دانشکده شیلات و محیط زیست

رساله جهت اخذ درجه دکتری در رشته
شیلات

مطالعه نگهداری کوتاه‌مدت و انجماد شیشه‌ای جنین ماهی قرمز، *Carassius auratus*, Linnaeus 1758

تحقیق و نگارش

فردین شالویی

استاد راهنما

دکتر محمدرضا ایمانپور

اساتید مشاور

دکتر علی شعبانی

دکتر محمدحسین نصراصفهانی

پاییز 1392

تعهدنامه پژوهشی

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه‌های تحصیلی دانشجویان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مبین بخشی از فعالیت‌های علمی- پژوهشی بوده و همچنین با استفاده از اعتبارات دانشگاه انجام می‌شود؛ بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

1- قبل از چاپ پایان نامه خود، مراتب را قبلا به طور کتبی به مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اطلاع داده و کسب اجازه نمایند.
2- قبل از چاپ پایان نامه در قالب مقاله، همایش، اختراع و اکتشاف و سایر موارد، ذکر نام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان الزامی است.
3- انتشار نتایج پایان نامه باید با اطلاع و کسب اجازه از استاد راهنما صورت گیرد.

اینجانب **فردین شالویی** دانشجوی رشته **شیلات** مقطع **دکتری** تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی و امضاء

چکیده

هدف از این مطالعه بهینه کردن روش نگهداری کوتاه‌مدت و حفاظت انجمادی جنین ماهی قرمز به روش انجماد شیشه‌ای بود. شش آزمایش به صورت گام‌به‌گام برای جستجو شرایط بهینه در نگهداری کوتاه‌مدت جنین ماهی قرمز طرح‌ریزی شد. نخست جنین ماهی قرمز در هشت مرحله تکاملی درون آب کلرزدایی و هوادهی شده به مدت 24 ساعت در دمای 0 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. نتایج نشان داد که مراحل اولیه تکاملی نسبت به سرد کردن حساسیت بالایی دارند. جنین‌ها در مرحله تپش قلب در دماهای 0، 4 و 8 درجه سانتی‌گراد به مدت 84 ساعت در آب نگهداری شدند. نتایج نشان داد که می‌توان جنین در این مرحله را تا 18، 24 و 48 ساعت بدون کاهش درصد تفریخ در دماهای 0، 4 و 8 درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد. درصد تفریخ جنین‌های نگهداری شده در مایع سلومیک مصنوعی ماهی قرمز و محلول دتلاف نسبت به آب و دیگر محلول‌ها بالاتر بود (P<0/01). اگرچه درصد تفریخ در مایع سلومیک مصنوعی از محلول دتلاف بالاتر بود ولی اختلاف آن‌ها معنی‌دار نبود (P>0/05). همچنین اضافه کردن آنتی‌بیوتیک، آلبومین سرم گاوی و بافر هپس باعث افزایش بقاء جنین‌ها در نگهداری کوتاه‌مدت شد ولی غلظت‌های مطالعه شده آنتی‌اکسیدان و بافر تریس تأثیر معنی‌داری روی درصد تفریخ جنین‌ها نداشت. نتایج این سری از آزمایش‌ها نشان داد که می‌توان جنین ماهی قرمز را به مدت 60 ساعت در مایع سلومیک مصنوعی همراه با 25 میلی‌مول در لیتر بافر هپس، 1 گرم در لیتر آلبومین سرم گاوی، 100 واحد بین‌المللی پنی‌سیلین همراه با 10 گرم در لیتر استروپتومایسین بدون کاهش معنی‌دار در درصد تفریخ و لارو سالم نسبت به گروه شاهد نگهداری نمود (P>0/05). برای پیدا کردن بهترین غلظت ضد یخ‌ها برای انجماد جنین ماهی قرمز، جنین‌ها در مرحله تپش‌قلب در معرض پنج ضد یخ نفوذکننده (دی‌متیل‌سولفوکساید، متانول، پروپیلن‌گلیکول، گلیسرول و اتیلن‌گلیکول) و دو ضد یخ نفوذناپذیر (پلی‌وینیل‌پیرولیدون و ساکاروز) در غلظت‌های 5، 10، 15 و20 % به مدت 5، 15 و30 دقیقه قرار گرفتند. بر اساس نتایج این آزمایش پروپیلن‌گلیکول کمترین و گلیسرول و اتیلن‌گلیکول بیشترین سمیت را داشتند (P<0/01). همچنین در غلظت و زمان‌های مطالعه شده ساکاروز سمیتی برای جنین‌ها نداشت (P>0/05) ولی غلظت 20 % پلی‌وینیل‌پیرولیدون به مدت 30 دقیقه برای آن‌ها کشنده بود. در مرحله آخر سمیت و کارایی چهار محلول انجماد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که محلول انجماد پروپیلن‌گلیکول در ترکیب با متانول سمیت کمتر و کارایی بالاتر نسبت به بقیه محلول‌های انجماد دارد (P<0/01). بعد از انجماد گشایی جنین‌ها در دو دمای 25 و 40 درجه سانتی‌گراد خصوصیات ریخت‌شناسی جنین‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شد. بالاترین نسبت جنین‌ها با ظاهر سالم (35/65 %) در انجماد گشایی در دمای 40 درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (P<0/05) ولی هیچ‌کدام از این جنین‌ها تفریخ نشدند.

واژگان کلیدی: انجماد سازی شیشه‌ای، حفاظت انجمادی، نگهداری کوتاه‌مدت، ضد یخ‌ها، ماهی قرمز

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول

1-1- مقدمه و کلیات 2

2-1- سئوال‌های اصلی تحقیق 5

3-1- فرضیه‌ها 5

4-1- اهداف پژوهش 5

5-1- ضد یخ‌ها و کاربرد آن‌ها در حفاظت انجمادی 6

1-5-1- ضد یخ‌های نفوذکننده و مکانیسم‌های حفاظتی آن‌ها 6

2-5-1- ضد یخ‌های غیر نفوذکننده و مکانیسم های حفاظتی آن‌ها 7

6-1- روش‌های مورد استفاده در حفاظت انجمادی 8

1-6-1- انجماد کنترل‌شده و آرام 9

2-6-1- انجماد سازی شیشه‌ای 9

1-2-6-1- مزیت‌های انجماد سازی شیشه‌ای نسبت به روش کنترل‌شده و آرام 10

7-1- آسیب‌های ناشی از انجماد 11

1-7-1- تشکیل کریستال‌های یخ خارج سلولی 11

2-7-1- تشکیل کریستال‌های یخ داخل سلولی 11

8-1- مراحل تکاملی جنین در ماهیان 12

9-1- ماهی قرمز به عنوان یک گونه مدل 16

فصل دوم

2-1- مروری بر مطالعات انجام‌شده 20

فصل سوم

3-1- مواد 26

3-2- روش‌ها 27

3-2-2- تأمین و نگهداری مولدین 27

3-2-3- اجرای عملیات تکثیر 27

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

3-2-4- مطالعه مراحل تکاملی جنینی ماهی قرمز 28
3-3- نگهداری کوتاه‌مدت جنین ماهی قرمز (آزمایش اول)..... 29
3-3-1- بررسی حساسیت جنین ماهی قرمز به سرد کردن 30
3-3-2- بررسی دمای نگهداری بهینه 31
3-3-3- آنالیز شاخص‌های یونی و آلی مایع سلومیک 31
3-3-4- بررسی تأثیر محلول‌های فیزیولوژیکی مختلف روی بقاء جنین‌های سرد شده 31
3-3-5- بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک، آنتی‌اکسیدان، حفاظت کننده غشاء سیتوپلاسمی و بافر روی میزان بقاء جنین‌های سرد شده 33
3-3-6- بررسی همزمان غلظت بهینه آنتی‌بیوتیک، آنتی‌اکسیدان، آلبومین سرم گاوی و بافر روی میزان بقاء جنین‌های سرد شده..... 34
3-4- بررسی سمیت ضدیخ‌های نفوذکننده و غیر نفوذکننده (آزمایش دوم) 35
3-5-بررسی سمیت محلول‌های انجماد و انجماد شیشه‌ای جنین ماهی قرمز (آزمایش سوم)..... 36
3-5-1- طراحی محلول‌های انجماد و بررسی سمیت و کارایی آن‌ها..... 36
3-5-2- بررسی امکان انجماد شیشه‌ای جنین ماهی قرمز 37
3-6- تجزیه و تحلیل‌های آماری 40

فصل چهارم

4-1- مراحل تکاملی جنین ماهی قرمز و پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب..... 42
4-2- نگهداری کوتاه‌مدت جنین ماهی قرمز (آزمایش اول)..... 43
4-2-1- حساسیت جنین ماهی قرمز در مراحل مختلف تکاملی نسبت به دمای صفر درجه سانتی‌گراد..... 43
4-2-2- تأثیر دماهای مختلف در نگهداری کوتاه‌مدت..... 45
4-2-3- ترکیبات آلی و غیر آلی مایع سلومیک ماهی قرمز..... 46
4-2-4- تأثیر محلول‌های فیزیولوژیک مختلف و مایع سلومیک مصنوعی ماهی قرمز 46
4-2-5- تأثیر غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک، آنتی‌اکسیدان، حفاظت کننده غشاء سیتوپلاسمی و بافر بر میزان بقاء جنین‌های سرد شده 47

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

4-2-6- تأثیر همزمان فاکتورهای مطالعه شده روی بقاء جنین‌های سرد شده 51
4-3- سمیت ضد یخ‌های نفوذکننده و غیر نفوذکننده (آزمایش دوم) 54
4-3-1- تأثیر غلظت‌های مختلف ضد یخ‌های نفوذکننده بر درصد تفریخ جنین ماهی قرمز 54
4-3-2- تأثیر غلظت‌های مختلف ضد یخ‌های غیر نفوذکننده بر درصد تفریخ جنین ماهی قرمز 59
4-4- سمیت محلول‌های انجماد و انجماد شیشه‌ای جنین ماهی قرمز (آزمایش سوم) 60
4-4-1- سمیت و کارایی محلول‌های انجماد 60
4-4-2- انجماد شیشه‌ای جنین ماهی قرمز 63

فصل پنجم

5- بحث و نتیجه‌گیری 65
5-1- نگهداری کوتاه‌مدت جنین ماهی قرمز 66
5-1-1- حساسیت مراحل مختلف جنینی نسبت به سرد کردن و تأثیر دماهای مختلف 66
5-1-2- تأثیر مایع سلومیک مصنوعی و محلول‌های فیزیولوژیکی مختلف و بر درصد 69
5-1-3- تأثیر غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک، آنتی‌اکسیدان، حفاظت کننده غشاء سیتوپلاسمی و بافر بر میزان بقاء جنین‌های سرد شده 71
5-1-4- تأثیر همزمان فاکتورهای مطالعه شده بر میزان بقاء جنین‌های سرد شده ماهی قرمز 73
5-2- سمیت ضد یخ‌های نفوذکننده و غیر نفوذکننده 75
5-3- انجماد شیشه‌ای جنین ماهی قرمز 77
5-4- نتیجه‌گیری نهائی 80
5-5- پیشنهادها 81
5-5-1- پیشنهادهای اجرایی 81
5-5-2- پیشنهادهای پژوهشی 81
فهرست منابع 84

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول 3-1- وسایل مصرفی مورد استفاده در تحقیق..... 26
جدول 3-2- ترکیبات سازنده محلول‌های فیزیولوژیک مورد استفاده در آزمایش 3-3-4..... 32
جدول 3-3- غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک، آنتی‌اکسیدان، آلبومین سرم گاوی و بافرها..... 33
جدول 3-4- غلظت‌های مختلف محلول‌های انجماد و نحوه در معرض قرارگیری جنین با آن‌ها 36
جدول4-1- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب در طول سه دوره تکثیر 43
جدول 4-2- حساسیت جنین ماهی قرمز نسبت به سرد کردن در مراحل مختلف تکاملی 44
جدول 4-3- ترکیبات آلی و غیر آلی مایع سلومیک در مولدین ماده و رسیده ماهی قرمز..... 46
جدول 4-4- تأثیر محلول‌های مختلف فیزیولوژیک روی میزان درصد تفریخ جنین‌های نگهداری شده..... 47
جدول 4-5- مقدار غلظت کشنده ضد یخ‌های نفوذکننده برای جنین ماهی قرمز..... 57
جدول 4-6- تأثیر زمان‌های مختلف در معرض قرارگیری در غلظت‌های مختلف ضد یخ‌های نفوذکننده بر درصد تفریخ جنین ماهی قرمز..... 58
جدول 4-7- تأثیر غلظت‌های مختلف ساکاروز و پلی‌ونیل‌پیرولیدون در زمان‌های متناوب بر درصد تفریخ جنین ماهی قرمز 59
جدول 4-8- تأثیر عملیات انجماد و انجماد گشایی بر مشخصات ظاهری جنین ماهی قرمز 63
جدول 5-1- سمیت ضد یخ‌های نفوذکننده در برخی از گونه‌های مطالعه شده. 75

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل 1-1- تسهیم مروبلاستیک و صفحه‌ای در جنین ماهیان 14
شکل 1-2- مراحل تشکیل جنین در ماهیان از مرحله بلاستولا تا گاسترولاسیون 15
شکل 1-3- تقسیم‌بندی مراحل تکاملی جنین ماهیان از مرحله روخزیدگی بر اساس تعداد قطعات بدن..... 16
شکل 3-1- میکروسکوپ نوری و استرئومیکروسکوپ مورد استفاده در تحقیق 29
شکل 3-2- نمایی کلی از آزمایش اول 30
شکل 3-3- ضد یخ‌های مورد استفاده در تحقیق 35
شکل 3-4- نمایی کلی از نحوه انجماد شیشه‌ای..... 38
شکل3-5- نمودار جریانی مطالعه انجام شده در زمینه نگهداری کوتاه‌مدت و انجماد شیشه‌ای..... 39
شکل 4-1- مراحل مختلف تکاملی جنین ماهی قرمز 42
شکل 4-2- مقایسه داده‌های درصد تفریخ جنین ماهی قرمز نگهداری شده در دماها و زمان‌های مختلف... 45
شکل 4-3- مقایسه داده‌های درصد تفریخ جنین ماهی قرمز نگهداری شده در محلول مایع سلومیک مصنوعی همراه با غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک 48
شکل 4-4- درصد تفریخ جنین ماهی قرمز نگهداری شده در محلول مایع سلومیک مصنوعی همراه با غلظت‌های مختلف آنتی‌اکسیدان..... 49
شکل 4-5- درصد تفریخ جنین ماهی قرمز نگهداری شده در محلول مایع سلومیک مصنوعی همراه با غلظت‌های مختلف بافر 50
شکل 4-6- درصد تفریخ جنین ماهی قرمز نگهداری شده در محلول مایع سلومیک مصنوعی همراه با غلظت‌های مختلف آلبومین سرم گاوی..... 51
شکل 4-7- درصد تفریخ جنین ماهی قرمز نگهداری شده در محلول مایع سلومیک مصنوعی همراه با 100 واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر پنی‌سیلین، 10 میکروگرم در لیتر استروپتومایسین، 1 گرم در لیتر آلبومین سرم گاوی و 25 میلی‌مول در لیتر بافر هپس در دمای 8 درجه سانتی‌گراد..... 52
شکل 4-8- مقایسه داده‌های درصد لاروهای سالم نگهداری شده در طول دوره نگهداری کوتاه‌مدت 53
شکل 4-9- میانگین و انحراف معیار درصد تفریخ جنین‌های نگهداری شده در معرض غلظت‌های مختلف (5%، 10%، 15% و 20%) ضد یخ‌های نفوذکننده (دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO)، متانول (MeOH)، پروپیلن گلیکول (PG)، گلیسرول (Gly) و اتیلن‌گلیکول (EG)) به مدت 5 دقیقه،..... 54

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل 4-10- میانگین و انحراف معیار درصد تفریخ جنین‌ها در مرحله تپش قلب نگهداری شده در معرض غلظت‌های مختلف (5%، 10%، 15% و 20%) ضد یخ‌های نفوذکننده (دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO)، متانول (MeOH)، پروپیلن‌گلیکول (PG)، گلیسرول (Gly) و اتیلن‌گلیکول (EG)) به مدت 15 دقیقه 55
شکل 4-11- میانگین و انحراف معیار درصد تفریخ جنین‌ها در مرحله تپش قلب نگهداری شده در معرض غلظت‌های مختلف (5%، 10%، 15% و 20%) ضد یخ‌های نفوذکننده (دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO)، متانول (MeOH)، پروپیلن‌گلیکول (PG)، گلیسرول (Gly) و اتیلن‌گلیکول (EG)) به مدت 30 دقیقه 56
شکل 4-12- میانگین و انحراف معیار درصد تفریخ جنین‌ها در مرحله تپش قلب نگهداری شده در معرض محلول‌های مختلف انجماد به صورت تدریجی در مقایسه با گروه شاهد یا کنترل..... 60
شکل 4-13- مقایسه داده‌های درصد لاروهای سالم نگهداری شده محلول‌های مختلف انجماد در دمای اتاق 61
شکل 4-14- میانگین و انحراف معیار درصد تفریخ و نسبت لاروهای سالم جنین‌ها در مرحله تپش قلب نگهداری شده در محلول‌های مختلف انجماد در دمای 5- به مدت دو ساعت در مقایسه با گروه شاهد یا کنترل 62

فصل اول

مقدمه و کلیات

1-1- مقدمه و کلیات

به طور طبیعی با گذشت زمان، حیات و عملکرد موجودات زنده تغییر می‌کند و روبه‌زوال می‌گذارد. برای نگهداری و کاهش این روند، دانشمندان تلاش می‌کنند با حذف آب و کاهش دما زیر نقطه‌ای که واکنش‌های بیوشیمیایی رخ می‌دهد، ساعت زیستی موجودات را متوقف کنند. زمانی که سلول، بافت و یا موجود زنده در معرض دماهای زیر نقطه انجماد قرار می‌گیرد، ممکن است صدمه ببیند و حتی از بین بروند. همچنین امکان دارد برای ماه‌ها، سال‌ها و یا قرن‌ها باقی بمانند. کرایوبیولوژی[1] علمی است که تأثیر دماهای پایین روی موجودات زنده را بررسی می‌کند. حفاظت انجمادی[2] تکنیکی است که با استفاده از روش‌های خاص سرد کردن و منجمد کردن، می‌توان سلول، بافت و حتی موجود زنده را به مدت طولانی نگهداری کرد (بابین و همکاران، 2007). با توجه به یافته‌های تئوریک، با استفاده از تکنیک حفاظت انجمادی، سلول‌های جنسی را می‌توان از 200 تا 32000 سال نگهداری کرد (سوکئت و همکاران، 2000). برای حفاظت انجمادی مواد بیولوژیکی معمولاً از دو روش استفاده می‌شود: انجماد کنترل‌شده و آرام[3] و انجماد سازی شیشه‌ای[4]. انجماد سازی شیشه‌ای یا حفاظت انجمادی بدون تشکیل کریستال‌های یخ، امتیازات زیادی (کارایی بالاتر، راحتی و کم هزینه بودن) نسبت به روش‌های سنتی انجماد دارد و امروزه به طور گسترده استفاده می‌شود (چائو و لیائو، 2001؛ چن وتیان، 2005).

توانایی ایجاد بانک‌هایی از تخم، اسپرم و جنین‌های منجمد ماهی که قادر به حیات باشند، یکی از بهترین راه‌های حفاظت از گونه‌ها و توسعه آبزی‌پروری می‌باشد (کابریتا و همکاران، 2009). بر اساس لیست قرمز اتحادیه بین‌المللی حفاظت از طبیعت[5]، 2514 گونه ماهیان استخوانی حقیقی، 591 گونه ماهیان غضروفی، 13 گونه از لامپری و هگ فیش‌ها، 553 گونه از سخت‌پوستان و 218 گونه از دوکفه‌ای‌ها منقرض شده یا در معرض انقراض هستند. حفاظت انجمادی با ایجاد بانک‌های ژنی[6] یک

1 Cryobiology

2 Cryopreservation

3 Controlled slow freezing

4 Vitrification

5 International Union for Conservation of Nature (IUCN)

6 Genetic Resources Banks (GRBs)

روش مطمئن برای حفاظت از گونه‌های در معرض انقراض و واریته‌های بومی فراهم می‌کند. همچنین فرصت بازسازی جمعیت‌های بومی یک اکوسیستم، بعد از احیاء آن را ایجاد می‌کند (کابریتا و همکاران، 2009). بازسازی ذخایر برای حفظ گونه‌های بومی همیشه کارساز نیست، علاوه بر این خطر از بین رفتن تنوع ژنتیکی وجود دارد (ریابوواَ و همکاران، 2006). انجماد جنین علاوه بر حفاظت از ماده ژنتیکی نر و ماده، از اجزاء سیتوپلاسمی جمعیت اصلی از جمله بخش مهمی از ژنوم میتوکندری نیز حفاظت می‌کند.

علاوه بر کاربردهای ذکرشده حفاظت انجمادی برای حفظ تنوع زیستی، این تکنیک کاربردهای زیادی در آبزی‌پروری و دیگر زمینه‌ها دارد. یکی از تنگناهای بزرگ در آبزی‌پروری وابستگی به فصل تولیدمثل در هر گونه است. دست‌کاری‌های محیطی و هورمونی یک روش رایج برای فائق آمدن به این مشکل و تولید لارو در تمام طول سال می‌باشد. برای مثال ماهی توربوت (*Scophthalmus maximus*) در شرایط اسارت به بلوغ نمی‌رسد و زمان تکثیر بیش از یک میلیون تخم تولید می‌کند که این تخم‌ها باید در زمان کوتاه به علت فوق رسیدگی لقاح داده شوند. در نتیجه تولید لارو همیشه متناسب با ظرفیت تفریخگاه‌ها نیست و می‌تواند مشکلات زیاد مدیریتی ایجاد کند. حفاظت انجمادی در این زمینه می‌تواند بسیار کارساز باشد (کابریتا و همکاران، 2009). تخم و جنین ماهی به علت حساسیت زیاد و قرار گرفتن در معرض آلودگی‌های زیست‌محیطی در علوم سم‌شناسی بوم‌شناختی[1] اهمیت زیادی دارند (بیلارد و ژانگ، 2001). استانداردسازی و استفاده از آن‌ها به عنوان یک اندیکاتور احتیاج به جنین‌های با مشخصات معین دارد. حفاظت انجمادی می‌تواند منبع دائم برای تأمین این مواد بیولوژیکی برای هر آزمایشگاهی در سرتاسر جهان باشد. کاربردهای دیگر حفاظت انجمادی در علومی نظیر ژنتیک و بیوتکنولوژی، تولید پلی‌پولوئیدها، نقل و انتقال جهانی مواد ژنتیکی، انتقال ژن و شبیه‌سازی و علوم سلولی مولکولی می‌باشد (کابریتا و همکاران، 2009). در مورد نگهداری طولانی‌مدت جنین پستانداران روش‌های حفاظت انجمادی به خوبی توسعه یافته‌اند ولی در مورد ماهیان، مطالعات برای توسعه و بهبود شرایط نگهداری در دماهای پایین در حال توسعه می‌باشد.

برای افزایش موفقیت احتمالی انجماد شیشه‌ای جنین ماهی برای هرگونه خاص، بهینه کردن برخی از فاکتورهای موثر لازم می‌باشد. بررسی حساسیت جنین ماهی در مراحل مختلف تکاملی به سرد کردن[2] پیش‌نیازی برای مطالعات انجماد جنین ماهی می‌باشد (ژانگ و راسون، 1995). بررسی سمیت ضد

1 Ecotoxicology

2 Chilling

یخ‌های نفوذکننده و غیر نفوذکننده برای جنین هر گونه از عوامل موثر در موفقیت پروتکل انجماد جنین می‌باشد (رامن و همکاران، 2008). در نهایت بررسی کارایی محلول انجماد شیشه‌ای[1] برای بهینه کردن روش انجماد لازم می‌باشد (چائو و لیائو، 2001).

درجه حرارت عامل بسیار مهم و تأثیرگذاری روی تکامل جنین ماهی است. در بازه دمایی و زمانی مشخص، دماهای پایین باعث طولانی‌تر شدن و دماهای بالا باعث کوتاه شدن تکامل جنین ماهی می‌شود. سرد کردن جنین ماهی[2] روشی برای توقف تکامل جنین در مرحله مشخص و نگهداری آن در دماهای بالای نقطه انجماد است. بنابراین نگهداری کوتاه‌مدت جنین ماهی تکنیکی جالب در آبزی‌پروری و تحقیقات علمی به خصوص مطالعات جنین‌شناسی ماهی برای هماهنگ کردن تکامل جنین به دست آمده از مولدین در زمان‌های مختلف و به تأخیر انداختن تکامل آن‌ها می‌باشد (لانشتینر، 2009 و 2011). در نگهداری کوتاه‌مدت یا سرد کردن جنین ماهی، فعالیت‌های متابولیکی جنین ماهی به کندی صورت می‌گیرد. در دماهای پایین جنین ماهی قادر به متعادل نگاه‌داشتن محیط داخلی خود نیست. در نتیجه نفوذ آب و یون‌ها از محیط نگهداری به داخل جنین می‌تواند باعث بی‌ثباتی متابولیسم و فرآیندهای فیزیولوژیکی جنین شود (لانشتینر، 2009). رشد باکتری، بی‌ثباتی غشاء سیتوپلاسمی و تغییرات پی.اچ در طول نگهداری کوتاه‌مدت جنین، اسپرم و تخمک ماهی می‌تواند روی موفقیت نگهداری آن‌ها تأثیر منفی داشته باشد. در نتیجه اضافه کردن آنتی‌بیوتیک، آنتی‌اکسیدان، بافر و محافظت‌کننده غشاء پلاسمایی در غلظت‌های بهینه لازم می‌باشد.

ماهی قرمز[3] (*Carassius auratus*, Linnaeus 1758) گونه بسیار مناسبی جهت مطالعات تولیدمثلی، آندوکرینولوژی، ایمنی‌شناسی، سم شناسی، سلولی و مولکولی می‌باشد، زیرا از اندازه مناسبی جهت تحقیقات آزمایشگاهی برخوردار بوده و همچنین در محیط‌های آزمایشگاهی به راحتی قادر به بلوغ و تولیدمثل می‌باشد. در واقع از این‌گونه به عنوان مدل جهت بررسی کپور ماهیان استفاده می‌شود (لی و همکاران، 1997؛ پاسکیو و همکاران، 2008؛ موناکاتا و کوبایاشی، 2010). بنابراین نگهداری کوتاه‌مدت و بلندمدت جنین ماهی قرمز می‌تواند در مطالعات جنین‌شناسی، انتقال و جابجایی جنین و مدیریت مراکز تکثیر این‌گونه مفید باشد.

1 Vitrification solution

2 Chilled storage

3 Gold fish

با توجه به موارد ذکر شده سئوال‌های اصلی تحقیق، فرضیه‌ها و اهداف پژوهش به شرح زیر می‌باشد.

1-2- سئوال‌های اصلی تحقیق

1- چه مدت می‌توان جنین ماهی قرمز را به روش سرد کردن نگهداری کرد؟
2- آیا مراحل مختلف جنینی نسبت به سرد کردن حساس می‌باشند؟
3- آیا ضد یخ‌های مورد استفاده در انجماد جنین، برای جنین ماهی قرمز سمی هستند؟
4- امکان نگهداری جنین ماهی قرمز به روش انجماد شیشه‌ای وجود دارد؟

1-3- فرضیه‌ها

1- جنین ماهی قرمز در مراحل مختلف تکاملی نسبت به سرد کردن حساس می‌باشد.
2- عوامل متعددی مانند دماهای مختلف، محلول‌های نمکی مختلف و مایع سلومیک مصنوعی ماهی قرمز، غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین و استروپتومایسین)، آنتی‌اکسیدان (ویتامین سی و ای)، بافر (هپس و تریس) و محافظت‌کننده‌های غشاء سلولی (آلبومین سرم گاوی) می‌توانند در موفقیت نگهداری کوتاه‌مدت جنین ماهی قرمز موثر باشند.
3- نسبت‌های مختلف ضد یخ‌های نفوذکننده[1] (دی‌متیل‌سولفوکساید، گلیسرول، متانول، اتیلن‌گلیکول، پروپیلین‌گلیکول) و ضد یخ‌های غیر نفوذکننده[2] (ساکاروز و پلی‌وینیل‌پیرولیدون) برای جنین ماهی قرمز سمی هستند.
4- با استفاده از غلظت‌های بهینه ضد یخ‌ها و طراحی محلول‌های مختلف انجماد می‌توان جنین ماهی قرمز را از طریق انجماد شیشه‌ای نگهداری کرد.

1-4- اهداف پژوهش

1- بررسی امکان نگهداری کوتاه‌مدت و بلندمدت جنین ماهی قرمز
2- بررسی سمیت ضد یخ‌های نفوذکننده و غیر نفوذکننده بر جنین ماهی قرمز

1 Permeating cryoprotectants

2 Non-permeating cryoprotectants

1-5- ضد یخ‌ها و کاربرد آن‌ها در حفاظت انجمادی

در حفاظت انجمادی، سلول‌ها در دماهای خیلی پایین نگهداری می‌شوند. در این فرآیند احتیاج به ترکیباتی است که از سلول‌ها هنگام سرد و گرم کردن حفاظت کند. به این ترکیبات ضد یخ گفته می‌شود که باید حلالیت بالایی در آب داشته باشند و همچنین برای سلول سمی نباشند. در کل ضد یخ‌ها موادی هستند که قبل از منجمد کردن، سلول را در معرض آن قرار می‌دهند و موجب می‌شود بعد از انجماد گشایی بازیابی (بقا) بیشتری در سلول‌ها رخ دهد (کارو، 1969). ضد یخ‌ها را به دو گروه اصلی تقسیم می‌کنند: ضد یخ‌های نفوذکننده و ضد یخ‌های غیر نفوذکننده.

1-5-1- ضد یخ‌های نفوذکننده و مکانیسم‌های حفاظتی آن‌ها

ضد یخ‌های نفوذکننده مانند متانول[1]، دی‌متیل‌سولفوکساید[2]، پروپیلن‌گلیکول[3]، اتیلن‌گلیکول[4] و گلیسرول[5] وزن مولکولی کمی دارند و می‌توانند از غشاء سیتوپلاسمی عبور کنند. اگرچه ساز و کارهای حفاظتی ضد یخ‌های نفوذکننده به طور کامل شناخته نشده است، اما توضیحاتی در این زمینه در منابع مختلف ذکر شده است که عبارتند از:

1- زمانی که ضد یخ‌های نفوذکننده وارد سلول می‌شوند باعث کاهش چشمگیر در نقطه انجماد محلول‌های داخل سلولی می‌شوند (شپارد و همکاران، 1976).

2- در حضور ضد یخ‌های نفوذکننده، سلول مقدار زیادی آب پس می‌دهد در نتیجه مقدار کریستال‌های یخ داخل سلولی شکل‌گرفته کم می‌شود (کابریتا و همکاران، 2009).

3- زمانی که ضد یخ‌های نفوذکننده به درون سلول وارد می‌شوند توسط پیوندهای هیدروژنی با مولکول‌های حیاتی مانند پروتئین‌ها، دزوکسی ریبو نوکلوئیک اسید[6] و ریبونوکلوئیک اسید[7]

1 Methanol (MeOH)

2 Dimethyl sulphoxide (DMSO)

3 propylene glycol (PG)

4 Ethylene glycol (EG)

5 Glycerol (Gly)

6 DNA

7 RNA