اثر سمیت برخی مواد ضدانجماد نفوذپذیر و نفوذناپذیر بر جنین ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

سعیده کیوانلو[۱]، محمد سوداگر[۱*]، محمد مازندرانی[۱]

*Sudagar_m@yahoo.com

۱-دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۶

چکیده

آگاهی از اثر سمیت مواد ضدانجماد یکی از ضروری‌ترین پیش‌نیازها در طراحی دستورالعمل انجماد جنین ماهیان است. در این مطالعه به منظور بررسی اثر سمیت مواد ضدانجماد، جنین ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مراحل جنینی روخزیدگی ناقص و ضربان قلب انتخاب و برای مدت ۵ دقیقه در معرض آنزیم پروناز (۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) قرار گرفتند. جنین‌های نفوذپذیر شده در سه ماده ضدانجماد نفوذپذیر شامل: دی‌متیل‌سولفوکساید، متانول و پروپیلن‌گلیکول در غلظت‌های ۱ تا ۴ مولار و در یک ماده ضدانجماد نفوذناپذیر، ساکارز (در غلظت‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد) به مدت ۵ و ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شدند. پس از آن جنین‌ها شسته شده و تا زمان تفریخ انکوباسیون شدند. بررسی سمیت مواد ضدانجماد از طریق محاسبه درصد تفریخ لارو صورت گرفت. نتایج نشان داد در هر دو مرحله تکاملی، درصد تفریخ با افزایش غلظت و مدت زمان در معرض‌گذاری به‌طور معنی‌داری کاهش یافت؛ همچنین متانول ماده ضدانجماد نفوذپذیر با کمترین سمیت بود و پس از آن پروپیلن‌گلیکول و دی‌متیل‌سولفوکساید قرار داشتند. افزایش زمان در معرض‌گذاری با ساکارز به‌ویژه در مرحله ضربان قلب به‌طور معنی‌داری منجر به کاهش درصد تفریخ شد. با پیشرفت روند تکاملی (از مرحله روخزیدگی ناقص به ضربان قلب)، حساسیت جنین ماهی کپور معمولی نسبت به مواد ضدانجماد کاهش یافت.

کلمات کلیدی: کپور معمولی، جنین، سمیت، مواد ضدانجماد، نفوذپذیری

* نویسنده مسئول

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.2.16.5]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113487]

مقدمه

توسعه فناوری‌های نوین در زمینه انجماد جنین، انقلابی در پرورش حیوانات اهلی و همچنین فناوری‌های تولیدمثل انسان در دهه‌های اخیر ایجاد کرده است. در زمینه تولید فرآورده‌های دامی، انجماد ابزاری را برای حفاظت از ژنوم - گونه‌ای پدر و مادر و حمل‌ونقل جهانی مواد ژنتیکی فراهم می‌کند و به‌عنوان روشی برای نجات ژنتیکی است (Dobrinski, 2002). علاوه‌بر آن، انجماد جنین یک ابزار ضروری برای کاربردهای بیوتکنولوژی نوین جنینی مانند شبیه‌سازی و انتقال ژن است (Nguyen *et al.*, 2000). علیرغم موفقیت‌های قابل‌توجهی که در زمینه‌ی انجماد و محافظت در برابر سرما در جنین پستانداران (O'Neil *et al.*, 1998; Otoi *et al.*, 1998) و برخی بی‌مهرگان دریایی (Chao *et al.*, 1997) به‌دست آمده است اما، تاکنون مطالعات در زمینه انجماد جنین ماهیان با موفقیت‌های اندکی همراه بوده است (Chen & Tian, 2005; Tian *et al.*, 2015; Keivanloo & Sudagar, 2016). دستیابی به تکنیک انجماد موفقیت‌آمیز جنین ماهیان به‌طور بالقوه فواید بسیار زیادی به همراه خواهد داشت به‌طوری‌که: به کمک انجماد می‌توان جنین یک ماهی را برای مدت زمان دلخواه به‌صورت زنده و دست‌نخورده در سرما نگاه داشت و زاده-های یک نسل از ماهیان را برای مطالعات مستمر و طولانی برای مدت زمان دلخواه نگهداری نمود. 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؛ از کاربردهای دیگر این روش می‌توان به استفاده از آن در بازسازی ذخایر، دورگه‌گیری‌ها، تهیه بانک ژنتیکی اشاره کرد (سوداگر و کیوانلو، ۱۳۹۱).

انجماد هر بافت و یا ساختار بیولوژیک نیاز به استفاده از محلول‌های ضدانجماد[1] (محافظت‌کننده در برابر سرما) خاصی دارد که باید به درون سلول‌ها نفوذ کرده، باعث از دست دادن حداقل آب از جنین شده، از رشد کریستال-های یخ جلوگیری کند و در کل از اجزاء سلول حفاظت نماید. یکی از اطلاعات اساسی و مورد نیاز به‌منظور توسعه روش‌های انجماد، چگونگی اثر سمیت مواد ضدانجماد روی گونه مورد مطالعه است. سمیت این مواد ممکن است کم یا زیاد باشد، که با عواملی نظیر غلظت این مواد، دما و مدت زمان تماس سلول با مواد ضدانجماد رابطه مستقیم دارد (Cabrita *et al.*, 2008). مواد ضدانجماد خود به دو دسته مواد ضدانجماد نفوذپذیر و مواد ضدانجماد نفوذناپذیر تقسیم می‌شوند؛ مواد ضدانجماد نفوذپذیر به-دلیل وزن مولکولی پایین خود می‌توانند از غشای سلول عبور کنند و کاهش قابل‌ملاحظه‌ای را در دمای انجماد محلول‌های درون سلولی ایجاد نمایند (Cabrita *et al.*, 2008) حال آن‌که، مواد ضدانجماد نفوذناپذیر به‌دلیل وزن مولکولی بالا، توانایی ورود به سلول را ندارند و اساس کار آن‌ها بر پایه آبگیری از سلول قبل از انجماد می‌باشد که موجب کاهش شکل‌گیری کریستال‌های یخ در طول روند انجماد می‌شود؛ برخی از این مواد نیز ساختار کریستال‌ها را به ساختاری بی‌ضرر تبدیل می‌کنند (Cabrita *et al.*, 2008). آگاهی از سمیت مواد ضدانجماد یکی از ضروری‌ترین پیش‌نیازها در طراحی دستورالعمل انجماد جنین است. از طرفی نتایج متفاوتی که از بررسی سمیت مواد ضدانجماد در جنین ماهیان به‌دست آمده است نشان دهنده ضرورت و اهمیت مطالعات اختصاصی سمیت این مواد برای هر یک از گونه‌های آبزیان است (کیوانلو و سوداگر،۱۳۹۱).

کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) یکی از مهم-ترین گونه‌های خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) است که پراکنش وسیعی در حوضه‌ی دریای خزر، رودخانه تجن و تمام حوضه‌های آبریز ایران دارد (ستاری و همکاران، ۱۳۸۳). کپور معمولی یکی از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی در آسیا و اروپاست که به‌دلیل دارا بودن ویژگی‌های منحصر به فرد، حتی در استخرهای ذخیره آب کشاورزی و استخرهای بتنی نیز پرورش می‌یابد و در مزارع پرورشی تنها یک بار در سال تولیدمثل می‌کند (Dinnyes *et al.*, 1998). اطلاعات در زمینه اثر مواد ضدانجماد روی جنین ماهی کپور معمولی بسیار محدود و عمدتاً قدیمی هستند (Zhang *et al.*, 1989; Dinnyes *et al.*, 1998; Urbanyi *et al.*, 1997; Urbanyi *et al.*, 1998). تا کنون در ایران، هیچ تلاشی در زمینه بررسی اثر مواد ضدانجماد و امکان انجماد جنین ماهی کپور معمولی صورت نگرفته است، دسترسی به جنین این گونه در تمام طول سال می‌تواند کمک شایانی به توسعه جنبه-های متعدد تولید و پرورش این ماهی ارزشمند کند. هدف از این تحقیق، دستیابی به اطلاعات بنیادی و پایه در زمینه اثر سمیت برخی از رایج‌ترین مواد ضدانجماد مورد استفاده در انجماد جنین ماهیان، در جنین ماهی کپور

[1]. Cryoprotectants

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.2.16.5]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113487]

معمولی بود و در همین راستا، آزمایشاتی برای تعیین اثرات این مواد بر درصد تفریخ جنین این گونه انجام شد.

مواد و روش‌ها

محل اجرای آزمایش: محل اجرای این آزمایش در مرکز بازسازی ذخایر ماهیان استخوانی گلستان واقع در روستای سیجوال، استان گلستان و آزمایشگاه شیمی دانشکده شیلات و محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان بود.

مواد شیمیایی مصرفی: در این تحقیق به منظور یافتن غلظت‌های مجاز از ترکیبات و محلول‌های محافظت‌کننده در برابر سرما از سه ماده ضدانجماد نفوذپذیر شامل: پروپیلن‌گلیکول، دی‌متیل‌سولفوکساید و متانول؛ و از ساکارز به‌عنوان یک ماده ضدانجماد نفوذناپذیر استفاده شد. علاوه‌بر آن از آنزیم پروناز (نوع XIV از *استرپتومایسیز گریسیوز*[۲]) برای نفوذپذیر کردن لایه‌ی کوریون، محلول رینگر (۲/۹۹ گرم کلرید پتاسیم + ۶/۴۹ گرم کلرید سدیم + ۰/۲۹ گرم کلرید کلسیم و ۰/۲۰ گرم بی کربنات سدیم در یک لیتر آب) برای تهیه غلظت‌های مورد نیاز از مواد ضدانجماد و آنزیم پروناز و آب مقطر (برای شستشو) نیز استفاده گردید. همه مواد شیمیایی مورد استفاده از نمایندگی شرکت مرک آلمان در ایران خریداری شدند.

تهیه جنین: تخمک‌ها و اسپرم از مولدین کپور معمولی استحصال شده و پس از لقاح، تخم‌های لقاح یافته در داخل انکوباتورها با دمای۱±۲۴ درجه سانتی گراد مراحل تکامل جنینی خود را طی کردند. پس از گذشت ۸ و ۳۲ ساعت از زمان لقاح، جنین‌ها به‌ترتیب در دو مرحله روخزیدگی ناقص[۳] و ضربان قلب[۴] (Okada, 1960) برای انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند.

آزمایش سمیت مواد ضدانجماد: قبل از آنکه جنین ها در معرض مواد ضدانجماد قرار گیرند، لایه کوریون تخم‌ها با استفاده از آنزیم پروناز با غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به مدت ۵ دقیقه نفوذ پذیر شد (Robles *et al*., 2003; Cabrita *et al*., 2003a; Keivanloo & Sudagar, 2013). سپس ۳۵ عدد جنین ماهی کپور معمولی در دو مرحله تکاملی (روخزیدگی ناقص و ضربان قلب) در ۶۰ میلی‌لیتر از هر یک از غلظت‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ مولار از مواد ضدانجماد نفوذپذیر (پروپیلن‌گلیکول، دی‌متیل‌سولفوکساید و متانول) و غلظت‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد ساکارز برای زمان‌های ۵ و ۱۵ دقیقه در دمای ۱ ± ۲۴ درجه سانتی‌گراد (شرایط کارگاهی) غوطه‌ور شدند. سپس، جنین‌ها با آب مقطر آبکشی شده و ادامه مراحل تکاملی خود را در انکوباتورها طی کردند. گروه شاهد نیز در همان زمان بدون آن‌که در معرض مواد ضدانجماد قرار بگیرند در آب گارگاه مراحل انکوباسیون خود را انجام دادند. پس از تفریخ، بررسی سمیت مواد ضدانجماد از طریق محاسبه درصد تفریخ لارو (بر اساس فرمول ۱) صورت گرفت.

۱۰۰ × (تعداد کل جنین‌های مورد آزمایش / تعداد لارو تفریخ شده)= درصد تفریخ لارو : (فرمول ۱)

تجزیه و تحلیل آماری

نمونه برداری در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام و برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. داده‌های به‌دست آمده از این آزمایش به کمک آنالیز واریانس یک-طرفه (ANOVA One Way) و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند، همچنین برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه دانکن (Duncan) استفاده شد.

نتایج

اثرات سمیت مواد ضدانجماد نفوذپذیر روی جنین‌های ماهی کپور معمولی در دو مرحله تکاملی روخزیدگی ناقص و ضربان قلب در جدول ۱ نشان داده شده است. بررسی و آنالیز داده‌ها نشان داد تمامی عوامل مورد بررسی اعم از غلظت مواد ضدانجماد، مرحله تکامل جنینی و مدت زمان غوطه‌وری در مواد ضدانجماد، بر درصد تفریخ جنین ماهی کپور معمولی اثرگذار بودند.

در مرحله روخزیدگی ناقص، متانول نسبت به پروپیلن‌گلیکول و دی‌متیل‌سولفوکساید کمترین سمیت را در جنین کپور معمولی برجای گذاشت. در مرحله ضربان قلب، جنین کپور معمولی تحمل مشابهی نسبت به غلظت‌های متانول و پروپیلن‌گلیکول داشت و هر دو این مواد سمیت کمتری نسبت به دی‌متیل‌سولفوکساید نشان دادند. در مرحله ضربان قلب، بالاترین درصد تفریخ پس از ۵ دقیقه در معرض‌گذاری با محلول ۱ مولار متانول به-دست آمد (۸۰/۹۴ درصد) که تفاوت معنی‌داری با غلظت

[۲] - *Streptomyces griseus*
[۳] - half-epiboly
[۴] - heartbeat

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.2.16.5]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113487]

۳ مولار نداشت (جدول ۱). بیشترین سمیت و پایین‌ترین درصد تفریخ پس از ۱۵ دقیقه در معرض‌گذاری با محلول ۴ مولار دی‌متیل‌سولفوکساید در جنین‌های ماهی کپور معمولی در مرحله روخزیدگی ناقص (۲۱/۰۴ درصد) و ضربان قلب (۴۱/۹۰ درصد) مشاهده شد (جدول ۱).

از نتایج حاصل از بررسی اثر این سه ماده ضدانجماد چنین استنباط شد که ترتیب سمیت مواد ضدانجماد برای جنین کپور معمولی در دو مرحله تکاملی به صورت: متانول< پروپیلن‌گلیکول < دی‌متیل‌سولفوکساید بود.

بررسی داده‌های به دست آمده نشان داد جنین کپور معمولی در مرحله روخزیدگی ناقص نسبت به در معرض-گذاری با مواد ضدانجماد اندکی حساس‌تر از مرحله ضربان قلب بود.

در معرض‌گذاری با غلظت‌های مختلف ساکارز، اثرات متفاوتی را در جنین کپور معمولی در هر دو مرحله تکاملی بر جای گذاشت (شکل ۱). در مرحله روخزیدگی ناقص، پس از ۵ دقیقه غوطه‌وری جنین‌ها در غلظت‌های ۱۵ و ۲۰ درصد ساکارز، درصد تفریخ هیچ تفاوت معنی-داری با گروه شاهد نداشت. در مرحله ضربان قلب، درصد تفریخ پس از ۵ دقیقه در معرض‌گذاری با غلظت‌های مختلف ساکارز کاهش معنی‌داری را نشان نداد (شکل ۱). افزایش زمان در معرض‌گذاری با ساکارز از ۵ به ۱۵ دقیقه منجر به کاهش درصد تفریخ شد.

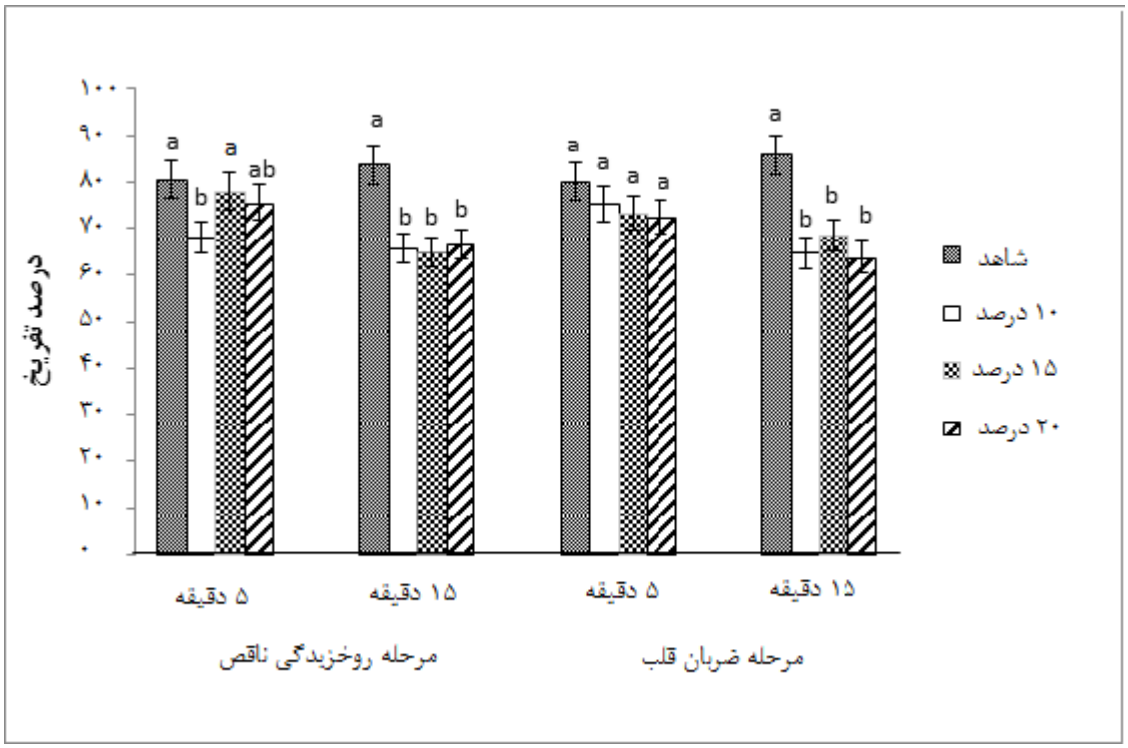
جدول ۱: درصد تفریخ در جنین‌های ماهی کپور معمولی در مرحله روخزیدگی ناقص (الف) و ضربان قلب (ب) پس از غوطه‌وری در غلظت-های مختلف دی‌متیل‌سولفوکساید، متانول و پروپیلن‌گلیکول.

Table 1: Hatching rate of (A) half-epiboly stage and (B) heartbeat stage exposed to different concentration of dimethyl sulfoxide, methanol and propylene glycol.

مواد ضدانجماد		درصد تفریخ				
		غلظت				
	زمان غوطه‌وری	شاهد	۱ مولار	۲ مولار	۳ مولار	۴ مولار
الف						
دی‌متیل‌سولفوکساید	۵ دقیقه	۸۶/۶۶ ±۵/۶۷ ^{a}	۶۰/۶۶ ±۵/۶۷ ^{bc}	۶۶/۸۵±۱۲/۸۶ ^{b}	۶۱/۹۰± ۹/۳۴ ^{bc}	۴۷/۰۴ ±۷/۷۳ ^{c}
	۱۵ دقیقه	۸۲/۹۴±۲/۱۴ ^{a}	۵۹/۴۲ ±۹/۸۲ ^{bc}	۶۶/۸۵ ±۷/۴۳ ^{b}	۵۰/۷۶ ±۲/۱۴ ^{c}	۲۱/۰۴ ±۲/۱۴ ^{d}
متانول	۵ دقیقه	۸۵/۴۲ ±۳/۷۱ ^{a}	۸۱/۷۱ ±۳/۷۱ ^{a}	۶۹/۳۳ ±۷/۷۳ ^{b}	۶۳/۱۳ ± ۳/۷۱ ^{bc}	۵۴/۴۷ ± ۵/۶۷ ^{c}
	۱۵ دقیقه	۸۲/۹۴ ±۲/۱۴ ^{a}	۷۰/۵۶±۳/۷۱ ^{b}	۵۳/۲۳ ±۵/۶۷ ^{c}	۴۸/۲۸ ± ۱۱/۱۴ ^{c}	۶۶/۸۵ ± ۷/۴۳ ^{b}
پروپیلن‌گلیکول	۵ دقیقه	۸۲/۹۴ ±۷/۷۳ ^{a}	۷۴/۲۸ ±۳/۷۱ ^{ab}	۷۰/۵۷ ±۷/۴۳ ^{b}	۶۸/۰۹ ±۲/۱۴ ^{b}	۶۹/۳۳ ±۵/۶۷ ^{b}
	۱۵ دقیقه	۸۱/۷۱ ±۳/۷۱ ^{a}	۶۰/۶۶ ±۵/۶۷ ^{c}	۸۱/۷۱ ±۳/۷۱ ^{a}	۷۳/۰۴ ±۵/۶۷ ^{ab}	۶۳/۳۳±۷/۴۳ ^{c}
ب						
دی‌متیل‌سولفوکساید	۵ دقیقه	۸۶/۶۶ ±۳/۳۰ ^{a}	۶۲/۸۵ ±۱۰/۳۰ ^{b}	۷۰/۴۷ ±۱۰/۰۳ ^{b}	۵۹/۹۹ ±۵/۷۱ ^{bc}	۴۶/۶۶ ±۷/۱۸ ^{c}
	۱۵ دقیقه	۸۵/۷۱ ±۲/۸۶ ^{a}	۴۸/۵۶±۷/۵۶ ^{bc}	۶۴/۷۵±۹/۱۸ ^{b}	۶۱/۹۰± ۱۴/۰۹ ^{b}	۴۱/۹۰ ±۴/۳۶ ^{c}
متانول	۵ دقیقه	۸۴/۷۵ ±۷/۱۸ ^{a}	۸۰/۹۴ ±۳/۲۹ ^{ab}	۶۵/۷۱ ±۴/۹۴ ^{c}	۷۱/۴۲ ± ۵/۷۱ ^{bc}	۵۳/۳۳ ± ۹/۱۸ ^{d}
	۱۵ دقیقه	۸۳/۸۰ ±۴/۳۶ ^{a}	۷۵/۲۳ ±۱/۶۵ ^{a}	۶۱/۹۰ ± ۶/۵۹ ^{b}	۴۳/۸۰ ± ۶/۵۹ ^{c}	۵۲/۳۷ ± ۵/۹۴ ^{bc}
پروپیلن‌گلیکول	۵ دقیقه	۸۱/۹۰ ±۵/۹۴ ^{a}	۷۵/۲۳ ±۷/۱۸ ^{ab}	۷۱/۴۲ ±۲/۸۵ ^{abc}	۶۱/۹۰ ±۹/۱۸ ^{c}	۶۴/۷۵ ±۷/۱۸ ^{bc}
	۱۵ دقیقه	۸۳/۸۰ ±۱۰/۸۱ ^{a}	۷۰/۴۷ ±۱۳/۵۰ ^{ab}	۷۳/۲۳ ±۳/۳۰ ^{ab}	۶۱/۹۰ ±۱۰/۸۱ ^{bc}	۵۱/۴۲ ±۵/۷۱ ^{c}

در هر ردیف میانگین هایی (میانگین ± خطای معیار) که دارای حروف متفاوت هستند اختلاف معنی دار ($p<۰/۰۵$) با یکدیگر دارند.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.2.16.5]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113487]



شکل ۱: درصد تفریخ در جنین‌های ماهی کپور معمولی در مرحله روخزیدگی ناقص و ضربان قلب پس از غوطه‌وری در غلظت‌های مختلف ساکارز.

Figure 1: Hatching rate of common carp embryos at half-epiboly and heartbeat stages were exposed to different concentration of sucrose.

بحث

در این مطالعه، چگونگی اثر سمیت سه ماده ضدانجماد در جنین ماهی کپور معمولی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد در جنین کپور معمولی در هر دو مرحله تکاملی در میان مواد ضدانجماد نفوذپذیر مورد بررسی، کم‌ترین سمیت را متانول داشت و به‌دنبال آن به‌ترتیب پروپیلن-گلیکول و دی‌متیل‌سولفوکساید قرار داشتند. این نتیجه مشابه با نتایج مطالعات در جنین ماهی کپور معمولی بود (Dinnyes *et al.*, 1998).

متانول از رایج‌ترین مواد ضدانجماد نفوذپذیری است که در زمینه انجماد جنین ماهیان به‌کار می‌رود (Hagedorn *et al.*, 1996; Hagedorn *et al.*, 1997) و عمدتاً به‌عنوان یک ماده ضدانجماد نسبتاً غیر سمی از آن نام برده می‌شود؛ به‌گونه‌ای که هیچ اثری مبنی بر سمیت این ماده ضدانجماد در جنین ماهی گورخری (*Brachydanio rerio*) (Zhang *et al.*, 1993)، کپورماهیان هندی (Ahammad *et al.*, 1998)، کپور معمولی (Dinnyes *et al.*, 1998)، میگوی پنائیده (*Penaeus japonicus*) (Gwo and Lin, 1998)، کفشک ماهی (*Paralichthys olivaceus*) (Zhang *et al.*, 2005; Chen and Tian, 2005) و تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) (Keivanloo & Sudagar, 2013) به ثبت نرسیده است. با این وجود، در جنین میگوی ببری سیاه (*Penaeus monodon*) (Vuthiphandchai *et al.*, 2005) و شانک سرخ (*Pagrus major*) (Xiao *et al.*, 2008) متانول نسبت به سایر مواد ضدانجماد سمیت بیش‌تری داشت و سبب کاهش چشمگیر درصد تفریخ گردید.

نتایج بررسی‌های انجام شده در زمینه اثر سمیت مواد ضدانجماد نشان داد در جنین ماهی باس دریایی ژاپنی (*Lateolabrax japonicus*) غلظت‌های مختلف پروپیلن‌گلیکول نسبت به دیگر مواد ضدانجماد اثر سمیت کمتری را در جنین بر جای گذاشت (Tian *et al.*, 2003). این یافته، در پژوهش‌های انجام شده در جنین کفشک ماهی (Zhang *et al.*, 2005)، شانک سرخ (Xiao *et al.*, 2008)، ماهی سفید ژاپنی (*Sillago japonica*) (Rahman *et al.*, 2008) و ماهی قرمز (*Carassius auratus*) (Shaluei *et al.*, 2013) نیز مشاهده شد.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.2.16.5]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113487]

به‌دنبال نتایج موفقیت‌آمیز استفاده از دی‌متیل‌سولفوکساید در انجماد اسپرم ماهیان، از این ماده در زمینه انجماد جنین ماهیان نیز استفاده شد (Rana, 1995). به‌طوری‌که در مطالعات مربوط به انجماد جنین ماهیانی مانند: مداکا (*Oryzias latipes*) (Arii *et al*., 1987)، ماهی آزاد (Arii *et al*., 1992)، توربوت (*Scophtalmus maximus*) (Cabrita *et al*., 2003a)، کفشک ماهی (Zhang *et al*., 2005)، شانک سرخ (Ding *et al*., 2007; Xiao *et al*., 2008)، ماهی سفید ژاپنی (Rahman *et al*., 2008)، ماهی قرمز (Shaluei *et al*., 2013) و تاس‌ماهی ایرانی (Keivanloo & Sudagar, 2013) دی‌متیل‌سولفوکساید یک ماده ضدانجماد مناسب بود که حداقل سمیت را در این گونه‌ها نشان داد. با این وجود، در تحقیق حاضر، دی‌متیل‌سولفوکساید در قیاس با دو ماده ضدانجماد دیگر سمیت بیشتری برای جنین ماهی کپور معمولی داشت.

نتایج به‌دست آمده بیانگر اهمیت مطالعات اختصاصی سمیت مواد ضدانجماد در هر گونه برای تعیین غلظت‌های مناسب هر یک از این مواد است. در این مطالعه مکانیسم سمیت مواد ضدانجماد مورد ارزیابی قرار نگرفت اما مواردی نظیر: دناتوره شدن آنزیم‌ها، شکستگی و اختلال در پمپ‌های یونی تراغشایی، تولید فرمالدئید سمی، از هم گسیختگی و اختلال در سیستم حمل و نقل میتوکندری و انحلال و متلاشی شدن ساختار DNA به‌عنوان اثرات مخرب مواد ضدانجماد بر سلول‌ها مطرح شده‌اند (Mande & Sobhia, 2000; Bonner *et al*., 2000; Spikings *at al*., 2012)

اثر هر ماده ضدانجماد نه تنها به ویژگی‌ها و خواص شیمیایی آن، بلکه به مدت زمان در معرض‌گذاری با آن نیز بستگی دارد. بررسی‌های صورت گرفته در لارو میگوی آب شیرین (*Macrobrachium rosenbergii*) (Pillai *et al*., 2001)، جنین ماهی توربوت (Cabrita *et al*., 2003b)، شانک سرطلایی (*Sparus aurata*) (Cabrita *et al*., 2006)، شانک سرخ (*Pagrus major*) (Xiao *et al*., 2008)، ماهی قرمز (Shaluei *et al*., 2013) و تاس‌ماهی ایرانی (Keivanloo & Sudagar, 2013) نشان داد افزایش زمان غوطه‌وری در مواد ضدانجماد سبب شد، سمیت مواد ضدانجماد نیز افزایش یابد. در جنین ماهی کپور معمولی نیز افزایش مدت زمان در معرض‌گذاری (از ۵ به ۱۵ دقیقه) موجب شد غلظت قابل‌تحمل مواد ضدانجماد به‌طور معنی‌داری کاهش یابد (به جز تیمارهای ۲ و ۳ مولار پروپیلن‌گلیکول). با وجود آن‌که علت اصلی و نحوه بروز این صدمات هنوز ناشناخته است اما، این احتمال وجود دارد که این ترکیبات (مواد ضدانجماد) سبب ایجاد صدمات و اثرات زیان‌آوری در همه یا بخشی از پیکره موجود شده و از این رو درصد تفریخ را کاهش دهند. به‌نظر می‌رسد که مدت زمان در معرض‌گذاری جنین با مواد ضدانجماد، عامل مهمی است به‌ویژه هنگامی‌که از غلظت‌های بالای مواد ضدانجماد استفاده می‌شود. با این حال باید توجه داشت برای دستیابی به انجماد موفقیت‌آمیز جنین، باید مقداری کافی از مواد ضدانجماد به درون پیکره جنین وارد شوند و این مستلزم استفاده از غلظت‌های بالای مواد ضدانجماد است. نتایج تحقیقات صورت گرفته در این زمینه نیز حاکی از آن است که ارتباط مستقیمی بین غلظت‌های بالای این مواد و موفقیت در امر انجماد جنین وجود دارد (Cabrita *et al*., 2008). مواد ضدانجماد نفوذناپذیر برای جلوگیری از تشکیل کریستال‌های یخ در پیکره موجودات ضروری هستند. اثرات محافظت در برابر سرما (ضدانجماد) در این ترکیبات عمدتاً بر مبنای دهیدراسیون و آبگیری از سلول‌ها پیش از فرآیند سردسازی؛ و افزایش ویسکوزیته محیط است که منجر به کاهش تشکیل کریستال‌های یخ طی فرآیند انجماد می‌شود (Bautista & Kanagawa, 1998; Kuleshova *et al*., 2001). از سوی دیگر، این ترکیبات سبب کاهش نفوذ غلظت‌های بالای مواد ضدانجماد نفوذپذیر شده و سبب کاهش سمیت آن‌ها در غلظت‌های بالا می‌شوند (Kuleshova *et al*., 1999; Cabrita *et al*., 2003b) و اکثر محلول‌هایی که برای هدف انجماد جنین آبزیان طراحی و استفاده می‌شوند، حاوی ترکیبی از مواد ضدانجماد نفوذپذیر و یک یا چند ماده نفوذناپذیر هستند (Shaw *et al*., 2000).

بررسی‌های انجام شده در جنین پستانداران نشان می‌دهد قندها از عواقب ناشی از آبگیری سلول‌ها جلوگیری کرده و میزان سمیت مواد ضدانجماد را کاهش می‌دهند. قندها سبب آبگیری آرام و تدریجی از سلول‌ها شده و از غشا سلول در زمان کاهش دما محافظت می‌کنند (Crowe *et al*., 1990; Hotamisligil *et al*., 1996). به‌طور کلی نتایج بررسی حاضر نشان داد جنین کپور معمولی قادر است غلظت‌های ساکارز را به خوبی تحمل کند بدون آن‌که کاهش چشمگیری در درصد تفریخ

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.2.16.5]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113487]

ایجاد شود. بنابراین به نظر می‌رسد ساکارز می‌تواند گزینه‌ای مناسب جهت آزمایشات انجماد جنین در این گونه باشد.

توانایی تحمل جنین نسبت مواد ضدانجماد به مرحله تکامل جنینی نیز بستگی دارد (Suzuki *et al*., 1995; Urbanyi *et al*., 1997). جنین ماهیان در مراحل اولیه تکامل جنینی از نفوذپذیری و تراوایی نسبتاً بالایی برخوردار هستند اما، نسبت به ورود مواد ضدانجماد و تغییرات غلظت مایعات درون و برون سلولی بسیار حساس بوده و خطر مرگ جنین وجود دارد (Vuthiphandchai *et al*., 2005). در طی مراحل تکامل جنینی آبزیان از جمله: ماهی، بی‌مهرگان دریایی و سخت‌پوستان، حساسیت نسبت به مواد ضدانجماد کاهش یافته و مقاومت در برابر سمیت مواد ضدانجماد افزایش می‌یابد (Simon *et al*., 1994; Newton & Subramoniam, 1996; Urbanyi *et al*., 1997; Dinnyes *et al*., 1998). نتایج بررسی‌های در جنین ماهی درام سرخ (*Sciaenops ocellatus*) نشان داد این ماهی در مرحله جوانه دمی نسبت به مرحله مورولا، حساسیت کم‌تری نسبت به غلظت‌های مختلف مواد ضدانجماد داشت (Robertson *et al*., 1988). در جنین تاس‌ماهی ایرانی نیز با پیشرفت روند تکاملی از ۲۴ به ۴۸ ساعت، حساسیت جنین نسبت به مواد ضدانجماد کاهش یافت و جنین تاس‌ماهی ایرانی در مرحله ۴۸ ساعت پس از لقاح مقاومت بیش‌تری برای تحمل غلظت‌های مختلف مواد ضدانجماد داشت (Keivanloo & Sudagar, 2013). علت این امر می‌تواند افزایش تحمل نسبت به دستکاری، تغییر در تراوایی و نفوذپذیری غشای سلولی و توانایی تنظیم اسمزی باشد.

در جنین ماهی کپور معمولی نیز با پیشرفت روند تکاملی از مرحله روخزیدگی ناقص به مرحله ضربان قلب، حساسیت جنین نسبت به مواد ضدانجماد کاهش یافت. این مشاهده با نتایج چندین مطالعه دیگر در جنین ماهی کپور معمولی (Dinnyes *et al*., 1998)، ماهی قرمز (Liu *et al*., 1993; Shaluei *et al*., 2013) و ماهی سر ماری (*Channa striata*) (Sharifuddin & Siti Azizah, 2014) مطابقت دارد. در مرحله ضربان قلب، سیستم گردش خون به‌طور کامل در حال فعالیت است و می‌تواند موجب ممانعت یا کاهش صدمات شده و از سوی دیگر کارایی مکانیسم‌های ترمیم و بازسازی را افزایش دهد (Dinnyes *et al*., 1998).

در مجموع به نظر می‌رسد آگاهی از اطلاعات پایه در زمینه اثر سمیت مواد ضدانجماد، مدت زمان مناسب برای غوطه‌وری جنین در این مواد و یافتن مرحله جنینی مناسب نکات کلیدی در طراحی یک دستورالعمل مناسب برای انجماد و نگهداری جنین ماهیان در سرما باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از جناب آقای دکتر عباسعلی حاجی بگلو به‌خاطر مساعدت در انجام تحقیقات و کلیه کارمندان مرکز بازسازی ذخایر ماهیان استخوانی گلستان تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

منابع

ستاری، م.، شاهسونی، د. و شفیعی، ش.، ۱۳۸۳. ماهی‌شناسی (۲). نشر حق شناس. ۵۰۲ صفحه.

سوداگر، م. و کیوانلو، س.، ۱۳۹۱. کاربردهای انجماد جنین در آبزیان. دومین همایش ملی منابع شیلاتی دریای خزر. ۹ آبان، گرگان. صفحات ۴ تا۱.

کیوانلو، س. و سوداگر، م.، ۱۳۹۱. تاثیر عوامل موثر در سمیت مواد ضدانجماد در جنین ماهیان. مجله حفاظت و بهره‌برداری از منابع طبیعی. جلد اول، شماره دوم. صفحات ۸۴ تا ۷۳.

Ahammad, M.M., Bhattacharyya, D. and Jana, B.B., 1998. Effect of different concentrations of cryoprotectant and extender on the hatching of Indian major carp embryos (*Labeo rohita*, *Catla catla*, and *Cirrhinus mrigala*) stored at low temperature. Cryobiology, 37: 318–324. doi.org/10.1006/cryo.1998.2127

Arii, K., Suzuki, T., Takai, R. and Kozima, T.T., 1992. Tolerance of fish eggs to dimethyl sulfoxide as the cryoprotectant. Journal of the Tokyo University of Fisheries, 79: 121-126.

Arii, N., Namai, K. and Gomi, F., 1987. Cryopreservation of medaka embryos during development. Zoology Science, 4: 813- 818.

Bautista, J.A.N. and Kanagawa, H., 1998. Current status of vitrification of embryos

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.2.16.5]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113487]

and oocytes in domestical animals: ethylene glycol as an emerging cryoprotectant of choice. Japan Journal of Veterinary Research, 45: 183-191. doi.org/10.14943/jjvr.45.4.183

Bonner G. and Klibanov A.M., 2000. Structural stability of DNA in non-aqueous solvents. Biotechnology Bioengineering, 68: 339-344.

Cabrita E., Chereguini O., Luna M., de Paz P. and Herráez M.P., 2003a. Effect of different treatments on the chorion permeability to DMSO of turbot embryos (*Scophtalmus maximus*). Aquaculture, 221: 593-604. doi:10.1016/S0044-8486(03)00073-5

Cabrita E., Robles V., Chereguini O., Wallace J.C. and Herra´ez M.P., 2003b. Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). Cryobiology, 47: 204-213. doi:10.1016/j.cryobiol.2003.10.001

Cabrita E., Robles V., Wallace J.C., Sarasquete M.C. and Herra´ez M.P., 2006. Preliminary studies on the cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. Aquaculture, 251: 245–255. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.04.077

Cabrita, E., Robles, V. and Herráez, M.P., 2008. Methods in Reproductive Aquaculture Marine and Freshwater Species. CRC Press. Pp 265-294.

Chao, N.H., Lin, T.T., Chen, Y.J., Hsu, H.W. and Liao, I.C., 1997. Cryopreservation of late embryos and early larvae in the oyster and hard clam. Aquaculture, 155: 31–44. doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00107-5

Chen, S.L. and Tian, Y.S., 2005. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrfication. Theriogenology, 63: 1207-1219. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.06.007

Crowe, J.H., Carpenter, J.F., Crowe, L.M. and Anchordoguy, T.J., 1990. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. Cryobiology, 27: 219–231. doi.org/10.1016/0011-2240(90)90023-W

Ding, F.H., Xiao, Z.Z. and Li, J., 2007. Preliminary studies on the vitrification of red sea bream (*Pagrus major*) embryos. Theriogenology, 68: 702–708. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.05.064

Dinnyes A., Urbanyi B., Baranyai B. and Magyary I., 1998. Chiling sensivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the presence of cryoprotectants: work in progress. Theriogenology, 50: 1-13.

Dobrinski, J.R., 2002. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. Theriogenology, 57: 285-302. doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00672-0

Gwo, J.C. and Lin, C.H., 1998. Preliminary experiments on the cryopreservation of penaeid shrimp (*Penaeus japonicus*) embryos, nauplii and zoea. Theriogenology, 49: 1289–1299. doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00076-4

Hagedorn, M., Kleinhans, F.W. and Wildt, D.E., 1996. Water permeability studies in dechorionatcd zebrafish embryos. Cryobiology, 33: 646.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.2.16.5]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113487]

Hagedorn, M., Kleinhans, F.W., Wilt, D.E. and Rall, W.F., 1997. Chill sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. Cryobiology, 34: 251–263. doi.org/10.1006/cryo.1997.2002

Hotamisligil, S., Toner, M. and Powers, R.D., 1996. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. Biology of Reproduction, 55: 161-168. doi.org/10.1095/biolreprod55.1.161

Keivanloo, S. and Sudagar, M., 2016. Cryopreservation of Persian sturgeon *(Acipenser persicus)* embryos by DMSO-based vitrificant solutions. Theriogenology, 85: 1013-1018. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.11.012

Keivanloo, S. and Sudagar, M., 2013. Preliminary Studies on the Cryopreservation of Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) Embryos. Open Access Scientific Reports, 2: 3. doi:10.4172/scientificreports.674

Kuleshova, L.L., MacFarlane, D.R., Trounson, A.O. and Shaw, J.M., 1999. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. Cryobiology, 38: 119–130. doi.org/10.1006/cryo.1999.2153

Kuleshova, L.L., Shaw, J.M. and Trounson, A.O., 2001. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. Cryobiology, 43: 21-31. doi.org/10.1006/cryo.2001.2335

Liu, K., Chou, T. and Lin, H. D., 1993. Cryosurvival of goldfish embryo after subzero freezing. Aquatic Living Resource, 6: 63-66. doi.org/10.1051/alr:1993007

Mande, S.C. and Sobhia, M.E., 2000. Structural characterization of protein denaturant interactions: crystal structures of hen egg-white lysozyme in complex with DMSO and guanidinium chloride. Protein Engineering, 13: 133-141. doi.org/10.1093/protein/13.2.133

Newton, S.S. and Subramoniam, T., 1996. Cryoprotectant toxicity in penaeid prawn embryos. Cryobiology, 33: 172. doi.org/10.1006/cryo.1996.0017

Nguyen, B.X., Sotomaru. Y., Tani, T., Kato, Y. and Tsunoda, Y., 2000. Efficient cryopreservation of bovine blastocysts derived from nuclear transfer with somatic cells using partial dehydration and vitrification. Theriogenology, 53: 1439. doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00286-7

O'Neil L., Paynter S.J., Fuller B.J. and Shaw R.W., 1998. Vitrification of mature mouse oocytes in a 6 M DMSO solution supplemented with antifreeze glycoproteins. Cryobiology, 37: 59– 66. doi.org/10.1006/cryo.1998.2098

Okada, Y., 1960. Studies on the freshwater fishes of Japan. Prefectural University of Mie Tsu, Mie Prefecture, Japan. PP: 860.

Otoi, T., Yamamoto, K., Koyama, N., Tachikama, S. and Suzuki, T., 1998. Cryopreservation of mature bovine oocytes by vitrification in straws. Cryobiology, 37:77– 85. doi.org/10.1006/cryo.1998.2103

Pillai, B.R., Rao, K.J. and Mohanty, J., 2001. Toxicity of selected

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.2.16.5]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113487]

Cryoprotectants to the First Zoeal Stages of Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) (de Man). Asian. Fisheries Science, 14: 1-8.

Rahman, S.M., Majhi, S.K., Suzuki T., Matsukawa, S., Strussmann, C.A. and Takai, R., 2008. Suitability of cryoprotectants and impregnation protocols for embryos of Japanese whiting *Sillago japonica*. Cryobiology, 57: 170–174. doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.08.002

Rana, K., 1995. Preservation of gametes, In: Bromage, N.R. and Roberts, R.J. R., (ed) Broodstock Management and Egg and Larval Quality. Iowa State Press. Blackwell. London. pp: 53-75.

Robertson, S.N., Lawrence, A.L., Neil, W.H., Arnold, C.R. and McCarty, G., 1988. Toxicity of the cryoprotectants glycerol, dimethyl Ssulfoxide, ethylene glycol, methanol, sucrose, and sea salt solution to the embryos of red drum. Progressive Fish Culturist, 50: 148-154. doi.org/10.1577/1548-8640(1988)050<0148:TOTCGD>2.3.CO;2

Robles, V., Cabrita, E., Real, M., Álvarez, R. and Herráez, M.P., 2003. Vitrification of turbot embryos: preliminar assays. Cryobiology, 47: 30-39. doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00066-X

Shaluei, F., Imanpoor, M.R., Shabani, A. and Nasr-Esfahani, M.H., 2013. Effect of different concentrations of permeable and non-permeable cryoprotectants on the hatching rate of goldfish (*Carassius auratus*) embryos. Asian Pacific Journal of Reproduction, 2: 185-188. doi.org/10.1016/S2305-0500(13)60144-X

Sharifuddin, M. and Siti Azizah M.N., 2014. Preliminary studies on cryopreservation of snakehead (*Channa striata*) embryos. Cryobiology, 69: 1–9. doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.04.001

Shaw, J.M., Oranratnachai, A. and Trounson, A.O., 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. Theriogenology, 53: 59-72. doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00240-X

Simon, C., Dumont, P., Cuende, F.X. and Diter, A., 1994. Determination of suitable freezing media for cryopreservation of *Penaeus indicus* embryos. Cryobiology, 31: 245-253. doi.org/10.1006/cryo.1994.1030

Spikings, E., Zampolla, T., Rawson, D., Wang, Y. and Zhang, T., 2012. Effect of methanol on mitochondrial organization in zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles. Theriogenology, 77: 28-38. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.07.009

Suzuki, T., Komada, H., Takai, R., Arii, K. and Kozima, T.T., 1995. Relation between toxicity of cryoprotectant DMSO and its concentration in several fish embryos. Fisheries Science, 61: 193-197. doi.org/10.2331/fishsci.61.193

Tian, Y., Jiang, J., Song, L., Chen, Z., Zhai, J., Liu, J., Wang, N. and Chen, S., 2015. Effects of cryopreservation on the survival rate of the seven-band grouper (*Epinephelus septemfasciatus*) embryos. Cryobiology, 71: 499-506. doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.10.147

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.2.16.5]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113487]

Tian, Y.S., Chen, S.L., Yan, A.S., Ji, X.S. and Yu, G.C., 2003. Cryopreservation of the sea perch (*Lateolabrax japonicus*) embryos by vitrification. Acta Zoologica Sinica, 49: 843-850.

Urbanyi, B., Baranyai, B. and Dinnyes, A., 1998. Chilling sensitivity of non-activated carp (*Cyprinus carpio*) eggs. Theriogenology, 49: 175.

Urbanyi, B., Baranyai, B., Magyary, I. and Dinnyes, A., 1997. Toxicity of methanol, DMSO and glycerol on carp (*Cyprinus carpio*) embryos in different development stages. Theriogenology, 47: 408.

Vuthiphandchai, V., Pengpun, B. and Nimrat, S., 2005. Effects of cryoprotectant toxicity and temperature sensitivity on the embryos of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture, 246: 275– 284. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.02.050

Xiao, Z.Z., Zhang, L.L., Xu, X.Z., Liu, Q.H., Liu, Q.H. and Li, J. 2008. Effect of cryoprotectants on hatching rate of red seabream (*Pagrus major*) embryos. Theriogenology, 70: 1086-1092. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.028

Zhang, X.S., Zhao, L., Hua, T.C. and Zhu, H.Y., 1989. A study on cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) embryos. Cryo Letters, 10: 271-278.

Zhang, Y.Z., Zhang, S.C., Liu, X.Y., Xu, Y.J., Hu, J.H., Xu, Y.Y., Li, J. and Chen, S.L., 2005. Toxicity and protective efficency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. Theriogenology, 63: 765-773. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.04.011

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.2.16.5]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113487]

Toxicity of some permeable and non-permeable cryoprotectants on common carp (*Cyprinus carpio*) embryos

Keivanloo S.[1]; Sudagar M.[1*]; Mazandarani M.[1]

*Sudagar_m@yahoo.com

1- Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources

Abstract

Knowledge of cryoprotectants toxicity is one of the prerequisites for the design of fish embryo cryopreservation protocols. In order to study the effects of cryoprotectants toxicity, common carp (*Cyprinus carpio*) embryos at half-epiboly and heartbeat stages were selected and exposed to pronase E, type XIV of *Streptomyces griseus*, (2 mg/ml in Ringer solution) for 5 min. Permeabilized embryos were immersed in: three permeable cryoprotectants, dimethyl sulfoxide (DMSO), methanol (MeOH) and propylene glycol (PG) in concentrations ranging from 1 to 4 M; and one non-permeable cryoprotectant, sucrose (in concentrations of 10%, 15% and 20%) for 5 and 15 min. After these treatments, the embryos were washed and incubated until hatched. The toxicity of the cryoprotectant was assessed by the hatching rate. The results showed that there was a significant decrease of hatching rate in both developmental stages with increased concentration and duration of exposure. In addition, MeOH was the least toxic permeable cryoprotectant, followed by PG and DMSO. Prolonged exposure to sucrose significantly reduced hatching rate, especially at the heartbeat stage. With the increasing of the embryonic development (from half-epiboly to heartbeat stage) sensitivity to cryoprotectants were decreased.

Keywords: Common carp (*Cyprinus carpio*), Embryos, Toxicity, Cryoprotectants, Permeability

*Corresponding author

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.2.16.5]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113487]