

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده شیلات و محیط زیست

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته

شیلات- تکثیر و پرورش آبزیان

**تأثیر برخی از مواد محافظ سرمایی و نسبت‌های مختلف رقیق کننده روی  
کیفیت اسپرم در فیل ماهی (*Huso huso* انجماد طولانی مدت و )**

پژوهش و نگارش:

علی صادقی

استاد راهنما:

دکتر محمد رضا ایمانیپور

تابستان ۱۳۹۲

تقدیم به

پدر و مادر بزرگوارم که توان پاسخ زحمات بی دریغشان از

عهده‌ی شانه‌هایم خارج است

## تشکر و قدردانی

اکنون که نگارش این طرح به پایان رسیده است، مجال یافتم تا سپاس خود را نثار تمامی بزرگواری که با الطاف بی حد و حصر خود، من را در پیمودن این راه یاری نموده‌اند.

جناب آقای دکتر محمد رضا ایمانپور استاد راهنمای بزرگووارم، زبان بنده در قدردانی و سپاسگذاری از علم‌آموزی و مهربانی جنابعالی قاصر است. کمال احترام و آرزوی سلامتی را برای شما دارم که بدون مساعدتان این پروژه به نتیجه‌ی مطلوب نمی‌رسید.

از استاد مشاور باکمالات و شایسته، جناب آقای دکتر وحید تقی زاده، که با سعه صدر با حسن خلق و فروتنی، در تمامی مراحل انجام پروژه از هیچ‌گونه کمکی دریغ ننموده‌اند، بدینوسیله نهایت سپاسگذاری خود را عرض می‌دارم

## چکیده

در این تحقیق دو آزمایش انجام شد، در آزمایش اول تلاش شد تا بهترین ماده محافظ سرمایی نفوذپذیر و بهترین نسبت رقیق‌سازی برای انجماد اسپرم فیل‌ماهی تعیین شود و برای این کار از متانول و دی‌متیل سولفوکساید به عنوان مواد محافظ سرمایی نفوذپذیر استفاده گردید که هر کدام در غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد به رقیق‌کننده اضافه شدند. سپس اسپرم با رقیق‌کننده در نسبت‌های ۰/۵ : ۱، ۱ : ۱ و ۲ : ۱ مخلوط و سپس اسپرم منجمد شد. در آزمایش دوم بین استفاده از مواد محافظ سرمایی نفوذپذیر و استفاده از ترکیب بین ماده محافظ سرمایی نفوذناپذیر و نفوذناپذیر روی کیفیت اسپرم انجمادزدایی شده فیل‌ماهی مقایسه‌ای انجام شد. برای این کار از متانول و دی‌متیل سولفوکساید به عنوان مواد محافظ سرمایی نفوذپذیر و از آلبومین سرم گاوی به عنوان ماده محافظ سرمایی نفوذناپذیر استفاده شد. یکبار متانول و دی‌متیل سولفوکساید، هر کدام در غلظت ۱۰ درصد به رقیق‌کننده اضافه شدند و سپس رقیق‌کننده با نسبت ۱ : ۱ با اسپرم مخلوط شد. بار دیگر از ترکیب آلبومین سرم گاوی در غلظت‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با متانول و دی‌متیل سولفوکساید ۱۰ درصد استفاده شد که با رقیق‌کننده ترکیب شدند و سپس رقیق‌کننده با نسبت ۱ : ۱ با اسپرم مخلوط شد. برای بررسی کیفیت اسپرم انجمادزدایی شده در آزمایش اول، اسپرم‌های منجمد بعد از ۳، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ روز از حالت انجماد خارج شدند و همچنین برای آزمایش دوم، اسپرم‌ها پس از ۳۰ و ۶۰ روز از حالت انجماد خارج شدند. نتایج بدست آمده از آزمایش اول نشان داد که در تیماری که دارای دی‌متیل سولفوکساید ۱۰ درصد و با نسبت رقیق‌سازی ۱ : ۱ بود بالاترین مدت زمان تحرک و درصد تحرک اسپرم‌های پس از ۳، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ روز انجماد مشاهده شد (بترتیب  $S \pm 47/52 \pm 319/12$  و  $\% \pm 2/40 \pm 30/31$  و  $S \pm 18/42 \pm 98/18$  و  $\% \pm 2/10 \pm 10/30$ ). نتایج بدست آمده از آزمایش دوم نشان داد که در تمام تیمارهای ترکیبی بین مواد محافظ سرمایی نفوذپذیر و نفوذناپذیر، طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم‌های انجمادزدایی شده، نسبت به تیمارهایی که تنها دارای مواد محافظ سرمایی نفوذپذیر بودند، بالاتر بودند. در بین تیمارهای ترکیبی، تیماری که دارای دی‌متیل سولفوکساید ۱۰ درصد با آلبومین سرم گاوی ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود، دارای بالاترین طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم‌های انجمادزدایی شده پس از ۳۰ و ۶۰ روز انجماد بود (بترتیب  $S \pm 20/47 \pm 158/24$  و  $\% \pm 2/80 \pm 20/45$  و  $S \pm 24/20 \pm 31/58$  و  $\% \pm 1/90 \pm 17/20$ ).

لغات کلیدی : دی متیل سولفوکساید، متانول، آلبومین سرم گاوی، مدت زمان تحرک اسپرم، درصد تحرک اسپرم

## فهرست مطالب

صفحه	عنوان
	<b>فصل اول: مقدمه و کلیات</b>
۲	۱-۱- مقدمه.....
۵	۱-۱-۱- فرضیات و اهداف.....
۶	۲-۱- مفاهیم.....
۶	۱-۲-۱- ویژگی های فیل ماهی.....
۷	۲-۲-۱- پراکنش.....
۸	۳-۲-۱- گامتوزن در ماهیان نر.....
۹	۴-۲-۱- انجماد اسپرم.....
۱۰	۵-۲-۱- ظروف نگهداری و ذخیره اسپرم.....
۱۰	۶-۲-۱- رقیق کننده.....
۱۱	۷-۲-۱- مواد محافظت کننده و نقش آن در انجماد.....
	<b>فصل دوم: سابقه تحقیق</b>
۱۵	۱-۲- سابقه تحقیق در داخل کشور.....

۲-۲- سابقه تحقیق در خارج کشور..... ۱۹

### فصل سوم: مواد و روش

۳-۱- مواد..... ۲۵

۲-۳- روش‌ها..... ۲۶

۱-۲-۳- محل نمونه برداری و انجام تحقیق..... ۲۶

۲-۲-۳- روش اسپرم‌گیری..... ۲۶

۳-۲-۳- ارزیابی کیفی اسپرم..... ۲۹

۱-۳-۲-۳- آنالیز حرکتی..... ۲۹

۴-۲-۳- ارزیابی کمی اسپرم..... ۳۱

۵-۲-۳- رقیق‌کننده..... ۳۳

۱-۵-۲-۳- آزمایش اول، تعیین بهترین ماده محافظ سرمایی نفوذپذیر و مناسب‌ترین نسبت رقیق

سازی برای انجماد اسپرم فیل‌ماهی..... ۳۳

۲-۵-۲-۳- آزمایش دوم، مقایسه بین استفاده از مواد محافظ سرمایی نفوذپذیر و استفاده از ترکیب بین

ماده محافظ نفوذپذیر و نفوذناپذیر روی کیفیت اسپرم انجمادزدایی شده فیل‌ماهی..... ۳۳

۶-۲-۳- ظروف انجماد اسپرم..... ۳۵

۷-۲-۳- روش انجماد..... ۳۵

۸-۲-۳- ذوب و انجمادزدایی..... ۳۶

۳-۲-۹- تجزیه و تحلیل آماری..... ۳۷

#### فصل چهارم: نتایج

۴-۱- خصوصیات نرهای انتخاب شده برای انجام آزمایش..... ۳۹

۴-۲- تاثیر نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی همراه با غلظت‌های مختلف دی متیل سولفوکساید و متانول روی کیفیت اسپرم‌های منجمد شده فیل ماهی (آزمایش ۱)..... ۳۹

۴-۲-۱- تاثیر نسبت‌های مختلف رقیق کننده همراه با غلظت‌های مختلف دی متیل سولفوکساید روی پارامترهای حرکتی اسپرم فیل ماهی، پس از ۳ روز انجماد..... ۳۹

۴-۲-۲- تاثیر نسبت‌های مختلف رقیق کننده همراه با غلظت‌های مختلف دی متیل سولفوکساید روی پارامترهای حرکتی اسپرم فیل ماهی، پس از ۱۵ روز انجماد..... ۴۳

۴-۲-۳- تاثیر نسبت‌های مختلف رقیق کننده همراه با غلظت‌های مختلف دی متیل سولفوکساید روی پارامترهای حرکتی اسپرم فیل ماهی، پس از ۳۰ روز انجماد..... ۴۶

۴-۲-۴- تاثیر نسبت‌های مختلف رقیق کننده همراه با غلظت‌های مختلف دی متیل سولفوکساید روی پارامترهای حرکتی اسپرم فیل ماهی، پس از ۶۰ روز انجماد..... ۴۹

۴-۲-۵- تاثیر نسبت‌های مختلف رقیق کننده همراه با غلظت‌های مختلف متانول روی پارامترهای حرکتی اسپرم فیل ماهی، پس از ۳ روز انجماد..... ۵۲

۴-۲-۶- تاثیر نسبت‌های مختلف رقیق کننده همراه با غلظت‌های مختلف متانول روی پارامترهای حرکتی اسپرم فیل ماهی، پس از ۱۵ روز انجماد..... ۵۵

۴-۲-۷- تاثیر نسبت‌های مختلف رقیق کننده همراه با غلظت‌های مختلف متانول روی پارامترهای حرکتی اسپرم فیل ماهی، پس از ۳۰ روز انجماد..... ۵۸



۸-۲-۴- تاثیر نسبت‌های مختلف رقیق کننده همراه با غلظت‌های مختلف متانول روی پارامترهای حرکتی اسپرم فیل ماهی، پس از ۶۰ روز انجماد.....	۶۱
۳-۴- مقایسه بین استفاده از مواد محافظ سرمایی نفوذپذیر و استفاده از ترکیب بین ماده محافظ نفوذپذیر و نفوذناپذیر روی کیفیت اسپرم انجمادزدایی شده فیل ماهی (آزمایش ۲).....	۶۴
۱-۳-۴- مقایسه بین استفاده از مواد محافظ سرمایی نفوذپذیر و استفاده از ترکیب بین ماده محافظ نفوذپذیر و نفوذناپذیر روی پارامترهای حرکتی اسپرم فیل ماهی، پس از ۳۰ روز انجماد.....	۶۴
۲-۳-۴- مقایسه بین استفاده از مواد محافظ سرمایی نفوذپذیر و استفاده از ترکیب بین ماده محافظ نفوذپذیر و نفوذناپذیر روی پارامترهای حرکتی اسپرم فیل ماهی، پس از ۶۰ روز انجماد.....	۶۶
<b>فصل پنجم: بحث.....</b>	۶۹
نتیجه‌گیری نهایی.....	۷۶
پیشنهادات.....	۷۷
منابع مورد استفاده.....	۷۹
چکیده انگلیسی.....	۸۷

## فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول ۳-۱- مواد مصرفی مورد استفاده در تحقیق.....	۲۵
جدول ۳-۲- مواد غیر مصرفی مورد استفاده در تحقیق.....	۲۵
جدول ۴-۱- خصوصیات نرهای انتخاب شده برای انجام آزمایش.....	۳۹
جدول ۴-۲- آنالیز واریانس دوطرفه تاثیر غلظت‌های مختلف دی متیل سولفوکساید و نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی روی طول دوره تحرک اسپرم انجمادزدایی شده فیل‌ماهی پس از ۳ روز انجماد. ۴۱	۴۱
جدول ۴-۳- آنالیز واریانس دوطرفه تاثیر غلظت‌های مختلف دی متیل سولفوکساید و نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی روی درصد تحرک اسپرم انجمادزدایی شده فیل‌ماهی پس از ۳ روز انجماد.....	۴۱
جدول ۴-۴- تاثیر نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی همراه با غلظت‌های مختلف دی متیل سولفوکساید روی پارامترهای حرکتی اسپرم فیل‌ماهی پس از ۳ روز انجماد.....	۴۲
جدول ۴-۵- آنالیز واریانس دوطرفه تاثیر غلظت‌های مختلف دی متیل سولفوکساید و نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی روی طول دوره تحرک اسپرم انجمادزدایی شده فیل‌ماهی پس از ۱۵ روز انجماد. ۴۴	۴۴
جدول ۴-۶- آنالیز واریانس دوطرفه تاثیر غلظت‌های مختلف دی متیل سولفوکساید و نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی روی درصد تحرک اسپرم انجمادزدایی شده فیل‌ماهی پس از ۱۵ روز انجماد.....	۴۴
جدول ۴-۷- تاثیر نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی همراه با غلظت‌های مختلف دی متیل سولفوکساید روی پارامترهای حرکتی اسپرم فیل‌ماهی پس از ۱۵ روز انجماد.....	۴۵

جدول ۴-۸- آنالیز واریانس دوطرفه تاثیر غلظت‌های مختلف دی متیل سولفوکساید و نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی روی طول دوره تحرک اسپرم انجمادزدایی شده فیل ماهی پس از ۳۰ روز انجماد. ۴۷

جدول ۴-۹- آنالیز واریانس دوطرفه تاثیر غلظت‌های مختلف دی متیل سولفوکساید و نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی روی درصد تحرک اسپرم انجمادزدایی شده فیل ماهی پس از ۳۰ روز انجماد..... ۴۷

جدول ۴-۱۰- تاثیر نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی همراه با غلظت‌های مختلف دی متیل سولفوکساید روی پارامترهای حرکتی اسپرم فیل ماهی پس از ۳۰ روز انجماد..... ۴۸

جدول ۴-۱۱- آنالیز واریانس دوطرفه تاثیر غلظت‌های مختلف دی متیل سولفوکساید و نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی روی طول دوره تحرک اسپرم انجمادزدایی شده فیل ماهی پس از ۶۰ روز انجماد. ۵۰

جدول ۴-۱۲- آنالیز واریانس دوطرفه تاثیر غلظت‌های مختلف دی متیل سولفوکساید و نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی روی درصد تحرک اسپرم انجمادزدایی شده فیل ماهی پس از ۶۰ روز انجماد..... ۵۰

جدول ۴-۱۳- تاثیر نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی همراه با غلظت‌های مختلف دی متیل سولفوکساید روی پارامترهای حرکتی اسپرم فیل ماهی پس از ۶۰ روز انجماد..... ۵۱

جدول ۴-۱۴- آنالیز واریانس دوطرفه تاثیر غلظت‌های مختلف متانول و نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی روی طول دوره تحرک اسپرم انجمادزدایی شده فیل ماهی پس از ۳ روز انجماد..... ۵۳

جدول ۴-۱۵- آنالیز واریانس دوطرفه تاثیر غلظت‌های مختلف متانول و نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی روی درصد تحرک اسپرم انجمادزدایی شده فیل ماهی پس از ۳ روز انجماد..... ۵۳

جدول ۴-۱۶- تاثیر نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی همراه با غلظت‌های مختلف متانول روی پارامترهای حرکتی اسپرم فیل ماهی پس از ۳ روز انجماد..... ۵۴

جدول ۴-۱۷- آنالیز واریانس دوطرفه تاثیر غلظت‌های مختلف متانول و نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی روی طول دوره تحرک اسپرم انجمادزدایی شده فیل ماهی پس از ۱۵ روز انجماد..... ۵۶

- جدول ۴-۱۸- آنالیز واریانس دوطرفه تاثیر غلظت‌های مختلف متانول و نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی روی درصد تحرک اسپرم انجمادزدایی شده فیل‌ماهی پس از ۱۵ روز انجماد..... ۵۶
- جدول ۴-۱۹- تاثیر نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی همراه با غلظت‌های مختلف متانول روی پارامترهای حرکتی اسپرم فیل‌ماهی پس از ۱۵ روز انجماد..... ۵۷
- جدول ۴-۲۰- آنالیز واریانس دوطرفه تاثیر غلظت‌های مختلف متانول و نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی روی طول دوره تحرک اسپرم انجمادزدایی شده فیل‌ماهی پس از ۳۰ روز انجماد..... ۵۹
- جدول ۴-۲۱- آنالیز واریانس دوطرفه تاثیر غلظت‌های مختلف متانول و نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی روی درصد تحرک اسپرم انجمادزدایی شده فیل‌ماهی پس از ۳۰ روز انجماد..... ۵۹
- جدول ۴-۲۲- تاثیر نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی همراه با غلظت‌های مختلف متانول روی پارامترهای حرکتی اسپرم فیل‌ماهی پس از ۳۰ روز انجماد..... ۶۰
- جدول ۴-۲۳- آنالیز واریانس دوطرفه تاثیر غلظت‌های مختلف متانول و نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی روی طول دوره تحرک اسپرم انجمادزدایی شده فیل‌ماهی پس از ۶۰ روز انجماد..... ۶۲
- جدول ۴-۲۴- آنالیز واریانس دوطرفه تاثیر غلظت‌های مختلف متانول و نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی روی درصد تحرک اسپرم انجمادزدایی شده فیل‌ماهی پس از ۶۰ روز انجماد..... ۶۲
- جدول ۴-۲۵- تاثیر نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی همراه با غلظت‌های مختلف متانول روی پارامترهای حرکتی اسپرم فیل‌ماهی پس از ۶۰ روز انجماد..... ۶۳
- جدول ۴-۲۶- اثرات استفاده از ترکیب بین ماده محافظ نفوذپذیر و نفوذناپذیر روی کیفیت اسپرم انجمادزدایی شده فیل‌ماهی پس از ۳۰ روز انجماد..... ۶۵
- جدول ۴-۲۷- اثرات استفاده از ترکیب بین ماده محافظ نفوذپذیر و نفوذناپذیر روی کیفیت اسپرم انجمادزدایی شده فیل‌ماهی پس از ۶۰ روز انجماد..... ۶۷

## فهرست اشکال

عنوان	صفحه
شکل ۱-۱- فیل ماهی.....	۶
شکل ۲-۱- پراکنش فیل ماهی در دریای خزر.....	۷
شکل ۳-۱- دی متیل سولفوکساید.....	۱۳
شکل ۴-۱- متانول.....	۱۳
شکل ۵-۱- آلبومین سرم گاوی.....	۱۳
شکل ۱-۳- تزریق هورمون هیپوفیز به مولدین جهت رسیدگی جنسی.....	۲۷
شکل ۲-۳- اسپرم گیری از مولدین در استخرهای کورانسکی.....	۲۸
شکل ۳-۳- نمونه اسپرم.....	۲۸
شکل ۴-۳- انتقال اسپرم به آزمایشگاه.....	۲۸
شکل ۵-۳- میکروسکوپ وارونه نیکون.....	۳۰
شکل ۶-۳- لام هموسیتومتر.....	۳۲
شکل ۷-۳- افزودن محلول رقیق کننده به همراه مواد محافظ سرما به اسپرم.....	۳۴
شکل ۸-۳- سرمادهی تدریجی توسط بخار ازت مایع.....	۳۵
شکل ۹-۳- وارد کردن نمونه‌ها در داخل تانک ازت مایع.....	۳۵

شکل ۳-۱۰- انجمادزدایی اسپرم..... ۳۷

فصل اول:

## مقدمه

در آب‌های سرتاسر جهان حدود ۲۷۰۰۰ گونه ماهی شناسایی شده که در بین آنها ۲۷ گونه از ماهیان خاویاری از نظر ارزش اقتصادی جزء گرانترین و با ارزش‌ترین آنها محسوب می‌گردند و منحصرأ در نیمکره شمالی زیست می‌کنند. شش گونه از ماهیان فوق در آب‌های دریای خزر و رودخانه‌های منتهی به آن وجود دارند که در مجموع ۹۰ درصد از کل ذخایر ماهیان خاویاری جهان را تشکیل می‌دهند (بیلارد و لکونیترا، ۲۰۰۱). میزان ذخایر این ماهیان با ارزش به علت از بین رفتن زیستگاه طبیعی آن‌ها، تخریب اکوسیستم، تغییرات آب و هوایی و مهم‌تر از همه صید بی‌رویه آنها کاهش یافته است (آذر تاکامی و کهنه شهری، ۱۳۵۳). لذا کلیه گونه‌های ماهیان خاویاری بخصوص تمامی گونه‌های حوضه دریای خزر در لیست ماهیان در معرض خطر اتحادیه بین‌المللی حفاظت از طبیعت<sup>۱</sup> IUCN قرار گرفته‌اند و از سال ۱۹۹۸ به بعد تمام تاس‌ماهیان در فهرست کنوانسیون نظارت بر تجارت گونه‌های گیاهی و جانوری در معرض انقراض<sup>۲</sup> CITES قرار گرفته‌اند (شعبانی، ۱۳۸۴). فیل‌ماهی ( *Huso huso* ) در حوضه دریای خزر، سیاه و آزوف زندگی می‌کند و در دریای آدریاتیک نیز شناسایی شده است. فیل‌ماهی یکی از بزرگترین ماهیان دریای خزر است که به طول ۶ متر و وزن بیش از یک تن می‌رسد (آس و همکاران، ۱۹۹۱). گوشت و به ویژه خاویار این ماهی موجب شده است تا از نظر تجاری دارای اهمیت زیادی باشد (رونیا و وارادی، ۱۹۹۵). مرور آمار صید سالانه تاس‌ماهیان در

<sup>۱</sup>. International union for conservation of natural and natural resources

<sup>۲</sup>. Convention of international trade endangered species funa and flora

جهان حاکی از کاهش شدید آن طی دهه اخیر است (هلسیک، ۱۹۸۹). اهمیت تکثیر مصنوعی ماهیان خاویاری زمانی آشکار می‌شود که بدانیم در حال حاضر ۷۵ درصد میزان صید ماهیان خاویاری جهان حاصل از اقدامات تکثیر مصنوعی این گونه‌ها است (درشو و لوتس، ۱۹۸۸). در آبی پروری مدرن ارزیابی کیفیت سمن یکی از تحقیقات کاربردی و جالب جهت سنجش لقاح مصنوعی می‌باشد که البته با توجه به اهمیت موضوع تحقیقات اندکی در این زمینه انجام شده است (آس و همکاران، ۱۹۹۱). در صنعت پرورش ماهی همواره بیشترین توجه به کیفیت تخم و لارو معطوف گشته و توجه کمتری نسبت به کیفیت اسپرم شده است. در صورتیکه کیفیت هر دو نوع گامت روی موفقیت لقاح و بقای لارو تاثیر گذار است (رورانگوا و همکاران، ۲۰۰۴). با توجه به روند کاهش صید ماهیان خاویاری و خطر نابودی ذخایر این ماهیان، بکارگیری تدابیر و اقدامات اساسی در این خصوص الزامی است. یکی از روش‌های جلوگیری از انقراض نسل آنها، ذخیره سازی و ایجاد بانک گامت منجمد با استفاده از تکنیک انجماد اسپرم است. نگهداری اسپرم در شرایط انجماد شاخه‌ای از علم کرایوبیولوژی<sup>۳</sup> است که به حفظ و نگهداری طولانی مدت سلول در دمای بسیار پایین می‌پردازد (آشوود اسمیت، ۱۹۸۰). مهمترین اصل در فرآیند انجماد، کاهش آسیب در اثر تشکیل بلورهای یخ داخل سلولی است که با سرد کردن آهسته و خروج آب داخل سلولی تا حد مناسب، قبل از سرد کردن یا طی آن انجام می‌شود (بیلارد و همکاران، ۱۹۹۷). محلول رقیق کننده برای افزایش زمان نگهداری اسپرم ماهیان در نگهداری بلند مدت و برای بهبود تکثیر مصنوعی مورد استفاده قرار می‌گیرد (چولهنگ و چاپمن، ۲۰۰۵). مدت

---

<sup>3</sup>. Cryobiology



زمان تحرک اسپرم و درصد سلول‌های متحرک با توجه به گونه ماهی، دما، ترکیب رقیق کننده و همچنین نسبت رقیق سازی متفاوت است (علوی، ۱۳۷۹). در فرایند انجماد اسپرم از افزودنی‌های مهم رقیق کننده، مواد محافظ سرمایی است که شامل دو نوع محافظت کننده نفوذپذیر و محافظت کننده نفوذناپذیر می‌باشد. دی متیل سولفوکساید و متانول رایج ترین مواد محافظت کننده نفوذپذیر می‌باشد و آلبومین سرم گاوی<sup>۴</sup> بعنوان یکی از بهترین مواد محافظت کننده نفوذناپذیر شناخته شده است (بیلارد و همکاران، ۲۰۰۴). در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی بر روی کاربرد انواع مواد محافظ سرمایی در انجماد اسپرم ماهیان به عمل آمده است، اما در نحوه کاربرد این مواد و غلظت مناسب آن در روند انجماد اسپرم ماهیان خاویاری اتفاق نظری وجود نداشته است. از این رو مطالعه بیشتر بر روی بررسی حیات اسپرم در شرایط انجماد و اثر مواد محافظ سرمایی در غلظت‌های مختلف و همچنین تاثیر نسبت رقیق سازی روی مدت زمان تحرک و درصد تحرک اسپرم برای تثبیت روش مناسب در روند انجماد اسپرم ماهیان خاویاری ضروری به نظر می‌رسد.

---

<sup>4</sup>. Bovine serum albumin

## ۱-۱-۱ فرضیات و اهداف

با توجه به بررسی‌های فوق فرضیات زیر مطرح می‌شود:

۱. غلظت‌های مختلف دی متیل سولفوکساید، متانول و آلومین سرم گاوی روی کیفیت اسپرم فیل ماهی پس از انجماد تأثیرات متفاوت دارد.
۲. نسبت‌های مختلف رقیق سازی روی کیفیت اسپرم فیل ماهی تأثیر می‌گذارد.
۳. اضافه کردن آلومین سرم گاوی (محافظت کننده نفوذناپذیر) به متانول و دی متیل سولفوکساید (محافظت کننده نفوذپذیر) باعث افزایش کیفیت اسپرم فیل ماهی پس از انجماد می‌شود.

## اهداف:

۱. بررسی اثرات غلظت‌های مختلف دی متیل سولفوکساید، متانول و آلومین سرم گاوی روی کیفیت اسپرم انجمادزدایی شده فیل ماهی
۲. تعیین مناسب ترین نسبت رقیق سازی برای انجماد اسپرم فیل ماهی
۳. بررسی اثرات بکارگیری ماده محافظ سرمایی نفوذپذیر و نفوذناپذیر بصورت ترکیبی روی طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم انجمادزدایی شده فیل ماهی

## ۲-۱ مفاهیم

### ۱-۲-۱ ویژگی‌های فیل ماهی



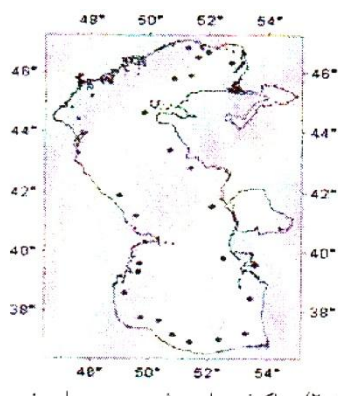
شکل ۱-۱- فیل ماهی

فیل ماهی (*Huso huso*) از ماهیان غضروفی استخوانی متعلق به خانواده *Acipenseridae* می‌باشد. این ماهی دامنه دمایی زیادی را تحمل می‌کند (۱ تا ۳۰ درجه سانتی گراد)، اما دمای ۱۰ تا ۲۰ درجه سانتی گراد را ترجیح می‌دهد. سن بلوغ در فیل ماهی ماده ۱۷-۱۸ سالگی و در فیل ماهی نر در ۱۳-۱۴ سالگی می‌باشد. برای تولید مثل، مهاجرت بهاره یا پاییزه به رودخانه دارند. اما در فصل بهار بیشتر مهاجرت صورت می‌گیرد. زمان تولید مثل به طغیان آب رودخانه بستگی دارد. بستر رودخانه محل تخم‌ریزی، سنگلاخی و قلوه سنگی به همراه ماسه می‌باشد و سرعت آب ۱/۵ تا ۲ متر در ثانیه و با عمق ۴ تا ۱۵ متر باید باشد (فیندی، ۱۹۹۷). فیل ماهی در جوانی از پلانکتون‌های جانوری، کرم‌ها، حشرات کفزی و بی‌مهرگان و به تدریج از ماهیان نظیر کلمه (*Rutilus rutilus*)، سیاه کولی (*Vimba vimba*) و کپور (*Cyprinus carpio*) و در فصل مهاجرت به رودخانه از کاراس

(*Carassius carassius*)، ماش ماهی (*Aspius aspius*) و بسیاری ماهیان دیگر تغذیه می‌نماید

(رونیا و وارادی، ۱۹۹۵).

### ۲-۲-۱ پراکنش



فیل ماهی در بخش‌های شمالی، میانی و جنوبی دریای خزر پراکنش دارد و بیشتر در مناطقی با بستر گل و لای زیست می‌کند. این ماهی در دریای خزر در اعماق ۱۰۰ تا ۱۲۰ متری مشاهده می‌شود.

شکل ۲-۱- پراکنش فیل ماهی در دریای خزر