"مقاله پژوهشی"

بهینه سازی روش اشعه دهی UV جهت تخریب DNA اسپرماتوزوای تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*) در مطالعات گاینوژنزیز: سنجش کامت

محمد حسن زاده صابر*[۱]، حسین ذوالقرنین[۲]، محمد علی سالاری علی آبادی[۲]، محمد علی یزدانی ساداتی[۳]، مهتاب یارمحمدی[۱]

۱. گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج جهاد کشاورزی، رشت، ایران

۲. گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر

۳. گروه تکثیر و پرورش، موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج جهاد کشاورزی، رشت، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۱۰

چکیده

القای گاینوژنزیز (ماده زایی) به اسپرماتوزوا با DNA تخریب شده همزمان با تحرک بالا نیاز دارد. در این مطالعه برای بدست آوری این قابلیت در اسپرماتوزوای تاسماهی سیبری از اشعه UV با دوز ۴۲۵۷ ژول بر متر مربع استفاده شد. ابتدا مایع سمینال با استفاده از سانتریفیوژ از اسپرماتوزوا جدا شد و سپس اسپرم ۱۰ درصد تهیه و تحت تابش اشعه UV در زمان های ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ ثانیه قرار گرفت تا بهترین میزان تحرک و درصد تخریب DNA با استفاده از روش سنجش دنباله (comet assay) در مقایسه با شاهد بدست آید. همزمان قابلیت لقاح این اسپرم ها در تخمک تاسماهی استرلیاد و میزان لارو تفریخ شده آن آزمایش گردید. بر اساس نتایج بدست آمده بهترین مدت زمان اشعه دهی به اسپرماتوزوا ۹۰ ثانیه تعیین شد که در این مدت، میزان تخریب DNA دنباله ۱/۹۶ ± ۳۲/۲۷ درصد، میزان تحرک اسپرم اشعه داده ۵۰ درصد با حرکت رو به جلو، میزان لقاح ۰/۵۲ ± ۵۲/۱ درصد و میزان تفریخ تخم ۰/۱۱ ± ۱/۱ درصد بدست آمد. بنابراین اسپرم تاسماهی سیبری غیرفعال شده ژنتیکی می تواند در مطالعات گاینوژنزیز بین گونه ای در تاسماهیان با هدف تولید نتاج تمام ماده و به منظور حفاظت از انقراض آنها استفاده شود.

کلمات کلیدی: تاسماهی سیبری، اسپرماتوزوا، سنجش کامت، لقاح، تفریخ.

* عهده‌دار مکاتبات (✉). saber.merag@gmail.com

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.10.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.1]

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-03]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.10.5]

[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.1]

مقدمه

تاسماهیان یکی از قدیمی ترین خانواده ماهیان بوده که راسته آنها با ۲ خانواده Acipenseridae با ۴ جنس *Acipenser* (۱۷ گونه)، *Huso* (۲ گونه)، *Scaphirhynchus* (۳ گونه) و *Pseudoscaphirhynchus* (۳ گونه) و خانواده Polyodontidae با ۲ جنس *Polyodon* (۱ گونه) و *Psephurus* (۱ گونه) می‌باشند. آنها در حدود ۲۰۰ میلیون سال قبل توسعه یافته‌اند و دوبرابر شدن ژنوم آنها چندین بار اتفاق افتاده و با گونه‌زایی ادامه پیداکرده-است که در حال حاضر ۲۷ گونه از تاسماهی شکلان وجود دارد (Fopp-Bayat *et al*., 2017). ۱۷گونه از ۲۷ گونه این ماهیان در جهان نیز در محیط طبیعی به شدت در معرض خطر انقراض می باشند و ۸۵ درصد آنها در خطر انقراض هستند (IUCN, 2010). به دلیل کاهش جمعیت تاسماهیان لازم است که پرورش آنها در آبزی‌پروری گسترش‌یابد. تولید آنها در شرایط کنترل شده در دهه های اخیر افزایش یافته است و به سمت تجاری شدن (Wei *et al*., 2011; Bronzi *et al*., 2011) و به خصوص با اهداف حفاظتی پیش می-رود (Takahashi and Officer, 2010; Williot *et al*., 2002).

تاسماهی سیبری در حوضه آبریز سیبری، دریای کارا، دریای لاپتف و شرق دریای سیبری شرقی آب‌های داخلی، رود اب، رود سنی سئی، دریاچه بایکال، رود آنگارا، رود لنا، رود کولیما در قزاقستان و جمهوری خلق چین و بخش‌هایی از روسیه یافت می‌شود و گونه اصلی پرورش تاسماهیان در آسیا-اروپا است (Williot *et al*., 2001). این گونه علاوه بر اینکه به عنوان گونه پرورشی جدید با سرعت رشد و عادت پذیری بالا است، اخیرا از اسپرم آن در دستکاری های ژنتیکی به منظور تولید تاسماهیان تمام ماده استفاده شده است (Saber *et al*., 2014). برای این منظور بایستی DNA اسپرماتوزوا با استفاده از موتاژن های فیزیکی و شیمیایی تخریب گردد که در بین موتاژن های فیزیکی، اشعه UV به علت قابلیت حمل ونقل ساده دستگاههای مورد استفاده و کم خطر بودن بیشتر ترجیح داده می‌شود (Lebeda *et al*., 2014). این اشعه قابلیت شکست کروموزوم و DNA را دارد (Pandian, 2011) و آسیب‌هایی روی DNA ایجاد می‌کند که ممکن است باعث شکست زنجیره دوتایی آن (Duble Strand Breaks) شود (Piferrer *et al*., 2004). غیرفعال سازی DNA هسته-ای در اسپرماتوزوای ماهیان برای القای گاینوژنزیز و ایجاد فرزندانی با DNA هسته ای مادری مفید هستند، زیرا می‌تواند نتاج تمام ماده در گونه هایی نظیر تاسماهیان جهت دستیابی به خاویار ایجاد نماید (Pandian, 2011; Fopp-Bayat *et al*., 2007). از طرفی در تاسماهیان و گونه های در حال انقراض که دارای سیستم تعیین جنسیت هتروگامتی ماده هستند، گاینوژنزیز می تواند هر دو جنس نر و ماده را با نسبت متفاوت تولید نماید (حسن زاده صابر و همکاران، ۱۳۹۸، Grunina *et al*., 2011). برای این منظور نیاز به غیرفعال کردن ژنوم اسپرماتوزوا و توانایی باروری بالا بطور همزمان می‌باشد.

سنجش دنباله (comet assay) یا الکتروفورز ژل سلولهای منفرد (SCGE) می‌تواند غیرفعال سازی DNA اسپرماتوزوا و شکست رشته ای در سلول ها با اشعه را به عنوان روشی تطبیق پذیر، حساس و کم

هزینه ارزیابی کند (Collins, 2004; Simon and Carrell, 2013) و به‌منظور نظارت بر تاثیر این روش استفاده شود. تاکنون از سنجش دنباله برای تعیین درصد تخریب DNA در اسپرم UV داده شده تاسماهیان استفاده نشده است. تلفیق سنجش دنباله و آنالیز تحرک اسپرم برای بهینه نمودن پروسه های گاینوژنتیک در ماهیان پیشنهاد شده است (Dietrich *et al*., 2005; Lebeda *et al*., 2014). عامل دیگر در ارزیابی کیفی اسپرم، میزان لقاح اسپرم در بدو ورود به تخم و تفریخ آن می‌باشد (برادران نویری و حسن زاده صابر، ۱۳۹۷ ;Cabrita *et al*., 2008). در اکثر گونه های دریایی این بررسی تا تفریخ لارو نیز می‌تواند انجام شود چون زمان تکامل جنینی خیلی کوتاه است ولی در گونه هایی که زمان تکامل جنینی خیلی طولانی دارند می توان بعد از مرحله گاسترولاسیون این ارزیابی را انجام داد (Cabrita *et al*., 2008).

هدف از انجام این تحقیق دستیابی به مناسب ترین دوز اشعه UV جهت تخریب DNA اسپرم تاسماهی سیبری همزمان با حفظ تحرک آن با استفاده از سنجش دنباله، لقاح و تفریخ در مطالعات القای گاینوژنزیز بود.

مواد و روش‌ها

این بررسی در فروردین سال ۱۳۹۵ در سایت تکثیر و بازسازی ذخایر موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر انجام پذیرفت. یک مولد ماده با کیفیت مناسب تاسماهی استرلیاد که کیفیت تخمک های آن بر اساس مهاجرت قطب حیوانی (GV) تایید گردید (بهمنی و کاظمی، ۱۳۷۷) و همچنین یک مولد نر تاسماهی سیبری مناسب جهت دریافت اسپرم آن و در معرض قرار گیری اشعه UV و لقاح انتخاب گردید. جهت رسیدگی جنسی مولد ماده با توجه به درجه حرارت آب (۰/۵± ۱۵ درجه سانتی‌گراد) از هورمون GnRH ساخته شده در شرکت ثامن به میزان ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم در دو مرحله که در مرحله اول ۲۰٪ و بعد از ۶ ساعت، باقیمانده هورمون به مولد ماده در داخل عضله پشتی استفاده‌گردید. برای تاسماهی سیبری نر، تزریق GnRH در یک مرحله (همزمان با تزریق دوم مولد ماده) به میزان ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم صورت گرفت. سپس اسپرم و تخمک بترتیب از مولد نر و ماده استحصال گردید (پوردهقانی و همکاران، ۱۳۸۹). به میزان ۴۰ میلی لیتر اسپرم از تاسماهی سیبری دریافت شد که ۱۰ میلی لیتر آن، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و از ۳۰ میلی‌لیتر اسپرم باقیمانده، مایع سمینال، با استفاده از سانتریفوژ با دور ۵۰۰۰ در دقیقه بمدت ۵ دقیقه جداگردید.

از مایع سمینال جهت رقیق سازی اسپرم استفاده شد، زیرا اسپرم‌ها در مایع سمینال هیچگونه تحرکی ندارند و در طی مدت تاباندن اشعه UV بدون تحرک باقی می‌مانند. از آنجائیکه غلظت اسپرم دریافتی از تاسماهی سیبری $۱/۵۶ \times ۱۰^{۹}$ اسپرم در میلی‌لیتر مکعب بود، برای تاباندن اشعه UV نیاز به اسپرم رقیق شده است. بنابراین به میزان ۰/۹ میلی لیتر از مایع سمینال با ۰/۱ میلی لیتر از اسپرم اولیه (۱۰٪) در داخل پتری دیش با قطر ۳/۲ سانتی متر و به عمق ۱ میلی متر ریخته شد. ضخامت کم محلول اسپرم سبب می‌گردد تا تاثیر اشعه UV بر روی آن بیشتر باشد. به منظور جلوگیری از کم شدن تحرک ناشی از گرمای حاصل از تابش اشعه به اسپرم، ظرف (پتری دیش) حاوی اسپرم بر روی محلول آب سرد شده قرارگرفت. همچنین به

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.10.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.1]

منظور جلوگیری از فعالیت مجدد اسپرم اشعه دیده در نور بلافاصله اسپرمهای UV داده شده و استوک در ظروف تیره ریخته شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

در این بررسی از لامپ UV مدل UVG-54 با طول موج کوتاه ۲۵۴ نانومتر ساخت شرکت UVP آمریکا (CA-91786-Upland) استفاده گردید. در هنگام اشعه دهی، منبع نوری و پتری دیش حاوی اسپرم بر روی یک شیکر اوربیتالی با دور ۹۰ در دقیقه حرکت داده شد تا تابش اشعه بطور تقریبا یکسان بر تمامی اسپرمها باشد. فاصله منبع UV با اسپرم رقیق شده ۱۲ سانتی‌متر بود. شدت تابش اشعه UV در فاصله مذکور ۴۷۳ میکروووات/ سانتی متر مربع ثبت شد (اندازه‌گیری شده در سازمان انرژی اتمی ایران، ۱۳۸۴). شدت موثر UV، بر اساس روش Hassanzadeh Saber و همکاران (۲۰۰۸) تعیین شد. سپس پتری دیش حاوی اسپرم رقیق شده در فواصل زمانی مختلف ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰و ۱۵۰ ثانیه در معرض لامپ UV قرار داده شد و پس از هر مدت اشعه، یک نمونه اسپرم اشعه داده شده با یک نمونه اسپرم شاهد جهت ارزیابی میزان تحرک اسپرم به طور همزمان در زیر میکروسکوپ مورد بررسی‌قرارگرفت. برای این منظور، ۱۰ میکرولیتر از اسپرم را با ۵۰۰ میکرولیتر محلول فعال کننده (آب) ، مخلوط (Aramli *et al.*, 2015) و سپس منحنی کاهش تحرک اسپرم‌های اشعه دیده در مقایسه با اسپرم‌های شاهد رسم گردید (شکل ۱).

برای اجرای آزمایش ارزیابی تخریب تک سلولی ژل الکتروفورز یا سنجش دنباله، ابتدا ۲۰ میکرولیتر نمونه اسپرم از هر تیمار با ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (PBS) عاری از Ca^{2+} و Mg^{2+} مخلوط شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از محلول رقیق‌شده فوق با ۱۰۰ میکرولیترآگارز با نقطه ذوب پایین (۰/۷۵ درصد) (۴۰ درجه سانتی‌گراد) مخلوط گردید (Li *et al.*, 2008). از این مخلوط ۱۲۰ میکرولیتری، برای تهیه دو ژل کوچک (با حجم ۶۰ میکرولیتر) برای هر نمونه استفاده شد. هر حجم ۶۰ میکرولیتری به‌طور جداگانه بر روی لام سمباده‌ای که از قبل با آگارز با نقطه ذوب معمولی (۱/۲ درصد) از روز قبل پوشانده شده بود ریخته شد. سپس، هر یک از ژل‌ها با لامل پوشانده شده و جهت بسته‌شدن به مدت ۱۰ دقیقه در یخچال (۴+ درجه‌ی سانتی‌گراد) قرار گرفتند. پس از این مدت، لامل‌ها از روی ژل‌ها برداشته شده و لام حاوی ژل‌ها برای حذف سیتوپلاسم و غشای اسپرم در بافر تجزیه‌کننده (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10) تازه وخنک قرار گرفت. ۶۰ دقیقه بعد، برای باز شدن پیچش DNA، لام‌ها بطور افقی در تانک الکتروفورز حاوی بافر قلیایی (0.3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH 13) به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند. به منظور حرکت دادن قطعات شکسته شده DNA، پس از این مدت لام‌ها در همان بافر به مدت ۳۵ دقیقه مورد الکتروفورز (1 Vcm-1 و 300 mA) قرار گرفتند. در خاتمه الکتروفورز، لام‌ها سه مرتبه و هر بار به مدت ۵ دقیقه با بافر تریس (0.4 M Tris-HCl pH 7.5) و پس از آن با آب‌مقطر دوبار تقطیر شست‌وشو داده شده و پس از شست‌وشو، درمجاورت هوا خشک شدند (مودی و همکاران،۱۳۹۱). نمونه‌ی لام‌ها برای حفظ کیفیت در جعبه تاریک و سرما نگهداری شدند. یک‌ساعت قبل از مشاهده‌ی لام‌ها توسط میکروسکوپ، ژل‌ها با

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.10.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.1]

محلـول اتیـدیوم بروماید ($20\mu g\ ml^{-1}$) رنـگ‌آمیزی شـدند (Pérez-Cerezales *et al*., 2010). در ادامـه و پـس از قـرار دادن لامـل بـر روی هـر ژل، بـا کمـک میکروسـکوپ فلوئورسـنت (Nikon, Japan) بـا بزرگ‌نمایی x ۲۰ مورد بررسی‌قرارگرفتنـد. بـا بررسـی کامل ژل در زیر میکروسکوپ، از قسمت‌های مختلف هر ژل تصویربرداری شده و تعداد ۱۰۰-۵۰ عدد اسپرم با کیفیت و بدون هم‌پوشانی از نمونه‌های مختلف بـرای ارزیابی انتخاب شدند (Cabrita *et al*., 2005).

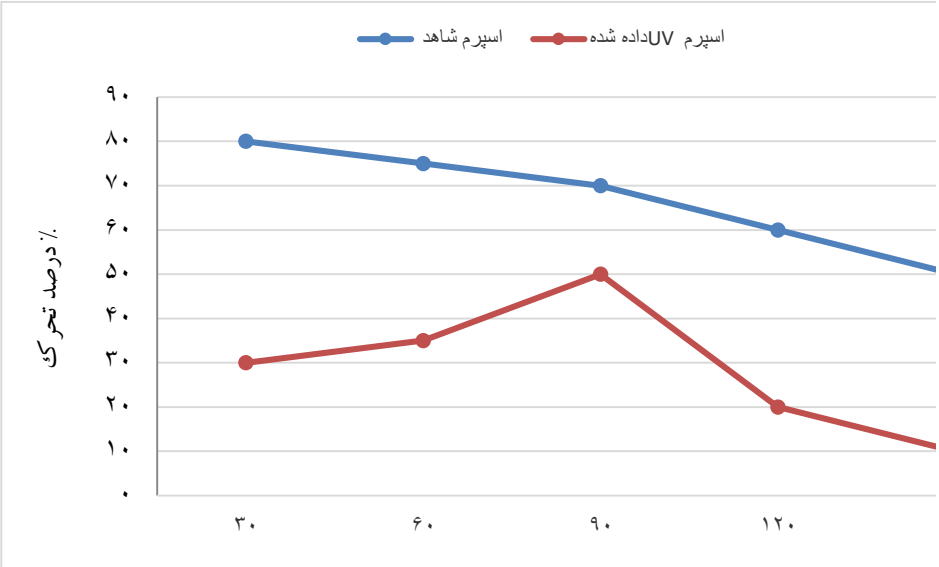
پس از استحصال تخمـک از تاسـماهی اسـترلیاد، هر تیمار اسپرم با ۹ میلی لیتر از آب سالن تکثیر ترکیب و بلافاصله به تخمـک اضـافه‌گردیـد. بـه منظـور تسـت باروری و میزان تفریخ تخم، هر تیمار اسپرم با ۱۰ گـرم از تخمک تاسماهی استرلیاد (۹۰ عدد در گرم) ترکیب و میـزان لقـاح در مراحـل جنینـی و تعـداد لارو تفـریخ شده (بازماندگی) مورد ارزیـابی‌قرارگرفـت و بـا تیمـار شاهد مقایسه شد. تیمارهای آزمایشی مورد اسـتفاده در این بررسی (در مجموع ۶ تیمـار) شـامل دو گـروه: ۱- هاپلوئید {(اسپرم اشعه دیده تاسماهی سیبری و لقاح بـا تخمک سالم تاسماهی استرلیاد)، ۵ تیمـار (H_{30}, H_{60}, H_{90}, H_{120}, H_{150})} و ۲- هیبریـد دیپلوئیـد {(اسـپرم سـالم تاسـماهی سـیبری و تخمـک سـالم تاسـماهی استرلیاد) به عنوان شاهد، ۱ تیمار} بودند. تخمها بعـد از شستشـو (کهنـه‌شـهری و آذری تاکـامی، ۱۳۵۳) بـه انکوباتورهای ویس به منظور گذراندن مراحـل جنینـی انتقـال یافتنـد. در تمـام ایـن مـدت دمـای آب سـالن انکوباسیون اندازه گیری شده و بـر ایـن اسـاس درصـد لقاح و درصد تفریخ محاسبه‌گردید.

به منظور تجزیه و تحلیل آمـاری، جهـت بررسـی میزان تحرک و قابلیت باروری اسـپرم اشـعه داده شـده در تیمارهـای متفـاوت و مقایسـه آن بـا گـروه شـاهد، همچنین مقایسه لقاح، تفریخ و بازماندگی در تیمارهای مختلف هاپلوئید و مقایسه آن با شاهد و ثبـت آنهـا بـه صورت میانگین و انحراف معیار در سـطح ۹۵ درصـد ($P<0.05$) استفاده شد. به منظور بررسـی توزیـع نرمـال داده ها در گروه ها و تکرار ها جهت تشکیل تیمـار هـا از آزمـون Kolmogorov-smirnov اسـتفاده شـد. در صورت نرمال بودن داده ها به منظور مقایسه آماری بین گروه ها در تیمار ها از آزمون آنالیز واریـانس یکطرفـه و پس از بررسی همگنی داده ها در گروه ها بـا آزمـون Test of Homogeneity of Variances و جهـت مقایسه گروه ها با یکـدیگر از آزمـون دانکـن اسـتفاده شد. کلیه آنـالیز هـای آمـاری بـا اسـتفاده از نـرم افـزار SPSS ویرایش ۲۰ و جهت رسم نمودار ها از نرم افزار Excel ۲۰۰۷ استفاده شد. با استفاده از نرم‌افزار Comet score نسخه ۱۵، سنجش طول دنباله‌ی کامت، درصد DNAدر دنباله‌ی کامت و شاخص اولیو (OM) (طول دنباله‌ی محتوی DNA × درصد DNA حرکـت یافتـه) (Shaliutina *et al*., 2013; Xu *et al*., 2013) انجـام گرفت.

نتایج

درصد تحرک اسپرم تازه و اسپرم UV داده شده اسپرم تازه مولد تاسماهی‌سیبری دارای تحرک ۸۰ درصد در جهت رو به جلو، مدت تحرک ۳۱۸ ثانیه و با تراکم $۱/۵۶ \times ۱۰^{۹}$ اسپرم در میلی‌لیتر مکعب ارزیابی شد (جدول ۱). در تیمارهای متفاوت اسپرم UV داده شده، در زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰و ۱۵۰ ثانیه در مولد تاسماهی‌سیبری نر به ترتیب ۳۰، ۳۵، ۵۰، ۲۰ و ۱۰ درصد تحرک با حرکت رو به جلو ارزیابی شد.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.10.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.1]



شکل ۱: مقایسه درصد تحرک اسپرم UV داده شده با شاهد بر اساس معیار زمانی

جدول۱: پارامترهای مورد بررسی در اسپرم شاهد مولد نرتاسماهی سیبری

ردیف	پارامترهای مورد بررسی	مقدار
۱	درصد تحرک	۸۰
۲	زمان تحرک (ثانیه)	۳۱۸
۳	pH	۸/۰۳
۴	اسمولالیته	۱۵۲
۵	حجم (میلی لیتر)	۱۲۰
۶	تراکم (میلیارد در هر میلی لیتر)	$۱/۵۶ \times ۱۰^{۹}$
۷	اسپرماتوکریت (درصد)	۱۳/۳۳

براساس درصد تحرک و نوع حرکت، بهترین زمان در معرض قرارگیری اسپرم تحت اشعه UV، در زمان ۹۰ ثانیه ارزیابی شد زیرا که دارای درصد تحرک مناسبی نسبت به اسپرم شاهد بوده و حرکت روبه جلو داشت.

میزان تخریب DNA اسپرم در معرض اشعه UV قرار داده شده

در مقایسه میانگین طول دنباله کامت در زمان های مختلف و بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P<0.05$). در این ارتباط میانگین طول دنباله کامت در اسپرم اشعه دیده در زمان های ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ به شکل معنی‌داری بیشتر از اسپرم شاهد بوده است. بیشترین میزان طول دنباله کامت در اسپرم در معرض اشعه قرارگرفته به مدت ۱۵۰ ثانیه و کمترین آن در اسپرم شاهد مشاهده

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.10.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.1]

گردید. بر اساس نتایج حاصله، با افزایش زمان، طول دنباله کامت افزایش داشته است (جدول ۲).

جدول ۲: میانگین طول دنباله کامت در تیمار های زمانی مختلف

تیمار	خطای استاندارد ± میانگین*	حداقل	حداکثر
شاهد	۱۵/۶۳ ± ۰/۲۹^{c}	۹/۳۷۵	۲۰/۸۳۳
H_{30}	۵۵/۱۰ ± ۱/۱۶^{b}	۲۶/۵۶۲	۷۹/۶۸۷
H_{60}	۵۱/۰۱ ± ۰/۷۷^{ab}	۲۹/۶۸۷	۷۲/۹۱۶
H_{90}	۵۱/۸۵ ± ۱/۴۵^{ab}	۲۱/۸۷۵	۹۴/۷۹۱
H_{120}	۵۴/۵۳ ± ۰/۷۵^{ab}	۳۲/۸۱۲	۹۳/۷۵
H_{150}	۶۵/۴۳ ± ۱/۳۲^{a}	۳۹/۰۶۲	۹۲/۷۰۸

* مقادیر بر حسب میکرو متر می باشد

در مقایسه میانگین درصد DNA دنباله کامت در زمان های مختلف و بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P<0.05$). در این ارتباط میانگین میزان DNA دنباله کامت در اسپرم های اشعه دیده در زمان های ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ ثانیه به شکل معنی داری بیشتر از اسپرم شاهد بوده است. بیشترین میزان DNA دنباله کامت در زمان ۱۵۰ ثانیه مشاهده گردید. از نظر درصد DNA دنباله کامت، تفاوت معنی داری بین دو تیمار زمانی H_{60} و H_{90} وجود نداشت ($P>0.05$) و درصد شکستگی DNA اسپرم در این دو تیمار از بقیه تیمارها (غیر از شاهد) کمتر بود. بر اساس نتایج حاصله، با افزایش زمان، به طور نسبی درصد DNA دنباله افزایش داشته است (جدول ۳).

جدول ۳: میانگین درصد DNA در دنباله کامت در تیمارهای زمانی مختلف

تیمار	خطای استاندارد ± میانگین	حداقل	حداکثر
شاهد	۹/۰۲ ± ۰/۸۵ ^{d}	۰/۱۳۷۳۹	۲۹/۵۷۸
H_{30}	۴۰/۴۶ ± ۱/۹۳ ^{b}	۱/۸۷۹۱۹	۹۲/۳۱۴۲
H_{60}	۳۲/۷۹ ± ۱/۶۹ ^{c}	۲/۲۰۹۴۵	۸۴/۰۵۹
H_{90}	۳۲/۲۷ ± ۱/۹۶ ^{c}	۰/۲۶۱۷۸	۸۵/۱۳۹۴
H_{120}	۴۱/۷۹ ± ۱/۳۵ ^{b}	۳/۵۰۳۶۳	۹۱/۸۷۲۷
H_{150}	۴۸/۹۷ ± ۱/۹۶ ^{a}	۹/۲۶۴۴۸	۹۲/۱۱۳۹

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.10.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.1]

جهت مقایسه میانگین شاخص اولیو (OM) در زمان های مختلف و بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد ($P<0.05$). در این ارتباط میانگین شاخص OM در اسپرم های اشعه دیده در زمان های ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ به شکل معنی‌داری بیشتر از اسپرم شاهد بوده است. بیشترین میزان شاخص OM در زمان ۱۵۰ ثانیه مشاهده گردید. شاخص اولیو در دو تیمار H_{60} و H_{90} از بقیه تیمارها (غیر از شاهد) کمتر بود به طوری‌که این دو تیمار با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری داشتند. بر اساس نتایج حاصله، با افزایش زمان، به طور نسبی شاخص اولیو افزایش یافته است (جدول ۴).

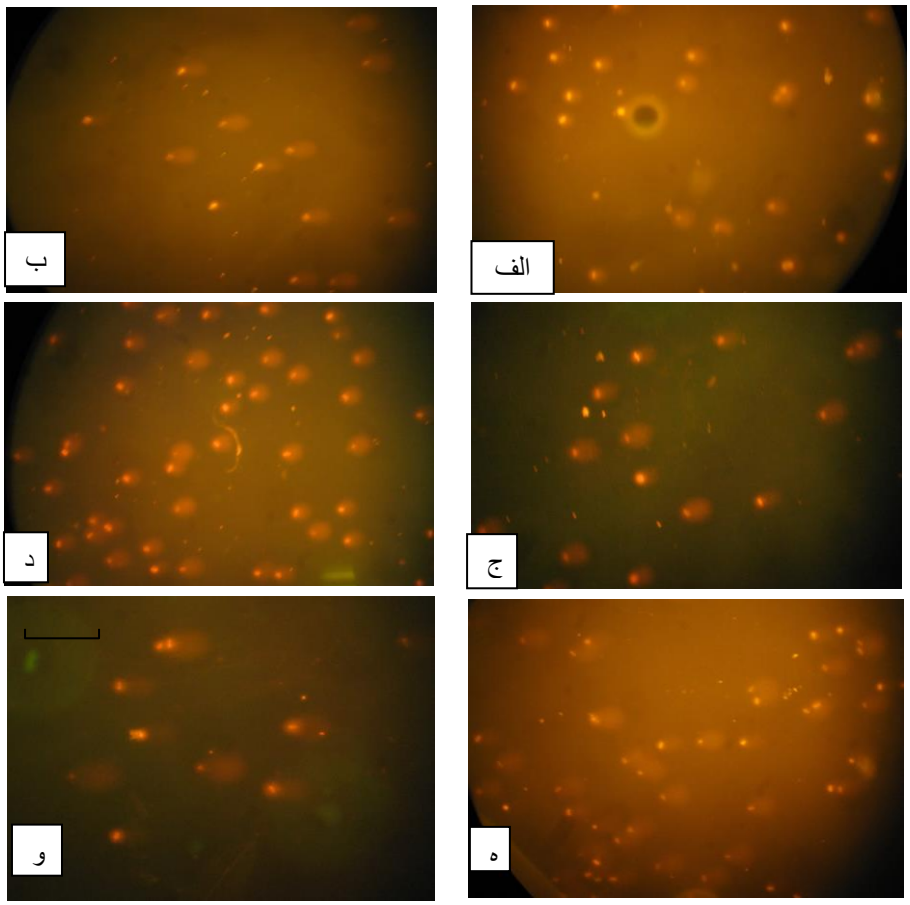
جدول ۴: میانگین شاخص OM در تیمارهای زمانی مختلف

تیمار	خطای استاندارد ± میانگین	حداقل	حداکثر
شاهد	۰/۹۰ ± ۰/۸۵ ^{d}	۰/۰۰۱۶۵	۳/۹۳۶۸۳
H_{30}	۱۹/۳۱ ± ۱/۹۳ ^{b}	۱/۰۸۷۶۹	۶۷/۲۸۷۸
H_{60}	۱۳/۴۴ ± ۱/۶۹ ^{c}	۰/۵۷۵۸۴	۴۵/۸۸۴۱
H_{90}	۱۵/۰۸ ± ۱/۹۶ ^{bc}	۰/۰۲۶۸۱	۵۴/۱۰۱
H_{120}	۱۸/۱۵ ± ۱/۳۵ ^{b}	۱/۲۸۴۳۱	۷۱/۰۳۹۱
H_{150}	۲۷/۲۷ ± ۱/۹۶ ^{a}	۲/۷۲۸۹۲	۶۸/۹۹۴

الکتروفورز سلول‌های انفرادی اسپرم

نمونه تصاویر به‌دست آمده حاصل از الکتروفورز ژل‌های حاوی اسپرم و نمونه اثر دنباله در اسپرم شاهد و طی زمان‌های مختلف تابش اشعه UV در شکل ۵ (الف- و) آمده است.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.10.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.1]



شکل ۵: نمونه اثر دنباله در اسپرم شاهد و UV داده شده طی زمان‌های مختلف اشعه دهی. (الف): شاهد، (ب): ۳۰ ثانیه تابش، (ج): ۶۰ ثانیه تابش ، (د): ۹۰ ثانیه تابش، (ه): ۱۲۰ ثانیه تابش و (و): ۱۵۰ ثانیه تابش (مقیاس تصاویر ۲۰ میکرون می‌باشد)

این اشکال بیان‌گر اثر زمان بر میزان تخریب DNA است، که نشان داد اگرچه این تخریب وابسته به زمان بوده و با گذشت زمان، طول دنباله ی کامت و درصد DNA در دنباله، افزایش می‌یابد ($P<0.05$) ولی اثر هرتویگ به وضوح در آن نشان داده که شدت تخریب در ۹۰ ثانیه اشعه دهی (تصویر "د") کمتر از سایر زمان ها می‌باشد.

درصد لقاح و تفریخ در تیمارهای هاپلوئید به منظور تعیین بهترین تیمار اشعه

به منظور بررسی دقیق تر تاثیر زمان در معرض اشعه UV بر روی اسپرم تاسماهی سیبری، ترکیب اسپرم در معرض UV قرار داده شده با مقداری از تخمک تاسماهی استرلیاد صورت گرفت، که به اصطلاح آزمایشات باروری نامیده می‌شود و تیمار هاپلوئید به وجود آمد (جدول ۵). میزان لقاح در تیمارهای هاپلوئید با یکدیگر و با گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌داری بودند ($P<0.05$). اختلاف معنی داری در میزان خروج لارو بین تیمارهای هاپلوئید H_{30} و H_{60} و همچنین در بین تیمارهای H_{90} و H_{120} وجود

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.10.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.1]

نداشت (P>0.05). ولی این تیمارها با سایر تیمارهای هاپلوئید و شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند (P<0.05). تیمار H_{90} در مقایسه با سایر تیمارهای هاپلوئید دارای درصد لقاح بالاتر و دارای میزان تفریخ پایینی بود. تعداد لارو باقیمانده در این تیمار دارای سندرم هاپلوئیدی بودند و به صورت ناقص الخلقه تفریخ شدند که در فاصله کوتاهی پس از تفریخ تلف شدند.

جدول ۵: مقایسه درصد لقاح و تفریخ تخم در نمونه های شاهد و اشعه UV داده شده (هاپلوئید) در زمان‌های مشخص

ردیف	زمان تابش اشعه UV (ثانیه)	درصد لقاح	درصد تفریخ
H_{30}	۳۰	۳۶/۳ ± ۰/۲۸	۲/۱ ± ۰/۰۵
H_{60}	۶۰	۳۹/۷ ± ۰/۱۷	۲ ± ۰/۱۱
H_{90}	۹۰	۵۲/۱ ± ۰/۵۲	۱/۱ ± ۰/۱۱
H_{120}	۱۲۰	۲۷/۲ ± ۰/۲۸	۰/۷ ± ۰/۰
H_{150}	۱۵۰	۱۲/۱ ± ۰/۱۱	۰
شاهد	۰	۷۰/۷ ± ۰/۳۴	۶۵/۵ ± ۰/۳۴

بحث

کاربرد اشعه UV در آبزی‌پروری در غیر فعال سازی ژنوم اسپرم آبزیان جهت تولید نتاج ماده در تاسماهیان و سایر آبزیان می‌باشد. از این پروسه که گاینوژنزیز نامیده می‌شود در تهیه نقشه ژنتیکی، مطالعات اثرات لکوس های منفرد، مکانیزم تعیین جنسیت و تولید سریع لاین‌های همخون استفاده می‌گردد (Rougeot *et al*., 2005). بعلاوه در تاسماهیان به‌عنوان گونه‌های در حال انقراض که سیستم تعیین جنسیت هتروگامتی ماده دارند، گاینوژنزیز بین گونه‌ای می‌تواند در احیای گونه‌های آنها استفاده شود (Grunina *et al*., 2011; Saber *et al*., 2014). القای موفق گاینوژنزیز نیاز به غیرفعال کردن ژنوم اسپرم و همزمان توان باروری بالا دارد. بنابراین دستیابی به دوز مناسب UV ضروری به نظر می‌رسد. دوزهای پایین تر اشعه UV موفقیتی در غیرفعال سازی ژنوم اسپرم ندارد، زیرا ممکن است مقدار اندکی از DNA پدری را به زیگوت منتقل کند. از طرفی دوزهای بالاتر اشعه، مورفولوژی اسپرم را تغییر داده و تحرک آن را جهت تکامل جنینی کاهش می‌دهد (Don and Avtalion, 1993; Li *et al*., 2000). به‌طورکلی به منظور القای ماده زایی (گاینوژنزیز) می‌توان از اسپرم غیرفعال ژنتیکی هومولوگ و یا هترولوگ استفاده نمود. ولی در تاسماهیان که در نقطه بحرانی انقراض قراردارند، استفاده از اسپرم هترولوگ غیرفعال شده به دلیل کمبود اسپرم هومولوگ توصیه می‌گردد. همچنان که Meng و همکاران (۲۰۱۶) توصیه کردند که در صورت پایین بودن کمیت و کیفیت اسپرم هومولوگ، می‌توان از اسپرم غیرفعال ژنتیکی هترولوگ استفاده نمود.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.10.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.1]

یکی از پارامترهای مهم در اسپرم قبل از تابش اشعه، تراکم بهینه و بعد از تابش اشعه، حرکت مستقیم آن می‌باشد. اگر تراکم اسپرم یا غلظت آن بیشتر از مقدار بهینه باشد، ممکن است که اشعه UV نتواند به اسپرمهای قرارگرفته در لایه‌های پایینی نفوذ نماید که در این هنگام اسپرم اشعه دیده حتی در بالاترین شدت اشعه حاوی اسپرماتوزوا در لایه‌های پایین است که دارای جذب پایینی از UV می‌باشد (Lebeda *et al.*, 2014). اگر تراکم اسپرم یا غلظت آن کمتر از مقدار بهینه باشد، افزایش چشمگیری در شکستگی DNA اسپرم ایجاد می‌شود. درنتیجه منجر به کاهش چشمگیر تحرک اسپرم شده و ممکن نیست که چنین اسپرمی مناسب برای گاینوژنزیز باشد (Dietrich *et al.*, 2005).

میزان تحرک اسپرم به پارامترهای مختلفی از جمله کیفیت مولدین نر، رسیدگی جنسی از لحاظ فیزیولوژی و همچنین شرایط حمل، نگهداری و میزان پاسخ دهی مولد به تزریق GnRH متناسب با درجه حرارت بستگی‌دارد (پورکاظمی و همکاران، ۱۳۸۹). پس از استحصال اسپرم و صرف مدت زمان لازم برای در معرض قرار دهی آن به اشعه UV و سپس نگهداری اسپرم UV داده شده در محیط خارج بدن و مقایسه آن با شاهد، میزان تحرک اسپرم در هر دو گروه شاهد و اشعه داده‌شده کاهش‌داشت. این کاهش تحرک در اسپرم اشعه داده شده به مراتب بیشتر از اسپرم شاهد بود. افزایش میزان تحرک در مدت زمان ۹۰ ثانیه در معرض قرارگیری اسپرم در اشعه نسبت به سایر مدت های تابش اشعه، سبب‌گردید که این مدت زمان به عنوان بهترین زمان تابش اشعه مدنظر قرارگیرد. همچنان که Lebeda و همکاران (۲۰۱۴) عنوان کردند یکی از راههای تشخیص موثر بودن اشعه UV بر غیرفعال سازی DNA اسپرم ماهیان، میزان تحرک اسپرماتوزوا می‌باشد. علت اصلی کاهش تحرک در اسپرم UV داده شده، تاثیر اشعه بر روی کل حجم اسپرماتوزوا است که نه تنها DNA اسپرم را تخریب می‌کند بلکه سیستم تحرک و یا آکروزوم را به شدت از بین می‌برد. Li و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که در معرض قرارگیری اسپرم به اشعه UV، موجب تخریب ساختاری و عملکردی در اسپرم شده و سبب غیرمتحرک شدن اسپرماتوزوا می‌گردد. Don و Avtalion (۱۹۹۳) اظهار کردند که اشعه UV می‌تواند کروماتین اسپرماتوزوا را از فشردگی خارج کرده و عامل اصلی تخریب غشای سیتوپلاسمی و پوشش هسته ای باشد و در غیرفعال سازی هسته نر عمل‌کند. Xu و همکاران (۲۰۰۷) در ماهی کراکر زرد (*Pseudosciaena crocea*) به این نتیجه اشاره کردند که با افزایش شدت و مدت تابش اشعه UV، تحرک اسپرم نیز کاهش می‌یابد.

در سال‌های اخیر به منظور ارزیابی کیفیت اسپرم تاسماهیان، علاوه بر تحرک، شاخص‌های متنوعی همچون بررسی میزان تخریب غشاها (Horváth *et al.*, 2008; Dorsey *et al.*, 2011)، تخریب DNA (برادران نویری و حسن زاده صابر، ۱۳۹۷ Ciereszko *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008;)، ارزیابی‌های میزان عوامل ممانعت‌کننده ترکیبات اکسیدکننده فعال(ROS) (Shaliutina-Kolešová *et al.*, 2013; Dzyuba *et al.*, 2015; Aramli *et al.*, 2015)، قابلیت لقاح (Horváth *et al.*, 2008; Dadras *et al.*, 2014) و در نهایت کیفیت لاروها و بچه‌ماهیان تولید شده (Glogowski *et al.*, 2002) مورد توجه قرار

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.10.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.1]

گرفته‌اند. تا کنون هیچ گونه سنجشی از تخریب DNA اسپرم در معرض اشعه UV قرار داده شده تاسماهیان به روش سنجش دنباله قلیایی به عنوان یک سنجش مهم در ارزیابی کیفی آن انجام نگرفته است. تنها در مطالعه Lebeda و همکاران (۲۰۱۴) مقایسه ای بین مواد شیمیایی تخریب کننده DNA اسپرم و اشعه UV و معرفی بهترین ماده شیمیایی به عنوان ماده تخریب کننده DNA اسپرم در مطالعات القای گاینوژنزیز در تاسماهیان صورت گرفته است.

در مطالعه حاضر، سه مولفه اصلی از سنجش دنباله شامل طول دنباله کامت، درصد DNA دنباله و شاخص اولیو (OM) بررسی گردید. اما همانند مطالعات دیگران، بهترین مولفه درصد DNA دنباله است (Sowmithra *et al*., 2015). این مولفه می‌تواند میزان شکستگی DNA را به همراه درصد تحرک اسپرم به عنوان بهترین شاخص برای اسپرم غیرفعال شده ژنتیکی معرفی‌نماید (Dietrich *et al*., 2005). طول کمتر دنباله در مدت زمان های ۶۰ و ۹۰ ثانیه نسبت به سایر تیمارها و همچنین درصد DNA دنباله و شاخص اولیو نشان داد که در این دو مدت تابش اشعه، میانگین ۳۲ درصد تخریب DNA، برای غیرفعال سازی DNA اسپرم با حفظ اثر تحرک آن کافی می-باشد. بنابراین می‌توان اذعان نمود که در تلفیق میزان تحرک اسپرم و سنجش دنباله، ۳۲ درصد شکستگی DNA با استفاده از ۹۰ ثانیه در معرض قرارگیری آن به اشعه UV می‌تواند الگوی مناسبی در غیر فعال سازی DNA با میزان تحرک بهینه در اسپرم تاسماهی سیبری باشد. در مطالعه صورت گرفته توسط Saber و همکاران (۲۰۱۴) در غیرفعال سازی ژنوم اسپرم تاسماهی سیبری با در معرض قرار گیری اشعه UV با شدت ۴۷۳ میکرو وات/سانتی متر مربع، با تلفیق سنجش های درصد تحرک و میزان لقاح و تفریخ در گروههای هاپلوئید، بهترین مدت اشعه را ۶۰ ثانیه معرفی شد. Fopp-Bayat و همکاران (۲۰۰۷) مدت تابش اشعه را در اسپرم دورگه بستر (فیل ماهی ماده در استرلیاد نر) به منظور القای گاینوژنزیز در تاسماهی استرلیاد را ۶۰-۷۰ ثانیه اعلام نمود ولی این مدت بر حسب گونه حتی در نرهای مختلف به دلیل تراکم مختلف اسپرم، می‌تواند متفاوت باشد (Lebeda *et al* 2014; Lebeda *et al*., 2014). اگر چه در مطالعه حاضر هم مدت زمان ۶۰ ثانیه می‌تواند در غیر فعال سازی DNA پدری مفید باشد ولی کارآیی ۹۰ ثانیه اشعه‌دهی بهتراست.

در بررسی صورت گرفته بر غیرفعال سازی ژنوم پدری در ماهی قزل آلای رنگین کمان با استفاده از اشعه UVC توسط Dietrich و همکاران (۲۰۰۵)، مشخص گردید که ۵۵٪ میزان DNA دنباله یا شکستگی آن به مدت ۵ دقیقه تابش اشعه، بهترین درصد و مدت برای غیرفعال سازی ژنوم اسپرم به منظور القای گاینوژنزیز در این ماهی می باشد. اگرچه آنها بر روی مکانیزم های فعالیت UVC روی DNA اسپرم مطالعه ای نکردند ولی فرض کردند که آسیب اولیه از چنین تابشی، موجب ایجاد دایمرهای پریمیدین سیکلوبوتان و تولیدات نوری پریمیدین -۶-۴- پریمیدون از طریق جذب مستقیم توسط DNA می شود (Ravanat *et al*., 2001).

نکته جالب توجه در مطالعه حاضر، وجود DNA دنباله در گروه شاهد به میزان ۹ درصد بود، هم چنان که در بررسی Lebeda و همکاران (۲۰۱۴) بر روی نمونه اسپرم شاهد تاسماهی استرلیاد نیز در حدود ۱۰

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.10.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.1]

درصد شکستگی DNA وجود داشت. به نظر می رسد که کیفیت اسپرم بر حسب نوع گونه و شرایط فیزیولوژیک، به میزان زیادی تابع زمان می باشد و هرچه اسپرم به مدت طولانی تری در خارج بدن ماهی نگهداری شود، دچار افت تدریجی کیفیت و به دنبال آن کاهش تحرک و بروز شکستگی DNA می گردد. از طرفی کیفیت و میزان تحرک اسپرم دریافتی از جنس نر نیز مهم می باشد.

در بعضی از گونه ها در زمان بهینه کردن شدت اشعه و زمان در معرض قرار گیری اشعه، یک پدیده پارادوکس به نام "اثر هرتویگ" وجود دارد که در آن میزان بازماندگی جنین ها با افزایش شدت اشعه و زمان در معرض، به تدریج کاهش می یابد تا به صفر برسد ولی بعد یک افزایش در میزان بازماندگی حاصل می گردد. چنین اثری در قزل آلای رنگین کمان (Dorafshan *et al*., 2006; Chourrout, 1980)، آزاد ماهی چام (*Oncorhynchus keta*) (Onozato, 1982) ، باس دریایی (*Dicentrarchus labrax* L.) (Felip *et al*., 2001)، ماهی توربوت (*Scophthalmus maximus*) (Piferrer *et al*., 2004) و کراکر زرد بزرگ (*Pseudosciaena crocea*) (Xu *et al*., 2007) مشاهده شد، که مشابه با مطالعه کنونی می‌باشد. نتایج حاصل از لقاح و تفریخ تخم هاپلوئید در این مطالعه اذعان می‌دارد که بهترین زمان قرارگیری اسپرم هترولوگ تحت اشعه UV با شدت ۴۷۳ میکروواط/ سانتی‌متر مربع به مدت ۹۰ ثانیه می‌باشد که در راستای نتایج حاصل از منحنی شبه هرتویگ می‌باشد. بالاترین میزان لقاح در نتاج هاپلوئید در این مدت تابش اشعه در مقایسه با شاهد و سایر تیمارها می‌تواند به ارتباط بین شدت UV و موفقیت لقاح با اسپرم اشعه داده نسبت داده شود.

با افزایش مدت تابش اشعه UV، کاهش محسوسی در درصد لقاح وجود داشت طوریکه Li و همکاران (۲۰۰۰) اظهار کردند که در معرض قرار گیری اسپرم به اشعه UV، موجب تخریب آکروزوم و فلاژلوم می‌شود که با افزایش شدت اشعه، تخریب آکروزوم بیشتر شده و فلاژله های اسپرماتوزوا از بین می‌رود و در نهایت چنین اسپرمی کاهش قابل توجه‌ای در میزان فعالیت تخم ها (لقاح) ایفا می‌کند. چنین تخریب ناشی از افزایش مدت اشعه، اسپرماتوزوا را غیر متحرک کرده و نمی‌تواند در پوسته تخم نفوذ کند. این کاهش تحرک در بارب نقره ای (Pongthana *et al*., 1995)، گربه ماهی (*Ictalarus punctatus*) (Goudie *et al*., 1995)، باس دریایی (Felip *et al*., 1999)، فلاندر (Luckenbach *et al*., 2004) و توربوت (Piferrer *et al*., 2004) مشاهده گردیده‌است.

در این بررسی، میزان تفریخ بسیار پایین لارو در اکثر تیمارهای هاپلوئید نشان دهنده دریافت مناسب اشعه UV و تخریب DNA اسپرم می‌باشد. Omoto و همکاران در سال ۲۰۰۵ اظهار داشت که تعداد کم لارو تفریخ شده در تیمار هاپلوئید نشان دهنده عدم توانایی تاثیر اسپرم UV داده شده بر فعالیت تخم می-باشد. تعداد کم لارو بوجود آمده در تیمار های هاپلوئید این مطالعه، دارای سندرم هاپلوئیدی بودند که در همان ابتدای زندگی از بین رفتند که این سندرم هاپلوئیدی در تاسماهی سفید (VanEenennaam *et al*., 1996)، بستر (هیبرید فیلماهی♀ × استرلیاد ♂) (Omoto *et al*., 2005)، تاسماهی استرلیاد (Fopp-

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.10.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.1]

Bayat *et al*., 2007)، تاسماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*) (Hassanzadeh Saber *et al*.,2008)، تاسماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) (Saber *et al*.,2014)، تاسماهی استرلیاد آلبینو (Fopp-Bayat and Ocalewicz, 2015) و در ماهیان دریایی نظیر کراکر بزرگ زرد (Xu *et al*., 2007)، ماهی توربوت (Piferrer *et al*., 2004) نیز ایجاد شده بود. Pan و همکاران (۲۰۱۷) در تحقیقی بر روی گونه ای از گربه‌ماهی، اثر هرتویگ را مشاهده کرده و لاروهای تفریخ شده آنها در بعضی از تیمارها قبل از تغذیه فعال از بین رفتند. Kashiwagi (۱۹۸۰) و Yamaki و همکاران (۱۹۹۹) عنوان کردند که هاپلوئیدها در طی مراحل تکامل جنینی قبل یا به زودی بعد از تفریخ و یا در مراحل اولیه لاروی، قبل از شروع تغذیه می‌میرند. هرچند ممکن است تعداد خیلی کمی از لاروهای هاپلوئید زایا در بعضی از تیلاپیاها نظیر (*Oreochromis mossambicus*) مشاهده گردد. ولی آنها بدشکلی شدیدی نظیر شکستگی دمی را نشان دادند و در شنا کردن، تغذیه و فرار از شکارچی ناتوان بودند (Varadaraj, 1993). بعضی از محققین اظهار داشتند که سندرم هاپلوئیدی می تواند بعلت عدم جفت شدن ژنهای طبیعی یا بیان ژنهای نهفته مزاحم ناشی از آمیزش خویشاوندی با درجه بالا باشد (Xu *et al*., 2007; Hassanzadeh Saber *et al*., 2008). Olaniyi و Omitogun (۲۰۱۴) اظهار داشتند که صفر شدن میزان بازماندگی در گروه های هاپلوئید، نشان دهنده غیرفعال شدن ژنتیکی موثر اسپرماتوزوا می‌باشد.

بر اساس نتایج حاصله مشخص گردید که با تلفیق چندین روش در سنجش اسپرم قرار گرفته در معرض اشعه UV شامل درصد تحرک اسپرم، سنجش کامت برای تعیین درصد شکستگی DNA اسپرم غیرفعال ژنتیکی و آزمایش توانایی لقاح و تفریخ، بهترین دوز اشعه ۴۲۵۷ ژول بر متر مربع در مدت زمان ۹۰ ثانیه با شدت ۴۷۳ میکروووات/سانتی متر مربع می‌باشد. بنابراین اسپرم تاسماهی سیبری غیرفعال شده ژنتیکی می‌تواند در مطالعات گاینوژنزیز بین گونه‌ای در تاسماهیان با هدف تولید نتاج تمام ماده و به منظور حفاظت از انقراض آنها استفاده شود.

سپاسگزاری

از کلیه همکاران سایت تکثیر و بازسازی ذخایر خصوصا ریاست وقت بخش که در انجام این تحقیق نهایت همکاری را داشته اند تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

۱. برادران نویری، ش.، حسن زاده صابر، م.، ۱۳۹۷. روش های ارزیابی کیفیت اسپرم ماهیان. نشریه توسعه آبزی پروری، ۱۲ (۳)، ۱۵-۲۹.

۲. پوردهقانی، م.، کاظمی، ر.، پورکاظمی، م.، ۱۳۸۹. تکثیر و پرورش ماهی خاویاری استرلیاد به عنوان ماهی زینتی در ایران. مجموعه مقالات نخستین همایش ماهیان زینتی ایران، ۳۰ تا ۳۱ تیر، تهران.

۳. پورکاظمی، م.، محسنی، م.، علیپور، ع. ر.، نوروز فشخامی، م. ر.، حسن زاده صابر، م.، برادران نویری، ش.، بهمنی، م.، رضوانی گیل کلایی، س.، ۱۳۸۹. گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی ژینوژنزیز در تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و فیلماهی (*Huso huso*). موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۷۰ صفحه.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.10.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.1]

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-03]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.10.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.1]

۴. حسن زاده صابر، م.، ذوالقرنین، ح.، سالاری علی آبادی، م. ع.، یزدانی ساداتی، م. ع.، یارمحمدی، م.، ۱۳۹۸. ایجاد جنس نر تاسماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) با به کارگیری اسپرم هترولوگ غیرفعال در القای گاینوژنز. نشریه فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، ۷ (۴)، ۱۰۵-۱۳۶.

۵. کهنه شهری، م. ، آذری تاکامی، ق. ، ۱۳۵۳. تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری. انتشارات دانشگاه تهران. ۲۸۱ صفحه.

۶. مودی، س.، فرحمند،ح.، میرواقفی، ع.، اسحاق‌زاده، ح.، کاظمی، ر.، ۱۳۹۱. بررسی اثر محافظتی ویتامین E بر یکپارچگی DNA اسپرم منجمد شده فیلماهی (*Huso huso*) با استفاده از سنجش کامت قلیایی. ژنتیک نوین، (۳) ۸، ۲۷۶-۲۶۹.

7. Aramli, M.S., Azarin, H., Farsi, P., 2015. Retracted: Motility parameters, adenosine triphosphate content and oxidative stress indices of sterlet, *Acipenser ruthenus* sperm after 6 days of storage. Aquaculture Research, 48(2), 719-724.
8. Bronzi, P., Rosenthal, H., Gessner, J., 2011. Global sturgeon aquaculture production: an overview. Journal of Applied Ichthyology, 27(2), 169-175.
9. Cabrita, E., Robles, V., Herráez, P., 2008. Methods in reproductive aquaculture: marine and freshwater species. CRC Press.
10. Cabrita, E., Robles, V., Rebordinos, L., Sarasquete, C., Herráez, M.P., 2005. Evaluation of DNA damage in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* and gilthead sea bream, *Sparus aurata* cryopreserved sperm. Cryobiology, 50(2), 144-153.
11. Chourrout, D., 1980. Thermal induction of diploid gynogenesis and triploidy in the eggs of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. Reproduction Nutrition Development, 20(3A), 727-733.
12. Ciereszko, A., Dabrowski, K., Froschauer, J., Wolfe, T.D., 2006. Cryopreservation of semen from lake sturgeon. Transactions of the American Fisheries Society, 135(1), 232-240.
13. Collins, A.R., 2004. The comet assay for DNA damage and repair. Molecular Biotechnology, 26(3), 249.
14. Dadras, H., Khara, H., Noveiri, S.B., 2014. Effect of sperm pH and density on fertilization success in Persian sturgeon, *Acipenser persicus* (Borodin, 1897). Comparative Clinical Pathology, 23(4), 975-978.
15. Dietrich, G.J., Szpyrka, A., Wojtczak, M., Dobosz, S., Goryczko, K., Ciereszko, A., 2005. Effects of UV irradiation and hydrogen peroxide on DNA fragmentation, motility and fertilizing ability of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa. Theriogenology, 64(8), 1809-1822.
16. Don, J., Avtalion, R.R., 1993. Ultraviolet irradiation of tilapia spermatozoa and the Hertwig effect: electron microscopic analysis. Journal of Fish Biology, 42(1), 1-14.
17. Dorafshan, S., Kalbassi, M.R., Pourkazemi, M., Mojazi Amiri, B., 2006. Optimization of UV irradiation for production of gynogenetic rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: emphasising Hertwig effect and photoreactivation. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 6(1), 19-34.
18. Dorsey, K.M., Guthrie, H.D., Welch, G.R., Mohler, J., Theisen, D.D., Siewerdt, F., Vinyard, B.T., Woods III, L.C., 2011. Quality assessment of wild Atlantic sturgeon semen under conditions of short-term storage. North American Journal of Aquaculture, 73(4), 418-425.
19. Dzyuba, V., Cosson, J., Dzyuba, B., Rodina, M., 2015. Oxidative stress and motility in tench, *Tinca tinca* spermatozoa. Czech Journal of Animal Science, 60(6), 250-255.
20. Felip, A., Piferrer, F., Carrillo, M., Zanuy, S., 1999. The relationship between the effects of UV light and thermal shock on gametes and the viability of early

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-03]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.10.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.1]

markers. Aquaculture Research, 39(14), 1483-1487.

29. Horváth, Á., Wayman, W.R., Dean, J.C., Urbányi, B., Tiersch, T.R., Mims, S.D., Johnson, D., Jenkins, J.A., 2008. Viability and fertilizing capacity of cryopreserved sperm from three North American acipenseriform species: a retrospective study. Journal of Applied Ichthyology, 24(4), 443-449.
30. IUCN, I., 2010. Red list of threatened species. International Union for Conservation of Nature (Available at: www. iucnredlist. org/mammals, 2008).
31. Kashiwagi, K., 1980. Mature haploids and their reproductive capacity in *Rana rugosa*. Scientific Report of the Laboratory for Amphibian Biology, 4, 217-237.
32. Lebeda, I., Dzyuba, B., Rodina, M., Flajshans, M., 2014. Optimization of sperm irradiation protocol for induced gynogenesis in Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. Aquaculture International, 22(2), 485-495.
33. Lebeda, I., Gazo, I., Flajshans, M., 2014. Chemical induction of haploid gynogenesis in starlet, *Acipenser ruthenus*. Czech Journal of Animal Science, 59, 310-318.
34. Li, P., Wei, Q., Liu, L., 2008. DNA integrity of *Polyodon spathula* cryopreserved sperm. Journal of Applied Ichthyology, 24(2), 121-125.
35. Li, Q., Osada, M., Kashihara, M., Hirohashi, K., Kijima, A., 2000. Effects of ultraviolet irradiation on genetical inactivation and morphological structure of sperm of the Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis*. Aquaculture, 186(3-4), 233-242.
36. Luckenbach, J.A., Godwin, J., Daniels, H.V., Beasley, J.M., Sullivan, C.V., Borski, R.J., 2004. Induction of diploid gynogenesis in southern flounder, *Paralichthys lethostigma* with homologous and heterologous sperm. Aquaculture, 237(1-4), 499-516.
37. Meng, Z., Liu, X., Liu, B., Hu, P., Jia, Y., Yang, Z., Zhang, H., Liu, X., Lei, J., 2016. Induction of mitotic gynogenesis in turbot, developmental stages in a marine teleost fish, the sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. Heredity, 83(4), 387-397.
21. Felip, A., Zanuy, S., Carrillo, M., Piferrer, F., 2001. Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. Genetica. 111(1-3), 175-195.
22. Fopp-Bayat, D., Kolman, R., Woznicki, P., 2007. Induction of meiotic gynogenesis in starlet, *Acipenser ruthenus* using UV-irradiated bester sperm. Aquaculture, 264(1-4), 54-58.
23. Fopp-Bayat, D., Ocalewicz, K., 2015. Activation of the albino sterlet, *Acipenser ruthenus* eggs by UV-irradiated bester hybrid spermatozoa to provide gynogenetic progeny. Reproduction in Domestic Animals, 50(4), 554-559.
24. Fopp-Bayat, D., Ocalewicz, K., Kucinski, M., Jankun, M., Laczynska, B., 2017. Disturbances in the ploidy level in the gynogenetic starlet, *Acipenser ruthenus*. Journal of Applied Genetics, 58(3), 373-380.
25. Glogowski, J., Kolman, R., Szczepkowski, M., Horváth, Á., Urbányi, B., Sieczyński, P., Rzemieniecki, A., Domagała, J., Demianowicz, W., Kowalski, R., Ciereszko, A., 2002. Fertilization rate of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*, Brandt milt cryopreserved with methanol. Aquaculture, 211(1-4), 367-373.
26. Goudie, C.A., Simco, B.A., Davis, K.B., Liu, Q., 1995. Production of gynogenetic and polyploid catfish by pressure-induced chromosome set manipulation. Aquaculture, 133(3-4), 185-198.
27. Grunina, A.S., Skoblina, M.N., Recoubratsky, A.V., Kovalev, K.V., Barmintseva, A.E., Goncharov, B.F., 2011. Obtaining gynogenetic progeny of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* using eggs matured and ovulated in vitro. Journal of Applied Ichthyology, 27(2), 701-705.
28. Hassanzadeh Saber, M., Noveiri, S.B., Pourkazemi, M., Yarmohammadi, M., 2008. Induction of gynogenesis in stellate sturgeon, *Acipenser stellatus* Pallas, 1771 and its verification using microsatellite

Scophthalmus maximus. Aquaculture, 451, 429-435.
38. Olaniyi, W.A., Omitogun, O.G., 2014. Monosex fish production in fisheries management and its potentials for catfish aquaculture in Nigeria. In Vulnerability of Agriculture, Water and Fisheries to Climate Change (pp. 301-312). Springer, Dordrecht.
39. Omoto, N., Maebayashi, M., Adachi, S., Arai, K., Yamauchi, K., 2005. Sex ratios of triploids and gynogenetic diploids induced in the hybrid sturgeon, the bester (*Huso huso* female× *Acipenser ruthenus* male). Aquaculture, 245(1-4), 39-47.
40. Onozato, H., 1982. The" Hertwig effect" and gynogenesis in chum salmon, *Oncorhynchus keta* eggs fertilized with (60) Co gamma-ray irradiated milt. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan).
41. Pan, Z.J., Zhu, C.K., Wang, H., Chang, G.L., Ding, H.Y., Qiang, X.G., Yu, X.S., 2017. Induction of meiotic gynogenesis in bagrid catfish, *Pseudobagrus ussuriensis* with homologous sperm and its confirmation for female homogamety. Aquaculture Research, 48(11), 5659-5665.
42. Pandian, T.J., 2011. Sex determination in fish. CRC Press.
43. Pérez-Cerezales, S., Martínez-Páramo, S., Beirão, J., Herráez, M.P., 2010. Fertilization capacity with rainbow trout DNA-damaged sperm and embryo developmental success. Reproduction, 139(6), 989-997.
44. Piferrer, F., Cal, R.M., Gómez, C., Álvarez-Blázquez, B., Castro, J. and Martínez, P., 2004. Induction of gynogenesis in the turbot, *Scophthalmus maximus*: Effects of UV irradiation on sperm motility, the Hertwig effect and viability during the first 6 months of age. Aquaculture, 238(1-4), 403-419.
45. Pongthana, N., Penman, D.J., Karnasuta, J., McAndrew, B.J., 1995. Induced gynogenesis in the silver barb, *Puntius gonionotus* Bleeker and evidence for female homogamety. Aquaculture, 135(4), 267-276.
46. Ravanat, J.L., Douki, T., Cadet, J., 2001. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 63(1-3), 88-102.
47. Rougeot, C., Ngingo, J.V., Gillet, L., Vanderplasschen, A., Melard, C., 2005. Gynogenesis induction and sex determination in the Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. Aquaculture, 243, 411–415.
48. Saber, M.H., Noveiri, S.B., Pourkazemi, M., Yazdani, M., Ghoroghi, A., Bahmani, M., Pourdehghani, M., Chakmehdouz, F., Yarmohammadi, M., Nowruzfashkhami, M., 2014. Induction of meiotic gynogenesis in ship sturgeon, *Acipenser nudiventris* using UV-irradiated heterologous sperm. Journal of Applied Genetics, 55(2), 223-229.
49. Shaliutina, A., Hulak, M., Gazo, I., Linhartova, P., Linhart, O., 2013. Effect of short-term storage on quality parameters, DNA integrity, and oxidative stress in Russian, *Acipenser gueldenstaedtii* and Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* sperm. Animal Reproduction Science, 139(1-4), 127-135.
50. Shaliutina-Kolešová, A., Gazo, I., Cosson, J., Linhart, O., 2013. Comparison of oxidant and antioxidant status of seminal plasma and spermatozoa of several fish species. Czech Journal of Animal Science, 58(7), 313-320.
51. Simon, L., Carrell, D.T., 2013. Sperm DNA damage measured by comet assay. In Spermatogenesis (pp. 137-146). Humana Press, Totowa, NJ.
52. Sowmithra, K., Shetty, N.J., Jha, S.K., Chaubey, R.C., 2015. Evaluation of genotoxicity of the acute gamma radiation on earthworm, *Eisenia fetida* using single cell gel electrophoresis technique (Comet assay). Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 794, 52-56.
53. Takahashi, S., Officer, F., 2010. Sturgeon conservation and the role of Japan. The State of Wildlife Trade in Japan, 10, 42-47.
54. Van Eenennaam, A.L., Van Eenennaam, J.P., Medrano, J.F., Doroshov, S.I., 1996.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.10.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.1]

Rapid verification of meiotic gynogenesis and polyploidy in white sturgeon, *Acipenser transmontanus* Richardson. Aquaculture, 147(3-4), 177-189.

55. Varadaraj, K., 1993. Production of viable haploid *Oreochromis mossambicus* gynogens using UV-irradiated sperm. Journal of Experimental Zoology, 267(4), 460-467.
56. Wei, Q.W., Zou, Y., Li, P., Li, L., 2011. Sturgeon aquaculture in China: progress, strategies and prospects assessed on the basis of nation-wide surveys (2007–2009). Journal of Applied Ichthyology, 27(2), 162-168.
57. Williot, P., Arlati, G., Chebanov, M., Gulyas, T., Kasimov, R., Kirschbaum, F., Patriche, N., Pavlovskaya, L.P., Poliakova, L., Pourkazemi, M., Kim, Y., 2002. Status and management of Eurasian sturgeon: an overview. International Review of Hydrobiology: A Journal Covering all Aspects of Limnology and Marine Biology, 87(5-6), 483-506.
58. Williot, P., Sabeau, L., Gessner, J., Arlati, G., Bronzi, P., Gulyas, T., Berni, P., 2001. Sturgeon farming in Western Europe: recent developments and perspectives. Aquatic Living Resources, 14, 367–374.
59. Xu, J.H., You, F., Yan, B.L., Zhang, P.J., 2007. Effects of ultra-violet irradiation on sperm motility and diploid gynogenesis induction in large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* undergoing cold shock. Aquaculture International, 15(5), 371-382.
60. Xu, X.R., Zhu, J.Q., Ye, T., Wang, C.L., Zhu, Y.F., Dahms, H.U., Jin, F., Yang, W.X., 2013. Improvement of single-cell gel electrophoresis (SCGE) alkaline comet assay. Aquatic Biology, 18(3), 293-295.
61. Yamaki, M., Kawakami, K., Taniura, K., Arai, K., 1999. Live haploid-diploid mosaic charr, *Salvelinus leucomaenis*. Fisheries Science, 65(5), 736-741.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1400.15.1.10.5]
[DOI: 10.52547/aqudev.15.1.1]