نمونه برداری می‌تواند نشانه تاثیر مشابه دو رقیق کننده بر ساختار تاژک اسپرم این ماهی باشد. تفاوت در شاخص‌های تحرک اسپرم می‌تواند به علل مختلف از جمله تفاوت در ویژگی‌های بیوشیمیایی مایع سمینال گونه‌ها، نوع و غلظت هورمون به کار رفته شده، روش انجماد، دمای آب، مدت زمان سپری شده بین تزریق هورمون و استحصال اسپرم، تغذیه ماهی، دفعات اسپرم‌گیری و دوره زمانی فصل تکثیر، بروز کند (Alavi et al., 2012a; Aramli et al., 2014). از آنجا که در مطالعات قبلی بر روی سایر ماهیان خاویاری چنین تفاوت‌های انفرادی در بین افراد هر گونه نیز مشاهده شد، تعداد نمونه‌های مورد بررسی (Linhart et al., 2006) و جایگاه صید آن‌ها (رودخانه، دریا، پرورشی) (برادران نویری و همکاران 1386؛ Ciereszko et al., 2006) نیز می‌تواند در نتایج به دست آمده تاثیرگذار باشد.

در این مطالعه مشخص شد که امکان نگهداری اسپرم ماهی خاویاری بستر در ازت مایع، با روش به کار رفته به مدت یک سال وجود دارد. با وجود این که هر دو رقیق کننده به کار رفته در این مطالعه، نتایج مشابهی در القای مجدد تحرک اسپرم ماهی بستر داشتند،

باعث کاهش سرعت حرکت اسپرم از 147 میکرومتر در ثانیه به 135 میکرومتر در ثانیه شد (Linhart et al., 2006). این مطالعات حاکی از آن است که استفاده از مواد محافظ سرمای مختلف در انجماد اسپرم ماهیان خاویاری، اثر مشابهی ندارد. بررسی‌های تکمیلی که بر روی رقیق کننده‌های ثابت با مواد محافظ سرمایی مختلف صورت گرفته نیز نشان داد که قابلیت تحرک اسپرم ماهیان خاویاری علاوه بر نوع ماده محافظ سرما، به عوامل دیگری از جمله ترکیب شیمیایی محلول رقیق کننده، درصد مواد محافظ سرما و ترکیب بیوشیمیایی چربی غشاهای اسپرم مرتبط است (Boryshpolets et al., 2011).

کاهش درصد و مدت زمان تحرک اسپرم ماهی بستر پس از مخلوط شدن با هر دو رقیق کننده در مقایسه با نمونه بدون رقیق کننده در روز نمونه برداری می‌تواند به دلیل اثرات مخرب مشابه رقیق کننده‌ها بر میتوکندری‌ها، تغییر فشار اسمزی و یا تغییر pH باشد (Viveiros et al., 2015). از طرفی، از آنجا که سرعت حرکت اسپرم تا حد زیادی وابسته به سلامت ساختاری تاژک و فرکانس زنش تاژک است (Cosson, 2008)، تشابه سرعت اسپرم در هر دو رقیق کننده E1 و E2 با یکدیگر و با نمونه

اما مطالعه ویژگی‌های بیوشیمیایی مایع سمینال، قابلیت لقاح هر یک از تیمارها در نگهداری طولانی مدت اسپرم، استفاده از سایر محلول‌های رقیق کننده و نگهداری نمونه‌ها به مدت طولانی‌تر از یک سال، می‌تواند در آینده اطلاعات کامل‌تری به منظور انتخاب مناسب‌ترین رقیق کننده و بهبود روش نگهداری بلندمدت اسپرم این ماهی با ارزش در اختیار قرار دهد.

منابع

- برادران نوبری ش.، علیپور ع. و پورکاظمی م. 1382. انجماد اسپرم پنج گونه از تاسماهیان دریای خزر. مجله علمی شیلات ایران، ویژه نامه اولین سمپوزیوم ملی ماهیان خاویاری ایران. ص: 23-28.
- برادران نوبری ش.، علیپور ع.، پوردهقانی م.، چکمه‌دوز ف.، پورکاظمی م.، محسنی م. و stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*). Iranian Journal of Fisheries Sciences, 8: 1–12.
- Aramli M.S., Azarin H. and Farsi P. 2017. Motility parameters, adenosine triphosphate content and oxidative stress indices of sterlet, *Acipenser ruthenus* sperm after 6 days of storage. Aquaculture Research, 48: 719–724.
- Aramli M.S., Kalbassi M.R. and Nazari R.M. 2014. Monthly fluctuations during the breeding season of sperm concentration, volume, motility and composition of seminal and coelomic fluid in broodfish of Persian sturgeon, *Acipenser persicus* Borodin, 1897. Journal of Applied Ichthyology, 30(2): 261–266.
- Aramli M.S., Nazari R.M. and Gharibi M.R. 2015. Effect of post-thaw storage time on motility and fertility of cryopreserved beluga sturgeon (*Huso huso*) sperm. Reproduction in Domestic
- حلاجیان ع. 1386. پایه‌گذاری بانک اسپرم ماهیان خاویاری جنوب دریای خزر. مجله دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، 2(3): 53-60.
- عابدی م. 1375. بررسی امکان انجماد اسپرم در ماهیان خاویاری. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان. 95ص.
- Alavi S.M.H., Hatef A., Mylonas C.C., Gela D., Papadaki M., Rodina M., Kaspar V., Psenicka M., Podhorec P. and Linhart O. 2012a. Sperm characteristics and androgens in (*Acipenser ruthenus*) after induction of spermiation by carp pituitary extract or GnRH α implants. Fish Physiology and Biochemistry, 38: 1655–1666.
- Alavi S.M.H., Hatef A., Psenicka M., Kaspar V., Boryshpolets S., Dzyuba B., Cosson J., Bondarenko V., Rodina M., Gela D. and Linhart O. 2012b. Sperm biology and control of reproduction in sturgeon: (II) sperm morphology, acrosome reaction, motility and cryopreservation. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 22(4): 861–886.
- Alipour A., Baradaran Noveiri S., Nowruzfashkhami M.R. and Pourkazemi M. 2009. Fertilizing ability of cryopreserved spermatozoa in the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) and

- Animals, 50(2): 349–352.
- Billard R., Cosson J., Noveiri S.B. and Pourkazemi M. 2004.** Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. *Aquaculture*, 236: 1–9.
- Boryshpolets S., Dzyuba B., Rodina M., Alavi S.M.H., Gela D. and Linhart O. 2011.** Cryopreservation of starlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa using different cryoprotectants. *Journal of Applied Ichthyology*, 27(5): 1147–1149.
- Bronzi P. and Rosenthal H. 2014.** Present and future sturgeon and caviar production and marketing: A global market overview. *Journal of Applied Ichthyology*, 30: 1536–1546.
- Bronzi P., Rosenthal H. and Gessner J. 2011.** Global sturgeon aquaculture production: An overview. *Journal of Applied Ichthyology*, 27: 169–175.
- Cabrera E., Sarasquete C., Martinez-Paramo S., Robles V., Beirao J., Perez-Cerezales S. and Herraiz M.P. 2010.** Cryopreservation of fish sperm: Applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology*, 26: 623–635.
- Chebanov M. and Billard R. 2001.** The culture of sturgeons in Russia: production of juveniles for stocking and meat for human consumption. *Aquatic Living Resources*, 14: 375–381.
- Ciereszko A., Dabrowski K., Froschauer J. and Wolfe T.D. 2006.** Cryopreservation of semen from lake sturgeon. *Transactions of the American Fisheries Society*, 135: 232–240.
- Ciereszko A., Toth G.P., Christ S.A. and Dabrowski K. 1996.** Effect of cryopreservation and theophylline on motility characteristics of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) spermatozoa. *Theriogenology*, 54: 665–672.
- Cosson J.J. 2008.** Methods to analyse the movement of fish spermatozoa and their flagella. P: 63–102. In: Alavi S.M.H., Cosson J., Coward K. and Rafiee R. (Eds.). *Fish Spermatology*. Alpha Science Ltd, Oxford, UK.
- Dzuba B.B., Kopeika E.F., Cherepanov V.V. and Drokin S.I. 1999.** Sturgeon sperm quality after 6 years of cryopreservation. *Journal of Applied Ichthyology*, 15(4-5): 312–312.
- Hassanzadeh Saber M., Baradaran Noveiri S., Pourkazemi M., Yazdani M., Ghoroghi A., Bahmani M., Pourdehghani M., Chakmehdouz F., Yarmohammadi M. and Nowruzfashkhami M. 2014.** Induction of meiotic gynogenesis in ship sturgeon *Acipenser nudiventris* using UV-irradiated heterologous sperm. *Journal of Applied Genetics*, 55: 223–229.

- Horvath A., Wayman W.R., Dean J.C., Urbanyi B., Tiersch T.R., Mims S.D., Johnson D. and 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(4): 443–449.
- IUCN. 2016.** The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016.3. Retrieved May 9, 2017, from www.iucnredlist.org.
- Kalbassi M.R., Lorestani R. and Ghafle Maramazi J. 2013.** Analysis of saline activator solution effects on sperm quality indices of *Barbus sharpeyi* by Image J software. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 12(2): 357–377.
- Linhart O., Mims S.D., Gomelsky B., Cvetkova L.I., Cosson J., Rodina M., Horvath A. and Urbanyi B. 2006.** Effect of cryoprotectants and male on motility parameters and fertilization rate in paddlefish (*Polyodon spathula*) frozen-thawed spermatozoa. *Journal of Applied Ichthyology*, 22: 389–394.
- Nazari R.M., Modanloo M., Ghomi M.R. and Ovissipor M.R. 2010.** Application of synthetic hormone LHRH-A2 on the artificial propagation of Persian sturgeon *Acipenser persicus*. *Aquaculture International*, 18: 837–841.
- Omoto N., Maebayashi M., Mitsuhashi E., Yoshitomi K., Adachi S. and Yamauchi K. 2001.** Histological observations of gonadal sex differentiation in the F2 hybrid sturgeon, the bester. *Fisheries Science*, 67: 1104–1110.
- Shaliutina-Kolesova A., Cosson J., Lebeda I., Gazo L., Shaliutina O., Dzyuba B. and Linhart O. 2015.** The influence of cryoprotectants on sturgeon (*Acipenser ruthenus*) sperm quality, DNA integrity, antioxidant responses and resistance to oxidative stress. *Animal Reproduction Science*, 159: 66–76.
- Tsvetkova L.I., Cosson J., Linhart O. and Billard R. 1996.** Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawed spermatozoa in sturgeons *Acipenser baeri* and *A. ruthenus*. *Journal of Applied Ichthyology*, 12: 107–112.
- Urbanyi B., Horvath A. and Kovacs B. 2004.** Successful hybridization of *Acipenser* species using cryopreserved sperm. *Aquaculture International*, 12: 47–56.
- Viveiros A.T.M., Nascimento A.F., Leal M.C., Goncalves A.S.C., Orfao L.H. and Cosson J. 2015.** Methyl glycol, methanol and DMSO effects on post-thaw motility, velocities, membrane integrity and mitochondrial function of *Brycon orbignyanus* and *Prochilodus lineatus* (Characiformes) sperm. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(1): 193–201.



Effects of two extenders on sperm motility indices during long term preservation of bester sturgeon (*Huso huso* ♀ × *Acipenser ruthenus* ♂) semen

Shahrouz Baradaran Noveiri¹, Ahmad Noori^{2*}, Mahmoud Bahmani³,
Mohammad Ali Yazdani Sadati⁴, Arash Akbarzadeh²

Received: December 2016

Accepted: March 2016

Abstract

Sperm cryopreservation has been considered as one of the gamete management strategies for artificial reproduction in sturgeons. Bester is a promising fish in sturgeon aquaculture but sperm cryopreservation of this fish had not been studied before. In the present study, changes in motility indices of bester sturgeon spermatozoa were investigated after one year of cryopreservation with two different extenders. The mean percentage of motility, total duration and VSL of samples diluted with E1 extender were $47.57 \pm 4.7\%$, 96.77 ± 6.61 s and $125.39 \pm 40.81 \mu\text{ms}^{-1}$, respectively and reached to $33.71 \pm 5.36\%$, 102.5 ± 5.24 s and $60.84 \pm 24.55 \mu\text{ms}^{-1}$, respectively after one-year preservation. Diluted samples with E2 extender showed $41.47 \pm 3.06\%$, 102 ± 9.01 s and $110.26 \pm 31.19 \mu\text{ms}^{-1}$ for these parameters at sampling day and reduced to $28.51 \pm 4.55\%$, 82.67 ± 10.11 s and $52.77 \pm 27.6 \mu\text{ms}^{-1}$ after one-year preservation. Results of this study revealed that there are no significant differences among studied motility indices between two extenders ($P > 0.05$). These findings could be regarded as basic information to improve long-term cryopreservation method of bester semen in future.

Key words: *Semen Extender, Motility Indices, Bester, Long-term Cryopreservation.*

1- Ph.D. Student in Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

2- Assistant Professor in Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

3- Professor in Department of Fish Physiology, International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

4- Associate Professor in Department of Aquaculture, International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

*Corresponding Author: nooryahmad@gmail.com