بیوتکنیک نگهداری کوتاه مدت اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

محمد پورکاظمی[(۱)]*؛ علی شکیبی دریا کناری [(۲)]؛ محمد رضا کلباسی، م.ر.[(۳)]؛ حسین عبدالحی [(٤)] و شهروز برادران نویری [(٥)]

pkazemi_m@yahoo.com

۱ و٥- انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت صندوق پستی: ٣٤٦٤- ٤١٦٣٥

۲ - دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی تربیت مدرس نور صندوق پستی: ٣٥٦-٤١٦٣٥

۳ - دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، نور ، صندوق پستی: ٣٥٦ - ٤٦٤١٤

٤ -موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران ، صندوق پستی: ٦١١٦- ١٤١٥٥

تاریخ دریافت:اسفند ۱۳۸۹		تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۱

لغات کلیدی: اسپرم، قزل آلای رنگین کمان، درصد تحرک، درصد لقاح

گونه‌های مختلف آزاد ماهیان از اواخر دهه ۱۳۳۰ شمسی به ایران معرفی و در آبهای داخلی و در شرایط محصور پرورش داده شدند و روند تولید آنها از رشد فزاینده‌ای برخوردار شده است. در این بین ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) برای طعم لذیذ و شرایط تکثیر و پرورش آسانتر مورد توجه بیشتری قرار گرفته است.

از مزایای نگهداری کوتاه مدت اسپرم این ماهی می‌توان به کم هزینه بودن، امکان اجرای صحرایی آن، کاربرد وسیع و آسان در مزارع تکثیر و پرورش بخصوص برای حمل و جابجایی اسپرم مولدین در مراکز تکثیر مجاور یا انتقال اسپرم‌های دستکاری شده (Babiak *et al*., 2002 ;Robles *et al*., 2003) اشاره کرد.

مطالعات متعددی در خصوص انجماد اسپرم آزاد ماهیان صورت گرفته است. اسپرم ماهی آزاد آتلانتیک (*Salmo salar*) توسط Alderson و Macneil (۱۹۸۴) و ماهی قزل‌آلای قهوه‌ای (*Salmo trutta*) (Erdahl & Graham ,1980) مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین موفقیت‌های بیشتری در رابطه با انجماد اسپرم گونه‌های مختلف آزاد ماهیان از جمله ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*S. salar*) و گونه‌های مختلف جنس *Oncorhynchus* بدست آمد (Kerby, 1983).

روشهای بکار رفته در مطالعات قبلی همگی جهت نگهداری طولانی مدت اسپرم این ماهی طراحی گردید McNiven *et al*., 1993; Conget *et al*., 1996; Cabrita *et al*., 2001) و براساس انجماد عمیق و با استفاده از روشهای پر هزینه و زمان بری همچون مخازن ازت مایع، فریزر قابل برنامه ریزی، یخ خشک (Tekin *et al*., 2007; Piironen , 1993) انجام شده که در شرایط کارگاهی معمولی در بسیاری از مراکز قابل اجرا و بهره‌برداری نیست. هدف از این تحقیق ، معرفی روش آسان برای نگهداری کوتاه مدت اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان همراه با تعیین قابلیت تحرک و لقاح اسپرم در دوره زمانی مختلف بوده است.

در این تحقیق از ۲۹ عدد ماهی مولد قزل‌آلای رنگین کمان موجود در مرکز تکثیر و پرورش آزاد ماهیان شهید باهنر

*نویسنده مسئول

[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-27]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1391.21.4.3.1]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110097]

(کلاردشت) پس از بیهوشی با ماده MS-222 و به روش خشک کردن محوطه تناسلی و ماساژ شکمی و به میزان ۱±۴/۴۹میلی لیتر از هر مولد اسپرم‌گیری شد (Canyurt & Akhan, 2008). میانگین طول و وزن مولدین نر بترتیب معادل ۵/۱۲±۳۶/۰۱ سانتیمتر و ۳۶۷ ± ۱۰۶۰ گرم و مولدین ماده معادل ۴/۳۸±۴۳/۳ سانتیمتر و ۳۳۹±۱۵۱۰ گرم بود.

برای بررسی تحرک اسپرم، ابتدا نمونه‌های مولدین بصورت مجزا به نسبت ۲۰ : ۱ با ۱۶ محلول رقیق کننده مختلف (جدول ۱) (Lahnstener *et al*., 1996) مخلوط شده و قابلیت بقا و تحرک آنها بررسی گردید. در نهایت محلول رقیق کننده (گلوکز ۵۴ گرم بر لیتر، DMSO ۹۰ میلی‌لیتر ر، زرده تخم مرغ میلی‌لیتر ۱۰۰ و تریس ۰/۵گرم بر لیتر) (Jodun *et al*., 2006 ; Wheeler & Thorgaard, 1991) انتخاب شده و میزان تحرک اسپرم‌ها هر نیم ساعت یکبار، با بزرگنمایی ۴۰۰ در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند.

نمونه‌های استحصال شده به نسبت ۱:۳ با رقیق کننده مخلوط شده (رقیق کننده : اسپرم) (Ninhaus-Silveria *et al*., 2006) و سپس به پایوت های انجماد ۰/۵ میلی لیتری (IMV فرانسه) منتقل شدند.

تعیین تراکم اسپرم نیز با کمک لام هموسیتومتر و ده دقیقه پس از رقیق سازی به نسبت ۶۰۰ : ۱ با سرم فیزیولوژی انجام گرفت (Ninhaus-Silveria *et al*., 2006). شرایط دمایی مربوطه بترتیب در دمای آزمایشگاه (۱۵+ درجه)، درون یخچال معمولی (۵ + درجه) و روی یخ خرد شده (۲– ۱+ درجه) مهیا گردید.

عملیات تکثیر با مخلوط نمودن ۰/۵ میلی لیتر اسپرم هر مولد با ۱۰ گرم تخمک تازه در زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از نگهداری انجام شد. این حجم اسپرم ابتدا با ۱۰ میلی‌لیتر محلول فعال کننده اسپرم این ماهی (NaCl 0.9%, Tris 0.01 M, Glycine 0.02 M, Theophyllin 5 mM) (Scheerer &Thorgaard, 1989) مخلوط شده و اسپرم رقیق شده به تخمک‌ها اضافه شد. اضافه کردن آب و آبگیری تخمهای لقاح یافته طبق روال شرایط مرکز تکثیر انجام شد. متعاقب آن، درصد لقاح، درصد تخم چشم زده (۱۶ – ۱۴ روز بعد از لقاح)، درصد لارو استحصالی (۳۳ – ۳۰ روز بعد از لقاح) و درصد بازماندگی لاروها (۵۰ – ۴۵ روز بعد از لقاح) با نمونه برداری از روی شبکه سینی های انکوباتور محاسبه گردید.

جدول ۱: مشخصات ترکیب شیمیایی محلولهای مورد استفاده

شماره محلول	ترکیبات (بر حسب گرم در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر)	منبع
۱	NaCl (0.444), KCl (0.164), $CaCl_2$ (0.022), Na_2HPO_4 (0.043), $NaHCO_3$ (0.101), Fructose (0.101), DMSO (10%)	Gallant *et al*., 1993
۲	NaCl (0.75), KCl (0.38), $NaHCO_3$ (0.2), Glucose (0.1), DMSO (12%), Egg yolk (20%)	Stein & Bayrle, 1978
۳	NaCl (0.504), KCl (0.253), KOH (0.999), $MgCl_2$,$6H_2O$ (0.02), Tris (1.999), Glucose (1.009), Citric acid (0.01), DMSO (10%)	McNiven *et al*., 1993a
۴	Glucose (5.4), DMSO (9%), Egg yolk (20%), Tris (0.05)	Wheeler & Thorgaard, 1991
۵	NaCl (0.75), Glucose (5.4), DMSO (10%)	پژوهش حاضر
۶	NaCl (0.75), KCl (0.38), $NaHCO_3$ (0.2), Glucose (0.1),DMSO (10%)	Chew *et al*., 2010
۷	Sucrose (20.54), DMSO (11.72%)	Tekin *et al*., 2003
۸	Biociphous commercial spermatozoa extender	Alipour *et al*., 2009
۹	Glucose (5.4), DMSO (9%), Egg yolk (10%)	Ninhaus-Silveira *et al*., 2006
۱۰	NaCl (0.592), KCl (0.172), BSA (0.4), DMSO (10%)	Cabrita *et al*., 2005
۱۱	NaCl (0.592), KCl (0.172), CaCl2 (0.068), MgSO4 (0.015), Tris (2.42), BSA (0.4), DMSO (10%), Egg yolk (10%)	Lahnsteiner *et al*., 1995
۱۲	Glucose (10), Egg yolk (20%), Glycerol (5.4)	Herraez *et al*., 1993
۱۳	NaCl (0.44), KCl (0.62), MgCl2 (0.008), NaHCO3 (0.02), CaCl2 (0.022), DMSO (10%)	Pillai *et al*., 1994
۱۴	NaCl (0.188), KCl (0.72), Na2HPO4 (0.041), MgSO4 (0.023), NaHCO3 (0.01), Glucose (0.1), CaCl2 (0.023), DMSO (10%)	Koldras & Bieniarz, 1987
۱۵	Sucrose (20.53), Glycerol (5), Egg yolk (10%),	Herraez *et al*., 1993
۱۶	NaCl (0.4), Glucose (2.05), Na2C6H5O7 (0.8), DMSO (15%)	Moczarski, 1977

[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-27]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1391.21.4.3.1]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110097]

به منظور تعیین درصد لقاح پس از اینکه تخمهای لقاح یافته بخوبی آب جذب نمودند اقدام به شمارش و بر اساس فرمول ۱۰۰ × تعداد کل تخمها / تعداد تخمهای لقاح یافته = درصد لقاح محاسبه گردید. همچنین درصد چشم زدگی ، درصد تفریخ لاروها و درصد باقیماندگی بر اساس فرمولهای زیر محاسبه شد (Bromage & Cumaranataunga, 1988):

= درصد چشم زدگی تخمهای لقاح یافته

۱۰۰ × تعداد تخمهای لقاح یافته / تعداد تخمهای چشم زده

= درصد تفریخ لاروها

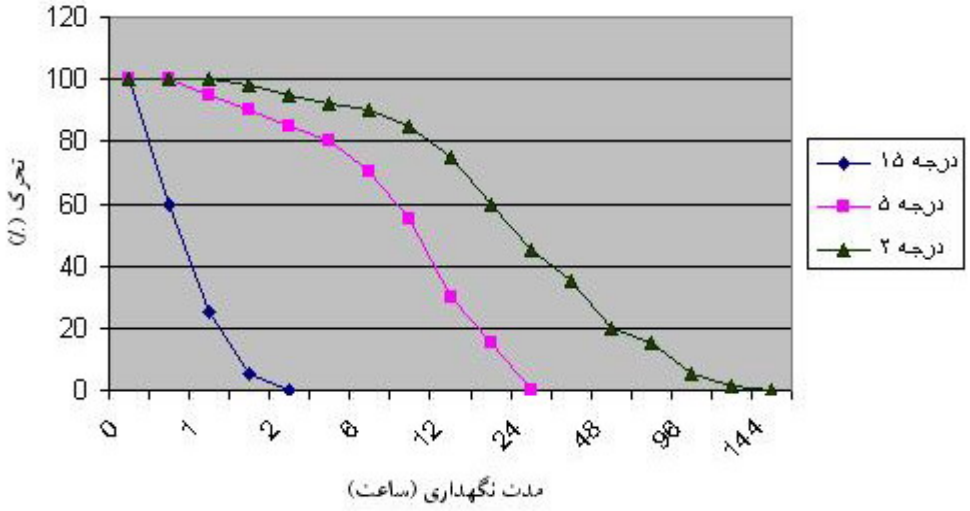
۱۰۰ × تعداد تخمهای لقاح یافته / تعداد تخمهای چشم زده فعال) = درصد باقیماندگی

۱۰۰ × تعداد کل لاروها / تعداد لاروهای سالم (با شنای

جهت تجزیه و تحلیل های آماری داده ها از نرم افزار SPSS 15 و آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و به منظور بررسی تفاوت بین میانگین ها از آزمون دانکن (Duncan test) با درصد اطمینان ۹۵ درصد استفاده گردید . میانگین داده‌ها براساس (میانگین± انحراف معیار) ارائه گردید. رسم نمودارها به کمک نرم‌افزار Excel 2003 انجام شد.

نتایج این بررسی نشان داد که میانگین تراکم اسپرم در مولدین نر بررسی شده در این تحقیق معادل $۱۰^{۹}$ × ۶/۱۵±۱۴/۵ اسپرم د ر هر میلی لیتر(محدوده $۱۰^{۹}$ × ۲۵/۱– ۴/۹) بود. میانگین درصد تحرک اسپرم طی گذشت زمانهای مختلف پس از نگهداری ، به تفکیک درجه حرارت در نمودار شماره ۱ آمده است.

درصد تحرک نمونه اسپرم این ماهی در شرایط نگهداری در دمای معمولی آزمایشگاه بسرعت و پس از۲ ساعت به صفر می رسد. اما چنانچه دمای نگهداری به ۵ درجه سانتیگراد کاهش یابد، زمان به صفر رسیدن تحرک اسپرم به ۲۴ ساعت افزایش می‌یابد. این افت تحرک بخصوص بعد از ساعت ششم پس از نگهداری در این دما سریع می‌باشد. همچنین قابلیت حفظ تحرک اسپرم این ماهی در دمای پایین‌تر باز هم افزایش یافته بطوریکه در دمای ۲-۱ درجه سانتیگراد، مدت زمان به صفر رسیدن تحرک اسپرم به ۱۴۴ساعت (۶ شبانه‌روز) افزایش می‌یابد.



نمودار ۱: درصد تحرک اسپرم قزل آلای رنگین کمان در دما و زمانهای مختلف نگهداری

[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-27]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1391.21.4.3.1]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110097]

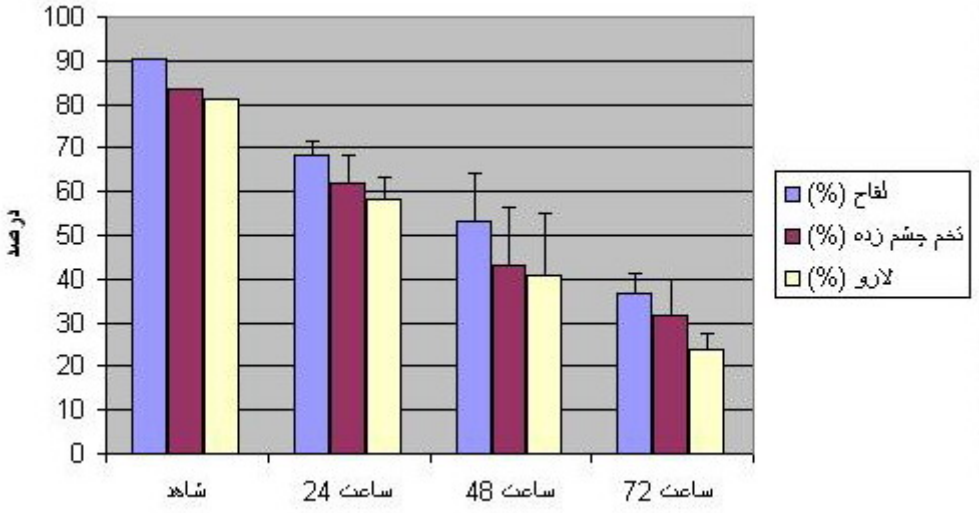
از آنجایی که درصد تحرک اسپرم این ماهی پس از نگهداری در دمای ۱۵ درجه و ۵ درجه سانتیگراد بترتیب بعد از ۲ و ۲۴ ساعت به صفر رسید، مراحل انجام لقاح فقط برای نمونه اسپرم‌های نگهداری شده در یخ خرد شده انجام گرفت. نتایج درصد لقاح ، درصد تخم چشم زده و درصد تبدیل به لارو این نمونه‌ها در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از نگهداری در نمودار شماره ۲ آمده است.

نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که درصد لقاح، تخم چشم‌زده و تبدیل به لارو در لقاح تخمک با اسپرم تازه، از کلیه تیمارهای نگهداری کوتاه مدت اسپرم پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بطور معنی‌داری بالاتر است ($P < 0.05$). در حالیکه درصد لقاح در نمونه شاهد ۹۰/۲۲ درصد است ولی درصد لقاح پس از نگهداری در مدت زمانهای مزبور بترتیب به میزان ۲۱/۸۷ درصد، ۳۷/۱۱ درصد و ۵۳/۶۹ درصد کاهش می‌یابد. درصد تبدیل به تخم چشم زده در نمونه شاهد ۸۳/۲۷ درصد بوده ولی در تیمارها بترتیب به ۲۱/۱۷ درصد، ۴۰/۰۵ درصد و ۵۱/۶۷ درصد کاهش یافت. همچنین کاهش درصد تبدیل به لارو در بین تیمارها و شاهد (۸۱/۱۲ درصد) بترتیب معادل ۲۲/۹۱ درصد، ۴۰/۱۹ درصد و ۵۷/۴۴ درصد بود (نمودار ۲).

مقایسه آماری بین تیمارهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نگهداری اسپرم این ماهی در دمای ۲-۱ درجه نیز نشان داد که هرچه این مدت زمان نگهداری در سرما طولانی تر شود، درصد لقاح، درصد تخم چشم زده و درصد تبدیل به لارو تخمها با گذشت زمان بطور معنی‌داری ($P < 0.05$) با کاهش مواجه خواهند شد.

نگهداری کوتاه مدت اسپرم ماهی آزاد اقیانوس اطلس با حفظ تحرک آن، برای اولین بار توسط Truscott & Idler (1969) در دمای ۴ درجه سانتیگراد انجام شد. هر چند که تاکنون اثرات نامطلوب این نوع نگهداری بر اسپرم قزل‌آلا مورد مطالعه قرار نگرفته اما نگهداری کوتاه مدت اسپرم این ماهی با حفظ قابلیت تحرک و لقاح آن، در شرایط کارگاهی و در مراکز تکثیر بدون نیاز به تجهیزات پیشرفته و هزینه بر کاربرد فراوانی دارد .

یکی از عملی‌ترین راههای ارزیابی میزان موفقیت عملیات انجماد و نگهداری اسپرم ماهیان ، بررسی میزان بقای اسپرم (Billard *et al.*, 1995) و قابلیت لقاح آن پس از انجمادزدایی می‌باشد (Tekin *et al.*, 2007).



نمودار ۲: میانگین درصد لقاح، درصد تخم چشم زده و درصد تبدیل به لارو نمونه اسپرم قزل‌آلای رنگین کمان در ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت پس از نگهداری

[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-27]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1391.21.4.3.1]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110097]

کاهش درصد لقاح از حدود ۸۰ درصد به صفر در اسپرم ماهی قزل‌آلای رنگین کمان پس از ۱۸۰ ثانیه نگهداری در دمای اتاق توسط Liley و همکاران (۲۰۰۲) گزارش شده است. همچنین کاربرد محلول رقیق کننده حاوی گلوکز (300 mM) در مقایسه با محلول‌های فاقد آن نیز قابلیت حفظ لقاح اسپرم این ماهی را با روش یخ خشک تا ۴۸ درصد نشان داد (شاهد ۸۹/۷ درصد) (Tekin *et al*., 2007).

از طرف دیگر اثرات منفی افزایش مدت زمان نگهداری اسپرم این ماهی بر کیفیت لقاح را می‌توان با مقایسه میزان اختلاف درصدهای تبدیل به لارو از درصد لقاح و کاهش نسبت درصد لارو به درصد لقاح در بین تیمارهای مختلف نشان داد (جدول ۱). با بررسی نتایج این تحقیق مشخص می‌شود که این کاهش با گذشت زمان نگهداری اسپرم در یخ خرد شده از زمان لقاح (شاهد) تا ۷۲ ساعت پس از نگهداری بترتیب از ۹/۲- درصد به ۱۲/۹۵- درصد می‌رسد. این افت کیفیت همچنین در مقایسه نسبت درصد تبدیل به لارو به درصد لقاح نیز بطور معنی‌داری دیده می‌شود (جدول ۲) ($P< 0.05$). این مقایسه نشان می‌دهد که نه تنها قابلیت لقاح در نمونه اسپرم نگهداری شده در یخ ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با گذشت زمان کاهش می‌یابد، بلکه با گذشت زمان، از میزان کارایی مراحل تکوین جنینی این ماهی نیز کاسته می‌شود.

انتخاب محلول رقیق کننده همراه با زرده تخم مرغ بدلیل کارایی بیشتر این محلول در حفظ قابلیت تحرک اسپرم در بررسی های اولیه بود. افزایش زرده تخم مرغ به محلول رقیق کننده اسپرم این ماهی به علت وجود لیپوپ روتئین‌های با وزن پایین، سبب محافظت بیشتر سلولی شده (Babiak *et al*., 1999) و اثر مثبت آن قبلاً در انجماد اسپرم ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)(Lahnsteiner *et al*., 2009: Perez-Cerezales *et al*., 2010) گزارش شده است.

عوامل متعدد محیطی (دما، تغذیه، فتوپریود و....) و ژنتیکی (توانایی در هضم غذا و ویتامین‌ها، نژادهای مختلف) روی بقا و قابلیت لقاح اسپرم ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تاثیرگذار هستند (Lahnsteiner *et al*., 2009; Canyurt & Akhan, 2008).

این مطالعه نشان می‌دهد که نگهداری اسپرم ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در یخ خرد شده بدلیل امکان فراهم آوردن شرایط سرمایی با حداقل تجهیزات و هزینه‌ها و همچنین امکان حمل و جابجایی صحرایی بسیار راحت نمونه‌های منجمد شده نسبت به یخچال معمولی از مزیت‌های کاربردی بالاتری برخوردار است. از آنجایی که در این تحقیق مشخص گردید که در شرایط نگهداری روی یخ خرد شده، برغم کاهش میزان تحرک اسپرم پس از ۲۴ ساعت تا ۵۰ درصد (نمودار ۱)، می‌توان انتظار باروری تخمک این ماهی تا ۶۸ درصد شاهد (نمودار ۲) را داشت، پیشنهاد می‌شود برای طولانی‌تر کردن مدت زمان نگهداری اسپرم ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در جابجایی‌های کوتاه مدت در مراکز تکثیر و پرورش این ماهیان، اسپرم‌های استحصالی پس از مخلوط شدن با رقیق کننده ، فوراً در لوله‌های آزمایش در بسته و بصورت عمودی روی یخ خرد شده قرار داده و حمل شوند.

جدول ۲: مقایسه میزان کاهش درصدهای تبدیل به لارو از درصد لقاح و نسبت آنها در اسپرم ماهی قزل‌آلای رنگین کمان پس از زمانهای مختلف نگهداری

معیارها	شاهد	۲٤ ساعت بعد	٤۸ ساعت بعد	۷۲ ساعت بعد
کاهش درصد تبدیل به لارو از درصد لقاح	۹/۲ درصد-	۱۰/۲٤ درصد-	۱۱/۲۸درصد -	۱۲/۹۵ درصد -
نسبت درصد تبدیل به لارو به درصد لقاح	۸۹/۸	۸۵	۷٦/۹	٦٤/٦

[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-27]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1391.21.4.3.1]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110097]

منابع

Alderson, R. and Macneil, A. J., 1984. Preliminary investigations of cryopreservation of milt of Atlantic salmon *Salmo salar* and its application to commercial farming. Aquaculture, 43:351–354.

Alipour, A.; Baradaran Noveiri, S.; Nowruzfashkhami, M.R. and Pourkazemi, M., 2009. Fertilizing ability of cryopreserved spermatozoa in the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) and stellate sturgeon (*A.stellatus*). Iranian Scientific Fisheries Journal, 8(1):1-12.

Babiak, I.; Glogowski, J.; Dobosz, S.; Kuzminski, H. and Goryczko, K., 2002. Semen from rainbow trout produced using cryopreserved spermatozoa is more suitable for cryopreservation. Journal of Fish Biology, 60:561–570.

Babiak, I.; Glogowski J.; Luczynski, M.J.; Luczynski, M. and Demianowicz, W., 1999. The effect of egg yolk, low density lipoproteins, methylxanthines and fertilization diluent on cryopreservation efficiency of northern pike (*Esox lucius*) spermatozoa .Theriogenology, 52(3): 473-479.

Billard R.;, Cosson J.; Crim W. and Suquet M., 1995. Sperm physiology and quality. *In*: Bromage, N.R., Roberts, R.J. (eds.) Broodstock Management and Egg and Larval Quality. Blackwell Science, Oxford, England, pp.25–52.

Bromage N.R. and Cumaranataunga R., 1988. Egg production in the rainbow trout. *In:* (Muir, J. F. and Robert, R.J. eds). Recent advances in aquaculture, Blackwell Science, Oxford, England ,UK. 3:63-139.

Cabrita E.; Robles V.; Alvarez R. and Herráez M.P., 2001. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: Application to large scale fertilization .Aquaculture, 201(3-4): 301-314.

Cabrita E.; Robles V.; Rebordinos L.; Sarasquete C. and Herraez M.P., 2005. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. Cryobiology, 50:144–153.

Canyurt M.A. and Akhan S., 2008. Effect of Ascorbic Acid Supplementation on sperm quality of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 8:171-175.

Chew P.C.; Abd-Rashid Z.; Hassan R.; Asmuni M. and Chuah H.P., 2010. Semen cryo-bank of the Malaysian Mahseer (*Tor tambroides* and *T. douronensis*). Journal of Applied Ichthyology, 26:726 –731.

Conget P.; Fernández M.; Herrera J.G. and Minguell J., 1996. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa using programmable freezing . Aquaculture, 143(3-4):319-329.

Erdahl D. and Graham E., 1980. Cryopreservation of spermatozoa of the brown, brook and rainbow trout. Cryobiology Letters, 1:203–8.

Gallant R.K.; Richardson G.F. and McNiven M.A., 1993. Comparison of different extenders for the cryopreservation of Atlantic Salmon spermatozoa. Theriogenology, 40:479-486.

Herraez M. P.; Carral J.; Alvarez R.; Saez-Royuela M. and De Paz P., 1993. Efecto de distintos diluyentes y crioprotectores sobre la fertilidad del semen de la trucha comun y la trucha arco-iris.Actas *IV* Congreso National Acuiculture, pp.1-6.

Jodun W.A.; King K. and Farrell P., 2006. Methanol and Egg Yolk as Cryoprotectants for Atlantic Salmon Spermatozoa. North American Journal of Aquaculture, 69:36–40.

Kerby J.H., 1983. Cryogenic preservation of sperm from striped bass, Transactions of The American Fisheries Society, 112:86–94.

Koldras M. and Bieniarz, 1987. Cryopreservation of carp sperm. Poland Archives of Hydrobiology, 34(1):125-134.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-27]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1391.21.4.3.1]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110097]

Lahnsteiner F., Weismann T. and Patzner R.A., 1995. A uniform method for cryopreservation of semen of salmonid fish (*Oncorhynchus mykiss, Salmo trutta fario, Salmo trutta lacustris,Coregonus* sp.). Aquaculture Research, 26:801–807.

Lahnsteiner F.; Berger B.; Weismann T. and Patzner R.A., 1996. The influence of various cryoprotectants on semen quality of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) before and after cryopreservation. Journal of Applied Ichthyology, 12:99–106.

Lahnsteiner F.; Mansour N.; McNiven M.A. and Richardson G.F., 2009. Fatty acids of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen: Composition and effects on sperm functionality. Aquaculture, 298:118–124.

Liley N.R.; Tamkee, P.; Tsai, R. and Hoysak, D.J., 2002. Fertilization dynamics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effect of male age, social experience, and sperm concentration and motility on in vitro fertilization. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 59:144–152.

McNiven M.A., Gallant R.K. and Richardson G.F., 1993a. Dimethy-lacetamide as a cryoprotectant for rainbow trout spermatozoa. Theriogenology, 40:943-948.

McNiven M.A., Gallant R.K. and Richardson G.F., 1993b. Fresh storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen using a non-aqueous medium .Aquaculture, 109(1):71-82.

Moczarski M., 1977. Deep freezing of carp, *Cyprinus carpio* L. sperm. Bulletin of Poland Sciences, 25(3):187-190.

Ninhaus-Silveira A.;, Foresti F.; Tabata Y.A.; Rigolino M.G. and Veríssimo-Silveira R., 2006. Cryopreservation of semen from functional sex-reversed genotypic females of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 49(1):73-77.

Pérez-Cerezales S.; Martínez-Páramo S.; Beirão J. and Herráez M.P., 2010. Evaluation of DNA damage as a quality marker for rainbow trout sperm cryopreservation and use of LDL as cryoprotectant. Theriogenology, 74:282–289.

Pillai M.C.; Yanagimachi R. and Cherr G.N., 1994. *In vivo* and *in vitro* initiation of sperm motility using fresh and cryopreserved gametes from the Pacific herring, *Clupea pallasi*. Journal of Experimental Zoology, 269:62–68.

Piironen J., 1993. Cryopreservation of sperm from brown trout (*Salmo trutta* L.) and Arctic charr *(Salvelinus alpinus* L.). Aquaculture, 116(2-3):275-285.

Robles V.; Cabrita E.; Cuñado S. and Herraez M.P., 2003. Sperm cryopreservation of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): parameters that affect its ability for freezing. Aquaculture, 224:203-212.

Scheerer P.D. and Thorgaard G.H., 1989. Improved fertilization by cryopreserved rainbow trout semen treated with theophylline. Progressive Fish Culturists, 51:179-182.

Stein H. and Bayrle H., 1978. Cryopreserva-tion of the sperm of some freshwater teleosts. Annual Biology of Animal Biochemistry and Biophysics,18:1073-1076.

Tekin N.; Secer S.; Akcay E. and Bozkurt Y., 2003. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhyncus mykiss*) semen. The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh. 55:208–212.

Tekin N.; Secer S.; Akcay E.; Bozkurt Y. and Kayam S., 2007. Effects of glycerol additions on post-thaw fertility of frozen rainbow trout sperm, with an emphasis on interaction between extender and cryoprotectant. Journal of Applied Ichthyology, 23:60–63.

Truscott B. and Idler D.R., 1969. An improved exender for freezing Atlantic salmon spermatozoa. Journal of Fisheries Research Board of Canada, 26:3254-3258.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-27]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1391.21.4.3.1]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110097]

Short term preservation of spermatozoa of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Pourkazemi M.[(1)] *; Shakibi Daryakenari A.[(2)]; Kalbasi M.R.[(3)]; Abdolhay H.[(4)]; Baradaran Noveiri S.[(5)]

pkazemi_m@yahoo.com

1,5- International Sturgeon Research Institute, P.O.Box: 41635-3464, Rasht, Iran

3- Faculty of Marine Science and Natural Resources, Tarbiat Modares University, P.O.Box: 46414-356, Noor, Iran

4- Iranian Fisheries Research Organization, P.O.Box: 14155-6116, Tehran, Iran

Keywords: Spermatozoa, Short term preservation, *Oncorhynchus mykiss*, Motility rate, Fertilization rate

Abstract

Short term preservation of spermatozoa of salmonid fishes for practical use, increasing of reproduction potentials and reducing of expenses, has an important role in hatcheries. In this study spermatozoan motility and fertilization rate of 29 commercially cultured rainbow trout were examined. Semen was collected by abdominal stripping at the volume of 4.49±1 (mean±SD) ml and sperm concentration was determined by heamocytometer following 1:600 dilution with saline solution (0.9% NaCl). To find the effects of preservation time on fertilization capacity, samples were diluted with extender (Glucose 54gL^{-1}, Tris 0.5gL^{-1}, DMSO 9% , Egg yolk 20%) and held at 3 different cool conditions : room temperature (+15°C), refrigerator (+5°C) and crashed ice (+ 1-2°C) and sperm motility followed up each 30 mins until complete ceasation. Fertilization, hatching and larval stage rate were determined after 24, 48 and 72 hours. Results showed that the motility of sperm samples held at 15 °C and 5°C were completely ceased after 2 and 24 hours respectively. However it lasted up to 144 hours at1-2°C.Fertilization, hatching and larval stage rates of sperm samples hold at 1-2°C were 68.45% , 62.1% and 58.2% (after 24 hours), 53.2% , 43.2% and 40.9% (after 48 hours) and 36.6% , 31.6% and 23.7% after 72 hours, respectively, and all showed a significant decrease compared with control (90.32%, 83.27% and 81.12% respectively). Comparing the results showed that holding samples in test tubes at 1-2°C is the best method for short term storage of rainbow trout spermatozoa.

*Corresponding author

[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-27]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1391.21.4.3.1]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110097]