نشریه فن‌آوری‌های نوین در توسعه آبزی‌پروری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزادشهر/ ISSN: 2008-0026 سال چهاردهم، شماره سوم، پاییز ۹۹ / صفحات: ۳۳-۲۳

اثر سمیت برخی مواد ضد انجماد بر نرخ تفریخ جنین ماهی قره‌برون (*Acipenser persicus*)

میثم گنجی‌بخش[۱]، حسنی قلی‌پور کنعانی[۲*]، پروانه فرزانه[۱]، کوروش جمعه خالدی[۱]، محمد هرسیج[۲]، سمیرا داد[۲]، سید ابوالحسن شاهزاده فاضلی[۱]

[۱] مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران- بانک سلول‌های انسانی و جانوری، تهران، ایران

[۲] گروه شیلات، دانشگاه گنبدکاووس، گنبدکاووس، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۱/۳۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۹/۶/۱۵

چکیده

انجماد جنین عبارتند از جایگزین کردن مواد ضد انجماد با آب درون جنین است. انجماد موفقیت‌آمیز جنین ماهیان نیازمند ورود مقادیر و غلظت‌های مناسبی از مواد ضد انجماد به قسمت‌های مختلف جنین است. در مطالعه حاضر به‌منظور بررسی اثر سمیت مواد ضد انجماد، جنین ماهی قره‌برون در مرحله مورولا (۶ ساعت پس از لقاح) مورد بررسی قرار گرفت. از مواد ضد انجماد نفوذپذیر؛ متانول، دی متیل سولفوکساید و ترکیب اتیلن گلیکول به همراه دی متیل سولفوکساید در غلظت‌های (۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ مولار) و به همراه مواد ضد انجماد نفوذناپذیر سوکروز استفاده گردید. تخم‌ها در طی ۳ مرحله و هر مرحله نیز به مدت ۵ دقیقه در معرض محلول‌ها به ترتیب از مولاریته کم به مولاریته بالا قرار گرفته و تا زمان تفریخ در انکوباتورها قرار گرفتند. از لحاظ نرخ تفریخ اختلاف معنی‌دار آماری بین مواد ضد انجماد مختلف انتخاب شده، در هر سه تیمار در مقایسه با گروه شاهد وجود نداشت ($P>0/05$ و تحت آزمون دانکن). اگر چه از میان مواد ضد انجماد نفوذپذیر، ترکیب اتیلن گلیکول به همراه دی متیل سولفوکساید بیشترین سمیت را برای جنین ماهی قره‌برون داشت. همچنین سطوح مختلف متانول را نسبت به ترکیب اتیلن گلیکول به همراه دی متیل سولفوکساید بهتر تحمل کرده و نسبت به آن حساسیت کمتری داشت اما جنین ماهی مورد مطالعه سطوح مختلف از مواد دی متیل سولفوکساید را نسبت به دو ماده دیگر بهتر تحمل کرده و حساسیت کمتری نسبت به آن‌ها نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: مواد ضد انجماد، سمیت مواد ضد انجماد، نرخ تفریخ، جنین قره برون

مقدمه

یکی از ارزشمندترین ره‌آورد فن انجماد جنینی توانایی ذخیره‌سازی محتویات ژنی برای مدت زمان نامحدود می‌باشد. این امر نه تنها می‌تواند مبین نفع قابل توجه در حفظ رده‌های سلولی که مهندسی ژنتیک شده‌اند باشد، بلکه نقش اساسی در حفظ گونه‌های در معرض انقراض دارد. به‌طور معمول انجماد اسپرم ماهی در بسیاری نقاط دنیا در گونه‌های مختلف با موفقیت انجام می‌شود، درحالی‌که انجماد اووسیت و جنین ماهی در خیلی از گونه‌های ماهی با موفقیت زیادی همراه نبوده است. برای حفظ تنوع ژنتیکی، حفاظت از هر دو ژنوم پدری و مادری دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشد. علاوه بر این DNA

*نویسنده مسئول: gholipourk@gmail.com

میتوکندریایی درون سیتوپلاسم اووسیت هم باید حفظ گردد. اگرچه در سال‌های اخیر کارهای موفقیت‌آمیز زیادی در زمینه انجماد جنین ماهی صورت گرفته، فاکتورهای متعددی باعث ایجاد پیچیده‌تر شدن روند چالشی انجماد جنینی شده‌اند (Jalali و همکاران، ۲۰۱۰).

انجماد جنین ماهی می‌تواند نقش کلیدی را در تولید تخم، مدیریت ژنتیکی مولدین و حفظ ذخایر ماهیان بخصوص ماهیان در حال انقراض ایفا کند. تعداد کمی از مطالعات صورت گرفته، توانسته‌اند در زمینه انجماد جنین ماهی موفق عمل کنند (Wang و همکاران، ۱۹۹۲؛ Zhang و همکاران، ۱۹۸۹) که این امر می‌تواند به‌دلیل اندازه بزرگ جنین ماهی (۱-۷ میلی‌متر قطر) و ساختار پیچیده، نفوذپذیری کم نسبت به آب، حساسیت به ضایعات سرمایشی و مقدار زیاد زرده در تخم باشد (Gwo، ۲۰۰۰)، به همین دلیل دستورالعمل قابل اطمینانی جهت انجماد جنین در ماهیان وجود ندارد (Rana، ۱۹۹۵). یکی از فاکتورهای اساسی در انجماد جنین ورود و توزیع همگن مواد ضد انجماد در قسمت‌های مختلف جنین می‌باشد، تا بتوان اقدام به انجماد جنین نمود (Vuthiphandchai و همکاران، ۲۰۰۵). مواد منجمدکننده در دماهای پایین از جنین محافظت کرده و مانع مرگ جنین می‌شوند. از سوی دیگر این مواد در غلظت‌های بالا می‌توانند ایجاد مسمومیت کنند و درصد تفریخ را کاهش داده و باعث افزایش تلفات در جنین ماهیان شوند. همچنین اثرات هر ماده ضدانجماد علاوه بر ویژگی و خاصیت شیمیایی آن به مرحله تکامل جنینی، مدت زمانی که جنین در معرض مواد ضدانجماد قرار می‌گیرد و نوع گونه نیز بستگی دارد (Suzuki و همکاران، ۱۹۹۵).

کریوپروتکتنت‌های قابل نفوذ[1] توانایی نفوذ از غشای سلولی را دارند. رایج‌ترین مواد قابل نفوذ شامل متانول[2]، دی متیل سولفوکساید[3] (DMSO)، اتیلن گلیکول[4] (EG)، پروپیلن گلیکول[5] (PG) و گلیسرول می‌باشند. این ضد انجمادها با وزن مولکولی کم خود توانایی کاهش غلظت مواد محلول آسیب رسان را دارند (Mazur، ۲۰۰۴). همچنین شدیداً سبب کاهش نقطه انجماد گشته و بدین صورت از تشکیل کریستال یخ در داخل سلول جلوگیری می‌کنند (Shepard و همکاران، ۱۹۷۶). این مواد ضد انجماد جایگزین آب داخل سلولی شده و باندهای هیدروژنی با پروتئین، RNA و DNA تشکیل می‌دهند و این باندهای هیدروژنی استحکام سیتوپلاسم را با حفظ ساختار عملکردی افزایش می‌دهد DMSO از رایج‌ترین مواد ضد انجماد به‌کار رفته در روش انجماد سلولی سلول‌ها، بافت‌ها و ارگان‌ها می‌باشد. این ماده می‌تواند با بالا بردن غلظت یون‌های کلسیم در سیتوپلاسم، باعث ایجاد پاسخ‌های متابولیکی مانند دپلیمرازیسیون و سر هم شدن ساختار سلولی شود (Yamamoto, 1989).

با اینکه ضد انجمادها می‌توانند سلول‌ها را از آسیب‌های حاصل از سرمایش و انجماد حفظ کنند، می‌توانند به خودی خود در غلظت‌های بالا باعث آسیب و مرگ سلولی شوند (Fahy، ۱۹۸۶). سمیت این مواد می‌تواند به خاطر دناتره شدن پروتئین‌های داخل سلولی باشد. نظریه آسیب حاصل از دهیدراتاسیون، در واقع در اثر اتصال ضد انجمادها با مولکول‌های آب و در نتیجه جلوگیری از اتصال

۱. Permeable cryoprotectants
۲. Methanol
۳. Dimethulsulphoxide
۴. Ethylenglycol
۵. Propylenglycol

مولکول‌های آب به پروتئین‌ها و سایر ماکرومولکول‌ها می‌باشد (Clegg و همکاران، ۱۹۸۲). سمیت ضد انجمادها بستگی به نوع سلول دارد. برای مثال متانول سمیت کمتری برای تخم ماهی گورخری دارد (Zhang و همکاران، ۱۹۹۳). ولی برای جنین صدف سمی می‌باشد (Chao و همکاران، ۱۹۹۴). طبق گزارش Hoetelmans و همکاران در سال ۲۰۰۱، متانول با برهم‌کنش بر فسفولیپید غشا و بر هم زدن ساختار دو لایه لیپیدی باعث آسیب سلولی می‌شود. به این ترتیب که قسمت غیر قطبی الکل باعث ایجاد فاصله در بین زنجیره‌های چربی غشای داخلی و آسیب در ساختار آن می‌گردد (Patra و همکاران، ۲۰۰۶)، همچنین DMSO باعث دناتره شدن پروتئین‌ها می‌شود (Parkes و Smith، ۱۹۵۳).

جهت فائق آمدن بر این مشکلات، عمل ویتریفیکاسیون[1]، سرمایش سریع مواد مایع بدون ایجاد کریستال‌های یخ با استفاده از افزایش غلظت مواد ضد انجماد و انجماد سریع سوسپانسیون جنینی توسط Chen و Tian (۲۰۰۵) برای دستیابی به انجماد موفقیت‌آمیز ماهی فلاندر ژاپنی انجام شد. Edashige و همکاران (۲۰۰۶) با تکرار روش Chen و Tian (۲۰۰۵) نرخ بقای جنین فلاندر ژاپنی را مورد ارزیابی قرار داده و عدم موفقیت این روش را با عدم زنده‌مانی جنین بعد از دفریز اعلام داشتند. پیش‌تر از این گزارش، Zhang و همکاران (۱۹۸۹) گزارشی در مورد انجماد جنین ماهی کپور معمولی با روش انجماد آهسته در نیتروژن مایع داده شد که نتایج ایشان قابل تکرار نبود. همچنین گزارش‌های زیادی مبنی بر وابستگی انجماد جنین ماهی به مرحله جنینی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (Haga، ۱۹۸۲)، کپور معمولی (Dinnyes و همکاران، ۱۹۹۸)، مینو سرچرب (Cloud و همکاران، ۱۹۹۸) و ماهی طلایی (Li و همکاران، ۱۹۹۳) وجود دارد. Cabrita و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که جنین ماهی توربوت در مراحل نهایی جنینی نسبت به مواد ضدانجماد مقاوم‌تر می‌باشند. همچنین موازنه ۵ مرحله‌ای جنین فلاندر در محلول ویتریفای‌کننده که حاوی پروپیلن گلیسرول و متانول بود نرخ بقای بالای جنین را نشان داد. Zhang و همکاران (۲۰۰۵) توالی مسمومیت‌زایی مواد ضدانجماد در جنین فلاندر را به ترتیب پروپیلن گلیکول<متانول< دیمتیل سولفوکساید< گلیسرول گزارش کردند. توالی مشابه سمیت‌زایی نیز در جنین ماهی گورخری (Zhang و همکاران، ۲۰۰۵) و در سوف ماهی دریایی (Tian و همکاران، ۲۰۰۳) گزارش شد. بر اساس گزارش Dinnyes و همکاران (۱۹۹۸) در جنین ماهی کپور معمولی به‌ترتیب سمیت متانول< دیمتیل سولفوکساید< گلیسرول در مدت زمان ۴ و ۸ ساعت مرحله جنینی بود درحالی‌که در مرحله ۳۲ ساعته جنینی ترتیب سمیت مواد ضد انجماد متانول< گلیسرول< دیمتیل سولفوکساید بوده است. نکته قابل توجه در فن انجماد جنینی ماهی دستیابی به محلول ضد انجماد با بالاترین کارایی و کمترین سمیت در گونه مورد نظر می‌باشد.

Keiwanloo و Sudagar (۲۰۱۳) اثر سمیت ۶ ماده ضد انجماد نفوذپذیر DMSO، اتیلن گلیکول، پروپیلن گلیکول، استامید، متانول و گلیسرول را در غلظت‌های ۱ تا ۶ مولار و ۳ ماده ضد انجماد غیرقابل نفوذ سوکرز و عسل (۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد) و پلی ونیل پیرولیدون (۵، ۱۰ و ۱۵ درصد) را در مدت زمان مواجهه ۵ و ۱۰ دقیقه در مرحله جنینی ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از لقاح در تاس ماهی ایرانی مورد ارزیابی قرار دادند ایشان اذعان داشتند که جنین این ماهی بیشترین مقاومت را به مواد ضد انجماد در ۲۴ و ۴۸

۱. Vitrification

ساعت بعد از لقاح و با محلول حاوی ۱ و ۲- پروپان دی اُول دارد. Higaki و همکاران (۲۰۱۰) طی تحقیقی بر روی ماهی گورخری با به‌کارگیری ۵ ماده ضد انجماد در سه مرحله بلاستولا، گاسترولا و در مرحله تقسیم، نشان دادند که انجماد سریع جنین در مرحله تقسیم، بهترین زمان برای انجماد سلول‌های زایای اولیه می‌باشد. نتایج تحقیقات Chen و Tian (۲۰۰۵) در جنین ماهی فلاندر نشان داد، اتیلن گلیکول در تمامی غلظت‌های مورد بررسی برای جنین این گونه سمی بود، همچنین نتایج بیانگر آن بود که متانول سمیت کمتری نسبت به اتیلن گلیکول داشت. Robertson و همکاران در سال ۱۹۸۸ نیز بیان کردند اتیلن گلیکول حتی در پایین‌ترین غلظت هم اثرات سمی روی جنین ماهی باس کانالی دارد. با این حال، نتایج بررسی‌های Cabrita و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان داد اتیلن گلیکول ماده ضد انجمادی است که کمترین سمیت را در مراحل تکامل جنینی سیم دریایی سر طلایی دارد. نتایج بررسی‌های Zhang و Rawson در سال ۱۹۹۶ نشان دادند جنین ماهی گورخری، سطوح مختلف متانول را نسبت به اتیلن گلیکول بهتر تحمل کرده و نسبت به آن حساسیت کمتری داشت. در این تحقیق به دنبال به دست آوردن مؤثرترین و کم‌خطرترین روش انجماد (زمان مناسب و ترکیب ماده ضد انجماد مناسب) در تخم لقاح یافته تاس ماهی ایرانی می‌باشیم.

مواد و روش‌ها

تخم‌های لقاح یافته از ۲ عدد تاس ماهی ایرانی (۱ نر و ۱ ماده) از کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید رجائی تهیه شد، پس از زدودن چسبندگی توسط مخلوط آب و رس، در بازه زمانی حداکثر ۵ ساعت پس از باروری تخم‌ها، توسط کیسه‌های پلاستیکی فوق اشباع شده با هوا (نسبت ۱ آب به ۳ هوا) درون جعبه‌های عایق جهت ثابت نگه‌داشتن دما در ۲۲-۲۴ درجه سانتی‌گراد، به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از انتقال تخم‌ها به آزمایشگاه اقدام به عمل غوطه‌وری تخم‌ها در محلول‌های مورد نظر در ۶ ساعت پس از لقاح در مرحله (مورولا) کردیم.

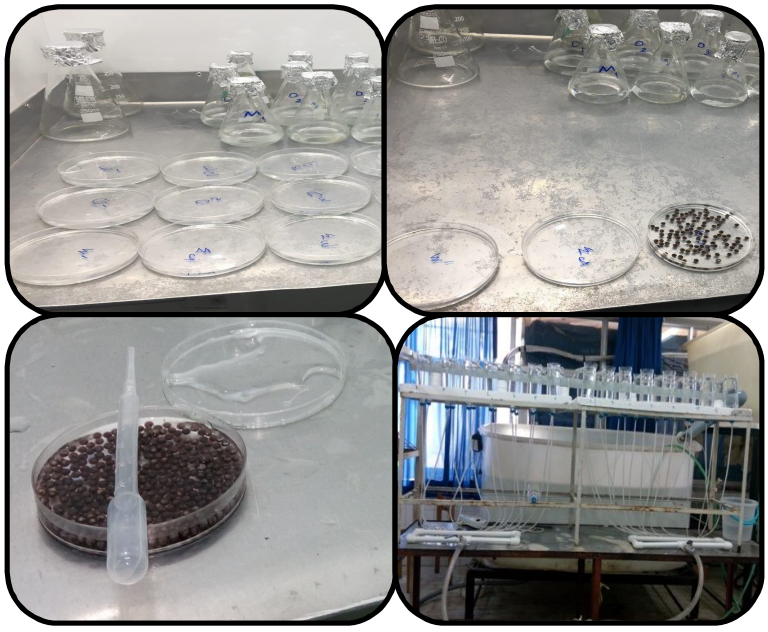
جهت فائق آمدن بر مشکل اثر سمیت مواد ضد انجماد چندین فن اتخاذ شده است. یک روش معمول استفاده از ترکیبی از این ترکیبات در محلول ضد انجماد می‌باشد. از آنجائی که غلظت هر یک از مواد ضد انجماد در حالت ترکیبی کمتر است اثر سمیت هر یک از آن‌ها نیز کاهش می‌یابد. در این تحقیق از مواد ضد انجماد نفوذپذیر متانول، دی متیل سولفوکساید و ترکیب اتیلن گلیکول به همراه دی متیل سولفوکساید و مواد ضد انجماد نفوذناپذیر سوکروز استفاده گردید.

تخم‌ها در مرحله مورولا به محلول‌های منجمدکننده مقاوم‌تر هستند (Strussmanna و همکاران، ۱۹۹۹) لذا در این مرحله در مواجهه با محلول منجمدکننده قرار گرفتند. قبل از انجماد ابتدا مراحل پیش سرمایشی جهت جلوگیری از استرس اسمزی انجام گرفت (Chen و Tian، ۲۰۰۵). به این صورت که تخم‌ها در طی ۳ مرحله با محلول‌های منجمدکننده قابل نفوذ با غلظت‌های ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ مولار به همراه سوکروز، به‌عنوان ماده غیرقابل نفوذ؛ هر مرحله نیز به مدت ۵ دقیقه به ترتیب از محلول با مولاریته کم به محلول با مولاریته بالا در نظر گرفته شد.

در این تحقیق تعداد ۵۰ عدد تخم لقاح یافته ماهی قره‌برون در هر یک از سه غلظت مورد نظر به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد غوطه‌ور شدند، برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد.

0. 5M SUC (sucrose) + 1 M DMSO (dimethylsulfoxid) + 1 M EtG (Ethylen glycol)
0. 5M SUC (sucrose) + 1 M DMSO (dimethylsulfoxid)
0. 5M SUC (sucrose) + 1 M MeOH (methanol)

سپس تخم‌ها به پلیت‌های مخصوص کشت بافت انتقال داده و با محلول PBS شستشو داده شدند، در انتها جهت بررسی نرخ تخم گشایی به انکوباتور ویس انتقال یافتند (شکل ۱). درصد تخم گشایی تخم‌هایی که در معرض مواد منجمدکننده قرار نگرفتند به‌عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند.



شکل ۱- مراحل انجام آزمایش

آنالیز داده‌ها: جهت بررسی سمیت مواد ضد انجماد با تعیین درصد تفریخ لارو صورت گرفت.

۱۰۰× (تعداد تخم‌های داخل انکوباتور / تعداد تخم‌های هچ شده) = درصد تخم گشایی

جهت دست‌یابی به این هدف از کاربرد بسته نرم‌افزاری SPSS جهت بررسی و مقایسات میانگین که داده‌های به دست آمده از میانگین ± انحراف معیار درصد تخم گشایی با ۳ تکرار بین تیمار با توجه به آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA One Way) انجام گرفت (سطح معنی‌داری P<۰/۰۵). نرم‌افزار Excel نیز جهت وارد نمودن داده‌های طرح و همچنین رسم نمودارها بکار گرفته شد.

نتایج

میزان درصد تخم گشایی در گروه کنترل (فاقد هیچ گونه ماده ضد انجماد و بدون قرارگیری در سرما) ۴۰/۲۵±۵/۶۷ درصد بوده است. مقایسه اثر سمیت مواد ضد انجماد متانول، دی متیل سولفوکساید و ترکیب دی متیل سولفوکساید به همراه اتیلن گلیکول بر درصد تخم گشایی مرحله مورولای جنینی در غلظت‌های مختلف (۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ مولار) نشان داد که درصد هچ تخم‌های غوطه‌ور شده در محلول حاوی دی متیل سولفوکساید با غلظت ۰/۵ مولار

(۴۸±۱۱/۳۱) بیشتر از تیمارهای دیگر بوده است اما اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (p>۰/۰۵).

مقایسه میانگین داده‌ها در بین سه ماده مورد استفاده متانول، دی متیل سولفوکساید و ترکیب اتیلن گلیکول به همراه دی‌متیل‌سولفوکساید در مرحله مورولای جنینی تغییرات معنی‌داری را در غلظت‌های مختلف و مشابه از هر سه مواد مورد آزمایش نشان نداد (p>۰/۰۵). (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه مقدار میانگین بین مواد مورد آزمایش در غلظت‌های مختلف بر روی درصد بقاء

غلظت‌های مختلف / مواد	۰/۵ مولار	۰/۷۵ مولار	۱ مولار	F	P
DMSO+ SUC	۴۸±۱۱/۳۱^{Aa}	۴۴±۵/۲۹^{Aa}	۳۶/۶۶±۷/۰۲^{Aa}	۱/۴۹	۰/۳۱
MeOH+ SUC	۳۳±۱۸/۳۸^{Aa}	۴۳/۳۳±۱۵/۰۱^{Aa}	۴۴/۶۶±۸/۰۸^{Aa}	۰/۵۰	۰/۶۳
EtG+ DMSO+ SUC	۳۸±۲/۸۲^{Aa}	۳۰/۶۶±۱۱/۰۱^{Aa}	۳۷/۳۳±۱۰/۰۶^{Aa}	۰/۵۰	۰/۶۳
Control		۴۰/۲۵±۵/۶۷			

حروف انگلیسی مشابه در هر ستون و سطر بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف بر روی درصد بقاء در سطح ۰/۰۵ و تحت آزمون دانکن می‌باشد.

داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است.

حروف بزرگ لاتین: مقایسه میانگین‌ها به‌صورتعمودی. حروف بزرگ لاتین:. مقایسه میانگین‌ها به‌صورتافقی

بحث و نتیجه‌گیری

در بررسی‌های صورت گرفته در زمینه انجماد جنین موجودات، اطلاعات مربوط به سمیت مواد ضد انجماد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. رایج‌ترین مواد قابل نفوذ شامل متانول، دی متیل سولفوکساید (DMSO)، اتیلن گلیکول (EG)، پروپیلن گلیکول (PG) و گلیسرول می‌باشند. در فرایند انجماد جنینی ازمواد ضد انجماد متنوعی استفاده می‌شود، ولی از میان آن‌ها DMSO کاربرد بیشتری دارد. در این مطالعه نیز به بررسی اثر سمیت سه مواد ضد انجماد نفوذپذیر متانول، دی متیل سولفوکساید و ترکیب اتیلن گلیکول به همراه دی متیل سولفوکساید بر جنین ماهی قره‌برون مورد بررسی قرار گرفت.

مواد ضد انجماد این توانایی را دارند که سمیت یکدیگر را کاهش دهند. به‌عنوان مثال ترکیب دی متیل سولفوکساید به همراه سایر مواد ضد انجماد یک ترکیب گرمازاست. در ترکیب فرمامید به همراه دی متیل سولفوکساید نسبت به اتیلن گلیکول گرمای بیشتری آزاد می‌شود و بدین ترتیب فرمامید نسبت به اتیلن گلیکول توانایی بیشتری در کاهش سمیت دی متیل سولفوکساید دارد. ترکیب دی متیل سولفوکساید به همراه فرمامید سبب می‌شود که توانایی زیستی کلیه به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یابد، که با دی متیل سولفوکساید به‌تنهایی امکان‌پذیر نیست (کیوانلو و همکاران، ۱۳۹۲).

به‌طورکلی، اثرات هر ماده ضد انجماد علاوه بر ویژگی و خاصیت شیمیایی آن، به مرحله تکامل و نوع گونه نیز بستگی دارد (Cabrita و همکاران، ۲۰۰۶؛ Suzuki و همکاران، ۱۹۹۵). بنابراین مرحله تکامل جنینی که در معرض انجماد قرار می‌گیرند از جمله فاکتورهای مؤثر بر درصد بقای جنین می‌باشد. لارو ماهیان در مرحله اول تکامل جنینی از نفوذپذیری و تراوایی نسبتاً بالایی برخوردار هستند اما نسبت به ورود مواد ضد انجماد و تغییرات غلظت مایعات

درون و برون سلولی بسیار حساس بوده و خطر مرگ جنین وجود دارد (Vuthiphandchai و همکاران، ۲۰۰۵). در طی مراحل تکامل جنینی در آبزیان مانند ماهی حساسیت به مواد ضد انجماد کاهش یافته و مقاومت در برابر سمیت مواد ضد انجماد افزایش می‌یابد (Simon و همکاران، ۱۹۹۴؛ Dinnyes و همکاران، ۱۹۹۸). با توجه به مطالعات صورت گرفته در مطالعه حاضر نیز از تخم لقاح یافته در مرحله مورولا (۶ ساعت بعد از لقاح) به دلیل حساسیت کمتر جنین به مواد ضد انجماد استفاده شد.

از میان مواد ضد انجماد مورد بررسی در این تحقیق، ترکیب اتیلن گلیکول به همراه دی متیل سولفوکساید بیشترین سمیت را در جنین ماهی قره‌برون داشت. همچنین جنین ماهی قره‌برون سطوح مختلف متانول را نسبت به ترکیب اتیلن گلیکول به همراه دی متیل سولفوکساید بهتر تحمل کرد و نسبت به آن حساسیت کمتری داشت که پس از مواد ترکیبی اتیلن گلیکول به همراه دی متیل سولفوکساید، بیشترین سمیت مربوط به متانول بود. همچنین جنین ماهی مورد مطالعه در این تحقیق سطوح مختلف از مواد دی متیل سولفوکساید را نسبت به دو ماده دیگر بهتر تحمل کرده و حساسیت کمتری نسبت به آن‌ها نشان دادند؛ اگرچه اختلاف معنی‌دار آماری بین غلظت‌های انتخاب شده، از لحاظ درصد بقا در هر سه تیمار از مواد دی متیل سولفوکساید، متانول و ترکیب اتیلن گلیکول به همراه دی متیل سولفوکساید در مرحله مورولا با گروه شاهد وجود نداشت ($P>0/05$، تحت آزمون دانکن). Higaki و همکاران (۲۰۱۰) طی تحقیقی بر روی ماهی گورخری با به‌کارگیری ۵ ماده ضد انجماد در سه مرحله بلاستولا، گاسترولا و در مرحله تقسیم، نشان دادند که انجماد سریع جنین در مرحله تقسیم، بهترین زمان برای انجماد سلول‌های زایای اولیه می‌باشد. نتایج ما نیز نشان‌دهنده مقاومت بالاتر جنین در مرحله مورولا به مواد ضد انجماد در هر سه محلول ضد انجماد می‌باشد. در مطالعه حاضر توالی مسمومیت‌زایی مواد ضد انجماد در جنین ماهی قره‌برون را می‌توان دی‌متیل سولفوکساید< متانول <ترکیب اتیلن گلیکول به همراه دی متیل سولفوکساید گزارش کرد.

Zhang و همکاران (۲۰۰۵) توالی مسمومیت‌زایی مواد ضد انجماد در جنین فلاندر را به‌ترتیب پروپیلن گلیکول<متانول< دی‌متیل سولفوکساید< گلیسرول گزارش کردند. توالی مشابه سمیت زایی نیز در جنین ماهی گورخری (Zhang و همکاران، ۲۰۰۵) و در سوف ماهی دریایی (Tian و همکاران، ۲۰۰۳) گزارش شد. بر اساس گزارش Dinnyes و همکاران (۱۹۹۸) در جنین ماهی کپور معمولی به ترتیب سمیت متانول< دیمتیل سولفوکساید< گلیسرول در مدت زمان ۴ و ۸ ساعت مرحله جنینی بود درحالی‌که در مرحله ۳۲ ساعته جنینی ترتیب سمیت مواد ضد انجماد متانول< گلیسرول< دیمتیل سولفوکساید بوده است. در اکثر مطالعات اثر سمیت اتیلن گلیکول را بیشتر از دی متیل سولفوکساید نشان دادند. نتایج تحقیقات Chen و Tian (۲۰۰۵) در جنین ماهی فلاندر نشان داد، اتیلن گلیکول در تمامی غلظت‌های مورد بررسی برای جنین این گونه سمی بود، همچنین نتایج بیانگر آن بود که متانول سمیت کمتری نسبت به اتیلن گلیکول داشت. Robertson و همکاران در سال ۱۹۸۸ نیز بیان کردند اتیلن گلیکول حتی در پایین‌ترین غلظت هم اثرات سمی روی جنین ماهی باس کانالی دارد. با این حال، نتایج بررسی‌های Cabrita و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان داد اتیلن گلیکول ماده ضد انجمادی است که کمترین سمیت را در مراحل تکامل جنینی سیم دریایی سر طلایی دارد. نتایج

بررسی‌های Zhang و Rawson در سال ۱۹۹۶ نشان دادند جنین ماهی گورخری، سطوح مختلف متانول را نسبت به اتیلن گلیکول بهتر تحمل کرده و نسبت به آن حساسیت کمتری داشت. بنابراین در مطالعه حاضر نیز ممکن است که ترکیب اتیلن گلیکول به همراه دی متیل سولفوکساید با دخالت در متابولیسم جنینی، در نتیجه منجر به کاهش نرخ بقا نسبت به دیگر مواد مورد استفاده شده باشد. Keiwanloo و Sudagar (۲۰۱۳) اثر سمیت ۶ ماده ضد انجماد نفوذپذیر DMSO، اتیلن گلیکول، پروپیلن گلیکول، استامید، متانول و گلیسرول را در غلظت‌های ۱ تا ۶ مولار و ۳ ماده ضد انجماد غیرقابل نفوذ سوکرز و عسل (۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد) و پلی ونیل پیرولیدون (۵ ، ۱۰ و ۱۵ درصد) را در مدت زمان مواجهه ۵ و ۱۰ دقیقه در مرحله جنینی ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از لقاح در تاس ماهی ایرانی مورد ارزیابی قرار دادند ایشان اذعان داشتند که جنین این ماهی بیشترین مقاومت را به مواد ضد انجماد در ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از لقاح و با محلول حاوی ۱ و ۲- پروپان دی اُول دارد و علت کاهش درصد تفریخ را شوک اسمزی، عدم تعادل یونی و یا اثر سمیت مواد ضد انجماد دانستند که نتایج ایشان در مورد مواد ضد انجماد با نتایج تحقیق حاضر مغایر می‌باشد. طبق گزارش Hoetelmans و همکاران (۲۰۰۱)، متانول نیز با برهم‌کنش بر فسفولیپید غشا و بر هم زدن ساختار دو لایه لیپیدی باعث آسیب سلولی می‌شود. به این ترتیب که قسمت غیر قطبی الکل باعث ایجاد فاصله در بین زنجیره‌های چربی غشای داخلی و آسیب در ساختار آن می‌گردد (Patra و همکاران، ۲۰۰۶). همچنین DMSO باعث دناتره شدن پروتئین‌ها می‌شود (Parkes و Smith، ۱۹۵۳).

در مطالعه حاضر نیز می‌توان پیشنهاد داد که سوکروز هم به‌عنوان یک ماده ضد انجماد نفوذناپذیر در فرایند دهیدراسیون انجماد جنینی با حفظ ساختار و عملکرد کامل جنین منجر به کاهش نرخ بقا در هریک از غلظت‌های مورد مطالعه نشده است. بنابراین با استفاده از یک پروتکل گام به گام طراحی شده در این مطالعه جهت جلوگیری از قرار گرفتن مستقیم جنین در غلظت بالایی از مواد ضد انجماد منجر به کاهش استرس اسمزی شده و اختلاف معنی‌دار آماری ($p>۰/۰۵$) بین تیمارها مشاهده نشده است.

نتیجه‌گیری

این احتمال وجود دارد که این ترکیبات (مواد ضد انجماد) سبب ایجاد اثرات زیان‌آوری در همه یا بخشی از پیکره موجود شده و از این‌رو درصد تفریخ را کاهش دهند. سمیت این مواد به عواملی نظیر؛ غلظت آن‌ها، دما و مدت زمان در معرض گذاری سلول با مواد ضد انجماد و گونه مورد مطالعه مرتبط است. با استفاده از اطلاعات به‌دست‌آمده در زمینه اثرات و حدود سمیت مواد ضد انجماد، می‌توان اقدام به ساخت محلول‌های شیشه ساز برای نگه‌داری جنین ماهیان در درجه حرارت‌های پایین برای مدت نامحدود نمود به‌طوری که پس از خروج از حالت انجماد بتوانند به حیات طبیعی خود ادامه دهند. نکته قابل توجه در فن انجماد جنینی ماهی دستیابی به محلول ضد انجماد با بالاترین کارایی و کمترین سمیت در گونه مورد نظر می‌باشد. در نتیجه می‌توان از مواد ضد انجماد مورد هدف در این مطالعه جهت انجماد جنین ماهی قره‌برون در مرحله مورولا با توجه به آثار کم سمی خود استفاده کرد. مطالعات بیشتر در این زمینه نیز منجر به دستیابی بهترین محلول با مناسب‌ترین غلظت جهت انجماد جنین این ماهی خواهد شد.

References

1. Kiwanloo, S. and Soodagar, M., 2013. Toxicity of some antifreeze substances in embryos of Qarabrun fish by immersion method. Journal of Applied Biology. 75-62.
2. Cabrita, E., Robles, V., Wallace, J.C., Sarasquete, M.C. and Herra´ez, M.P., 2006. Preliminary studies on the cryopreservation of gilthead seabream (Sparusaurata) embryos. Aquaculture 251, 245-255.
3. Cabrita, E., Sarasquete, C., Martinez-paramo, S., Robles, V., Beirao, J., Perez-Cerezales, S. and Herraez, M.P., 2010. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives' Journal of Applied Ichthyology 26(5), 623-635.
4. Chao, N.H., Chiang, C. P., Hsu, H.W., Tsai, C.T. and Lin, T.T., 1994. Toxicity tolerance of oyster embryos to selected cryoprotectants', Aquatic Living Resources 7(02), 99-104.
5. Chen, S. and Tian, Y., 2005. Cryopreservation of flounder (*Paralichthy solivaceus*) embryos byvitrification. Theriogenology 63, 1207-1219.
6. Clegg, J., Seitz, S., Seitz, P. and Wand Hazlewood, C.F., 1982. Cellular response to extreme water loss: The water-replacement hypothesis. Cryobiology 19, 306-316.
7. Cloud, J. G., Erdahl, A.L. and Graham, E.F., 1998. Survival and continued normal development of fish embryos after incubation at reduced temperatures. Transaction of American Fish Society 117, 503-506.
8. 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.
9. Edashige, K., Valdez, D.M., Hara, T., Saida, N., Seki, S. and Kasai, M., 2006. Japanese flounder (*Paralichthy solivaceus*) embryos are difficult to cryopreserve by vitrification. Cryobiology 53(1), 96-106.
10. Fahy, G.M., 1986. There levance of cryoprotectant "toxicity" tocryobiology, Cryobiology 23(1), 1-13.
11. Gwo, J.C., 2000. Cryopreservation of eggs and embryos from aquatic organisms. In: Tiersch TR, Mazik PM, editors.
12. Haga, Y., 1982. On the subzero temperature preservation of fertilized eggs of rainbow trout. Nippon Suisan Gakkaishi 48: 1564-1572
13. Higaki, S., Eto, Y., Kawakami, Y., Yamaha, E., Kagawa, N., Kuwayama, M., Nagano, M., Katagiri, S. and Takahashi, Y., 2010. Production of fertile zebra fish (Daniorerio) possessing germ cells (gametes) originated from primordial germ cells recovered from vitrified embryos. Reproduction 139, 733-740.
14. Hoetelmans, R.W., Prins, F.A., Velde, I., Meer, J., Velde, C.J. and Donck, J.H., 2001. Effects of acetone, methanol or para formaldehyde on cellular structure, visualized by reflection contrast microscopy and transmission and scanning electron microscopy. Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology 9(4), 346-51.
15. Jalali, M.A., Hosseini, S.A. and Imanpour, M.R., 2010. Physiological characteristics and stress resistance of greatsturgeon (Huso huso) juveniles fed with vitamins C, E and Hufa-enriched Artemia urmiana nauplii. Fish Physiology and Biochemistry 36, 555-564.
16. Keiwanloo, S., and Sudagar, M., 2012. Preliminary Studies on the Cryopreservation of Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) Embryos. Access Scientific Reports 2:3.
17. Li, S., Mao, Z., Han, W., Sun, Z., Yan, W., Chen, H. and Yan, S., 1993. In vitro oocytes maturation in the zebra fish and the fertilization and development of the mature egg. Chinese Journal of Biology 19(4), 247-255.
18. Mazur, P., 2004. Principles of cryobiology. In: Life in the Frozen state Ed. Fuller, B.J., Lane, N., Benson, E.E. CRC press, 214-315.
19. Parkes, A.S. and Smith, A.U., 1953. Regeneration of rat ovarian tissue grafted after exposure to low temperatures. Proceedings of the Royal Society of London 140, 455-470.

20. Patra, M., Salonen, E., Terama, E.,Vattulainen, I., Faller, R., Lee, B.W., Holopainen, J. and Karttunen, M., 2006. Under the Influence of Alcohol: The Effect of Ethanol and Methanol on Lipid Bilayers, Biophysical Journal 90(4), 1121-1135.
21. Rana, K., 1995. Preservation of gametes. In: Bromage NR, Roberts RJR (Eds) Brood stock Management and Egg and Larval Quality, Iowa State Press, Blackwell, London, pp. 53-75.
22. Robertson, S.N., Lawrence, A.L., Neil. W.H., Arnold, C.R. and McCarty, G., 1988. Toxicity of the cryoprotectants glycerol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, methanol, sucrose, and sea salt solution to the embryos of red drum. The Progressive Fish Culturist 50, 148-154.
23. Shepard, M.L., Goldston, C.S. and Cocks, F.H., 1976. The H2O-NaCl-glycerol phase diagram and its application in cryobiology. Cryobiology 13(1), 9-23.
24. Simon, C., Dumont, P., Cuende, F.X. and Diter, A., 1994. Determination of suitable freezing media for cryopreservation of *Peneus indicus* embryos. Cryobiology 31, 245-253.
25. Strssmanna, C., Nakatsugawaa, H., Takashimaa, F., Hasobea, M., Uzukib, T. and Takaib, R., 1999. Cryopreservation of Isolated Fish Blastomeres: Effects of Cell Stage, Cryprotectant Concentration, and Cooling Rate on Postthawing Survival. Cryobiology 39(3), 252-261.
26. Suzuki, T., Komada, H., Takai, R., Arii, K. and Kozima, T.T., 1995. Relation between toxicity of cryoprotectant Me 2 SO and its concentration in several fish embryos. Fisheries Scinece 61, 193-197.
27. Tian, Y.S., Chen, S.L., Yan, A.S., Ji, X.S. and Yu, G.C., 2003. Studies on vitrification method of sea perch (*Lateo labrax japonicus*) embryos. Acta Zoologica Sinica 49, 843-50.
28. Vuthi phandchai, 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.
29. Wang, T., Banker, M.C., Claydon, M., Hicks, G.L Jr. and Layne, J.R. Jr., 1992. Freeze in preservation of the mammalian cardiac explant. V. Cryoprotection by ethanol. Cryobiology 29(4), 470-477.
30. Yamamoto, N., 1989. Effect of dimethyl sulfoxide on cytosolicionized calcium concentration and cytoskeletal organization of hapatocytes in a primary culture. Cell Structure Function 14, 75-85.
31. Zhang, T. and Rawson, D.M., 1996. Feasibility studies on verification of intact Zebra fish (*Brachy daniorerio*) embryos. Cryobiology 33, 1-13.
32. Zhang, T., Isayeva, A., Adams, S.L. and Rawson, D.M., 2005. Studies on membrane permeability of zebra fish (*Danio rerio*) oocytes in the presence of different cryoprotectants. Cryobiology 50(3), 285-293.
33. Zhang, T., Rawson, D.M. and John Morris, G., 1993. Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebra fish (*Brachydanio rerio*). Aquatic Living Resources 6(02), 145-153.
34. Zhang, X.S., Zhao, L., Hua, T.C., Chen, X.H. and Zhu, H.Y., 1989. 'A study on the cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) embryos. Cryo Letters 10, 271-278.

New Technologies in Aquaculture Development, Islamic Azad University, Azadshahr Branch
Vol. 14, No. 3, Autumn 2020

The effect of some cryoprotectants on the hatching rate of sturgeon embryos (*Acipenser persicus*)

M. Ganjibakhsh[1], H. Gholipour Kanani[2*], P. Farzaneh[1], K. Jome Khaledi[1], M. Harsij[2], S. Dad[2], S.A. Shahzadeh Fazeli[1]
[1]Human and Animal Cell Bank, Iranian Biological Resource Center, Tehran, Iran
[2]Dept. Of Fisheries, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran

Abstract

Cryopreservation of fish embryo is replacement of cryoprotectants with water in side embryo. Cryopreservation of fish embryos requires an optimal concentration of cryoprotectants inside all embryo compartments. At this study toxicity of cryoprotectants, fish embryos were examined in stage (6 hours after fertilization).In the present study, to evaluate the cryoprotectant toxicity was determined in sturgeon embryos at morula stage (6 hours after fertilization). From permeable cryoprotectants, methanol, dimethyl sulfoxide and combination of dimethyl sulfoxide with ethylene glycol in concentrations (0.5, 0.75, and 1 M) and non-permeable, sucrose was used. Embryos treated in three stage and for each stage about 5 minutes from low to above molarity, and the embryos were incubated until hatching. There were no significant differences between cryoprotectants differences concentrations, in terms of hatching rate in each of three treatment compared with the controls (P>0.05 and under Duncan). However among the permeable cryoprotectants, combination of dimethyl sulfoxide with ethylene glycol had the highest toxicity for sturgeon embryos. But embryos better tolerated differences concentrations of dimethyl sulfoxide than two other cryoprotectants and less sensitive than.

Keywords: Cryopreservation, Cryoprotectant toxicity, Hatching rate, Sturgeon embryos

[*]Corresponding author; gholipourk@gmail.com