وزارت جهاد کشاورزی
شرکت سهامی شیلات ایران
موسسه تحقیقات شیلات ایران - پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

گزارش نهایی طرح تحقیقاتی:

بررسی امکان انجماد و نگهداری اسپرم دو گونه از ماهیان خاویاری : قره‌برون Acipenser persicus و ازون‌برون Acipenser stellatus

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات ، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات شیلات ایران - پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

عنوان : بررسی امکان انجماد و نگهداری اسپرم دو گونه از ماهیان خاویاری قره‌برون **Acipenser persicus** و ازون‌برون **Acipenser stellatus**

مجری : حسین نوروزی مقدم

واحد اجرا : پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

تاریخ انتشار : سال 1382

فهرست مندرجات

چکیده

مقدمـه

مواد و روشهای بررسی

نتایج

بحث

نتیجه گیری

تشکر و قدردانی

منابع

چکیده به زبان انگلیسی

چکیده

سالانه، افزایش دخالت های بشر در محیط زیست، سبب تشدید تغییرات شرایط اکولوژیك و از بین رفتن بسیاری از موجودات زنده و کاهش تعداد ماهیان خاویاری دریای خزر شده است. بنابراین انجماد و نگهداری اسپرم ماهیان خاویاری از مسائل ضروری می باشد. طوری که انجماد و نگهداری گامت ها و جنین‌ها یکی از راههای حفظ خزانه ژنی ماهیان می باشد. در این طرح ماهیان مولد از صیدگاههای ترکمن و تازه‌آباد واقع در جنوب دریای خزر صید شدند. ماهیان مولد برای مدت یك هفته در استخرهای مولدین درمعرض جریان آب رودخانه واقع در مزارع پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی یا شهید رجایی قرار داده شدند. سپس به ماهیان مولد نر میزان 2/5 میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن پودر هیپوفیز خشك شده ماهیان خاویاری به صورت داخل عضلانی تزریق شد. پس از گذشت مدت 12 ساعت اسپرم‌گیری از مولدین نر به کمك سوند متصل به سرنگ 50 میلی‌لیتری انجام شد. پس از رقیق کردن مقداری از این اسپرم در آب، فعالیت آن با میکروسکوپ مورد سنجش قرار گرفت. سپس اسپرم تازه به نسبت یك به ده در محیط نگهدارنده شامل 0/1 مولار تریس HCl، دو درصد دی‌متیل سولفکساید، 25 درصد زرده تخم مرغ و 0/04مولار ساکاروز رقیق شد. اسپرم رقیق شده با این روش به داخل سرنگ‌های یك میلی لیتری مکش گردید و براساس دو برنامه انجماد به روشهای آنی و تدریجی منجمد گردید. پس از گشت مدت زمانهای 12 تا 205 ساعت از انجماد اسپرم، فعالیت اسپرم خارج شده از شرایط انجماد تعیین شد. سپس از این اسپرم جهت لقاح استفاده گردید. نتایج نشان داد درصد لقاح این اسپرمها 27 و درصد جنین‌هایی که تا مرحله کیسه زرده پیشرفت کرده بودند 16 بوده است.

مقدمه

ماهیان خاویاری (Acipenseridae) به عنوان فسیلهای زنده شناخته می شوند که، به عنوان آخرین عضو یکی از بزرگترین گروه ماهیان بنام کندرواستین (Chondrosteans) باقی مانده‌اند. این ماهیان به طور غالب در دریاهای دوره ژوارسیك (Jurrasic) وجود داشته‌اند. در دهه‌های اخیر تعداد این ماهیان در محیطهای طبیعی کاهش قابل توجه‌ای یافته است که، این مسئله عمدتاً ناشی از کاهش جایگاههای زیست و صید بی رویه آنها بوده است. بطوری که هم اکنون بعضی از این گونه‌ها در معرض انقراض هستند. از این رو اجرای برنامه‌هایی در جهت حفظ و نگهداری تنوع ژنتیکی این گونه‌ها ضروری می باشد. یکی از روشهای مفید انجماد و ذخیره و نگهداری اسپرم می باشد که، در تکثیر و پرورش این ماهیان بسیار با اهمیت است و به صورت گسترده ای در امریکا رواج پیدا کرده است (Cierezko et al., 1996) . علاوه بر این یکی دیگر از مشکلات شناخته شده مزارع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری در ایران عدم دسترسی به موقع به اسپرم به دلیل عدم صید مولدین نر در زمان نیاز یا عدم سیال شدن اسپرم در مولدین نر است. به طوری که گاهی متخصصان امر تکثیر مواجه با رسیدگی و استحصال تخمکهای مولد ماده می شوند ولی اسپرم لازم جهت لقاح تخمکها در دسترس نمی‌باشد. لذا انجماد و نگهداری اسپرم قدم اساسی در حل این مشکل در مزارع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری می باشد. چرا که با حل این مشکل در مواقع لزوم می‌توان تخمکها را با اسپرم منجمد شده لقاح داد. از طرف دیگر این بانك ذخیره اسپرم در طولانی مدت در واقع جزیی از بانك ذخیره ژنتیکی (Genetic cryobank) این گونه‌ها خواهد بود.

کلیات

3-1- تاریخچه

در سال 1914 بروفیلدت (Brofeldt) از اولین کسانی بود که گزارش کرد اسپرم ماهی آزاد را می‌توان برای مدتی در شرایط سرما نگهداری کرد (Buyukhatipoglu et al., 1978). در سال 1939 ایلیز (Ellis) اولین روش نگهداری اسپرم این ماهیان را در سرم فیزیولوژی نمکی و در سال 1949 روکر (Rucker) نگهداری اسپرم را در یخچال گزارش کردند (Dilauro et al., 1999). همچنین در طی سالهای 1924 تا 1975 آزمایشات نگهداری اسپرم ماهیان آزاد در درجه حرارت صفر تا نه درجه سانتی‌گراد توسط عده‌ای از دانشمندان انجام شد (Buyukhatipoglu et al., 1978). موفقیت اساسی در زمینه نگهداری اسپرم ماهیان در دماهای پایین به وسیله بلکس‌تر (Blaxter) در سال 1953 انجام شد (Holtz, 1993). در طی سالهای 1949 تا 1959 تحقیقات کامل‌تری با هدف افزایش مدت نگهداری اسپرم به وسیله اضافه کردن محلول الکترولیت یا مایع حفره شکمی ماهیان ماده به آن، انجام شد (Buyukatipoglu et al, 1978). در ایران در سال 1356 انجماد اسپرم ماهیان خاویاری با استفاده از شیر و زرده تخم مرغ در دمای 60 درجه سانتی‌گراد در سردخانه انجام شد که براساس این مطالعات حرکت بطئی اسپرم تا شش ماه پس از نجماد گزارش شده است (آذری تاکامی، 1335).

طی سالهای 1968 تا 1975 به محلول رقیق کننده اسپرم (Extender) موادی نظیر لاکتوز، فروکتوز، لکتین، مانیتول، گلیسین، زرده تخم مرغ اضافه شد. همچنین جهت جلوگیری از آسیب دیدن اسپرم طی انجماد و گرم مجدد پس از انجماد (Thawing) از موادی نظیر اتیلن گلیکول، پیروپیلن گلیکول، گلیسرول، دی‌متیل سولفکساید (Dimethylsulfoxide) استفاده شد(Buyukatipoglu et al, 1978) . در سال 1978 مونیب(Mounib) انجماد مایع اسپرمی (Semin) را در یك رقیق کننده ساکاروز انجام داد. در جهت تکمیل تحقیقات او بعدها دانشمندان متوجه شدند که، اضافه کردن محیط رقیق کننده شامل ساکاروز 6 مولار که دارای 10 درصد دی‌متیل سولفکساید (DMSO) باشد برای نگهداری اسپرم مناسب می باشد. به طوری که لقاح اسپرمهایی که با این محیط منجمد شده‌بودند در مقایسه با شاهد حدود 80 الی 90 درصد بوده است (Haltz, 1993). در سال 1981 بیلارد (Billard) آزمایشاتی در زمینه نگهداری اسپرم ماهی قزل‌آلا در شرایط اکسیژن هوا انجام داد. در سال 1988 کونتی (Conte) نگهداری موفقیت آمیز اسپرم ماهی خاویاری سفید (White sturgeon) با نام علمی Acipenser transmontanus را برای مدت دو هفته انجام داد (Cierezko, 1996). علاوه بر این در

سمپوزیوم بین المللی ماهیان خاویاری که در سال 1993 در مسکو برگزار شد چیرپانوف (Cherepanov) و همکارانش مقاله‌ای در زمینه انجماد و نگهداری اسپرم ماهی خاویاری دریای سیاه و آزوف و کوپیکا (Kopeika) در زمینه اثرات عوامل نگهدارنده اسپرم (Cryoprotectant) در شرایط انجماد بر روی اسپرم ماهی ازون‌برون A.stellatus و همچنین دورکین (Dorkin) و همکارانش در زمینه انجماد اسپرم ماهی خاویاری سبز (ساخالین) A. medurostris micadoi ارائه کردند. در همان سال در سمپوزیوم بین‌المللی کپور ماهیان در مجارستان تستکوا (Tsvetkova) مقاله‌ای در زمینه نگهداری اسپرم دو گونه از ماهیان خاویاری A. ruthenus و A.baeri ارائه کرد. در سال 1994 دیلادو(Dilawro) و همکارانش نگهداری و ذخیره اسپرم ماهی خاویاری اقیانوس اطلس(sturgeon Atlantic) با نام علمی (A.oxyrhnchus) را برای مدت پنج روز در کیسه‌های پلاستیکی با هوادهی انجام دادند که در طی این آزمایشات قابلیت تحرك پذیری اسپرم پس از انجماد 80 الی 90 درصد بوده است. تحقیقات انجماد اسپرم از سال 1996 در آزمایشگاه سیستم‌های تولید مثلی انستیتوکاریومدیسن (Cryomedicine) آکادمی بین‌المللی اکراین توسط کوپیکا در حال انجام می‌باشد (Cherepanov et al., 1997).

در حال حاضر اطلاعات کمی از تغییراتی که روی اسپرم ماهیان در حین انجماد ایجاد می‌شود وجود دارد و کوشش‌های مختلفی جهت استاندارد کردن روشهای انجماد توسط دانشمندان در حال انجام می‌باشد که یکی از این تکنیکها استفاده از کامپیوتر جهت آنالیز تحرك اسپرم می باشد

. (Ciereszko et al., 1996)

2-3- ساختمان اسپرم در ماهیان خاویاری

اسپرم ماهیان خاویاری با اسپرم ماهیان آزاد متفاوت است. این تفاوتها شامل مرفولوژی، زمان طولانی تحرك پذیری اسپرم ماهیان خاویاری در آب شیرین و وجود اکروزوم در ساختمان اسپرم ماهیان خاویاری می‌باشد. اگر چه اسپرم ماهیان خاویاری مشابه اسپرم ماهی قزل‌آلا در مایع حفره شکمی فاقد تحرك می‌باشد. ساختمان اسپرم ماهیان خاویاری شامل چهار قسمت اکروزوم(Acrosome) ، هسته (Nuclous)، قطعه وسط (Midpiece)، تاژك (Flagellum) می‌باشد (تصویر 1). اسپرم ماهیان پس از ورود به محیط آب تحرك پذیر می‌شود به طوری که، درصد تحرك پذیری طی مدت سه دقیقه افزایش می‌یابد. سپس در مدت پنج دقیقه پس از ورود اسپرم به آب حداکثر اسپرمها فعال می‌شوند. در ماهیانی که جهت تخمریزی به رودخانه‌های

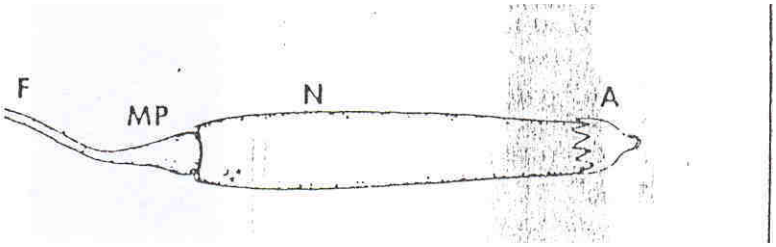
ساحلی مهاجرت می‌کند غلظت اسپرم در محیط اطراف محل تخمریزی در مقایسه با ماهیانی که لانه سازی دارند کمتر می‌باشد.

A= Acrosome اکروزوم

N= Nuclous هسته

M= Midpiece قطعه وسط

F= Flagellum (دم) تاژك



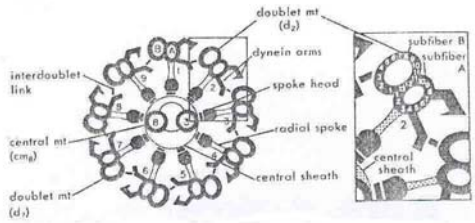
تصویر 1 – نمایش ساختمان اسپرم ماهیان خاویاری

تخمك در ماهیان خاویاری دارای تعداد زیادی میکروپیل می‌باشد. وجود این تعداد زیاد میکروپیل در تخمك ماهیان خاویاری ممکن است به لقاح موفقیت‌آمیز اسپرم با تخمك علی رغم غلظت کم اسپرم، کمك نماید. علاوه بر این وجود تعداد زیادی میکروپیل در تخمك این ماهیان، تعداد جایگاههای متعددی را برای واکنش اکروزوم با تخمك فراهم می‌نماید. اگرچه در هنگام لقاح این ماهیان تعداد زیادی اسپرم در نواحی میکروپیلها مشاهده شده است ولی این تعداد زیاد احتمال پلی‌اسپرمی را افزایش نمی‌دهند (Conte, 1989). اسپرم ماهیان خاویاری ساختمان پیچیده‌ای نسبت به اسپرم ماهیان استخوانی دارد. به طوری که برخلاف نبودن اکروزوم در ساختمان اسپرم ماهیان استخوانی فعالیت شبه اکروزومی (واکنش اکروزوم) در اسپرم ماهیان خاویاری مشاهده شده است. بنابراین در انتخاب یك روش مناسب برای انجماد اسپرم ماهیان خاویاری، باید برای تحرك پذیری و توانایی لقاح، ساختمان اکروزوم حفظ شود. زیرا مشاهده شده، اگر در نمونه‌هایی فعالیت شبه اکروزومی حفظ شده باشد تحرك پذیری بسیار زیاد خواهد شد (Ciereszko et al., 1996). بنابراین در یك بیوتکنیك مناسب جهت انجماد اسپرم، باید ساختمان اکروزوم، هسته، قطعه وسط، تاژك حفظ شود. از جمله این که از قرار دادن اسپرم در

شرایط محیطهای هیپوتونیك (محیطی که غلظت یونهای آن کمتراز غلظت یونهای اسپرم باشد) و محیط هیپرتونیك (محیطی که غلظت یونهای آن بیشتر از غلظت یونهای اسپرم باشد) خود داری شود.

2-3- تحرك پذیری اسپرم

در انجماد و نگهداری اسپرم تحرك پذیری آن یك پارامتر موثر برای سنجش توان باروری اسپرم می‌باشد. به طور معمول تحرك پذیری و فعالیت اسپرم به وسیله مشاهده میکروسکوپی و استفاده از لام هموسیتومتر (Hemocytometer) قابل سنجش می‌باشد. عوامل مهم در لقاح، فعالیت و تحرك پذیری می‌باشند. سیستم میکروتوبولی در تاژك اسپرم مسئول تحرك اسپرم می باشد. تعداد نه لوله (Tubule) دوتایی پیرامونی بنامهای توبوله‌های A و B در ساختمان میکروتوبولی تاژك وجود دارند. جنس توبولهای A و B از پروتئینی بنام توبولین می باشد. علاوه بر این توبول A دارای دو بازو از جنس پروتئینی بنام دینین (Dynein) می‌باشد. دینین دارای فعالیت ATPase می‌باشد به طوری که در اثر هیدرولیز ATP بازوهای دینین توبولهای A با پروتیئن توبولین توبول B مجاورش واکنش می‌دهند و باعث لغزش آنها می‌شوند. این لغزشها و ارتباطات متقابل بین توبولها وقتی ادامه می یابد سبب سر خوردن و لغزش بیشتر آنها می شود و در نتیجه سبب ایجاد کشش و حرکت تاژك و قابلیت انعطاف پذیری آن می شود (تصویر 2).



تصویر 2 – نمایش ساختمان عمومی توبولها

اسپرم ماهیان خاویاری در بیضه‌ها غیر فعال است. در روند تولید مثل در شرایط طبیعی تحرك پذیری اسپرم از طریق تغییر وضعیت بار اسپرم القاء می شود. به طوری که فاکتورهای محیطی نظیر یونها، pH و فشار اسمزی با تغییر وضعیت بار اسپرم سبب دپلاریزاسیون غشاء اسپرم می شوند و تحرك پذیری ایجاد می‌شود. همچنین فاکتورهای محیطی که سبب فعال شدن مسیر $cAMP\text{-}ATP\text{-}Mg^{2+}$ می شوند باعث ایجاد تحرك در اسپرم ماهیان می شوند (Stoss et al., 1983).

3-4- متابولیسم اسپرم

انرژی لازم برای تحرك و فعالیت اسپرم و متابولیسم‌های ضروری سلولی از سوختن مواد غذایی داخل اسپرم یا مواد غذایی اطراف اسپرم به روشهای هوازی یا غیر هوازی یعنی در حضور یا عدم حضور اکسیژن فراهم می شود. در ماهیانی نظیر ماهیان خاویاری که لقاح تخمك و اسپرم در محیط خارج از بدن صورت می‌گیرد اسپرم در محیط آبی فاقد مواد متابولیك ریخته می‌شود، از این جهت فرآیندهای متابولیسمی این اسپرمها به طور کامل وابسته به ذخیره داخل سلول اسپرم نظیر فسفولیپیدها، گلیکولیپیدها و گلیکوژن می باشند. به طوری که وجود مقدار قابل توجهی از گلیکوژن در قطعه وسطی اسپرم این ماهیان گزارش شده است. از طرفی در ماهیانی که لقاح داخلی دارند، علاوه بر اینکه اسپرم از مواد ذخیره شده خود جهت تحرك استفاده می‌کند به احتمال از مواد غذایی موجود در لوله تناسلی ماده هم جهت تحرك استفاده می‌کند. از طرف دیگر راه تجزیه هوازی مواد، فرآیند متابولیکی غالب برای اسپرم تعدادی از ماهیان از جمله قزل‌آلا می باشد. اکسیژن برای سوختن مواد در متابولیسم اسپرم ضروری است(Stoss, 1983). شواهد نشان می‌دهد اکسیژن به دلیل تنفس برای حفظ بقای اسپرم لازم است به طوری که، کاهش اکسیژن در محیط رقیق کننده میزان باقی ماندگی اسپرم را محدود می‌کند. بنابراین اگر میزان غلظت اسپرم زیاد، یعنی بین $20\text{-}25\times10^9$ در هر میلی لیتر باشد اکسیژن به سرعت در محیط مصرف می شود (Billard, 1981). ماهیانی نظیر ماهی آزاد اقیانوس اطلس در طی مدت یك ساعت به میزان 20 الی 40 میکرولیتر اکسیژن به ازای هر 10^{10} سلول اسپرم خود لازم دارد. مطالعات نشان داده که، نیازمندی اسپرم گونه‌های مختلف ماهیان به اکسیژن نسبت به اندازه اسپرم و سوخت و ساز آن فرق می‌کند. در گونه‌هایی از ماهیان که لقاح داخلی دارند به دلیل نیاز به فعالیت‌های متابولیکی زیاد از جمله گلیکولیز، ساختار غشایی میتوکندری در قطعه وسط اسپرم توسعه یافته است به طوری که، تعدادی از اسپرمها قادرند تا مدتها در لوله تناسلی ماده باقی

بمانند. برعکس در ماهیانی که لقاح خارجی دارند اسپرم پس از ریخته شدن به محیط آب، عمر بسیار کوتاهی دارد. ثابت شده است که. اگر مقدار کافی اکسیژن در محیطی که این اسپرم ریخته شده حل شده باشد متابولیسم هوازی مواد در داخل سلول اسپرم فرآیند غالب می‌باشد. در این حالت باقی ماندگی اسپرم بیشتر می‌شود (Stoss, 1989).

3-5- عوامل موثر بر تحریك پذیری (Motility) اسپرم

3-5-1- کاتیونها

کاتیون پتاسیم در مایع اسپرمی آزاد ماهیان سبب جلوگیری از تحرك پذیری اسپرم می شود. به طوری که رقیق کردن پتاسیم در محیط اسپرم این ماهیان یا خارج کردن پتاسیم از این محیط به وسیله دیالیز سبب ایجاد تحرك پذیری اسپرم ماهیان می شود بنابراین پتاسیم به عنوان یك عامل مهار کننده تحرك پذیری و لقاح می‌باشد. اگرچه در شرایط محیطهای فیزیولوژیك نظیر مایع تخمدان، علی رغم وجود بیش از یك مولار K^+ تحرك پذیری اسپرم مهارنمی شود، زیرا در این محیطهای فیزیولوژیك K^+ با سایر ترکیبات واکنش می‌دهد. کاتیونهای Na^+ ، Ca^{2+} ، Mg^{2+} باعث کاهش اثرات مهارکنندگی Na^+ بر روی تحریك پذیری اسپرم می‌شوند. به طوری که اثر کاتیونهای دو ظرفیتی بیش از Na^+ است. باینز (Baynes) در سال 1981 مشاهده کرد که K^+ یا K^+ به تنهایی سبب ایجاد تحرك پذیری اسپرم نمی‌شوند اما مقدار کمی Ca^{2+} به آنها اضافه شود سبب فعال شدن اسپرم میشوند.

همچنین همین اثر با شدت کمتری برای حالتی که Mg^{2+} به این یونها اضافه شود مشاهده گردید. اگرچه این نتیجه‌گیریها عمومیت نداشته بلکه ممکن است در گونه های مختلف اثرات مختلفی از کاتیونها دیده شود اگر به مایع اسپرمی NaCl اضافه شود باعث ایجاد تحرك پذیری اسپرم می شود. علاوه بر این تحرك پذیری ناشی از محلول یك به یك Na^+ به K^+ بیش از نسبت 16 به یك Na^+ به K^+ می‌باشد (Stoss, 1983).

3-5-2- شرایط اسیدی یا بازی (pH)

یکی از عوامل موثر بر تحرك پذیری pH است. در ماهی قزل‌آلا محلولهای قلیایی نظیر مایع تخمدان در pH=7/8 باعث تحرك پذیری نمی شود. در حالی که شرایط قلیایی بیشتر از مایع تخمدان یا مایع اسپرمی سبب ایجاد تحرك پذیری اسپرم در آزاد ماهیان می‌شود. در ماهی کفال خاکستری (Mugil cephalus) اسپرمها در شرایط pH بین 5/5 تا 7 فعال می‌شوند. اگرچه شرایط استاندارد مناسب برای فعالیت آنها pH =7 است (Stoss, 1983).

3-5-3- فشار اسمزی (Osmolarity)

ایجاد تحرك پذیری به وسیله تغییر فشار اسمزی محیط مایع اسپرمی در مقالات متعدد ارائه شده است. برطبق نظریات موریزاوا (Morisawa) و سوزوکی (Suzki) در سال 1980 محیطهای هیپوتونیك KCl, NaCl و مانیتول سبب آغاز تحرك پذیری اسپرم ماهیان که جهت تکثیر به آب شیرین مهاجرت می‌کنند می شوند. تحقیقات نشان داده که، اثرات محلولهای ایزوتونیك در ایجاد تحرك پذیری اسپرم ماهیان بیشتر از اثرات محلولهای هیپوتونیك می‌باشد. به طوری که محلول ایزوتونیك NaCl سبب ایجاد تحرك پذیری بر روی اسپرم اردك ماهی (Esox lucius) می شود. اگر چه برعکس محلول هیپوتونیك باعث ایجاد تحرك پذیری در اسپرم ماهیان استخوانی نظیر کفال خاکستری (Mugil cephalus) می شود. در این گونه محلول قندی هیپوتونیك باعث ایجاد افزایش تحرك پذیری اسپرم می‌شود. در آزاد ماهیان محلول نمکی یا مانیتول به میزان حدود 400 میلی اسمول سبب شروع تحرك پذیری اسپرم می شود. برطبق نظریات بیلارد (Billard) در سال 1980 محلول ساکاروز که دارای فشار اسمزی بین 200 تا 300 میلی اسمول در pH =9 باشد باعث ایجاد تحرك پذیری در اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان نمی شود. اگرچه هورست (Horst) فعال شدن اسپرم ماهی قزل‌آلای رنگین کمان را در فشار اسمزی 300 میلی اسمول مشاهده کرده است. وقتی اسپرم ماهیان زنده‌زا در معرض فشار اسمزی برابر 50 تا 300 میلی‌اسمول قرار گیرند فعال می شوند. در محلول رینگر اسپرم اغلب به صورت فوری تخریب می‌شود. از طرف دیگر وقتی در زمان اسپرم گیری در ماهیانی که مورد تکثیر قرار می‌گیرند اسپرمها در معرض هوا قرار داده شوند فعال می شوند. بنابراین واضح است که، شرایط محیطی طی تخمك گذاری و لقاح باعث فعال شدن و تحرك پذیری اسپرم ماهیان می شود. اگرچه چگونگی اثر این فاکتورهای محیطی بر روی اسپرم هنوز به خوبی مشخص نشده است (Stoss, 1983).

4 – مواد و روشهای بررسی

4-1- تامین مولدین

ماهیان مولد پس از صید از دریا با بررسی وضعیت ناحیه تناسلی و شکم تعیین جنسیت شدند. سپس این ماهیان توسط خودرو مجهز به کپسول اکسیژن در داخل چان برزنتی به مزرعه‌های تکثیر و پرورش منتقل شدند. محل اجرای طرح مزارع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری در آق‌قلا گرگان (شهید مرجانی) و سمسکنده ساری (شهید رجایی) بوده است. ماهیان مولد مزرعه شهید مرجانی از صیدگاه ترکمن و ماهیان مولد مزرعه شهید رجایی از صیدگاه تازه‌آباد تامین شدند. مولدین مورد استفاده شامل دو گونه از ماهیان خاویاری بنامهای تاس ماهی ایرانی قره‌برون (Acipenser persicus) و ازون‌برون (Acipenser stellatus) بودند. جزئیات مربوط به مولدین مورد استفاده در نتایج بیان شده است. ماهیان مولد منتقل شده، جهت عادت پذیری به آب شیرین و آمادگی رسیدگی جنسی به مدت هفت روز در استخرهای جداگانه نگهداری شدند.

4-2- حصول رسیدگی جنسی در مولدین

پس از عادات پذیری اولیه، وزن ماهیان مولد تعیین شد. سپس ماهیان مورد تزریق پودر هیپوفیز ماهی خاویاری (Sturgeon pituitary extract) که در استن خشك شده بود قرار گرفتند. جهت ایجاد رسیدگی جنسی به ماهیان مولد ماده به طور متوسط میزان سه میلی گرم بر کیلوگرم پودر هیپوفیز تزریق شد. برای این منظور ابتدا کل مقدار پودر هیپوفیز مورد نیاز هر مولد با توجه به وزن تعیین شد. سپس این مقدار در آب مقطر حل گردید. به دنبال آن تزریق ماهیان ماده در دو مرحله و تزریق ماهیان نر در یك مرحله انجام شد. در تزریق ماهیان ماده ابتدا یك سوم کل مقدار محلول هیپوفیز و در مرحله دوم به فاصله 12 ساعت پس از تزریق اول، بقیه مقدار محلول هیپوفیز تزریق شد، مقدار پودر هیپوفیز به کار برده شده برای ایجاد رسیدگی جنسی در ماهیان مولد نر به میزان دو نیم میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی بوده است. علاوه براین در تعدادی از تیمارهای مورد آزمایش جهت ایجاد رسیدگی هم زمان در مولدین نر و ماده، تزریق ماهیان مولد نر هم زمان با تزریق دوم مولدین ماده انجام شد. اگر چه بسته به روند اجرای کار در بعضی از مواقع فقط ماهیان نر جهت حصول اسپرم مورد تزریق قرار داده شدند.

4-3- دست یابی به سلولهای جنسی در مولدین

ماهیان ماده به فاصله زمانی ده ساعت پس از تزریق دوم با پایین آوردن سطح آب استخر با بررسی ناحیه تناسلی و فشار شکم از نظر رسیدگی جنسی و سیالیت تخمکها مورد بررسی قرار گرفتند. علاوه براین سیالیت اسپرم در ماهیان نر با کمك سوند متصل به سرنگ 50 میلی لیتری با مکش بررسی شد.

در صورت حصول اطمینان از رسیدگی جنسی مولدین، اسپرم گیری از ماهیان نر با سوند متصل به سرنگ انجام شد. برای حصول تخمکها ابتدا با وارد کردن ضربه به ناحیه سر ماهیان آنها را بیهوش کرده، سپس با پاره کردن شکم تخمك کشی از مولدین ماده انجام شد.

4-4- بررسی فعالیت اسپرم

پس از اسپرم گیری از مولدین نر فعالیت اسپرم مورد سنجش قرار گرفت. برای این منظور مقدار یك میلی لیتر اسپرم در آب مقطر رقیق شد. سپس به کمك سرنگ انسولین مقدار 0/05 میلی‌لیتر از آن روی لام قرار داده شد. برای سنجش فعالیت، در یك میدان دید با عدسی چشمی 40 میکروسکوپ تعداد 100 اسپرم از نظر وضعیت حرکتی، در فاصله زمانی یك دقیقه مورد شمارش قرار گرفتند. این روش مشابه روش کونت (Conte, 1989) می‌باشد. در روش کونت برای تعیین فعالیت اسپرم در طی مدت 30 ثانیه تعداد 100 اسپرم با عدسی چشمی 20 میکروسکوپ در میدان دید شمارش می شود. در این روش نمونه‌هایی که دارای تعداد 7 الی 10 عدد اسپرم متحرك فعال در میدان دید باشند جهت لقاح مناسب می‌باشند. و بر همین اساس اسپرمها از نظر حرکتی به سه دسته فعال که دارای حرکت سریع می باشند و نیمه فعال که دارای حرکاتی در پیرامون خود می باشند و اسپرمهای زنده که دارای حرکات ضربان‌دار در جایگاه خود می‌باشند تقسیم شدند.

4-5- اصول دست یابی به رقیق کننده مناسب

برای اجرای تیمارهای آزمایشی در مزرعه شهید مرجانی محلولهای مورد استفاده را از قبل آماده کرده و تیمارهای آزمایشی انجماد در محل آزمایشگاه بخش تکثیر و پرورش انجام شد. در مزرعه تکثیر و پرورش شهید رجایی پس از اسپرم گیری از مولدین، پایوت‌های حاوی اسپرم در داخل پودر یخ قرار داده شدند سپس جهت اجرای عملیات انجماد و نگهداری به آزمایشگاه ژنتیك پژوهشکده، در ساری منتقل شدند. ضمن درنظر گرفتن عواملی نظیر رعایت بهداشت و حفظ شرایط استریل، آزمایشات زیر جهت دست یابی به بیوتکنیك رقیق کننده مناسب اسپرم در نیتروژن مایع (Liquid nitrogen) انجام شد. در این بررسیها تلاش شده است که در حد امکان یکی از فاکتورها متغییر باشد تا بتوان ارتباط منطقی بین نتایج برقرار کرد. علاوه براین در تمام این آزمایشات به جز تیمار آزمایشی مربوط به تعیین نسبت رقیق کننده به اسپرم، از میزان یك میلی لیتر اسپرم به مقدار 10 میلی‌لیتر رقیق کننده استفاده شده است. در فاصله‌های زمانی 5 و 15 دقیقه پس از اینکه اسپرم به محیط رقیق کننده وارد شد فعالیت اسپرم بررسی شده است. هر یك از این آزمایشات 10 بار تکرار شده است. که جزئیات آزمایشات انجام شده به شرح زیر است.

الف: تعیین اثر هر یك از عوامل رقیق کننده به طور جداگانه بر فعالیت اسپرم

ب: تعیین ارتباط غلظت ساکارز بر فعالیت اسپرم

پ: تعیین اثر درصد زرده تخم مرغ بر فعالیت اسپرم

ت: تعیین اثر درصد دی متیل سولفکساید بر فعالیت اسپرم

ث: تعیین مقدار تریس (Tris- HCl) اضافه شده به محیط رقیق کننده

ج: تعیین نسبت اسپرم به رقیق کننده

چ: بررسی نقش اکسیژن دهی به محیط رقیق کننده و ارتباط آن با فعالیت اسپرم

ح: بررسی اثرات نحوه انجماد اسپرم

خ: بررسی اثرات گرم کردن (Thawing) اسپرم پس از انجماد

د: تعیین میزان توده سلولی اسپرم به مایع اسپرمی

ذ: بررسی نقش درصد دی متیل سولفکساید در شرایط انجماد

الف: به منظور تعیین اثر هر یك از اجزاء رقیق کننده روی فعالیت اسپرم، در چهار لوله آزمایش به ترتیب مقدار 10 میلی لیتر از آب مقطر خالص، ساکاروز یك مولار، دی متیل سولفکساید، زرده تخم مرغ، ریخته شد. سپس به هریك از لوله‌های آزمایش مقدار یك میلی‌لیتر از اسپرم تازه با فعالیت مناسب اضافه گردید. لوله‌های آزمایش را به‌آرامی تکان داده تا به خوبی ترکیب شوند. پس از گذشت مدت زمان 5 و 15 دقیقه فعالیت اسپرم در آنها بررسی شده است.

ب: جهت تعیین ارتباط غلظت ساکاروز با فعالیت اسپرم، غلظتهای مختلفی از ساکاروز به میزان 1، 2، 0/04 و 0/008 مولار در آب مقطر تهیه و وارد لوله‌های آزمایش جداگانه شدند. پس از اینکه اسپرم به لوله‌های آزمایش ریخته شد. فعالیت اسپرم در آنها بررسی شده است.

پ: با توجه به تعیین مقدار غلظتی از ساکاروز که اثر نامناسبی بر فعالیت اسپرم نداشته است. محلولهایی با غلظت پایه 0/04 مولار ساکاروز در آب مقطر تهیه شد. سپس به هر یك از لوله‌های آزمایش زرده تخم مرغ با درصدهای 5، 15، 25 و 35 وارد گردید. پس از این مرحله اسپرم به لوله‌های آزمایش اضافه شد. پس از گذشت مدت زمان لازم فعالیت اسپرم بررسی و نتایج یادداشت شد.

ت: پس از تعیین میزان درصد نسبی زرده تخم مرغ در محیط رقیق کننده، جهت تعیین اثرات درصد دی متیل سولفکساید به لوله‌های آزمایش حاوی محلول 0/04 مولار ساکاروز و 35 درصد زرده تخم مرغ به ترتیب مقادیر 2، 10، 18، 26 و 32 درصد دی‌متیل سولفکساید اضافه گردید. سپس اسپرم با نسبت یك به 10 در لوله‌های آزمایش ریخته شد. پس از گذشت مدت زمان لازم فعالیت اسپرم در آنها بررسی شد. در این آزمایشات نمونه‌هایی از این تمیارهای که به طور آنی (فوری) در ازت قرار داده شده بودند فعالیت اسپرم پس از گذشت 30 دقیقه بررسی شد.

ث: جهت تعیین مقدار تریس HCl مورد نیاز، ابتدا pH اسپرم خالص اندازه گیری شد. این pH برابر

7/6 می باشد. سپس با توجه به pH اسپرم، محیطی شامل ساکاروز 0/04 مولار، 25 درصد زرده تخم مرغ، دو درصدی دی متیل سولفکساید، تهیه شد. پس از این مرحله محیط رقیق کننده را با محلول یك مولار تریس تیتر کرده و به طور مرتب pH اندازه گیری شد. وقتی pH به مقدار میزان دلخواه مورد نظر یعنی pH برابر 7/6 رسید. مقدار تریس مصرف شده و حجم نهایی محلول یادداشت گردید.

ج: در بررسی اثرات نسبت اسپرم به محیط رقیق کننده ابتدا محیطی رقیق کننده حاوی ساکاروز 0/04 مولار، 25 درصد زرده تخم مرغ، 2 درصد دی‌متیل سولفکساید، تهیه شد. سپس اسپرم به میزان یك به 10 و یك به 100 در آن رقیق شد و اثرات این شرایط رقت بر فعالیت اسپرم طی مدت زمان یك ساعت بررسی شد.

چ: به منظور بررسی نقش اکسیژن در محیط رقیق کننده، ابتدا اسپرم به میزان یك به 10 در محیط رقیق کننده ریخته شد. سپس شیلنگ متصل به کپسول اکسیژن را به ظرف حاوی اسپرم و محیط رقیق کننده وارد گردید به طوری که اکسیژن به آرامی وارد محیط رقیق کننده شود. در این حالت فعالیت نمونه‌های حاوی اسپرم که در محیط رقیق کننده حاوی اکسیژن قرار داده شدند با نمونه های شاهد که در معرض اکسیژن قرار نگرفته‌اند پس از گذشت مدت یك ساعت مقایسه گردیدند.

ح: جهت بررسی اثرات نحوه انجماد بر روی فعالیت اسپرم، دو روش انجماد آنی (فوری) و تدریجی آزمایش شد. در روش انجماد آنی پس از ریختن اسپرم به محیط رقیق کننده، بلافاصله آنها را وارد سرنگ انسولین، اپندروف یا پایوت کرده و درون تانك ازت مایع 196- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در حالی که در روش انجماد تدریجی به ترتیب با قرار دادن نمونه در یخچال، فریزر، بخار نیتروژن مایع و نیتروژن بتدریج مایع دما کاهش داده شد به طوری که سرانجام نمونه‌ها در تانك ازت قرار داده شدند. در این حالت نسبت تقریبی کاهش درجه حرارت از دمای 23 تا 25 درجه سانتی‌گراد به میزان 5 درجه در دقیقه، از 15 تا صفر درجه سانتی‌گراد به میزان یك درجه در دقیقه، از صفر تا 25- درجه سانتیگراد به میزان 3 درجه سانتیگراد در دقیقه و از دمای 25- تا 70- درجه سانتیگراد به میزان 15 درجه سانتیگراد در دقیقه بوده است. سپس از دمای 70- درجه با ازت مایع تماس داده شدند. پس از چند لحظه در ازت مایع غوطه ور شدند.

خ: جهت بررسی اثرات نحوه گرم کردن اسپرم پس از خروج از شرایط انجماد، دو روش گرم کردن خشك و گرم کردن مرطوب آزمایش گردید. در روش گرم کردن خشك پایوتهای حاوی اسپرم منجمد پس از خروج از ازت مایع، برای مدت 15 دقیقه در انکوباتور با درجه حرارت 40 درجه سانتیگراد قرار داده شدند. ولی در روش گرم کردن مرطوب، ابتدا پایوتهای حاوی اسپرم به مدت 10 دقیقه در معرض آب با حرارت 23 درجه سانتیگراد داده شدند. سپس این پایوت‌ها به داخل بشری حاوی آب که در داخل انکوباتور با درجه حرارت 40 درجه سانتی‌گراد قرار داشت منتقل شدند و به مدت 25 دقیقه تحت این شرایط قرار گرفتند. پس از گرم کردن اسپرم با هر یك از روشهای فوق، مجدد اسپرم که در محیط رقیق

کننده قرار داشت به نسبت یك به 10 در آب مقطر با حرارت 37 درجه سانتیگراد رقیق شد. سپس بررسی فعالیت بر روی آن انجام گرفت.

د: جهت تعیین نسبت میزان توده سلولی (سلولهای اسپرم) به مایع اسپرمی، پس از اسپرم گیری از هر یك از ماهیان، مقدار 10 میلی‌لیتر اسپرم در لوله آزمایش مدرج ریخته شد. سپس این لوله آزمایش برای مدت یك شبانه روز به حالت دربسته در شرایط آزمایشگاه قرار داده شد. پس از گذشت این مدت نسبت توده سلولی که ته نشین شده بود به نسبت مایع اسپرمی که در روی توده سلولی قرار گرفته بود مورد سنجش قرار گرفت.

ذ: جهت بررسی نقش درصد دی‌متیل سولفکساید بر فعالیت اسپرم در شرایط ازت مایع، به محیط رقیق کننده پایه شامل 0/04 مولار ساکاروز، 25 درصد زرده تخم مرغ، دی‌متیل‌سولفکساید به میزانهای 2، 10، 18، 26 و 32 درصد اضافه شد. پس از تهیه محیطهای رقیق کننده حاوی درصدهای مختلف از دی‌متیل سولفکساید، اسپرم در هر یك از محیطهای رقیق کننده، ریخته شد و با روش تدریجی منجمد گردیدند. سپس بررسی فعالیت بر روی آنها انجام شد.

4-6- نحوه لقاح

شرایط آزمایشات برای انجام لقاح اسپرم منجمد شده، با تخمك طوری برنامه‌ریزی شده بود که، اغلب هنگامی که ماهیان ماده جهت حصول رسیدگی جنسی مورد تزریق قرار می‌گرفتند همزمان چند ماهی نر جهت در دسترس داشتن اسپرم غیر منجمد تازه، مورد تزریق قرار می‌گرفتند. از طرف دیگر اسپرم منجمد شده در تانك ازت نیز در دسترس قرار داشت. به طوری که به دنبال اطمینان از سیال شدن تخمکها در ماهی ماده، فعالیت اسپرم شاهد و منجمد بررسی می شد. سپس ماهی ماده با ضربه به ناحیه سر بیهوش و از استخر خارج می شد. آنگاه با پاره کردن شکم تخمکها استحصال می شد و به کمك توری خون و مایع تخمدان از تخمکهای استحصال شده جدا می‌گردید. تخمکهای استحصال شده وزن شده و به چند قسمت مساوی تقسیم می شدند. سپس لقاح تخمکها با اسپرمهای تازه یا منجمد انجام می شد. برای استفاده از اسپرم منجمد در لقاح، اسپرم منجمد پس از خروج از ازت مایع به روش مرطوب گرم گردید. لقاح به دو روش انجام شد. در روش اول مقدار یك میلی‌لیتر اسپرم منجمد گرم شده، در حجم 100 میلی لیتر آب مزرعه پرورش با درجه حرارت 37 درجه سانتی‌گراد رقیق شد و از آن برای لقاح 350 گرم تخمك استفاده گردید. در حالی که در روش دوم مقدار یك میلی لیتر اسپرم منجمد گرم شده، به میزان هر 350 گرم تخمك اضافه شد سپس مقدار 100 میلی‌لیتر آب 37 درجه سانتی‌گراد بر روی آنها ریخته شد و به مدت زمان 10 دقیقه جهت لقاح، اسپرم با تخمکها هم زده

شدند. پس از این مدت آب به آرامی از محیط تخم‌ها خارج شد. سپس جهت رفع چسبندگی تخمها، شستشوی آنها با آبی که در آن خاك رس حل شده بود به مدت يك و نیم ساعت انجام شد.

در طی عمل رفع چسبندگی، تخم‌ها به طور مرتب هم زده می‌شدند. به طوری که در طی این عمل در صورت لزوم برای دو تا پنج مرتبه آب حاوی پودر خاك رس با آب جدید حاوی این پودر تعویض شد. پس از گذشت مدت زمان لازم با وارد کردن آب تازه شستشوی تخمکها به مرور ادامه می‌یافت به طوری که در پایان به طور کامل پودر خاك رس شسته شد و تخمها به ترانهای انکوباسیون یوش چنکو منتقل شدند. در طی دوره انکوباسیون با کنترل جریان آب و خارج کردن تخمهای قارچ زده مراقبت‌های لازم انجام می شد.

در مجموع تعداد 25 قطعه ماهی مولد قره‌برون به تفکیك شامل 10 مولد ماده و 15 مولد نر در فاصله زمانی 1375/9/7 لغایت 1375/9/20 و 136/1/11 لغایت 1376/1/30 همچنین تعداد 20 قطعه مولد ازون‌برون به تفکیك شامل 7 مولد ماده و 13 مولد نر مورد تزریق قرار داده شدند. برای هر تیمار آزمایش مقدار 350 گرم تخمك در نظر گرفته شد. در حدود شش ساعت پس از لقاح، با نمونه برداری تصادفی و شمارش تعداد تخمهای چشم زده درصد لقاح تعیین شد. علاوه براین نمونه برداری و شمارش در مرحله مشخص شدن کیسه زرده (Yolk plug) نیز انجام شد. همچنین تعداد لارو خارج شده شناور شمارش گردیدند.

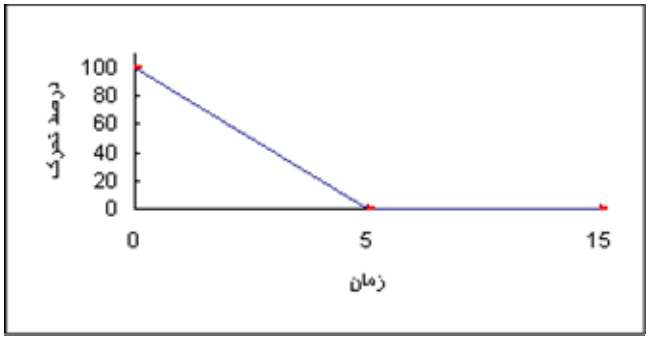
6 – نتایج

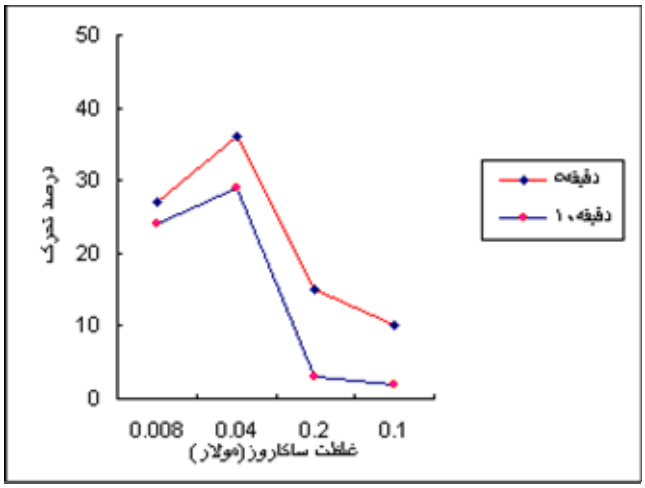
6-1- اصول دست یابی به رقیق کننده مناسب

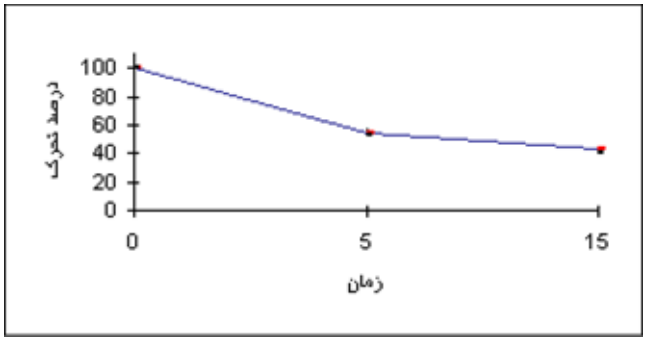
آزمایشات تعیین اثر هر يك از عوامل رقیق کننده، ارتباط غلظت ساکاروز بر فعالیت اسپرم، تعیین مقدار درصد زرده تخم مرغ، درصد دی‌متیل سولفکساید، براساس 10 بار تکرار هر آزمایش بر روی 10 قطعه ماهی قره‌برون می باشد. به طوری در نمودار شماره يك تا چهار میانگین نتایج اثرات این آزمایشات بر روی فعالیت اسپرم نشان داده شده است. در زمینه اثر عوامل رقیق کننده بر فعالیت اسپرم در حالتی که هر عامل به طور جداگانه بر روی اسپرم این ماهیان اثر داده شد. مشاهده گردید که، چند ثانیه پس از اضافه کردن اسپرم به محیط دی‌متیل سولفکساید خالص، تمام اسپرمها فعالیت خود را از دست می‌دهند. همچنین در غلظت‌های بسیار بالا ساکاروز سبب کاهش فعالیت اسپرم می شود در حالی که در غلظت 0/04 مولار نسبت به سایر غلظت‌های ساکاروز اسپرم فعالیت بیشتری داشته است (نمودار 5). درخصوص تعیین اثر درصد زرده تخم مرغ بر فعالیت اسپرم مشاهده گردید که بین میزان 25 و 35 درصد زرده تخم مرغ در مدت پنج دقیقه فعالیت تغییراتی نداشته است (نمودار 6). با توجه به نتایج آزمایش مبنی بر اینکه دی‌متیل سولفکساید خالص پس از چند ثانیه سبب از بین رفتن فعالیت تمام اسپرمها شده

است(نمودار 7). از طرف دیگر ضرورت استفاده از دی‌متیل سولفکساید به عنوان یك عامل حفاظت کننده در شرایط انجماد، بنابراین از میزان دو درصد دی‌متیل سولفکساید در محیط رقیق کننده استفاده شده است. در تعیین مقدار تریس HCl اضافه شده به محیط رقیق کننده جهت تنظیم pH از محلول یك مولار استفاده شد به طوری که مقدار مصرفی آن در محلول نهایی محیط رقیق کننده ساخته شده 0/1 مولار بوده است. در طی این مرحله pH محلول رقیق کننده از pH =8/6 به میزان pH اسپرم ماهیان خاویاری که برابر 7/6 بود تنظیم گردید. در زمینه اثرات اکسیژن‌دهی به محیطهای رقیق کننده در مقایسه با محیطهای رقیق کننده‌ای که در معرض اکسیژن قرار داده نشده بودند مشاهده گردید که فعالیت اسپرم در فاصله زمانی یك ساعت پس از در معرض گذاری، در نمونه‌های حاوی اکسیژن یك و نیم برابر نمونه‌های فاقد اکسیژن بوده است. در زمینه بکار گیری دو روش انجماد تدریجی و آنی مشاهده گردید که در انجماد به شیوه تدریجی پس از گذشت مدت زمان 10 شبانه روز تعداد اسپرمهای فعال پنج برابر اسپرمهای فعال، روش انجماد آنی بوده است (نمودار 8). در آزمایشات مربوط به استفاده از روش‌های گرم کردن اسپرم پس از انجماد مشاهده گردید، اسپرم فعال در روش گرم کردن مرطوب سه و نیم برابر روش گرم کردن خشك بوده است. در زمینه نتیجه توده سلولی (تعداد اسپرمها) به مایع اسپرمی مشاهده گردید که میزان توده سلولی به مایع اسپرمی یك به پنج بوده است.

در تیمارهای آزمایشی که اسپرم با درصدهای مختلف دی‌متیل سولفکساید در محیط رقیق کننده در شرایط ازت مایع قرار داده شده بودند. پس از گذشت مدت زمانهای 30 دقیقه و پنج شبانه روز فعالیت اسپرم بررسی شد مشاهده گردید که، بیشترین فعالیت در نمونه‌هایی که در محیط رقیق کننده حاوی دو درصدی متیل سولفکساید قرار داده شده‌اند می‌باشد. همچنین مقایسه این نمونه‌ها با نمونه‌های شاهد که با همین شرایط در ازت مایع قرار داده شده بودند نشان داد که وجود دی‌متیل سولفکساید در حفظ اسپرم در دماهای پایین نقش اساسی دارد جزئیات تیمارهای اسپرم ماهی ازون‌برون که با درصدهای مختلف دی‌متیل سولفکساید در محیط رقیق کننده پایه در ازت مایع قرار داده شده بودند در جدول شماره 1 بیان شده است.


100
80
60
40
20
0
درصد تحرک
0
5
15
زمان


50
40
30
20
10
0
درصد تحرک
0.008
0.04
0.2
0.1
غلظت ساکاروز (مولار)
دقیقه
دقیقه ۱۰


100
80
60
40
20
0
درصد تحرک
0
5
15
زمان

6-2- لقاح

در مجموع تعداد 25 قطعه مولد ماهی قره‌برون به تفکیك شامل 10 قطعه مولد ماهی ماده و 15 قطعه مولد ماهی نر در فاصله زمانی 1375/9/7 لغایت 1375/9/20 و همچنین 76/1/11 تا 76/1/30 و تعداد 20 قطعه مولد ماهی ازون‌برون به تفکیك شامل 7 مولد ماهی ماده و 13 مولد ماهی نر مورد تزریق قرار داده شدند جزئیات مشخصات بیومتری تعدادی از مولدین در جدول ضمیمه بیان شده است. نتایج نشان داد که، میزان 60 درصد ماهیان مولد ماده در هر دو گونه و 75 درصد ماهیان مولد نر در هر دو گونه که جهت رسیدگی جنسی مورد تزریق قرار گرفته بودند رسیدگی جنسی را نشان دادند. نتایج کلی تیمارهای آزمایشی براساس متوسط تعداد 50 عدد تخمك در هر گرم برای ماهی قره‌برون و تعداد 70 عدد تخمك برای ماهی ازون‌برون می باشد. جهت انجام عمل لقاح در هر تیمار، از اسپرمهای منجمد سه قطعه ماهی از همان گونه استفاده شده است این تیمارها بر روی تخمکهای پنج مولد ماده رسیده از هر یك از ماهیان در زمانهای مختلف انجام شده است. بطوری که هر تیمار آزمایش پنج بار تکرار شده است. نتایج حاصله براساس میانگین به دست آمده از این آزمایشات می‌باشند که در جدول شماره 2 و نمودار شماره 9 بیان شده‌اند.

از نظر فعالیت اسپرم کمترین فعالیت 12 و بیشترین فعالیت برابر 35 بوده است. همچنین کمترین درصد لقاح 8 و بیشترین آن 27 بوده است. علاوه بر این بیشترین تخمهایی که تا پایان مرحله گاسترولاسیون و تشکیل کیسه زرده پیشرفت داشته اند 16 درصد بوده است. این نتایج مربوط به لقاح اسپرمهایی است که، مدت زمان 12 تا 240 ساعت از انجماد آنها گذشته بود. در یکی از تیمارهای آزمایش مربوط به اسپرمهای که مدت 36 ساعت از انجماد آنها گذشته بود تعداد شصت قطعه لارو خارج شد. بررسیهای آزمایشگاهی نشان داد که، در تیمارهای اسپرم منجمد شده پس از اینکه از ازت مایع خارج می‌شدند اسپرماتیدها که دارای مراحل پایین‌تری از لحاظ رسیدگی جنسی بودند نسبت به اسپرماتوزوئیدها دارای قدرت تحرك بیشتری بودند. همچنین در حالتی که از اسپرم منجمد شده که وارد هیچ گونه محیط رقیق کننده‌ای نشده بود و مدت 12 ساعت از انجماد آنها گذشته بود در لقاح استفاده گردید تعداد هزار قطعه لارو تولید گردید.

جدول شماره 1: جزئیات نتایج تیمارهای اسپرم ماهی ازون برون با درصدهای مختلف دی‌متیل‌سولفکساید در محیط رقیق کننده پایه و ازت مایع

درصد DMSO	درصد فعالیت پس از 30 دقیقه	درصد فعالیت پس از 5 شبانه روز	درصد فعالیت پس از 10 شبانه روز
2	82	76	24
10	85	70	10
18	73	26	12
26	65	17	0
32	0	0	0
شاهد	35	0	0

جدول شماره 2: نتایج لقاح تیمارهای اسپرم منجمد شده قره برون و ازون‌برون (تعداد تکرار هر تیمار 5 بار و از ده مولد نر مختلف بوده است)

نوع ماهی	مدت زمان انجماد	بهترین درصد فعالیت	بهترین درصد لقاح	بهترین‌درصدتخمکهای‌کیسه‌زرده	تعداد اروها
قره برون	12	35	27	16	0
قره برون	24	27	21	16	0
قره برون	36	24	17	12	60قطعه
قره برون	45	12	0	0	0
قره برون	205	17	25	11	0
ازون برون	10	18	8	3	0
ازون برون	120	21	12	0	0
ازون برون	240	25	9	9	0

7- بحث

شرط اساسی نگهداری اسپرم در محیط رقیق کننده سالم ماندن اسپرم در طی مدت زمان انجماد می باشد. از آنجا که اسپرم ماهیان خاویاری از چهار قسمت اکروزوم، سر، قطعه وسط و دم تشکیل شده است بنابراین شرایط انجماد باید طوری باشد که به هیچکدام از این قسمتها آسیبی نرسد. بر طبق گزارش سیریزکو (Ciereszko, 1996) آنزیمی بنام اکروزین در ساختمان اکروزوم ماهیان خاویاری قرار دارد که این آنزیم شاخص مناسبی برای تشخیص آسیب‌های احتمالی که در طی انجماد به ساختار اسپرم این ماهیان وارد شود می باشد. به طوری که در طی مدت زمانهای طولانی نگهداری اسپرم فعالیت اکروزین کم می شود. اسپرمهایی که فعالیت اکروزین در آنها حفظ شود دارای تحرك پذیری بهتری خواهند بود. از سوی دیگر علی‌رغم وجود چندین میکروپیل در تخمکهای ماهیان خاویاری وجود اکروزوم برای ورود اسپرم از غشاء تخمك ضروری می باشد (Ciereszko, 1996) قسمت اصلی سر اسپرم دارای هسته اسپرم می باشد بنابراین شرایط محیطهای غیر ایزوتونیك با داشتن pHهای مختلف ممکن است سبب تخریب هسته اسپرم شوند. محیطهای رقیق کننده هیپوتونیك که غلظت یونهای آنها کمتر از غلظت یونهای اسپرم باشد سبب وارد شدن آب محیط به داخل اسپرم می شوند و در نتیجه موجب تورم اسپرم میشوند. ولی محیطهای هیپرتونیك که غلظت یونهای آنها بیشتر از غلظت یونهای اسپرم باشد سبب خارج شدن آب اسپرم به داخل محیطی شوند و در نتیجه موجب جمع شدن اسپرم میشوند. بنابراین هر دو فرآیند سبب تخریب اسپرم می‌شود. قطعه وسط اسپرم بیشتر حاوی میتوکندری و آنزیمها و واکنش‌های زنجیره تنفسی می باشد و با تولید ATP به عنوان منبع انرژی در تحرك و فعالیت‌های اسپرم نقش عمده‌ای دارد. لذا حضور اکسیژن و مصرف آن جهت فعالیت‌های اسپرم باید مورد نظر قرار گیرد. علاوه بر اینها در ساختمان دم پروتئینهای دنین توبول A با پروتئین‌های توبولین توبولB واکنش می‌دهند و زمینه حرکت را فراهم می‌نمایند بنابراین اگر به طریقی ساختمان این توبولها تخریب شود جلوی حرکت اسپرم گرفته خواهد شد. از طرف دیگر در مواقع نیاز اسپرم به تحرك، جایگاه لازم برای تحرك در محیط رقیق کننده پیرامون اسپرم وجود داشته باشد لذا باید میزان رقت در محیط مورد توجه قرار گیرد. همچنین در زمینه تاثیر جداگانه هر یك از اجزاء محیط رقیق کننده بر ساختمان اسپرم مسائلی قابل بررسی می باشد از جمله اینکه، ساکاروز در غلظت زیاد با ایجاد شرایط محیط هیپرتونیك و در غلظت‌های پایین با ایجاد شرایط محیط هیپوتونیك سبب تخریب اسپرم می شود. از طرف دیگر زرده تخم مرغ در محیط رقیق کننده دارای نقش یك عامل کمکی به حفاظت کننده‌ها (Caryoprotectant) می‌باشد و شاید تا حدودی نقش تغذیه‌ای داشته باشد. بنابراین وقتی اسپرم

را وارد محیط رقیق کننده‌ای که فقط از زرده تخم تشکیل شده باشد، می‌کنیم غلظت پروتئین‌ها وسایر ترکیبات زرده از حرکت اسپرم در محیط جلوگیری می‌کند. دی‌متیل سولفکساید عامل حفاظت کننده اسپرم می باشد برطبق گزارش هلتز(Holtz) در سال 1983 عدم استفاده از دی‌متیل سولفکساید در محیط رقیق کننده سبب تشکیل کریستالهایی در محیط می شود که این کریستالها سبب تخریب اسپرم می شوند. در این تحقیق وقتی دی‌متیل سولفکساید خالص بر اسپرم اثر داده شد مشاهده گردید که بلافاصله سبب از بین رفتن کامل اسپرم می شود که این از بین رفتن به دلیل خاصیت اسیدی دی‌متیل سولفکساید می باشد. لذا ضمن توجه به ضرورت استفاده از آن در محیط رقیق کننده، کاربرد غلظت متعادلی از آن به طوری که سبب تخریب ساختمان اسپرم نشود لازم می باشد. بنابراین غلظت به کار برده شده از فرمول نهایی این تحقیق به میزان دو درصد فراهم کننده شرایط مناسبی برای اسپرم می باشد.

اگرچه بعضی از محققین به جای دی‌متیل سولفکساید از گلیسرول به عنوان یك عامل حفاظت کننده استفاده کرده‌اند ولی نتایج این تحقیق مبین این میباشد که گلیسرول از تحرك اسپرم ماهیان خاویاری جلوگیری می‌کند. در مصرف تریس HCl مهمترین مسئله تیتر کردن محیط رقیق کننده و رسیدن به شرایط pH مناسب است به طوری که pH رقیق کننده مشابه pH اسپرم در محیط خودش باشد که این pH برابر 7/6 می باشد. علی رغم اینکه در سال 1983 هلتز نشان داد که، امکان نگهداری اسپرم آزاد ماهیان تا مدت 32 روز با اضافه کردن آنتی بیوتیك در دمای دو درجه سانتی‌گراد وجود داشته است و اگر چه آنتی بیوتیك از رشد باکتریها در محیط رقیق کننده در شرایط درجه حرارت آزمایشگاهی که احتمال حضور و فعالیت باکتریها وجود دارد جلوگیری می‌کند ولی در درجه حرارتهای بسیار پایین نظیر درجه حرارت 196- درجه سانتیگراد که باکتریهای محیطی قادر به زیست نمی باشند استفاده از آنتی بیوتیك ضروری نمی‌باشد. بر همین اساس در این تحقیق از آنتی بیوتیك در محیط رقیق کننده استفاده نشده است. یکی دیگر از تکنیکهایی که در این تحقیق به کار برده شده است وارد کردن اکسیژن به محیط رقیق کننده می باشد اگرچه با فرضیه استوس(Stoss) در سال 1983 مبنی بر اینکه در درجه حرارتهای پایین متابولیسم اسپرم کاهش می یابد بنابراین نیازی به وارد کردن اکسیژن به محیط رقیق کننده نمی‌باشد ولی با توجه به نتایج آزمایشات بیلارد (Billard) در سال 1981 مبنی بر اینکه اکسیژن روی باقی ماندگی آن ضروری است و کاهش آن در محیط سبب کاهش باقی ماندگی اسپرم می‌باشد بنابراین حتی اگر اکسیژن تاثیری نداشته باشد به دلیل گفته شده فوق بهتر می باشد قبل از وارد کردن اسپرم به محیط رقیق کننده تزریق اکسیژن به محیط انجام شود. علاوه بر اینها استفاده از زرده تخم مرغ با غلظت 10 تا 25 درصد در محیط رقیق کننده

ضروری م باشد زیرا در صورتی که زرده تخم مرغ در محیط نباشد یا به میزان اضافی در محیط باشد، پس از خارج کردن اسپرم از شرایط انجماد اثرات منفی در توانایی باروری اسپرم دارد (Cherepanov et al., 1997).

همچنین محیط رقیق کننده‌ای شامل بافرتریس 20 میلی‌مول در pH برابر هشت و مقدار 12 درصد دی‌متیل سولفکساید و 12 درصد زرده تخم مرغ برای انجماد و نگهداری اسپرم ماهیان خاویاری به کار گرفته شده است (Drokin et al., 1997). علاوه بر این محیط دیگری شامل 12/5 تا 17/5 درصد اتیلن گلیکول در بافرتریس NaCl به میزان 12/25 میلی‌مول در pH برابر 8/5 برای انجماد و نگهداری اسپرم ماهیان خاویاری استفاده شده است (Jahnichon et al., 1997). در تحقیق دیگری از اتیلن گلیکول و اتیل اتر در دمای حرارت 196- درجه سانتی گراد در ازت مایع جهت انجماد و نگهداری اسپرم ماهیان خاویاری استفاده شده است (Kopeika et al., 1993). این تحقیق اگرچه در زمینه تعدادی از مواد استفاده شده در محیط رقیق کننده با گزارشهای فوق مشابهت داشته است ولی در میزان مواد به کار برده با گزارشهای فوق اختلاف داشته است. نتیجه کاهش درجه حرارت با آنچه دروکین (Drokin) در سال 1997 درخصوص اسپرم این ماهیان به کار برده به میزان کاهش درجه حرارت انجماد به میزان 20 درجه سانتی‌گراد و در طی مدت زمان یك دقیقه در فاصله 25- تا 70- درجه اختلاف داشته است به طوری که در این تحقیق کاهش درجه حرارت از 25- تا 70- به میزان 15 درجه در دقیقه انجام گرفته شده است که در مقایسه با دروکین کندتر انجام شده است.

همچنین جهت بررسی فعالیت اسپرم پس از خارج کردن ان از محیط ازت مایع از محلولهای مختلفی استفاده شده است از جمله چیرپانوف (Cherepanov) در سال 1993 از KCl در بافر HCl و لین(Lin) در سال 1996 از محلول 25 میلی‌مولار NaCl در 30 میلی‌مولار تریس HCl در pH =8 و دروکین (Dorkini) در سال 1997 از آب معمولی با درجه حرارت 40 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه استفاده کرده‌اند که این تحقیق به لحاظ به کار بردن آب با حرارت 40 درجه به عنوان عامل فعال کننده مشابه عملکرد دورکین می باشد.

علاوه بر اینها از تئوفیلین (Theophyline) که یك متیل گزانتین می باشد به عنوان یك عامل فعال کننده اسپرم پس از انجماد استفاده شده است. تئوفیلین با افزایش سطح AMP حلقوی سبب افزایش تحرك پذیری اسپرم می شود (Ciereszko et al., 1996) به طوری که وقتی میزان AMP حلقوی زیاد باشد باعث افزایش فعالیت تجزیه گلیکوژن شده و در نتیجه گلوکز جهت تولید انرژی برای فعالیت در اختیار اسپرم قرار می‌گیرد.

یکی از مسائلی که اغلب در تکثیر و پرورش مصنوعی ماهیان خاویاری با آن مواجه می شویم این است که، تخمکهای ماهیان خاویاری توانایی پذیرش چندین اسپرم را دارند طوری که حالت پلی اسپرمی ممکن است در آنها اتفاق افتد و در نتیجه این حالت، سبب مرگ و میر تخمها در مراحل اولیه تسهیم شود (Doroshov, 1993). یکی دیگر از مسائل مورد بحث تجهیزات لازم جهت تجزیه و تحلیل فعالیت اسپرمها قبل و بعد از انجماد می باشد به همین جهت در سال 1996 سیریزکوه Ciereszko آنالیز فعالیت اسپرم ماهیان خاویاری را به وسیله کامپیوتر انجام داده است. هنگام استفاده از اسپرم منجمد جهت لقاح در صورت کم بودن تعداد اسپرمهای فعال پس از ذوب کردن اسپرم منجمد، جهت جبران این کاهش باید از تعداد زیادی از پایوت‌های اسپرم منجمد استفاده شود. اگرچه کیفیت تخمکهای استحصالی هم در زمینه میزان لقاح بی‌تاثیر نمی باشد و عواملی از جمله سن ماهیان ممکن است، بر کیفیت تخمکها و در نتیجه لقاح موثر باشند. همچنین مدت زمانی که تخمکها پس از اولاسیون در حفره شکمی ماهی باقی مانده‌اند در تاثیر گذاری میزان لقاح موثر می‌باشد.

اسپرم ماهی خاویاری سفید به طور موفقیت آمیز به مدت 14 شبانه روز توسط کونتی در سال 1989 نگهداری شده است. همچنین نگهداری و انجماد اسپرم این ماهیان طی مدت شش ماه توسط چیرپانوف (Cherepanov) در سال 1997 انجام شده است. علاوه براین در سال 1997 اسپرم ماهی خاویاری استرلیاد Acipenser ruthenus توسط جانچن (Jahnichen) و همکاران به مدتهای یك تا 11 ماه در شرایط انجماد نگهداری شد که پس از گذشت مدت زمان 27 روز فعالیت 40 درصد در نمونه‌های اسپرم وجود داشته است و لاروهای خارج شده از لقاح این اسپرمها بین 44 تا 94 درصد در مقایسه با شاهد بوده است که مقایسه نتایج حاصله از این تحقیق بیانگر چشم انداز روشنی از استمرار اینگونه تحقیقات در کشور می‌باشد.

8 – نتیجه گیری

درخصوص اجرای این تحقیقات پیشنهادات زیر قابل ارائه می باشد.

الف) محیط رقیق کننده شامل 0/04 مولار ساکاروز، 0/1 مولار تریس، 25 درصد زرده تخم مرغ و دو درصد دی‌متیل‌سولفکساید جهت انجماد و نگهداری اسپرم ماهیان قره‌برون و ازون‌برون مناسب می‌باشد.

ب) میزان رقت اسپرم به محیط رقیق کننده به نسبت یك به 10 قابل توجیه می باشد

ج) فاصله زمانی بین اسپرم گیری و وارد کردن اسپرم به محیط رقیق کننده می‌بایست به حداقل رسانده شود.

د) جهت اینکه آسیب‌های ناشی از اثرات گرمایی در انتقال اسپرم به حداقل رسانده شود لازم است انتقال اسپرم در ظروف حاوی یخ انجام شود.

9 – پیشنهادات

جهت بدست آوردن استاندارد قطعی و مناسب انجماد اسپرم این گونه‌ها لازم می‌باشد آزمایشگاههای مجهز به تجهیزات پیشرفته مربوط به نگهداری اسپرم در مزارع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری راه اندازی شود و تحقیقات مستمر در این زمینه‌ها انجام شود.

10- تقدیر و تشکر

از همه عزیزان و بزرگوارانی که در اجرای این پروژه تحقیقاتی به نحوی همکاری داشته اند تشکر و قدردانی می شود.

1) دکتر رضا پورغلام ریاست وقت مرکز تحقیقات شیلات استان مازندران (پژوهشکده اکولوژی دریای خزر) به لحاظ جدیت و پیگیری در حسن اجرای پروژه
2) دکتر حسینعلی خوشباور رستمی ریاست فعلی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر (مرکز تحقیقات سابق) به لحاظ پیگیری های مربوط به برگزاری جلسه دفاعیه و ارائه گزارش نهایی
3) مهندس علی سلمانی معاونت فعلی و مهندس فرامرز لالوئی معاونت سابق تحقیقاتی جهت نظارت زمانبندی اجراء و مکاتبات
4) دکتر سیروس امیری نیا به لحاظ داوری و تصحیح گزارش نهایی
5) سید نورالدین نوش آبادی مسئول کامپیوتر پژوهشکده جهت کمك در اطلاع رسانی و سیده زهرا نبوی و احترام السادات علوی جهت مساعدت در تایپ

12 – ضمیمه

مشخصات بیومتری تعدادی از مولدین قره‌برون مورد استفاده در پروژه

ردیف	جنسیت	تاریخ تزریق	وزن به کیلوگرم	طول کل cm	طول فورکcm
1	نر	75/9/7	21	160	146
2	نر	75/9/7	18	162	145
3	ماده	75/9/7	24	181	163
4	ماده	75/9/8	18	152	139
5	ماده	75/9/8	22	176	160
6	نر	75/9/20	25	175	159
7	ماده	75/9/20	22	179	159
8	ماده	75/9/20	29	149	137
9	ماده	76/1/11	18	159	149
10	ماده	76/1/15	22	176	160
11	ماده	76/1/20	21	160	146

منابع

- کهنه شهری، مجید، آذری تاکامی، قباد، 1353. تکثیر مصنوعی و پرورش ماهیان خاویاری. انتشارات دانشگاه تهران
- حسینی تهرانی، سید علی، عرفانیان احمدپور، محمود، 1369. مبانی زیست شناسی سلولی و مولکولی. انتشارات کتابستان مشهد.

- Billard, R., 1981: Short term preservation of sperm under oxygen atomosphore in Rainbow Trout. Aqu. 23. 287-293
- Buyukhatipoglu, S. and Holtz, W., 1978: Preservation of trout sperm in liquid of frozen state. Aqu. 14: 49-56
- Cherepanov, V.V. and Kopeika, E.F, 1993: Freezing of sperm of the Azov – Black Sea Acipenserids. International symposium on sturgeons. Sep: 6-11 Moscow Russina
- Cherepanov, V.V. and Kopeika, E.F., 1997: Cryopreservation and low temperature storage of sperm of sturgeons. Sixth international symposium on genetics in aquaculture. June 24-28. Striling Scotland
- Ciereszko, A., Dabrowski, K., Ochkur, S.I., 1996: Characterization of acrosin like activity of lake sturgeon spermatozoa. Molecular peroduction and development 45:20 27-11
- Ciereszko, A., Toth, G.P., Christ, S.A., Dabrowski, K., 1996: Effect of cryopreservation and theophyllin on motility characteristics of laks sturgeons spermatozoa. Theriogenology 45: 665-672
- Conte, F.S., 1989: Hatchery manual for the white sturgeon Cooperative extension. university of California section: II, VII
- Dilauro, M.N., Krise, W.F., 1994: Short term cold storage of Atlantic sturgeon sperm. The progressive fish culturist 56: 143-199
- Doroshov, S.I., 1983: Artifical propagation of the white sturgeon Acipenser transmontanus. Richardson Aqu. 32: 93-109

- Dorkin S.I., Kopeika, E.F., 1993: Cryopreservation of the sperm of Sakalin sturgeon. International symposium on sturgeons spe: -6-11 Moscow Russia
- Dorkin S.I., Kopeika, E.F., 1997: Cryopreservation and phospholipid content of spermatozoa of some sturgeon species. Sixth international symposium on genetic in aquaculture June 24-28 Striling Scotland
- Holtz, W., 1993: Cryopreservation of rainbow trout. Aqu. 110:97-100
- Jahnichen, H., 1997: Motility and fertilizing capability of cryopreserved Acipenser ruthenus sperm, Sixth international symposium on genetic in aquaculture June 24-28 Striling Scotland
- Kopeika, E.F. Dybenko, O.V., 1993. Effect of cryoprotective agents and cryopreservation on stellate sturgeon embryos. International symposium on sturgeon spe. 6-11 Moscow Russia
- Lin, F., Ciereszko, A., Dabrouski, K., 1996: Sperm production and cryopreservation in muskellunge after carp pituitary extract and human chorionc gonadotropin injection. The progressive fish culturist 58: 32-37
- Stoss, J., Holtz, W., 1983, Successful storage of chilled Rainbow trout spermatozoa for up to 3 days. Aqu. 31: 269-274
- Stoss, O., 1983: Fish gamete preservation and spermatozoan physiolog: Fish physiology Vol: IXB. Academic press Inc.
- Tsai, H. P., Chac, N.H., 1994: Cryopreservation of small ablone sperm technique and its significance. J. fish. Soc. Taiwn. 21(44): 347-360
- Tsvetkova, L.I., Cosson, G., Liniiart, O., Billard, R., 1993: Motility and fertilizing capacity of intact and frozen thawed spermatozoa in sturgeons Acipenser baeri and Acipenser ruthonus 6-9 sep. International symposium on the carp.

Abstract

Annually, increasing antropogenic impact on environment results in a considerable aggravation of the ecological condition and extinction of many species of organisms and a decrease in the abundance of Acipenseridae fish family in the Caspian Sea. Therefore cryopreservation of the sturgeons sperm has become on urgent problem. Thus cryopreservation of gametes and embryos is considered to be one of the ways to preserve gene pool of the fish. In this research the broodfish originated from Turkman and Tazabad fish capture station in south of Caspian Sea. They were stored in fish breeding pond with river water flow for one week in shahyd Marjani and shahyd Rajaei fish farms. The males of broodfish were injected intramuscularly with action dryed sturgeon pituitary at doses of 2.5 $mgkg^{-1}$ body weight. The sperm was collected 12h later, by a sound connected to 50ml syringe. Activity of fresh sperm wa determined by mean of microscope after its dilution by water. Then the fresh sperm was diluted by cryoprotective medium in proportion of 1:10 containing 0.1 M of Tris-HCl buffer, pH 8.6, 2% dimethyl sulphoxide, 25% yolk of chiken egg and 0.04 M saccharrose. sperm diluted using this way was poured into 1ml syringe and frozen according to two method: immediately or gradually. After 12h to 205h activity of frozen-thawed sperm was determined and used for fertilization. As the result showed that the percentage of foucoundation (success of fertilization) was 27 and the percentage of yolk sac embryo stage was 16.

Key words: Sturgeon, Sperm, Fish, Cryopreservation

Ministry of jahad - e - agriculture
Department of education & research

TITLE : The possibility study of preservation and freezing sperm of two sturgeon species: Acipenser persicus, Acipenser stellatus
executor : h. noruzi moghadam
unit of execution : ecological academy of caspian sea
date of publishing : atumn 2003

this plan with farvast numberhas registered in publications committee of research & eduction department of minstry of jahad - e - agriculture .

the right of publishing is limited just for editor. saying of items, & showing of pictures, tables & graphs with mentioning of reference is allowed.

Ministry of jahad - e - agriculture
Iran fisheries public company

Final report:

The possibility study of preservation and freezing sperm of two sturgeon species Acipenser persicus, Acipenser stellatus