CC BY

**مقاله علمی – پژوهشی:**

# تشکیل بانک اسپرم مولدین قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) مزارع منتخب عاری از بیماری خاص (SPF) از طریق انجماد

محمد حسن‌زاده صابر*[۱]

*saber.merag@gmail.com

۱-انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج جهاد کشاورزی، رشت، ایران.

تاریخ دریافت: مرداد ۱٤۰۲ تاریخ پذیرش: مهر ۱٤۰۲

## چکیده

با مولدسازی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) عاری از بیماری خاص (SPF) در کشور و تکثیر آنها، لزوم ایجاد بانک اسپرم از مولدین مورد نظر ضروری به‌نظر رسید. در این تحقیق، پس از بررسی کارایی چهار رقیق‌کننده تعریف شده برای انجماد اسپرم قزل‌آلا، مناسب‌ترین رقیق‌کننده (سوکروز ۰/۶ مولار و DMSO ۸ درصد) انتخاب شد. نمونه‌های اسپرم استحصالی از ۲۴ مولد، شامل چهار مولد از هر یک از مزارع منتخب عاری از بیماری خاص سطح کشور در استان‌های مازندران و آذربایجان غربی (سرشار، معروفی، فخاری، حدیدی، ملکی‌تبار و قربانی) پس از ارزیابی کیفی، منجمد گردیدند. آزمایش لقاح نمونه اسپرم‌ها در روز نمونه‌برداری و مقایسه درصد لقاح آنها با اسپرم‌های منجمد در سه بازه زمانی (۴، ۲۴ و ۴۸ ساعت) نیز تغییر معنی‌داری بین اسپرم گروه شاهد و نمونه‌های انجمادزدایی شده نشان نداد. نتایج مشخص نمود که از شیوه به‌کار رفته در این تحقیق، می‌توان در انجماد و نگهداری اسپرم مولدین قزل‌آلای رنگین‌کمان SPF به‌خوبی استفاده نمود و در صورت نیاز، اسپرم‌های حاصل از بهترین مولدین را با این شیوه به سایر مراکز انتقال داد.

**لغات کلیدی:** انجماد اسپرم، بانک اسپرم، *Oncorhynchus mykiss*، لقاح، SPF

*نویسنده مسئول

## مقدمه

سابقه تولید ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در جهان به دهه هفتاد قرن نوزدهم برمی‌گردد و تاکنون این ماهی در بیش از ۷۰ کشور در حال تولید است (Adeli and Baghaei, 2013). صنعت آبزی‌پروری در ایران نیز طی سال‌های گذشته توسعه چشم‌گیری یافته است. قزل‌آلای رنگین‌کمان گونه اصلی پرورشی ماهیان سردآبی ایران است که تولید آن طی سال‌های ۲۰۱۶-۲۰۰۳ به‌ترتیب از ۲۳ هزار تن به بیش از ۸۸ هزارتن افزایش یافته است (FAO, 2018). روند افزایش تولید ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از طریق افزایش سطح زیرکشت و بهره‌برداری پایدار از منابع آبی مناسب برای پرورش این ماهی و یا افزایش تولید در واحد سطح میسر خواهد شد. با این وجود، پایداری صنعت پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در بلندمدت از سویی، در گرو بهبود شرایط محیطی پرورش این ماهی و از سوی دیگر، نیازمند تأمین ذخایر اصلاح نژاد شده این گونه خواهد بود.

در حال حاضر، تولید و پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در کشور، به سبب عوامل مختلفی همچون بیماری‌های ویروسی و باکتریایی، دچار کاهش شده و نیاز عمومی پرورش‌دهندگان در این مورد، زمینه را برای وارادت بی‌برنامه تخم چشم‌زده و بچه ماهیان این گونه از خارج کشور فراهم نموده است. از سوی دیگر، عدم مدیریت ژنتیکی و متعاقب آن بروز ناهنجاری‌های ژنتیکی و افزایش میزان همخونی سبب گردیده است تا نیاز به تامین ذخایر بهبود یافته ژنتیکی از ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان موجود به‌شدت احساس شود و برنامه‌های مختلف اصلاح نژاد بر پایه اصول علمی جهت تولید ماهیان سریع‌الرشد و مقاوم به بیماری، هر چه زودتر در دستور کار قرار گیرند.

قدمت انجماد و نگهداری طولانی مدت اسپرم انواع آبزیان اقتصادی در جهان به بیش از شش دهه پیش بر می‌گردد (Blaxter, 1953). یافته‌های به‌دست آمده از مطالعات محققین مختلف در رابطه با نگهداری دراز مدت اسپرم آزاد ماهیان مختلف نشان داد که این تکنیک، یک روش کاربردی جهت جلوگیری از به‌هدر رفتن اسپرم مازاد مصرف و حفظ اسپرم مولدین با شناسنامه خاص جهت تکثیر هدفمند با افزایش تنوع ژنتیکی و بالتبع کاهش ضریب همخونی ناشی از آمیزش خویشاوندی بوده است (Labbe *et al*., 2001) و امکان استفاده ازاسپرم‌های منجمد در زمان عدم دسترسی به مولدین نر مناسب در فصل تکثیر را مهیا می‌سازد (Billard *et al*., 2004). Lahnsteiner و همکاران (۲۰۰۲) موفق شدند با استفاده از رقیق‌کننده حاوی نمک‌های مختلف، تا ۸۷٪ لقاح در اسپرم منجمد قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌دست آورند. در مطالعه Bozkurt (۲۰۰۶) رابطه مثبت بین درصد تحرک اسپرم و درصد لقاح در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان گزارش گردید. همچنین Ciereszko و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که استفاده از رقیق‌کننده گلوکز و متانول سبب القاء بیش‌ترین درصد تحرک (۴۹/۹ درصد) در نمونه‌های اسپرم انجمادزدایی شده قزل آلای رنگین‌کمان شده است.

تاکنون چندین مطالعه کاربردی بر نگهداری اسپرم انواع آزادماهیان کشور صورت گرفته است و نتایج آن می‌تواند در جهت مدیریت حفظ و نگهداری جمعیت‌های بهگزین شده این ماهیان با ارزش، کاربرد داشته باشد (Pourkazemi *et al*., 2012). Shakibi و همکاران (۲۰۰۰) با انجماد و نگهداری طولانی‌مدت اسپرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان موفق شدند پس از ۳، ۷ و ۳۰ روز نگهداری در ازت مایع به‌ترتیب ۶۴، ۶۲ و ۳۸ درصد تخم چشم‌زده استحصال نمایند. در تحقیق دیگری با کمک محلول گلوکز و متانول و با روش سرمادهی دستی از اسپرم ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) تا ۶۶/۶ درصد تخم چشم زده به‌دست آمد (Sarvi *et al*., 2006). Kalbasi و Lorestani (۲۰۰۶) نیز اثر ۱۲ رقیق‌کننده مختلف بر تحرک اسپرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را بدون عملیات انجماد مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که محلول حاوی NaCl و $CaCl_2$ دارای بیشترین قابلیت در افزایش مدت زمان تحرک اسپرم این ماهی است. از سویی، Baradaran Noveiri و همکاران (۲۰۱۳) در طرح ملی حفظ و بازسازی ذخایر ماهی آزاد دریای خزر در حوضه جنوبی دریای خزر نشان دادند که درصد تحرک اسپرم منجمد شده ماهی آزاد دریای خزر پس از هشت ماه نگهداری در ازت مایع، از ۳۲ درصد به ۲۰ درصد کاهش یافته است.

نگهداری طولانی‌مدت اسپرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌تواند ضمن پایه‌ریزی ایجاد بانک اسپرم در منطقه، نیازهای کاربردی مراکز تکثیر این ماهی را پوشش دهد و با در اختیار گذاشتن اسپرم از مولدین اصلاح شده، به افزایش کارایی تکثیر قزل‌آلا و رشد و تولید صنعت آبزی‌پروری آنها درکشور بیانجامد. در اختیار بودن اسپرم سالم و با کیفیت از مولدین اصلاح شده این ماهی، می‌تواند در افزایش تولید و برگشت سریع‌تر سرمایه و کمک به گسترش تکثیر ماهیان غیر آلوده کمک شایان توجهی نماید (Blesbois and Labbe, 2003). هدف از این مطالعه انتخاب مولدین مناسب جمعیت‌های مختلف قزل‌آلای رنگین‌کمان عاری از بیماری‌های خاص (SPF)[1] در کشور و استحصال اسپرم تعدادی از آنها جهت نگهداری طولانی‌مدت از طریق انجماد عمیق و ایجاد خزانه اسپرم این ماهیان با ارزش برای آینده است تا در مدیریت هدفمند تکثیر و پرورش آن با حفظ تنوع ژنتیکی نقش داشته باشد.

## مواد و روش کار

نمونه‌برداری مولدین قزل‌آلای رنگین کمان SPF در اسفند ۱۳۹۶ لغایت اردیبهشت ۱۳۹۷ در بخش قرنطینه مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی کشور (تنکابن) صورت گرفت. نمونه‌گیری اسپرم از مولدین SPF منتخب و نگهداری شده از شش مزرعه پرورشی کشور در استان‌های آذربایجان غربی و مازندران با رعایت اصول بهداشتی صورت گرفت. از هر مزرعه منتخب تعداد چهار مولد به صورت تصادفی (با میانگین طول کل و وزن مولدین به‌ترتیب معادل ۲۶۱۸±۴۰۲ گرم و ۵۵/۹±۲/۹ سانتی‌متر) و از هر مولد به میزان ۶-۱۰ میلی‌لیتر اسپرم استحصال گردید. شایان ذکر است، در این تحقیق کلیه مولدین به طور مجزا مورد بررسی قرار گرفته و اسپرم‌های منجمد شده نیز از هر مولد به‌صورت مجزا نگهداری شده‌اند.

در این تحقیق، ابتدا به منظور اطمینان از قابلیت و کارایی رقیق‌کننده مورد استفاده جهت حفظ کیفیت و شاخص‌های تحرک اسپرم مولدین قزل‌آلا، چهار رقیق‌کننده مختلف مورد سنجش اولیه قرار گرفت. شاخص‌های مدت زمان و درصد تحرک نمونه‌ها پس از مخلوط شدن با هر رقیق‌کننده و القاء تحرک با آب، به عنوان شاخص‌های کیفی رقیق‌کننده‌ها برای انتخاب مناسب‌ترین رقیق‌کننده مورد سنجش قرار گرفت (Baradaran Noveiri and Hassanzadeh Saber, 2018) (جدول ۱).

محلول رقیق‌کننده مورد استفاده در این تحقیق شامل (sucrose 0.6M, DMSO 8%) با pH ۸/۴ بود (رقیق‌کننده E4). نمونه‌های اسپرم استحصال شده به نسبت ۱:۳ با رقیق‌کننده مذکور مخلوط شده (رقیق‌کننده: اسپرم) (Nayan *et al*., 2015) و سپس با میکروسمپلر به نی‌های انجماد ۰/۵ میلی‌لیتری (IMV فرانسه) منتقل شدند. جهت سهولت دسترسی‌های بعدی به هر یک از نمونه‌ها، اسپرم‌های هر مولد از هر مزرعه به صورت مجزا در نی‌های رنگی متفاوت ذخیره شد. پس از هم‌دمایی نمونه‌ها در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه اقدام به انجماد نی‌های حاوی نمونه اسپرم‌های رقیق‌شده به‌روش دستی و با رعایت فاصله ۳ سانتی‌متر از سطح ازت مایع به‌مدت ۱۰ دقیقه گردید (Kutluyer *et al*., 2014). با استفاده از این روش، نرخ سرمادهی با بخار ازت مایع معادل تقریباً ۳۰ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه بود (Sarvi *et al*., 2006). در نهایت نمونه‌های منجمد شده در ازت مایع (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) غوطه‌ور شدند و باقیمانده آن در حال نگهداری است.

انجمادزدایی نمونه‌های منجمد جهت لقاح تیمارها، یک روز پس از انجماد، در حمام آب‌گرم با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه (Ciereszko *et al*., 2014) در آزمایشگاه صورت گرفت. به منظور انجام آزمایش لقاح، پس از بررسی مولدین ماده، از ۳ مولد به میزان ۶۰۰ گرم (با میانگین قطر ۲/۵ میلی‌متر) تخمک‌گیری شد. تخمک‌های استحصالی جهت از بین بردن اثر تفاوت کیفیت ماده‌ها، با هم مخلوط شده و به ۱۲ قسمت ۵۰ گرمی تقسیم شدند. برای آزمایش لقاح اسپرم‌های شاهد، ۰/۵ میلی‌لیتر اسپرم اولیه، با ۵۰ گرم تخمک مولدین ماده (۱۲ تخمک در گرم) مخلوط شده و پس از ۵ دقیقه هم زدن و شستشوی بعدی، به انکوباتورها منتقل شدند.

[1] Specific pathogen-free

**جدول ۱: مشخصات یونی محلول‌های آزمایشی رقیق‌کننده اسپرم ماهیان قزل‌آلای مورد استفاده**

**Table 1: Ionic characteristics of the used salmon sperm dilution experimental solutions**

| References | Chemical composition | Solutions |
|---|---|---|
| Ciereszko *et al*., 2014 | glucose 0.15 M, methanol 9% | $E_1$ |
| Kutluyer *et al*., 2014 | NaCl 6.52 g/l, KCl 0.8 g/l, $NaHCO_3$ 2 g/l, glucose 2 g/l, egg yolk 7.5%, DMSO 10% | $E_2$ |
| Nayan *et al*., 2015 | NaCl 3 g/l, $NaHCO_3$ 0.5 g/l, Glucose 60 g/l, DMSO 8% | $E_3$ |
| Nayan *et al*., 2015 | Sucrose 0.6 M, DMSO 8% | $E_4$ |

اسپرم‌های استحصالی از هر شش مزرعه مورد بررسی در تیمارهای شاهد و منجمد لقاح داده شد. لقاح اسپرم شاهد و اسپرم منجمد شده هر مزرعه، به صورت هم‌زمان و در یک تکرار (به دلیل ترکیب ۳ مولد ماده و از بین بردن تفاوت در کیفیت تخمک‌ها) انجام شد. به منظور به‌حداقل رساندن اثر تفاوت تراکم اسپرم‌ها در هر تیمار با شاهد مربوطه، حجم اسپرم منجمد مورد نیاز در آزمایش لقاح، با توجه به تراکم اولیه سنجش شده (۵۰۰ هزار اسپرم برای هر تخمک) (Bozkurt and Secer, 2006) محاسبه و مورد استفاده قرار گرفت. درصد لقاح نمونه‌ها در کلیه تیمارها، در فواصل زمانی ۴، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از این‌که تخم های لقـاح یافته به‌خوبی آب جذب نمودند، بـر اسـاس فرمول ۱۰۰ × تعداد کل تخم‌ها / تعداد تخم‌های لقاح یافتـه = درصد لقاح سنجش شد (Pourkazemi *et al*., 2012).

جهت بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون Shapiro-Wilk استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل میانگین بین تیمارهای لقاح شاهد و لقاح اسپرم‌های منجمد، از آزمون t مستقل[1] در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. میانگین نتایج تکرارها برای هر تیمار پس از محاسبه به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شد. برای تجزیه‌وتحلیل میانگین موارد مورد بررسی در بین تیمارها از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه[2] (ANOVA) و برای بررسی وجود یا فقدان اختلاف معنی‌دار بین میانگین تیمارها از آزمون Duncan در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل نسخه ۲۰۱۰ انجام شد.

## نتایج

به منظور بررسی تاثیر محلول‌های رقیق‌کننده انتخاب شده بر قابلیت‌های تحرک اسپرم مولدین قزل‌آلا، ابتدا از تعداد شش مولد نگهداری شده از بهترین مولد از لحاظ شاخص‌های کمی و کیفی در هر مزرعه نمونه‌گیری شدند و نتایج بررسی کمی و کیفی نمونه‌ها به‌دست آمد (جدول ۲). با بررسی‌های به‌عمل آمده مشخص گردید که محلول رقیق کننده شماره ۴ ($E_4$)، خصوصیات حیاتی اسپرم قزل‌آلا را به خوبی حفظ می‌کنند و القاء تحرک اسپرم پس از مخلوط کردن با این رقیق‌کننده، با کیفیت مناسب انجام می‌گیرد. لذا، این محلول جهت انجام عملیات انجماد کلیه نمونه‌ها در مراحل عملیاتی پروژه انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج حاصل از انجام آزمایش لقاح با نمونه اسپرم‌های استحصالی و منجمد در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌گونه که مشخص است، کاهش شاخص درصد لقاح اسپرم‌های شاهد در کلیه زمان‌های بررسی (۴ ساعت، ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت)، در مقایسه با نمونه‌های انجمادزدایی شده معنی‌دار نیست ($P>0/05$). همچنین درصدهای لقاح در کلیه تیمارها و شاهد نیز طی ۴۸ ساعت به میزان ناچیزی کاهش یافت اما این کاهش در نمونه‌های شاهد و انجمادزدایی شده معنی‌دار نیست ($P>0/05$).

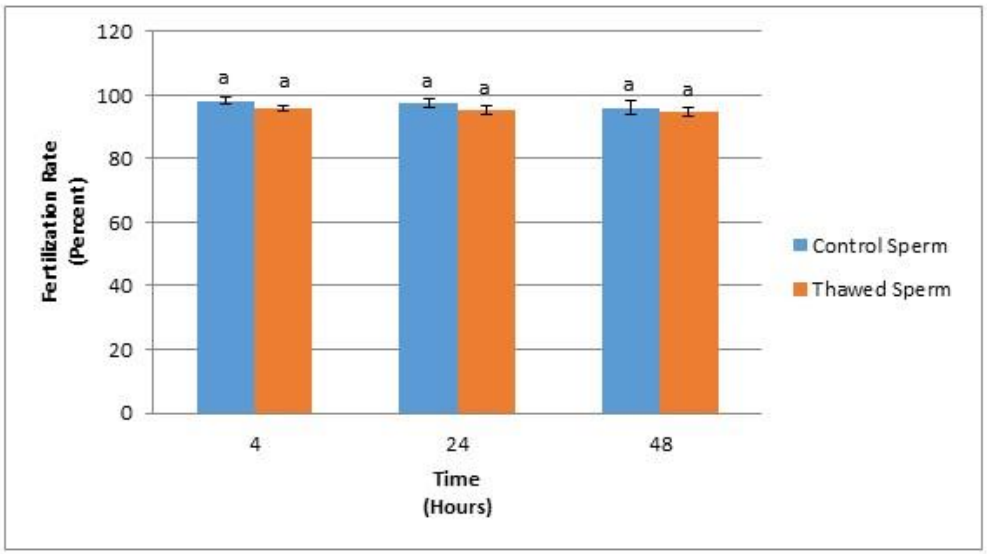
نتایج لقاح اسپرم‌های شاهد و منجمد شده بین مولدین مزارع مختلف نیز نشان داد که بیشترین افت درصد لقاح در نمونه اسپرم مولدین مزرعه فخاری مشاهده شده است (شکل ۲).

[1] Independent -Samples T test
[2] One way Analysis of Variance

**جدول ۲: مشخصات کیفی نمونه اسپرم‌های استحصالی ماهیان قزل‌آلا و اثر رقیق‌کننده‌های مختلف**

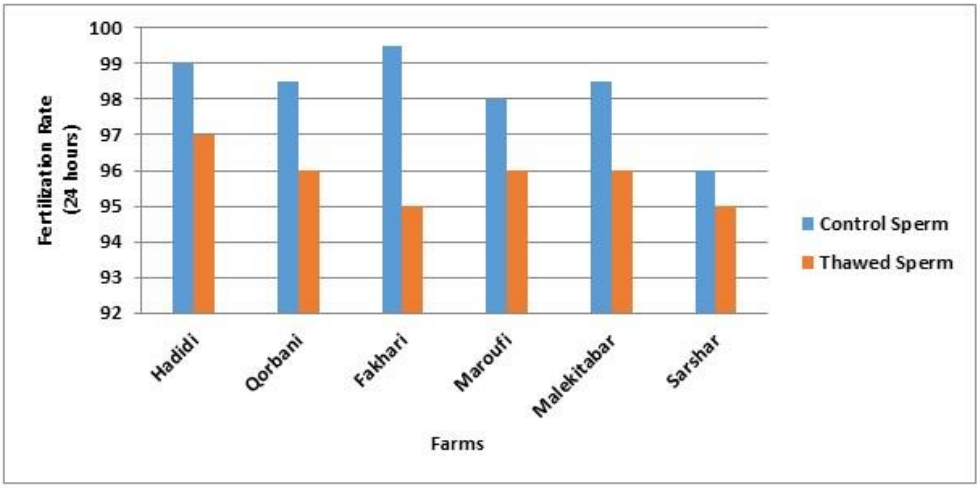
**Table 2: Qualitative characteristics of salmon sperm samples and the effect of different diluents**

| Motility percentage after mixing with activator (water) | | pH | Motility Duration (Sec) | Motility (Percent) | Density (Billion/ml) | Date | Farm | Province | Row |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0<br>0<br>0<br>10 | $E_1$<br>$E_2$<br>$E_3$<br>$E_4$ | 8.46 | 15 | 20 | 7.8 | 17 April 2018 | Hadidi | The west Azerbaijan | **1** |
| 0<br>5<br>0<br>50 | $E_1$<br>$E_2$<br>$E_3$<br>$E_4$ | 8.34 | 28 | 70 | 6.375 | 17 April 2018 | Qorbani | The west Azerbaijan | **2** |
| 5<br>0<br>0<br>40 | $E_1$<br>$E_2$<br>$E_3$<br>$E_4$ | 8.23 | 33 | 80 | 9.125 | 17 April 2018 | Malekitabar | The west Azerbaijan | **3** |
| 5<br>0<br>0<br>50 | $E_1$<br>$E_2$<br>$E_3$<br>$E_4$ | 7.57 | 10 | 20 | 14.7 | 17 April 2018 | Sarshar | Mazandaran | **4** |
| 0<br>0<br>0<br>10 | $E_1$<br>$E_2$<br>$E_3$<br>$E_4$ | 7.42 | 5 | 5 | 5.287 | 17 April 2018 | Fakhari | Mazandaran | **5** |
| 0<br>0<br>10<br>60 | $E_1$<br>$E_2$<br>$E_3$<br>$E_4$ | 7.7 | 16 | 30 | 5.17 | 17 April 2018 | Maroufi | Mazandaran | **6** |




**شکل ۱: تغییرات درصد لقاح اسپرم شاهد و منجمد مولدین قزل‌آلای رنگین‌کمان (SPF)**

**Figure 1: Fertilization percentage changes of fresh and frozen-thawed sperm of rainbow trout**




**شکل ۲: تفاوت درصد لقاح اسپرم شاهد و منجمد مولدین مزارع مختلف**

**Figure 2: The difference in the fertilization percentage of the fresh and frozen-thawed sperm of different farms**

## بحث

استفاده از تکنیک انجماد اسپرم گونه‌های مختلف آزادماهیان در سال‌های اخیر سبب بهبود تولید، کاهش هزینه نگهداری مولدین، گسترش فعالیت‌های حفظ ژنتیکی این ماهیان و سهولت حمل‌ونقل اسپرم بین مراکز تکثیر و کاهش خطر توسعه آلودگی‌ها شده است (Kutluyer *et al.*, 2014; Nayan *et al.*, 2015; Judycka *et al.*, 2018). با به‌کارگیری نتایج این طرح می‌توان با اعمال روش‌های انجماد و نگهداری طولانی‌مدت اسپرم ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی به عنوان بخشی ضروری از مدیریت پرورش این گونه و با تعامل با سایر پروژه‌های این طرح، به بهبود وضعیت ژنتیکی، افزایش تولید ماهیان عاری از بیماری‌های خاص این گونه مهم اقتصادی کمک شایانی نمود.

در مطالعات حفظ ذخایر مولدین خاص نظیر ماهیان عاری از بیماری، نگهداری اسپرم هر مولد به صورت مجزا بسیار با اهمیت است. گفته شده است که کیفیت پایین اسپرم استحصالی در برخی از ماهیان در فرایند لقاح را می‌توان با استفاده از نسبت بیشتر اسپرم به تخمک یا مخلوط کردن اسپرم چند مولد نر (Cabrita *et al.*, 2010) جبران نمود. هرچند که در تأیید این مورد هنوز اختلاف نظر وجود دارد (Baradaran Noveiri *et al.*, 2002; Cabrita *et al.*, 2010)، اما باید خاطر نشان نمود که استفاده هم‌زمان از اسپرم چند مولد نر برای لقاح تخمک یک ماهی، الزاماً به معنای مشارکت ژنتیکی همه اسپرم‌های مورد استفاده نیست، زیرا عملاً اسپرم‌های با شاخص‌های تحرک بالاتر، درصد بسیار بیش‌تری از تخمک‌ها را لقاح خواهند داد. در عمل حتی اگر اسپرم‌ها با حجم و تراکم یکسان مخلوط شده باشند، تعیین این‌که اسپرم هر مولد، چند درصد در لقاح مشارکت داشته است، بسیار دشوار و هزینه‌بردار است (Trippel, 2003; Sourinejad *et al.*, 2011). از آن‌جایی‌که مولدین مورد استفاده در تحقیقات بانک‌های ژن، دارای خصوصیات منحصربه‌فرد (شناسنامه‌دار، تغییر جنسیت یافته، دستکاری ژنتیکی شده و ...) هستند، حفظ و نگهداری جداگانه هر مولد کارایی آینده این بانک را افزایش خواهد داد.

در تحقیق حاضر، با بررسی چهار رقیق کننده مختلف که محققین پیشین برای انجماد اسپرم ماهی قزل‌آلا به‌کار بردند، مشخص شد که رقیق‌کننده حاوی سوکروز و DMSO دارای بهترین نتیجه در القاء تحرک اسپرم‌های انجمادزدایی شده بوده است. محلول گلوکز و ماده محافظ سرمای متانول در تحقیق Ciereszko و همکاران (۲۰۱۴) برای انجماد اسپرم قزل‌آلا به‌کار رفت. نتایج این بررسی نشان داد که بهترین رقیق‌کننده برای انجماد اسپرم این ماهی، رقیق‌کننده حاوی گلوکز (۰/۱۸ مولار) و ماده محافظ سرمای متانول (۹ درصد) بوده است. البته در آزمایش این گروه از نی‌های انجماد ۰/۲۵ میلی‌لیتری استفاده شد. Horváth و

همکاران (۲۰۱۰) اظهار کرده‌اند، استفاده از اسپرم‌های منجمد با حجم بالاتر در مزارع سهولت بیش‌تری دارد که مزیت کاربرد نی‌های انجماد ۰/۵ میلی‌لیتری را دو چندان می‌کند. همچنین Ciereszko و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که ۱۵ دقیقه هم‌دما کردن اسپرم با رقیق‌کننده قبل از انتقال به نی‌ها، کارایی تحرک اسپرم را پس از انجمادزدایی به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد. در روش کار تحقیق حاضر نیز از همین شیوه عملیاتی استفاده شده است و نتیجه کار موفقیت‌آمیز بود. مطالعات پیشین نشان داد که از بین محلول رقیق‌کننده‌های انجماد اسپرم قزل‌آلا، محلول رقیق‌کننده قندی حاوی ۰/۳ مولار گلوکز نتیجه بهتری نسبت به رقیق‌کننده نمکی Erdhal & Graham (شامل ۰/۱۴ گرم کلرید کلسیم، ۰/۲ گرم کلرید منیزیم، ۰/۲۵ گرم فسفات هیدروژن سدیم، ۲/۵ گرم کلرید پتاسیم، ۵/۸ گرم کلرید سدیم، ۰/۱ گرم اسید سیتریک و ۱۰ گرم گلوکز در یک لیترآب) داشته و کارایی آن در لقاح نمونه‌های انجمادزدایی شده (۷۷/۲ درصد لقاح) مناسب بوده است (Babiak *et al*., 2001). البته باید یادآور شد که در آزمایش این گروه، نمونه اسپرم‌های استحصالی از ۱۰ مولد مختلف با هم مخلوط شده و از روش پلت (با حجم ۰/۰۸ میلی لیتر) و یخ خشک برای انجماد اسپرم استفاده شد. آزمایش لقاح این مطالعه نیز با مخلوط کردن تخمک‌های ۷ مولد ماده و نسبت اسپرم به تخمک سه میلیون اسپرم برای هر تخمک بود. Ciereszko و همکاران (۲۰۱۴) نسبت‌های مختلف اسپرم به تخمک را در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، شامل ۱۰۰ هزار، ۳۰۰ هزار و ۶۰۰ هزار اسپرم برای هر تخمک، جهت مطالعه کارایی تکنیک انجماد اسپرم مورد بررسی قرار دادند و مشخص کردند که در لقاح اسپرم‌های شاهد هیچ تفاوتی بین نسبت‌های به‌کار رفته وجود ندارد، اما در لقاح نمونه‌های منجمد، استفاده از نسبت ۱۰۰ هزار به یک تخمک، دارای کم‌ترین درصد لقاح بودند و بین دو تیمار ۳۰۰ هزار به یک تخمک و ۶۰۰ هزار به یک تخمک، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. مطالعه این گروه نشان داد که با افزایش میزان نسبت اسپرم به تخمک در حد ۶۰۰ هزار اسپرم به ازاء هر تخمک می‌توان به درصد لقاح مشابه اسپرم‌های شاهد دست یافت. هر چند در اکثر منابع مربوط به قزل‌آلای رنگین‌کمان، از نسبت ۳۰۰ هزار به یک به عنوان نسبت مناسب مذکور (Tekin *et al*., 2007)، اما در تحقیقات محققین مختلف بر لقاح اسپرم منجمد این ماهی، این نسبت تا حد ۳ میلیون اسپرم برای هر تخمک نیز استفاده شده است (Babiak *et al*., 2001). گروه دیگری با استفاده از رقت‌های مختلف ماده محافظ سرمایDMSO توانستند تا ۹۲ درصد لقاح با استفاده از اسپرم‌های منجمد به‌دست آورند. اما باید یادآور شد که در آزمایش لقاح این گروه، نسبت مصرفی اسپرم برای هر تخمک معادل ۶ میلیون اسپرم برای هر تخمک بود (Nayan *et al*., 2015). در تحقیق Judycka و همکاران (۲۰۱۸) نیز که رقیق‌کننده مشابه تحقیق حاضر را برای انجماد اسپرم قزل‌آلا به‌کار بردند، جهت آزمایش لقاح نمونه‌ها از نسبت ۱ میلیون اسپرم برای هر تخمک استفاده کردند. این محققین درصدهای لقاح با اسپرم منجمد در آزمایش خود را در محدوده ۹۲-۲۹ درصد اعلام کردند. Lahnsteiner و همکاران (۲۰۰۲) نیز با استفاده از نسبت ۲/۷ میلیون اسپرم منجمد قزل‌آلا برای هر تخمک به نتایج مشابه (۸۷/۵ درصد) لقاح اسپرم‌های شاهد (۸۶/۷ درصد) دست یافتند. در تحقیق حاضر، با استفاده از رقیق‌کننده مشابه و استفاده از نسبت ۵۰۰ هزار اسپرم برای هر تخمک، نتایج لقاح اسپرم‌های منجمدتفاوت معنی‌داری با لقاح اسپرم‌های شاهد نداشت.

تحقیق حاضر بر انجماد اسپرم مولدین قزل‌آلای رنگین‌کمان SPF نشان داد که رقیق‌کننده مورد استفاده ($E_4$) و روش به کار رفته در این مطالعه، کارایی لازم برای القاء تحرک و حفظ قابلیت لقاح اسپرم این ماهی را داشته و با استفاده از نسبت ۵۰۰ هزار اسپرم به ازاء هر تخمک، نتایج لقاح اسپرم‌های انجمادزدایی شده در حد اسپرم شاهد بوده است. روش انجماد دستی مورد استفاده در این تحقیق، می‌تواند سبب توسعه کارایی این تکنیک در سطح مراکز تکثیر و پرورش قزل‌آلایی شود که فاقد امکان استفاده از تجهیزات پیشرفته انجماد اسپرم هستند. استفاده از این تکنیک می‌تواند علاوه بر پوشش نیاز اسپرم مراکز تکثیر این ماهی در سرتاسر کشور، توانایی حفظ اسپرم مولدین شناسنامه‌دار یا مولدین خاصی همچون قزل‌آلای عاری از بیماری را توسعه

دهد و به عنوان پدافند غیرعامل در آبزی‌پروری این گونه اقتصادی نقش مهمی در کشور ایفاء کند.

## تشکر و قدردانی

نویسنده و همکاران از زحمات جناب آقای دکتر محمود محسنی، رئیس محترم وقت مرکز تحقیقات ماهیان سردابی کشور و تلاش‌های مجدانه جناب آقای مهندس محمد اسماعیل راست روان، مسئول محترم وقت بخش تکثیر و پرورش آن مرکز کمال تشکر را دارند. جا دارد تا یادی از مجری محترم پروژه زنده یاد دکتر شهروز برادران نویری موسس بانک اسپرم ماهیان خاویاری کشور نمایم که اگر تلاش‌های مجدانه و صادقانه ایشان نبود، تنها بانک اسپرم مجهز آبزیان در کشور عزیزمان ایران تاسیس نمی‌گردید. نامش جاودان و راهش پر رهرو باد.

## منابع

**Adeli, A. and Baghaei, F., 2013.** Production and supply of rainbow trout in Iran and the world. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 5:335-341. DOI:10.5829/idosi.wjfms.2013.05.03.72133.

**Babiak, I., Glogowski, J., Goryczko, K., Dobosz, S., Kuzminski, H., Strzezek, J. and Demianowicz, W., 2001.** Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa. *Theriogenology*, 56(1):177-92. DOI:10.1016/s0093-691x(01)00553-2.

**Baradaran Noveiri, S. and Hassanzadeh Saber, M., 2018.** Methods of sperm quality assessment in fish. *Journal of Aquaculture development*, 12(3):15-29.

**Baradaran Noveiri, S., Pourkazemi, M., Kouchinian, P. and Yavari, V., 2002.** The effects of crypreservation on movement patterns of carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. *Pajouhesh & Sazandegi*, 55:6-10. [In Persian]

**Baradaran Noveiri, S., Rezvani, S., Zoriehzahra, S. J., Sayyad Bourani, M., Alipour, A., Nowruzfashkhami, M. R., Najjar Lashgari, S., Bahramian, B. and Zabihi, M., 2013.** Estabilishment of sperm bank of Caspian salmon broods. Iranian Fisheries Research Organization. *Final report of project*. 31 P. [In Persian]

**Billard, R., Cosson, J., Noveiri, S.B. and Pourkazemi, M., 2004.** Cryopreservation and short –term storage of sturgeon sperm, A review. *Aquaculture*, 236: 1-9. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2003.10.029

**Blaxter, J.H.S., 1953.** Sperm storage and cross-fertilization of Spring and Autumn spawning herring. *Nature*, 172:1189–1190.

**Blesbois, E. and Labbe, C., 2003.** Main improvements in semen and embryo cryopreservation for fish and fowl. In: Workshop on cryopreservation of animal genetic resource in Europe (eds) Planchenault D., Paris, pp. 55-56.

**Bozkurt, Y. and Secer, S., 2006.** Relationship between spermatozoa motility, egg size, fecundity and fertilization success in brown trout (*Salmo trutta fario*). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9(11):2141-2144. DOI:10.3923/pjbs.2006.2141.2144.

**Bozkurt, Y., 2006.** The Relationship between body condition, sperm quality parameters and fertilization success in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 5(4):284-288. DOI: javaa.2006.284.288.

**Cabrita, E., Sarasquete, C., Martinez-Páramo, S., Robles, V., Beirão, J., Pérez-Cerezales, S. and Herráez, P., 2010.** Cryopreservation of fish sperm: application and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology*, 26: 623-635. DOI: 10.1111/J.1439-0426.2010.01556.X.

**Ciereszko, A., Dietrich G.J., Nynca, J., Dobosz, S. and Zalewski, T., 2014.** Cryopreservation of rainbow trout semen using a glucose-methanol extender. *Aquaculture*, 420-421:275-281. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.11.014.

**FAO, 2018.** Review of the state of world fishery resources: inland fisheries, Circular No. C942 Rev.3, Rome. 397 P.

**Horváth, A., Urbányi, B., Wang, C., Onders, R.J. and Mims, S.D., 2010.** Cryopreservation of paddlefish sperm in 5-mL straws. *Journal of Applied Ichthyology*, 26:715–719. https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01551.x.

**Judycka, S., Nynca, J., Liszewska, E., Dobosz, S., Slowinska, M., Rozynski, R. and Ciereszko, A., 2018.** Cryopreserved rainbow trout semen can be used for the fertilization of up to 8000 eggs in a single application. *Aquaculture*, 490:25-28. DOI:10.1016/j.aquaculture.2018.02.026.

**Kalbasi, M. R. and Lorestani, R., 2006.** The effect of different diluents on the motility duration of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 13(6):132-143. [In Persian]

**Kutluyer, F., Kayim, M., Öğretmen, F., Büyükleblebici, S. and Tuncer, P.B., 2014.** Cryopreservation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa: effects of extender supplemented with different antioxidants on sperm motility, velocity and fertility. *Cryobilogy*, 69:462-466. DOI:10.1016/j.cryobiol.2014.10.005.

**Labbe, C., Martoriati, A., Devaux, A. and Maisse, G., 2001.** Effects of cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Molecular Reproduction and Development*, 60 (3):394-404. DOI:10.1002/mrd.1102.

**Lahnsteiner, F., Mansour, N. and Weismann, T., 2002.** A new technique for insemination of large egg batches with cryopreserved semen in the rainbow trout. *Aquaculture*, 209:359-367. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00869-9.

**Nayan, M., Gupta, S.K., Srivastva, S.K. and Krishna, G., 2015.** Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa (*Onchorhynchus mykiss*) using different cryodiluents. *Cryoletters*, 36(2):137-147.

**Pourkazemi, M., Shakibi Daryakenari, A., Kalbasi, M. R., Abdolhay, H. and Baradaran Noveiri, S., 2012.** Short term preservation of spermatozoa of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 21(4):157-164. [In Persian]

**Sarvi, K., Niksirat, H., Mojazi Amiri, B., Mirtorabi, S.M., Rafiee, G.R. and Bakhtiyari, M., 2006.** Cryopreservation of semen from the endangered Caspian brown

trout (*Salmo trutta caspius*) *Aquaculture*, 256:564–569. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.012.

**Shakibi Daryakenari, A., Pourkazemi, M., Kalbasi, M. R. and Abdolhay, H., 2000.** Investigating the possibility of freezing and preserving rainbow trout sperm. *M.Sc. thesis*. Faculty of Natural Resources and Sciences, Tarbiat Modares University. 85 P. [In Persian]

**Sourinejad, I., Kalbassi, M.R., Pino-Querido, A., Vera, M., Bouza, C. and Martinez, P., 2011.** Parentage assignment of progeny in mixed milt fertilization of Caspian brown trout *Salmo trutta caspius* using microsatellite DNA markers: Implications for conservation. *African Journal of Biotechnology*, 10(26):5084-5090. DOI:10.5897/AJB10.664.

**Tekin, N., Secer, S., Akcay, E., Bozkurt, Y. and Kayam, S., 2007.** Effects on glycerol additions on post –thaw fertility of frozen rainbow trout sperm, with an emphasis on interaction between extender and cryoprrotectant. *Journal of Applied Ichthyology*, 23:60-63. https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2006.00792.x.

**Trippel, E.A., 2003.** Estimation of male reproductive success of marine fishes. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 33:81-113. DOI:10.2960/J.v33.a6.

# Establishment a sperm bank of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) breeding from selected farms specific pathogen-free (SPF) in the country through cryopreservation

Hassanzadeh Saber M.*

International Sturgeon Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

**Abstract**

By broodstocking and propagating of specific pathogen-free (SPF) rainbow trout in Iran, the need to create a cryopreserved sperm bank from the breeders was deemed necessary. In this study, after evaluation of four different extenders for rainbow trout sperm cryopreservation, the best extender (0.6M sucrose and 8% DMSO) has been selected. The sperm samples were obtained from 24 breeders, including four breeders from each of the selected specific pathogen-free farms of the country in Mazandaran and West Azerbaijan provinces (Sarshar, Maroufi, Fakhari, Hadidi, Malekitabar, and Qorbani) were cryopreserved after qualitative evaluation. The fertilization test of sperm samples on the day of sampling and comparison of their fertilization percentage with frozen-thawed sperms in three time intervals (4, 24 and 48 hours) did not show any significant differences between the sperm of the control group and the frozen-thawed samples. The results indicated that the method used in this research can be well used in cryopreservation the sperm of SPF rainbow trout breeders and if needed, the sperm obtained from the best breeders can be transferred to other centers with this method.

**Keywords**: Sperm cryopreservation, Sperm bank, *Oncorhynchus mykiss*, Fertilization

*Corresponding author