انجماد اسپرم ماهی اوزون برون *Acipenser stellatus* با استفاده از رقیق کننده MT

امید جعفری*، اسماعیل عبداله زاده، محمد حسن زاده صابر و شهروز برادران نویری
انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

تاریخ دریافت: فروردین ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۴۰۲

چکیده

استفاده از تکنیک انجماد اسپرم به منظور انجام برنامه‌های بهگزینی مولدین، دسترسی به اسپرم در زمان‌های متفاوت و حفاظت از گونه‌ها دارای اهمیت بالایی در صنعت ماهیان خاویاری است. به طور معمول در کشور ایران از فرمولاسیون مبتنی بر زرده تخم مرغ و DMSO جهت انجماد اسپرم ماهیان خاویاری استفاده شده است. در مطالعه حاضر از رقیق کننده MT (Modified Tsvetkova's) استفاده شد که متشکل از اجزای اصلی متانول، ساکاروز، پتاسیم کلراید و تریس بود. این فرآورده با حذف ماده شیمیایی DMSO و زرده تخم مرغ جهت نگهداری از اسپرم اوزون برون (*Acipenser stellatus*) در حالت انجماد به مدت طولانی بکار گرفته شد و برای ارزیابی عملکرد درصد تحرک اسپرم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اسپرم ماهیان پس از مدت یک سال نگهداری در مخزن ازت حداقل دارای ۳۰ درصد تحرک بودند و بنابراین این رقیق کننده می‌تواند جهت نگهداری اسپرم اوزون برون بکار گرفته شود. از آنجاییکه اسپرم گونه‌های ماهیان خاویاری دارای غلظت نسبتاً مشابهی هستند لذا این رقیق کننده می‌تواند در سایر گونه‌های ماهیان خاویاری بکار رود.

کلمات کلیدی: انجماد اسپرم، اوزون برون، رقیق کننده، متانول.

* نویسنده مسئول: Jaafari.omid@yahoo.com

مقدمه

ماهیان خاویاری به عنوان مهمترین گونه‌های آبزی دریای خزر مطرح بوده که در حال حاضر از ۶ گونه بومی حاضر در دریای خزر، ۵ گونه آن به شدت در معرض خطر انقراض قرار دارند. ماهیان خاویاری پرورشی از تعداد محدودی مولد وحشی ایجاد شده اند. افت چشمگیر صید مولدین وحشی از دریا و در نتیجه عدم مشارکت آن‌ها در ارتقای تنوع ژنتیکی، باعث بروز مشکلاتی مانند آمیزش خویشاوندی، ناهنجاری های ریختی و افت تولید به دلیل کاهش تنوع ژنتیکی گردیده است. لذا می‌توان بیان داشت که عدم وجود مواد تولید مثلی مناسب از مولدین متفاوت در گونه‌های ماهیان خاویاری عامل مهمی در عدم تحقق دستیابی به تنوع ژنتیکی و در نتیجه مشکلات ناشی از آن بوده است. از سویی دیگر، بسیاری از مواقع ماهیان نر خاویاری در شرایط پرورشی در هنگام فصل تکثیر پاسخ مناسبی به هورمون های تحریک کننده نداده و اسپرم رهاسازی نمی‌کنند که این موضوع می‌تواند باعث لغو شدن برنامه تکثیر (به دلیل عدم وجود اسپرم مناسب جهت لقاح با تخمک) و همچنین خسارت اقتصادی فراوان به دلیل از دست رفتن تخمک های ماهیان خاویاری گردد (Billard *et al*., 2004). حجم اسپرم در ماهیان خاویاری معمولاً بالا بوده بطوریکه در مولدین بزرگ ماهیان خاویاری میزان استحصال مایع منی به ۱/۵ لیتر می‌رسد که در بسیاری از موارد تکثیر مصنوعی، مقدار اسپرم مازاد نیز وجود دارد که نیاز بوده این مایع تولید مثلی جهت استفاده در برنامه‌های آتی تکثیر و حفظ تنوع ژنتیکی ذخیره گردد. یکی دیگر از مشکلات مربوط به مولدین ماهیان خاویاری جثه بزرگ آن‌ها بوده که در عمل نیاز به فضای زیاد جهت نگهداری آن‌ها می‌گردد و در برخی موارد به دلیل عدم وجود فضای کافی مولدین نر کشتار می شوند. مشکلات مربوط به جابجایی این ماهیان بین مکان های مختلف به دلیل جثه بزرگ و در نتیجه آسیب دیدن و وارد شدن استرس به ماهی مولد که باعث کاهش کیفیت اسپرم به دلیل فعالیت ROS (Reactive oxygen species) می‌گردد که در نهایت باعث افت راندمان تکثیر می‌گردد. از اینرو، حفاظت و نگهداری طولانی مدت مواد تولید مثلی مانند اسپرم از طریق انجماد، جهت استفاده در برنامه های آتی تکثیر ماهیان خاویاری از اهمیت بالایی برخوردار است.

تاکنون انجماد اسپرم ماهیان با اهداف متعددی انجام شده است که از جمله می توان به ایجاد همزمانی دسترسی به گامت‌های هر دو جنس ماهی، تسهیل مدیریت مولدین و انتقال ساده گامت‌ها بین مزارع مختلف اشاره کرد؛ اما با توجه به اهمیت نگهداری ذخایر ژنتیکی ماهیان خاویاری که در معرض انقراض هستند تلاش های زیادی در خصوص نگهداری اسپرم به منظور ارتقای زنده مانی اسپرماتوزوآ و بهبود درصد لقاح انجام شده است (احمدی فخبی و همکاران، ۱۳۸۸؛ برادران نویری و همکاران، ۱۳۹۶؛ Aramli و همکاران، ۲۰۱۵). از اینرو، تلاش برای یافتن ترکیبات نگهدارنده و رقیق کننده ویژه ماهیان خاویاری با عملکرد بهینه در حال انجام است که در این میان استفاده از زرده تخم مرغ و DMSO به صورت روتین مورد استفاده قرار گرفته است (احمدی فخبی و همکاران، ۱۳۸۸؛ برادران نویری و همکاران، ۱۳۹۶؛ Billard و همکاران، ۲۰۰۴؛ Tsvetkova و همکاران، ۱۹۹۶). همچنین از گلیسرول و DMSO به عنوان محافظ انجمادی برای اسپرم ماهیان خاویاری (برادران نویری و همکاران، ۱۳۹۶؛ Baradaran Noveiri و همکاران، ۲۰۰۹؛ Golshahi و همکاران، ۲۰۱۸)، کفشک ماهیان (Zhang و همکاران، ۲۰۰۳)، seabass (Fauvel و همکاران، ۱۹۹۸) و کپورماهیان (Alvarez و همکاران، ۲۰۰۸) استفاده شده است. تعیین غلظت ها و درصد مواد نگهدارنده برای هر ماهی نیاز به بهینه سازی دارد. با توجه به غلظت پایین اسپرم ماهیان خاویاری نسبت به سایر ماهیان (0.5-2 × 109, Horváth et al., 2011) و شرایط فیزیولوژیکی متفاوت، کاربرد اکثر رقیق کننده ها و مواد ضد انجمادی یاد شده با سختی‌هایی در درصد لقاح و هچ شدگی همراه بوده‌اند (Horváth et al., 2011). روش MT (Modified Tsvetkova's) که اصلاح شده روش اصلی Tsvetkova's می‌باشد بر پایه متانول و حذف

DMSO بوده و کارایی بالاتر آن به‌خصوص در مرحله نرخ لقاح نسبت به سایر روش‌ها در ماهیان خاویاری مورد تأیید قرار گرفته است (Horváth *et al*., 2005). با توجه به موارد توضیح داده شده، هدف اصلی در مطالعه حاضر بررسی روش MT در انجماد اسپرم اوزون برون از نظر شاخص‌های تحرک اسپرم و درصد اسپرم‌های متحرک و معرفی آن به عنوان رویکردی با بازدهی مناسب جهت انجماد طولانی مدت اسپرم ماهی اوزون برون به منظور استفاده در برنامه های حفاظتی و آبزی‌پروری پایدار تاس‌ماهیان می باشد.

بیان مسئله، ضرورت و اهمیت

روند کاهشی ورود مولدین وحشی به چرخه بازسازی ذخایر از یک سو و توسعه تکثیر مصنوعی در آبزی‌پروری از سویی دیگر باعث افزایش نیاز به ذخیره مواد تولید مثلی ماهیان خاویاری شده است. زمان کوتاه ماندگاری گامت های با کیفیت یکی دیگر از معضل های مهم تکثیر ماهیان خاویاری است. لذا با توجه به زمان ماندگاری کم و زمان های مختلف بلوغ مولدین ماهیان خاویاری، تلاش های زیادی در سراسر دنیا جهت توسعه روش های نگهداری طولانی مدت ذخایر توارثی در حال انجام است. روش نگهداری طولانی مدت اسپرم، نه تنها در برنامه های تکثیر مصنوعی، بلکه برای انجام برنامه‌های بهگزینی و حفاظت گونه‌های با ارزش ماهیان خاویاری که عمدتاً بر اساس لیست قرمز IUCN (The International Union for Conservation of Nature) در طبقه به شدت در معرض خطر انقراض قراردرند (IUCN, 2022)، دارای اهمیت بالایی می‌باشد. از اینرو توسعه روش‌های دارای بازدهی بالا شرط اساسی در ایجاد بانک ژنی پویا به منظور جلوگیری از انقراض گونه‌های ارزشمند ماهیان خاویاری است.

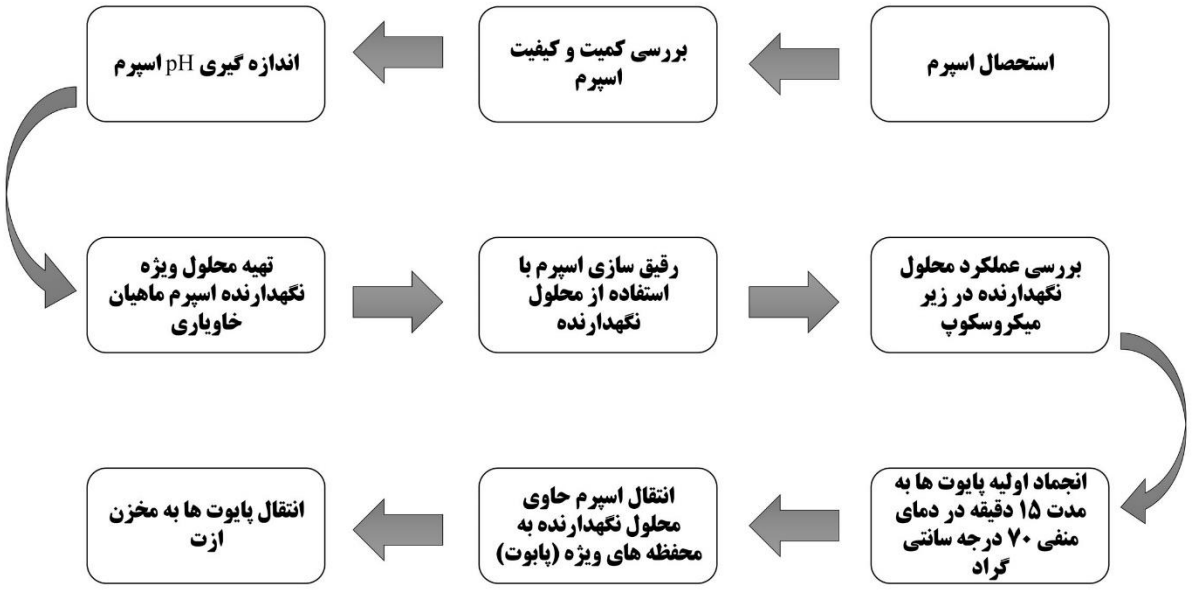
یکی از مهم‌ترین موارد در خصوص عدم دستیابی به بهگزینی در صنعت پرورش ماهیان خاویاری کشور، مشکلات مربوط به جابجایی این ماهیان بین مزارع و یا مناطق جغرافیایی مختلف است؛ در حالیکه به راحتی با در اختیار داشتن ذخایر اسپرم در حجم و فضای محدود می‌توان اسپرم منجمد شده را منتقل و فرایندهای بهگزینی را آغاز نمود. در بین عوامل گوناگون مؤثر در فرایند انجماد اسپرم، نحوه انجماد سازی اسپرم ماهیان خاویاری تأثیر بسزایی در کیفیت ماندگاری اسپرم خواهد داشت و عمده مشکلات موجود در فرایند انجماد اسپرم، تشکیل کریستال‌ها در هنگام انجماد و یا سمیت مواد مورد استفاده برای نمونه اسپرم می‌باشد. اسپرم گونه‌های مختلف ماهیان خاویاری از نظر شکل ظاهری و یا رقت تفاوت کمی با یکدیگر دارند؛ لذا به نظر می رسد دستیابی به یک رقیق کننده مناسب می‌تواند در همه گونه‌های ماهیان خاویاری مورد استفاده قرار گیرد (برادران نویری و همکاران، ۱۳۹۶؛ Billard و همکاران، ۲۰۰۴؛ Psenicka و همکاران، ۲۰۰۷).

ارایه دستور العمل

اسپرم مولدین نر اوزون برون پس از استحصال بلافاصله با کمک آب و یخ (با نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد) و یا داخل یخچال با دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شوند. اسپرم استحصال شده در ابتدا از نظر کمیت (تراکم) و کیفیت (درصد اسپرم های متحرک و زمان تحرک) مورد بررسی قرار می‌گیرند و در صورت تراکم بالا و درصد تحرک بالای ۸۰ درصد فرایند انجماد بر روی آن صورت می‌پذیرد. به منظور ساخت محلول محافظ سرمایی اسپرم در این تحقیق، ابتدا ۲۳/۴ میلی مولار ساکاروز، ۰/۲۵ میلی مولار پتاسیم کلرید و ۳۰ میلی مولار تریس را وزن و با آب مقطراستریل به ۸۰ درصد حجم مورد نظر رسانده و pH محلول بر روی ۸ تنظیم شد (Horváth *et al*., 2011). سپس ۱۰ درصد حجمی متانول به محلول اضافه و محلول همگن شد و پس از آن، به اندازه ۱۰ درصد باقی مانده مجددا آب مقطر استریل اضافه شد. حجم فراورده ایجاد شده بستگی به حجم اسپرم استحصال شده داشته و هم حجم با آن باید تهیه گردد. همچنین پس از آماده‌سازی محلول محافظ سرمایی مورد نظر، pH آن با pH مایع اسپرمی تنظیم شد (pH= ۷/۵). نهایتاً از محلول محافظ سرمایی حاصل به صورت مستقیم جهت افزودن به اسپرم اوزون برون و

نگهداری آنها در شرایط انجماد استفاده می گردد. جهت بررسی کیفیت اسپرم، از میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی ۴۰ استفاده می‌شود و شاخص‌های مربوط به کیفیت اسپرم مانند تحرک اسپرم و درصد اسپرم‌های متحرک ارزیابی می‌گردد. در این حالت (اسپرم مخلوط شده با اکستندر MT) اسپرم هیچ گونه فعالیتی از خود نشان نمی‌دهد که بیانگر عملکرد صحیح محلول رقیق کننده می‌باشد. سپس با اضافه کردن آب به میزان ۵ میکرولیتر، فعالیت اسپرم‌ها مشاهده می‌گردد. پس از بررسی عملکرد محلول، اسپرم های حاوی محلول رقیق کننده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای یخچال نگهداری شده و پس از آن طی یک دستوالعمل دمایی (دمای ۴ درجه سانتی گراد به ۷۰- درجه با استفاده از بخار ازت مایع به مدت ۳ تا حداکثر ۱۵ دقیقه بسته به حجم نمونه و سپس از دمای ۷۰- درجه به ۱۹۶- درجه سلسیوس) به انجماد کامل رسانده می‌شوند و تا زمان استفاده مجدد این اسپرم‌ها در تانک های ازت با دمای ۱۹۶- نگهداری می‌شوند (شکل ۱).

شکل ۱: مراحل انجماد اسپرم با استفاده از محلول نگهدارنده مطالعه حاضر را نشان می دهد. پایوت ها در واقع محفظه های اصلی نگهداری اسپرم رقیق شده با محلول نگهدارنده می باشند. در خاتمه کار مخزن ازت حاوی نیتروژن مایع با دمای منفی ۱۹۶ درجه سانتی گراد جهت نگهداری طولانی مدت پایوت ها مورد استفاده قرار می گیرد.



شکل ۱: مراحل اجرایی انجماد اسپرم اوزون برون جهت ذخیره سازی طولانی مدت با کمک محلول نگهدارنده

نتایج و یافته های ترویجی

رقیق کننده مطالعه حاضر که متشکل از اجزای اصلی متانول، ساکاروز، پتاسیم کلراید و تریس بوده این با حذف ماده شیمیایی DMSO و زرده تخم مرغ جهت نگهداری از اسپرم اوزون برون در حالت انجماد به مدت طولانی بکار گرفته شد. اسپرم ماهیان پس از مدت یک سال نگهداری در تانک ازت حداقل دارای ۳۰ درصد تحرک بودند. بطور کلی و بر اساس مطالعات انجام شده میزان درصد تحرک کمتری در اسپرم منجمد شده با متانول در قیاس با DMSO انتظار می‌رود (Horváth *et al*., 2005) در صورتیکه در مطالعه حاضر میزان تحرک مشاهده شده با

میزان اشاره شده در منابع با استفاده از DMSO تفاوت قابل توجهی ندارد (برادران نویری و همکاران، ۱۳۹۶). لذا با توجه به اینکه درصد لقاح بالاتر در اسپرم منجمد شده با متانول در قیاس با سایر محافظت کننده‌ها به اثبات رسیده است (Horváth *et al.*, 2011)؛ می‌توان بیان داشت که روش اصلاح شده Tsvetkova's (MT) می-تواند با موفقیت در برنامه‌های حفاظت از اسپرم ماهیان خاویاری به کار برده شود.

به طور خاص مطالعه حاضر می تواند جهت انجماد اسپرم ماهی ازون برون و حتی سایر ماهیان خاویاری به منظور تکثیر و تولید بچه ماهی استفاده شود. عدم نیاز به نگهداری مولدین نر آن هم برای چندین سال تا سن بلوغ، می تواند هزینه های صنعت آبزی پروری ماهیان خاویاری را تا حد زیادی کاهش دهد. جهت تولید فرآورده مطالعه حاضر و بکارگیری آن در مزارع می توان فرآورده را در ارلن های با حجم بالا تهیه و در قالب کیت ارائه نمود. همچنین جهت استفاده فرآورده حاضر در مقیاس حجم بالا می توان از دستگاه اتومات پرکننده اسپرم و فریزر دارای پنل کنترل دمایی استفاده کرد. استفاده در این مقیاس و تجهیزات آزمایشگاهی اتوماتیک صرفاً برای مراکز عمده ماهیان خاویاری قابل توصیه است، سایر مراکز تکثیر می توانند از زیرساخت های موجود در موسسات تحقیقاتی استفاده نمایند.

استفاده از این تکنیک به صورت خلاصه می تواند در زمینه های زیر قابلیت بهره برداری داشته باشد:

- نگهداری از بانک ژنتیکی مولدین وحشی بسیار کمیاب ماهیان خاویاری

-رفع نیازهای صنعت پرورش ماهیان خاویاری با نگهداری اسپرم ماهیان نر پرورشی و کاهش هزینه های تولید به دلیل عدم نیاز به نگهداری مولدین نر تا سن بلوغ

-استفاده از دانش انجماد اسپرم و کمک به برنامه های اصلاح نژاد و ایجاد نژادهای برتر با خصوصیات مورفولوژیکی مورد نیاز صنعت آبزی پروری

توصیه ترویجی

با توجه به اهمیت بالای حفاظت ذخایر ماهیان خاویاری و همچنین ضرورت حفظ تولید پایدار این ماهیان در صنعت آبزی پروری پیشنهاد می‌گردد مراکز خصوصی و دولتی طی هماهنگی با انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری در راستای انجماد اسپرم مازاد ماهیان خاویاری اقدام نمایند.

منابع

احمدی فخبی، م.، زمینی، ع. برادران نویری، ش. (۱۳۸۸). بررسی تاثیر متانول بر درصد و زمان تحرک اسپرم تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) پس از نگهداری در سرما. مجله علوم زیستی، ۳ (۳): ۱-۱۲.

برادران نویری، ش.، نوری، ا.، بهمنی، م. یزدانی ساداتی، م. ع.، اکبرزاده، ا. (۱۳۹۶). اثر دو نوع رقیق کننده بر شاخص های تحرک اسپرم ماهی بستر (*Huso huso* * *Acipenser ruthenus*) طی نگهداری بلند مدت. فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، ۵ (۴): ۷۲-۵۴.

Alvarez, B., Arenal, A., Fuentes, R., Pimentel, R., Abad, Z. and Pimentel, E., 2008. Use of post-thaw silver carp (Hypophtalmichthys molitrix) spermatozoa to increase hatchery productions. In Methods in Reproductive Aquaculture (pp. 367-372). CRC Press.

Aramli, M. S., Golshahi, K., Nazari, R. M., Aramli, S., & Banan, A. (2015). Effectiveness of glucose–methanol extender for cryopreservation of Huso huso spermatozoa. Animal reproduction science, 162, 37-42.

Baradaran Noveiri, S., Nowruzfashkhami, M. R., & 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.

Billard, R., Cosson, J., Noveiri, S. B., & Pourkazemi, M. (2004). Cryopreservation

and short-term storage of sturgeon sperm, a review. Aquaculture, 236(1-4), 1-9.

Fauvel, C., Suquet, M., Dreanno, C., Zonno, V. and Menu, B., 1998. Cryopreservation of sea bass (Dicentrarchus labrax) spermatozoa in experimental and production simulating conditions. Aquatic Living Resources, 11(6), pp.387-394.

Golshahi, K., Aramli, M. S., Nazari, R. M., & Habibi, E. (2018). Disaccharide supplementation of extenders is an effective means of improving the cryopreservation of semen in sturgeon. Aquaculture, 486, 261-265.

Horváth, A., Chèvre, P., & Urbányi, B. (2011). Sperm Cryopreservation in Sturgeon with a Special Focus on A. sturio. Biology and conservation of the European sturgeon *Acipenser sturio L*. 1758: the reunion of the European and Atlantic sturgeons, pp.465-475.

Horváth, Á., Wayman, W.R., Urbányi, B., Ware, K.M., Dean, J.C. & Tiersch, T.R. (2005). The relationship of the cryoprotectants methanol and dimethyl sulfoxide and hyperosmotic extenders on sperm cryopreservation of two North-American sturgeon species. Aquaculture, 247(1-4), pp.243-251.

IUCN, 2022. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022-2. https://www.iucnredlist.org. Accessed on [29.04.2023].

Psenicka, M., Alavi, S.H., Rodina, M., Gela, D., Nebesarova, J. and Linhart, O., 2007. Morphology and ultrastructure of Siberian sturgeon (Acipenser baerii) spermatozoa using scanning and transmission electron microscopy. Biology of the Cell, 99(2), pp.103-115.

Tsvetkova, L. I., Cosson, J., Linhart, O., & 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(2), 107-112.

Zhang, Y.Z., Zhang, S.C., Liu, X.Z., Xu, Y.Y., Wang, C.L., Sawant, M.S., Li, J. and Chen, S.L., 2003. Cryopreservation of flounder (Paralichthys olivaceus) sperm with a practical methodology. Theriogenology, 60(5), pp.989-996.

Cryopreservation of stellate sturgeon, *Acipenser Stellatus* spermatozoa using MT extender

Omid Jafari*, Esmail Abdollahzadeh, Mohammad Hassanzadeh Saber and Shahrouz Baradaran Noveiri

International Sturgeon Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Rasht, Iran

Received: April 2023 Accepted: June 2023

Abstract

Using cryopreservation techniques are so important in conducting brood stock selection programs, species protection, and accessibility to the spermatozoa throughout the year. Normally, in the conventional method in Iran, the formulation based on egg yolk and DMSO has been employed to freeze the sturgeon sperm. In the present study, the MT extender (Modified Tsvetkova's) which consists of the main components of methanol, sucrose, potassium chloride, and Tris has been used for the preservation of *Acipenser stellatus* spermatozoa, without using chemical substance DMSO and egg yolk and performance of sperm motility percentage was evaluated. Our results demonstrated that the frozen sperm had at least 30% motility after one year of storage in nitrogen tank. The results of this research show that this extender could be used to preserve *Acipenser stellatus* spermatozoa. Since the sperm's concentration of sturgeon species are similar, the usage of the MT extender can be suggested for other species of the sturgeons.

Keywords: *Acipenser stellatus*, Cryopreservation, Extender, Methanol.

*Corresponding author: Jaafari.omid@yahoo.com