و هُوالّذی سَخَرَالبَحرَ لِتأکُلوا مِنهُ لَحماً وَ طَریاً ... .

و هم او خدایی است که دریا را برای شما مسخر کرد تا

از گوشت و ماهیان حلال آن تغذیه کنید. **سوره النَحل آیه ١٤**

دانشکده شیلات و محیط زیست

پایان‌نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته
محیط زیست

اثر برخی مواد محافظت‌کننده در برابر انجماد در جنین تاس‌ماهی ایرانی *(Acipenser persicus)* به روش غوطه‌وری

پژوهش و نگارش:
سعیده کیوانلو

استاد راهنما:
دکتر محمد سوداگر

زمستان ۱۳۹۱

تعهد نامه پژوهشی

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مبین بخشی از فعالیتهای علمی-پژوهشی بوده و همچنین با استفاده از اعتبارات دانشگاه انجام می
شود بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

۱) در انتشار نتایج پایان نامه (رساله) در قالب مقاله،همایش، اختراع و اکتشاف و سایر موارد، ذکر نام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان الزامی است.
۲) انتشار نتایج پایان نامه(رساله) در قالب مقاله، همایش، اختراع و اکتشاف و سایر موارد، ذکر نام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان الزامی است.
۳) انتشار نتایج پایان نامه(رساله) باید با اطلاع و کسب اجازه از استاد راهنما صورت گیرد.
اینجانب سعیده کیوانلو دانشجوی رشته شیلات(تکثیر و پرورش آبزیان) مقطع کارشناسی ارشد تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آنرا قبول کرده و به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی و امضا

تقدیم به پدر بزرگوار و مادر مهربانم که اشتیاق‌شان به

آموختن و موفق بودنم

بزرگ‌ترین مشوق من در سال‌های تحصیل بود.

تشکر و قدردانی

از زحمات بی شائبه جناب آقای دکتر محمد سوداگر تشکر نموده و از این‌که مرا مورد تفقد قرار داده و راهنمایی اینجانب را به عهده گرفتند سپاسگزارم.

از جناب آقای دکتر علی شعبانی و جناب آقای دکتر حامد کلنگی که زحمت بازخوانی این پایان نامه را به عهده داشتند کمال تشکر را دارم.

از نماینده محترم تحصیلات تکمیلی سرکار خانم دکتر وحیده پیام نور که مدیریت جلسه دفاع را بر عهده داشتند تشکر و قدردانی می‌نمایم.

از همکاری ریاست محترم و کلیه کارمندان مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی که فرصت انجام پایان نامه حاضر را در آن مرکز فراهم ساختند کمال تشکر را دارم.

چکیده

تکنیک شیشه‌سازی می‌تواند به‌عنوان ابزار نویدبخشی برای انجماد موفقیت‌آمیز جنین ماهیان مطرح باشد. به‌منظور دستیابی به انجماد موفقیت‌آمیز جنین، چندین عامل باید در طراحی یک دستورالعمل شیشه‌سازی مورد توجه قرار گیرند. در تحقیق حاضر برخی از این عوامل (سمیت مواد ضدانجماد نفوذپذیر و نفوذناپذیر، سمیت محلول‌های شیشه‌ساز و دمای انجمادزدایی) در تاس‌ماهی ایرانی در دو مرحله تکامل جنینی (۲٤ و ٤٨ ساعت پس از لقاح) مورد بررسی قرار گرفتند. جنین‌ها در شش ماده ضدانجماد نفوذپذیر شامل: دی‌متیل‌سولفوکساید، اتیلن‌گلیکول، پروپیلن‌گلیکول، استامید، متانول و گلیسرول در غلظت‌های ۱ تا ٦ مولار و در سه ماده ضدانجماد نفوذناپذیر شامل: ساکارز، عسل (در غلظت‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد) و پلی‌ونیل‌پیرولیدون (در غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد) به مدت ۵ و ۱۰ دقیقه غوطه‌ور شدند. پس از آن جنین‌ها شسته شده و تا زمان تفریخ انکوباسیون شدند. نتایج نشان داد سمیت مواد ضدانجماد با افزایش غلظت و مدت زمان غوطه‌وری، افزایش یافت، جنین تاس‌ماهی ایرانی دی‌متیل‌سولفوکساید را بهتر از سایر مواد تحمل کرد و در مرحله ٤٨ ساعت پس از لقاح تحمل بیش‌تری نسبت به غلظت‌های مختلف این مواد داشت. شش محلول شیشه‌ساز بر پایه دی‌متیل‌سولفوکساید (محلول‌های شیشه‌ساز شماره ۱ تا ٦) با استفاده از یک دستورالعمل تلفیق چند مرحله‌ای طراحی و روی جنین در مرحله ٤٨ ساعت پس از لقاح مورد آزمایش قرار گرفتند. محلول‌های شیشه‌ساز بر پایه دی‌متیل‌سولفوکساید حاوی دی‌متیل‌سولفوکساید ۵ مولار+ سه ماده ضدانجماد نفوذپذیر دیگر + سه ماده ضدانجماد نفوذناپذیر بودند که طی یک دستورالعمل شش مرحله‌ای به‌تدریج غلظت آن‌ها افزایش می‌یافت. پیش از آن که جنین‌ها برای فرآیند انجماد به درون تیوپ‌ها منتقل شوند، اثر سمیت محلول‌های شیشه‌ساز آزمایش شد و بالاترین درصد تفریخ در جنین‌هایی مشاهده شد که در معرض محلول‌های شیشه‌ساز شماره ۳ و شماره ۵ قرار گرفته بودند. پس از فرآیند شیشه‌سازی (انجماد)، انجمادزدایی در حمام آب صفر و ۲۰ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت و سپس جنین‌ها تا زمان تفریخ انکوباسیون شدند. نتایج این مرحله نشان داد، تعدادی از جنین‌های شیشه‌ای شده با

استفاده از محلول‌های شیشه‌ساز شماره ۱، ۳، ٤، ٥ و ٦ زنده ماندند اما، همه جنین‌های منجمد شده با استفاده از محلول شیشه‌ساز شماره ۲ از بین رفتند. بالاترین درصد بقا (٤٥/٤٥ درصد) در جنین‌هایی به ثبت رسید که با استفاده از محلول شیشه‌ساز شماره ٦ منجمد شده و در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد انجمادزدایی شدند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد انجماد جنین تاس‌ماهی ایرانی با استفاده از تکنیک شیشه‌سازی و دستورالعمل به کار رفته در این پژوهش امکان پذیر است.

واژگان کلیدی: شیشه‌سازی، انجماد، مواد ضدانجماد، تاس‌ماهی ایرانی و جنین

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱- مقدمه ۲

۱-۱- کلیات ۲

۱-۲- مشکلات انجماد جنین ماهی..... ٤

۱-۲-۱- ساختار پیچیده..... ٤

۱-۲-۲- حساسیت نسبت به سرد سازی ۷

۱-۲-۳- اندازه جنین ۸

۱-۲- ٤- مواد ضدانجماد (محافظت کننده در برابر سرما) ۹

۱-۳- تاس‌ماهی ایرانی ۱۱

۱-۳-۱- طبقه‌بندی..... ۱۱

۱-۳-۲- پراکنش ۱۲

۱-٤- روش‌های انجماد ۱۳

۱-٤-۱- روش ریزتزریقی ۱۳

۱-٤-۲- روش حمام دادن (غوطه‌وری) ١٤
۱-۵- تکنیک شیشه‌سازی ١٥
۱-۷- سؤالات اصلی تحقیق ١٦
۱-۸- فرضیه‌ها..... ١٧
۱-۹- اهداف ١٧

فصل دوم: مروری بر منابع

۲- مروری بر منابع ١٨

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳- مواد و روش‌ها ٢٦
۳-۱- محل اجرای آزمایش ٢٧
۳-۲- تهیه مواد ٢٧
۳-۳- ساخت محلول‌های آزمایشی ٢٧
۳-٤- تهیه تخم ٢٨
۳-۵- پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب ٢٨
۳-٦- مراحل انجام آزمایش..... ٢٨

۳-٦-۱- آزمایش سمیت ترکیبات ضدانجماد ۲۹
۳-٦-۲- آزمایش سمیت محلول‌های شیشه‌ساز ۳۰
۳-٦-۳- آزمایش شیشه‌سازی (انجماد) جنین ۳۷
۳-۷- محاسبه درصد تفریخ ۳۸
۳-۸- تجزیه و تحلیل آماری ۳۸

فصل چهارم: نتایج

٤-۱- فاکتورهای محیطی ٤۰
٤-۲- سمیت مواد ضدانجماد نفوذپذیر ٤۰
٤-۳- سمیت مواد ضدانجماد نفوذ ناپذیر ٤٦
٤-٤- سمیت محلول‌های شیشه‌ساز ٤۷
٤-٥- آزمایش شیشه‌سازی (انجماد) جنین ٤۸

فصل پنجم: بحث و نتیجه‌گیری

٥-۱- سمیت مواد ضدانجماد ٥۱
٥-۱-۱- سمیت مواد ضدانجماد نفوذپذیر ٥۱
٥-۱-۲- سمیت مواد ضدانجماد نفوذناپذیر ٥٥

۵-۳- سمیت محلول‌های شیشه‌ساز ۵۷
۵-٤- آزمون شیشه‌سازی (انجماد) جنین ۵۸
نتیجه‌گیری کلی ٦۱
پیشنهادات پژوهشی ٦۲
پیشنهادات اجرایی ٦۳

منابع ٦٤

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱- طبقه‌بندی علمی در تاس‌ماهی ایرانی ۱۱

جدول ۳-۱- غلظت‌های ترکیبات ضدانجماد ۲۹

جدول ۳-۲- روند ساخت محلول‌های شیشه‌ساز بر پایه دی‌متیل‌سولفوکساید ۳۲

جدول ۳-۳- دستورالعمل غوطه‌وری جنین‌های تاس‌ماهی ایرانی در شش محلول‌های شیشه‌ساز بر پایه دی‌متیل‌سولفوکساید ۳۳

جدول ٤-۱- میانگین دمای آب، pH و شوری در طول دوره آزمایش ٤۰

جدول ٤-۲- درصد تفریخ در جنین‌های ۲٤ ساعته تاس‌ماهی ایرانی در غلظت‌های مختلف متانول، اتیلن‌گلیکول و پروپیلن‌گلیکول ٤۲

جدول ٤-۳- درصد تفریخ در جنین‌های ٤۸ ساعته تاس‌ماهی ایرانی در غلظت‌های مختلف متانول، اتیلن‌گلیکول و پروپیلن‌گلیکول ٤۳

جدول ٤-٤- درصد تفریخ در جنین‌های ۲٤ ساعته تاس‌ماهی ایرانی در غلظت‌های مختلف گلیسرول، دی‌متیل‌سولفوکساید و استامید ٤٤

جدول ٤-۵- درصد تفریخ در جنین‌های ٤۸ ساعته تاس‌ماهی ایرانی در غلظت‌های مختلف گلیسرول، دی‌متیل‌سولفوکساید و استامید ٤۵

جدول٤-٦- درصد تفریخ در جنین‌های ۲٤ و ٤۸ ساعته تاس‌ماهی ایرانی در غلظت‌های مختلف

ساکارز و عسل. ٤٦

جدول ٤-٧- درصد تفریخ در جنین‌های ٢٤ ساعته و ٤٨ ساعته تاس‌ماهی ایرانی در غلظت‌های مختلف پلی‌ونیل‌پیرولیدون ٤٧

جدول ٤-٨- سمیت محلول‌های شیشه‌ساز بر پایه دی‌متیل‌سولفوکساید در جنین‌های ٤٨ ساعته تاس-ماهی ایرانی ٤٨

جدول ٤-٩- درصد بقای لاروهای تاس‌ماهی ایرانی پس از انجماد زدایی در دمای صفر و ٢٠ درجه سانتی‌گراد ٤٩

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱- مقدمه

۱-۱- کلیات

توسعه فناوری‌های نوین در زمینه انجماد جنین، انقلابی در پرورش حیوانات اهلی و همچنین فناوری-های تولیدمثل انسان در دهه‌های اخیر ایجاد کرده است. در دهه هفتاد موفقیت‌هایی در رابطه با انجماد جنین موش به دست آمد (ویتینگ‌هام[1] و همکاران، ۱۹۷۲) و اولین گزارش از انجماد جنین گاو منتشر شد (ویلموت[2] و راوسون، ۱۹۷۳). سپس، روش انجماد برای جنین گاو، گوسفند، اسب، گربه، خرگوش، موش، موش‌صحرایی، میمون (رال[3]، ۱۹۹۲) و جنین انسان (ترانسن و موهر[4]، ۱۹۸۳) مورد استفاده قرار گرفت و اخیراً ، در سال ۲۰۰۰، اولین جنین منجمد شده خوک به دنیا آمد (دوبرینسکی[5] و همکاران، ۲۰۰۰).

در زمینه تولید فرآورده‌های دامی، انجماد ابزاری را برای حفاظت از ژنوم گونه‌ای مادر و پدر و حمل‌و-نقل جهانی مواد ژنتیکی فراهم می‌کند و به‌عنوان روشی برای نجات ژنتیکی است (دوبرینسکی[6]، ۲۰۰۲). علاوه‌بر آن، انجماد جنین یک ابزار ضروری برای کاربردهای بیوتکنولوژی نوین جنینی مانند شبیه‌سازی و انتقال ژن است (نگویین[7]، ۲۰۰۰). جنین گاو و گوسفند شبیه‌سازی شده، توسط انتقال هسته سلول‌های سوماتیک، انتقال هسته بلاستومر و یا تزریق DNA تولید می‌شود و در انتقال جنین در این روش‌ها بایستی از روش انجماد استفاده کرد (اوشی‌جیما[8] و همکاران، ۱۹۹۹).

---

1 - Whittingham
2 - Wilmut and Rowson
3 - Rall
4 - Trounsen and Mohr
5 - Dobrinsky
6 - Dobrinski
7- Nguyen
8 - Ushijima

دستیابی به تکنیک انجماد موفقیت‌آمیز جنین ماهیان به‌طور بالقوه فواید بسیار زیادی به دنبال خواهد داشت به طوری که: به کمک انجماد می‌توان جنین یک ماهی را برای مدت زمان دلخواه به‌صورت زنده و دست‌نخورده در سرما نگاه داشت. از آن‌جا که خطر انقراض بعضی از گونه‌های ماهیان وجود دارد، به کمک انجماد می‌توان اقدام به ذخیره و حفظ ذخایر ژنتیکی این ماهیان نمود و در نتیجه بقای این‌گونه ماهیان را امکان‌پذیر ساخت؛ همچنین این روش قادر خواهد بود زاده‌های یک نسل از ماهیان را برای مطالعات مستمر و طولانی برای مدت زمان دلخواه نگهداری نمود. از کاربردهای دیگر این روش می‌توان به استفاده از آن در بازسازی ذخایر، دورگه‌گیری‌ها، تهیه بانک ژنتیکی اشاره نمود. واضح است که حمل جنین در مسافت‌های طولانی به‌صورت منجمد بسیار آسان‌تر بوده و سبب افزایش بازدهی خواهد شد.

علیرغم موفقیت‌های قابل‌توجهی که در زمینه‌ی انجماد و محافظت در برابر سرما در جنین پستانداران (اونیل[1] و همکاران، ۱۹۹۸؛ اوتویی[2] و همکاران، ۱۹۹۸) و برخی بی‌مهرگان دریایی (چاو[3] و همکاران، ۱۹۹۷) به‌دست آمده است اما، تاکنون امکان انجماد کاملاً موفقیت‌آمیز جنین ماهیان فراهم نشده است. جنین ماهیان حساسیت بسیار بیش‌تری نسبت به مواد ضدانجماد دارند و ساختار آن‌ها بسیار پیچیده‌تر است، آن‌ها دارای ساختار چند لایه‌ای هستند که به‌صورت خارجی و بدون حفاظت بدن مادر توسعه پیدا می‌کنند (کابریتا[4] و همکاران، ۲۰۰۶ آ).

1 - O’Neil
2 - Otoi
3 - Chao
4 - Cabrita

۱-۲- مشکلات انجماد جنین ماهی

در مطالعات مربوط به انجماد جنین از ترکیبات و محلول‌های محافظت‌کننده در برابر سرما یا مواد ضدانجماد مختلفی استفاده می‌شود و عوامل گوناگونی در موفقیت انجماد جنین ماهیان تأثیرگذار هستند. یکی از فاکتورهای اساسی در انجماد جنین ورود و توزیع همگن مواد ضدانجماد در قسمت‌های مختلف جنین است، ابتدا این مواد باید وارد جنین شود تا بتوان اقدام به انجماد آن نمود. در حالت عادی موانعی وجود دارند که از ورود مواد یا محلول‌های ضدانجماد به درون پیکره جنین جلوگیری می‌کنند؛ همچنین حساسیت به سرما، تشکیل کریستال‌های یخ و عدم توزیع همگن ترکیبات ضدانجماد در داخل بخش‌های مختلف جنین از عوامل اصلی در عدم موفقیت انجماد جنین ماهیان می‌باشد. در ادامه پاره ای از مهم‌ترین مشکلات و موانع موجود بر سر راه انجماد موفقیت‌آمیز جنین ماهیان ذکر خواهند شد.

۱-۲-۱- ساختار پیچیده

در ماهی‌ها، بیش‌تر حجم سلول‌های تخم از زرده و مشتقات آن پر شده است که پس از لقاح به‌طور جزیی در تسهیم صفحه‌ای شرکت می‌کند. بخش‌های سلول به‌طور کامل در تخم تقسیم نمی‌شوند و تنها سیتوپلاسم بلاستودیسک به جنین تبدیل شده و زرده بدون تقسیم باقی می‌ماند. جنین ماهیان، سیستم-های بیولوژیکی پیچیده با سه قسمت متفاوت هستند که شامل: زرده بزرگ، بلاستودرم[1] (یا جنین در حال رشد در مراحل اولیه تکامل) و فضای پری‌وتیلین می‌شود. زرده توسط لایه پیوسته اطراف زرده[2] احاطه شده است، جنین در حال رشد توسط سلول‌های غشای پلاسما خودش محدود شده است و فضای پری-

1 - Blastoderm
2 - Yolk syncytial layer

وتیلین اطراف آن، این اجزا را احاطه کرده است و خود فضای پری‌وتیلین توسط غشای بیرونی (کوریون) محدود شده است و لایه کوریون از غشای وتیلین تخم تشکیل می‌شود (کالیچاران[1] و همکاران، ۱۹۹۸ ؛ راسون[2] و همکاران، ۲۰۰۰).

انجماد هر بافت و یا ساختار بیولوژیک نیاز به استفاده از محلول‌های ضدانجماد خاصی دارد که باید به درون سلول ها نفوذ کرده و باعث از دست دادن حداقل آب از جنین شود و همچنین از رشد کریستال‌های یخ جلوگیری کند و در کل از اجزاء سلول حفاظت نماید. ساختار خاص جنین ماهی، انجماد آن را دشوار و پیچیده می‌کند. هاگدورن[3] و همکاران (۱۹۹۷آ) عمده‌ترین دلایلی که سبب پیچیدگی روند انجماد جنین در ماهیان می‌شوند را چنین بیان کردند:

۱. اندازه بزرگ و در نتیجه نسبت سطح به حجم پایین که سیر جریان ورودی و خروجی آب و مواد ضدانجماد مورد نیاز برای موفقیت در روند انجماد و ذوب را دشوار می‌کند؛

۲. داشتن زرده بزرگ با رفتار اسمزی خاص؛

۳. حساسیت بالا نسبت به مواد ضدانجماد؛

٤. احتمال بالای تشکیل یخ در درون سلول که باعث اختلال در عملکرد غشاء می شود؛

۵. تفاوت در ویژگی‌های نفوذپذیری بخش‌های مختلف جنین؛

٦. غشاهای اطراف جنین که از ورود مواد ضدانجماد ممانعت به عمل می‌آورند؛

1- Kalicharan
2- Rawson
3 - Hagedorn

اولین گام در جهت دستیابی به انجماد موفقیت‌آمیز، برقراری تعادل مناسب میان آب و مواد ضدانجماد است. بررسی‌های متعددی در زمینه قابلیت نفوذپذیری جنین و راه‌کارهای افزایش آن صورت گرفته است. کوریون اولین غشای نیمه‌تراوای سلول است که اجازه ورود آب و سایر مولکول‌های کوچک از جمله برخی از مواد ضدانجماد مانند دی‌متیل‌سولفوکساید را می‌دهند (کابریتا و همکاران، ۲۰۰۳ آ، کابریتا و همکاران، ۲۰۰۳ ب).

برخی از گونه‌های ماهیان، به‌ویژه ماهی گورخری (*Brachydanio rerio*)، نسبتاً آسان به کوریون زدایی با استفاده از پروتئازها پاسخ می‌دهد (هاگدورن و همکاران،۱۹۹۷ ؛ ژانگ و راسون[1]، ۱۹۹۸ ؛ آدامز[2] و همکاران، ۲۰۰۵). با این وجود، بیش‌تر گونه‌های پرورشی مانند ماهی توربوت (*Scophthalmus maximus*)، دارای کوریون نسبتاً مقاوم در برابر تیمارهای کوریون‌زدایی هستند (رابلس[3] و همکاران، ۲۰۰۷).

بررسی میزان نفوذپذیری مواد ضدانجماد در دو قسمت زرده و بلاستودرم به‌طور جداگانه، نشان داد میزان نفوذپذیری آب در کیسه زرده و بلاستودرم یکسان، اما قابلیت نفوذپذیری موادضدانجماد در بلاستودرم به میزان قابل توجهی بالاتر از کیسه زرده بود (هاگدورن و همکاران، ۱۹۹۷ آ؛ کابریتا و همکاران، ۲۰۰۳ آ).

همچنین، نتایج تحقیقات صورت گرفته در زمینه نفوذپذیری نشان داد لایه پیوسته اطراف زرده عمده-ترین مانعی است که از ورود مواد ضدانجماد به داخل جنین جلوگیری می‌کند. نتایج مطالعات آدامز و همکاران (۲۰۰۵) نشان داد پس از لقاح از میزان نفوذپذیری غشاء پلاسمایی کاسته می‌شود. با ادامه روند تکامل جنینی به‌تدریج نفوذپذیری غشاء تا حدی افزایش می‌یابد اما، مقدار آن همواره کم‌تر از میزان

1- Zhang and Rawson
2 - Adams
3 - Robles

نفوذپذیری پیش از لقاح خواهد بود. با استفاده از این نتایج می‌توان چنین استنباط کرد که انجماد بلاستودرم به‌ویژه در مراحل اولیه تکامل جنینی، امری دشوار بوده و احتمال موفقیت‌آمیز بودن آن بسیار کم است.

همزمان با پیشرفت روند تکاملی در جنین، اهمیت لایه پیوسته اطراف زرده به‌عنوان یکی از مهم‌ترین موانع ورود مواد ضدانجماد به دورن جنین بیش‌تر شده و نفوذ غلظت‌های مناسب مواد ضدانجماد به درون کیسه زرده دشوارتر می‌شود. بنابراین برای دستیابی به انجماد موفقیت‌آمیز جنین ماهیان باید به دنبال راه‌کارهای مناسبی جهت افزایش نفوذپذیری در هر دو بخش کیسه زرده و بلاستودرم بود.

۱-۲-۲- حساسیت نسبت به سرد سازی[1]

جنین ماهی حساسیت بالایی نسبت به سرد شدن و کاهش دما دارد. دو نوع آسیب دیدگی ناشی از کاهش دما وجود دارد که عبارتند از:

۱- آسیب مستقیم که"شوک سرمایی" نیز نامیده می‌شود و در نتیجه سرد کردن سریع رخ می‌دهد؛

۲- آسیب غیر مستقیم که بستگی به نرخ انجماد دارد و معمولاً پس از در معرض قرار گیری طولانی در درجه حرارت های پایین ظاهر می‌شود. علت وقوع هر دو نوع آسیب مرتبط با تغییر و تحولی است که در چربی غشاء صورت می‌گیرد (کابریتا و همکاران، ۲۰۰۳ ب)؛

حساسیت نسبت به سردسازی به‌دلیل اثرات بازدارنده‌ای است که کاهش دما بر فرآیندهای متابولیکی و آنزیمی می‌گذارد و می‌تواند برای جنین در حال رشد، خصوصاً گونه‌هایی که دارای رشد و توسعه جنینی سریعی هستند (مانند ماهیان) زیان‌بار و مخرب باشد.

1 - Chilling sensitivity