

"مقاله پژوهشی"

بهینه سازی روش اشعه دهی UV جهت تخریب DNA اسپرماتوزوای تاسماهی سبیری (*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 پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۱۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۱۵

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 سبیری 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 $1/96 \pm 32/27$ درصد، میزان تحرک اسپرم اشعه داده ۵۰ درصد با حرکت رو به جلو، میزان لقاح $0/52 \pm 52/1$ درصد و میزان تفریخ تخم $0/11 \pm 1/1$ درصد بدست آمد. بنابراین اسپرم تاسماهی سبیری 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 سبیری، اسپرماتوزوا، سنجش کامت، لقاح، تفریخ.

مقدمه

و عادت پذیری بالا است، اخیراً 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 موتازن های فیزیکی و شیمیایی تخریب گردد که در بین موتازن های فیزیکی، اشعه UV به علت قابلیت حمل و نقل ساده دستگاههای مورد استفاده و کم خطر بودن بیشتر ترجیح داده می شود (Lebeda *et al.*, 2014). این اشعه قابلیت شکست کروموزوم و DNA را دارد (Pandian, 2011) و آسیب هایی روی DNA ایجاد می کند 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 گاینوژنریز و ایجاد فرزندان با DNA هسته ای مادری مفید هستند، زیرا می تواند نتایج 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، گاینوژنریز 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 می باشد.

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

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) می باشند. آنها در حدود ۲۰۰ میلیون سال قبل توسعه یافته اند و دوبرابر شدن ژنوم آنها چندین بار اتفاق افتاده و با گونه زایی ادامه پیدا کرده- است که در حال حاضر ۲۷ گونه از تاسماهی شکلان وجود دارد (Fopp-Bayat *et al.*, 2017). ۱۷ گونه 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 آبی پروری گسترش یابد. 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 آب های داخلی، رود اب، رود سنی سئی، دریاچه بایکال، رود آنگارا، رود لنا، رود کولیم در قزاقستان و جمهوری خلق چین و بخش هایی از روسیه یافت می شود 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

در معرض قرار گیری اشعه UV و لقاح انتخاب گردید. جهت رسیدگی جنسی مولد ماده با توجه به درجه حرارت آب (15 ± 0.5) درجه سانتی گراد) از هورمون GnRH ساخته شده در شرکت ثامن به میزان ۱۰ میلی گرم/کیلوگرم در دو مرحله که در مرحله اول ۲۰٪ و بعد از ۶ ساعت، باقیمانده هورمون به مولد ماده در داخل عضله پشتی استفاده گردید. برای تاسماهی سبیری نر، تزریق GnRH در یک مرحله (همزمان با تزریق دوم مولد ماده) به میزان ۲۰ میلی گرم/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 سبیری دریافت شد که ۱۰ میلی لیتر آن، در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری و از ۳۰ میلی لیتر اسپرم باقیمانده، مایع سمینال، با استفاده از سانتریفوژ با دور ۵۰۰۰ در دقیقه بمدت ۵ دقیقه جدا گردید.

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 سبیری $1.0^9 \times 1/56$ اسپرم در میلی لیتر 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 قرار گرفت. همچنین به

هزینه ارزیابی کند (Collins, 2004; Simon and Carrell, 2013) و به منظور 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., 2014; Lebeda et al., 2005). عامل دیگر در ارزیابی کیفی اسپرم، میزان لقاح اسپرم در بدو ورود به تخم و تفریح آن می‌باشد (برادران نویری و حسن زاده صابر، ۱۳۹۷; Cabrita et al., 2008). در اکثر گونه های دریایی این بررسی تا تفریح لارو نیز می‌تواند انجام شود چون زمان تکامل جنینی خیلی کوتاه است ولی در گونه هایی که زمان تکامل جنینی خیلی طولانی دارند می‌توان 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 سبیری همزمان با حفظ تحرک آن با استفاده از سنجش دنباله، لقاح و تفریح در مطالعات القای گاینوژنریز 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 سبیری مناسب جهت دریافت اسپرم آن و

فسفات (PBS) عاری از Ca^{2+} و Mg^{2+} مخلوط شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از محلول رقیق شده فوق با ۱۰۰ میکرولیتر آگارز با نقطه ذوب پایین (۰/۷۵ درصد) (۴۰ درجه سانتی گراد) 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 به طور 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 بسته شدن به مدت ۱۰ دقیقه در یخچال (+۴ درجه سانتی گراد) قرار گرفتند. پس از این مدت، لامل‌ها از روی ژل‌ها برداشته شده و لام حاوی ژل‌ها برای حذف سیتوپلاسم و غشای اسپرم در بافر تجزیه کننده (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10) تازه و خنک 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 آب مقطر دوبار تقطیر شست و شو داده شده و پس از شست و شو، در مجاورت هوا خشک شدند (مودی و همکاران، ۱۳۹۱). نمونه‌ی لام‌ها برای حفظ کیفیت در جعبه تاریک و سرما نگهداری شدند. یک ساعت قبل از مشاهده‌ی لام‌ها توسط میکروسکوپ، ژل‌ها با

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 سانتی گراد 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 تقریباً یکسان بر تمامی اسپرم‌ها باشد. فاصله منبع UV با اسپرم رقیق شده ۱۲ سانتی متر بود. شدت تابش اشعه UV در فاصله مذکور ۴۷۳ میکرووات/سانتی متر مربع ثبت شد (اندازه گیری 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، ۱۲۰ و 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 بررسی قرار گرفت. 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 میلی لیتر بافر

محلول اتیدیوم بروماید ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) رنگ آمیزی شدند (Pérez-Cerezales *et al.*, 2010). در ادامه و پس از قرار دادن لامل بر روی هر ژل، با کمک میکروسکوپ فلوروسنت (Nikon, Japan) با بزرگ‌نمایی $20 \times$ مورد بررسی قرار گرفتند. با بررسی 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 برای ارزیابی انتخاب شدند (Cabrita *et al.*, 2005).

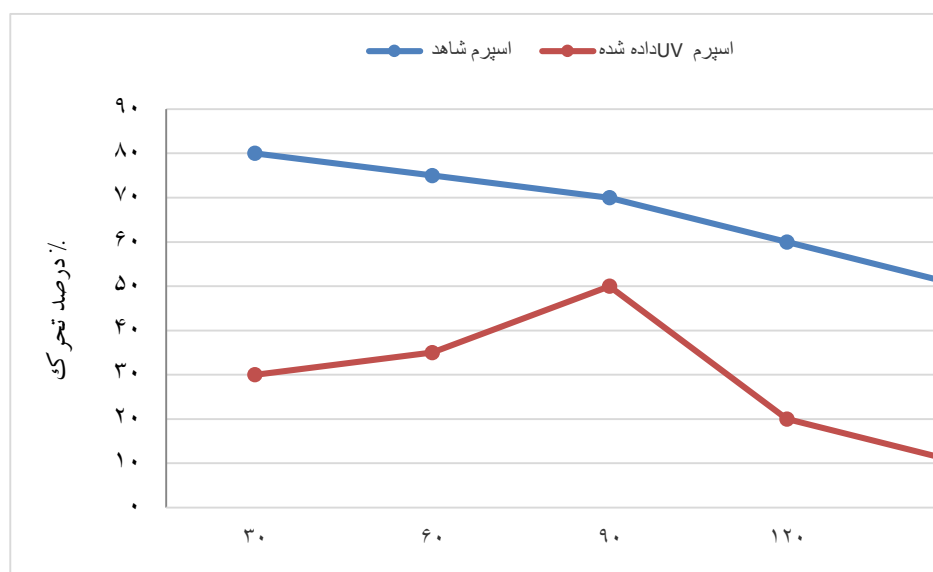
پس از استحصال تخمک از تاسماهی استرلیاد، هر تیمار اسپرم با ۹ میلی لیتر از آب سالن تکثیر ترکیب و بلافاصله به تخمک اضافه گردید. به منظور تست باروری و میزان تفریح تخم، هر تیمار اسپرم با ۱۰ گرم از تخمک تاسماهی استرلیاد (۹۰ عدد در گرم) ترکیب و میزان لقاح در مراحل جنینی و تعداد لارو تفریح شده (بازماندگی) مورد ارزیابی قرار گرفت و با تیمار شاهد مقایسه شد. تیمارهای آزمایشی مورد استفاده در این بررسی (در مجموع ۶ تیمار) شامل دو گروه: ۱- هاپلوئید {اسپرم اشعه دیده تاسماهی سبیری و لقاح با تخمک سالم تاسماهی استرلیاد}، ۵ تیمار (H_{30} , H_{60} , H_{90} , H_{120} , H_{150}) و ۲- هیبرید دیپلوئید {اسپرم سالم تاسماهی سبیری و تخمک سالم تاسماهی استرلیاد} به عنوان شاهد، ۱ تیمار {بودند. تخمها بعد از شستشو (کهنه‌شهری و آذری تاکامی، ۱۳۵۳) به انکوباتورهای ویس به منظور گذراندن مراحل جنینی انتقال یافتند. در تمام این مدت دمای آب سالن انکوباسیون اندازه گیری شده و بر این اساس درصد لقاح و درصد تفریح محاسبه گردید.

به منظور تجزیه و تحلیل آماری، جهت بررسی میزان تحرک و قابلیت باروری اسپرم اشعه داده شده

در تیمارهای متفاوت و مقایسه آن با گروه شاهد، همچنین مقایسه لقاح، تفریح و بازماندگی در تیمارهای مختلف هاپلوئید و مقایسه آن با شاهد و ثبت آنها به صورت میانگین و انحراف معیار در سطح ۹۵ درصد ($P < 0.05$) استفاده شد. به منظور بررسی توزیع نرمال داده ها در گروه ها و تکرار ها جهت تشکیل تیمار ها از آزمون Kolmogorov-smirnov استفاده شد. در صورت نرمال بودن داده ها به منظور مقایسه آماری بین گروه ها در تیمار ها از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و پس از بررسی همگنی داده ها در گروه ها با آزمون Test of Homogeneity of Variances و جهت مقایسه گروه ها با یکدیگر از آزمون دانکن استفاده شد. کلیه آنالیز های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۰ و جهت رسم نمودار ها از نرم افزار Excel ۲۰۰۷ استفاده شد. با استفاده از نرم افزار Comet score نسخه ۱۵، سنجش طول دنباله‌ی کامت، درصد DNA در دنباله‌ی کامت و شاخص اولیو (OM) (طول دنباله‌ی محتوی DNA \times درصد DNA حرکت یافته) (Shaliutina *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2013) انجام گرفت.

نتایج

درصد تحرک اسپرم تازه و اسپرم UV داده شده
 اسپرم تازه مولد تاسماهی سبیری دارای تحرک ۸۰ درصد در جهت رو به جلو، مدت تحرک ۳۱۸ ثانیه و با تراکم $10^9 \times 1/56$ اسپرم در میلی لیتر مکعب ارزیابی شد (جدول ۱). در تیمارهای متفاوت اسپرم UV داده شده، در زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ ثانیه در مولد تاسماهی سبیری نر به ترتیب ۳۰، ۳۵، ۵۰، ۲۰ و ۱۰ درصد تحرک با حرکت رو به جلو ارزیابی شد.



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

جدول ۱: پارامترهای مورد بررسی در اسپرم شاهد مولد نرتاسماهی سبیری

ردیف	پارامترهای مورد بررسی	مقدار
۱	درصد تحرک	۸۰
۲	زمان تحرک (ثانیه)	۳۱۸
۳	pH	۸/۰۳
۴	اسمولالیت	۱۵۲
۵	حجم (میلی لیتر)	۱۲۰
۶	تراکم (میلیارد در هر میلی لیتر)	$1/56 \times 10^9$
۷	اسپرما توکریت (درصد)	۱۳/۳۳

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 معنی داری بیشتر از اسپرم شاهد بوده است. بیشترین میزان طول دنباله کامت در اسپرم در معرض اشعه قرار گرفته به مدت ۱۵۰ ثانیه و کمترین آن در اسپرم شاهد مشاهده

بر اساس 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

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

جدول ۲: میانگین طول دنباله کامت در تیمارهای زمانی مختلف

تیمار	خطای استاندارد \pm میانگین *	حداقل	حداکثر
شاهد	$15/63 \pm 0/29^c$	9/375	20/833
H ₃₀	$55/10 \pm 1/16^b$	26/562	79/687
H ₆₀	$51/01 \pm 0/77^{ab}$	29/687	72/916
H ₉₀	$51/85 \pm 1/45^{ab}$	21/875	94/791
H ₁₂₀	$54/53 \pm 0/75^{ab}$	32/812	93/75
H ₁₅₀	$65/43 \pm 1/32^a$	39/062	92/708

* مقادیر بر حسب میکرو متر می باشد

ثانیه مشاهده گردید. از نظر درصد DNA دنباله کامت، تفاوت معنی داری بین دو تیمار زمانی H₉₀ و H₆₀ وجود نداشت (P>0.05) و درصد شکستگی DNA اسپریم 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).

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 اسپریم های اشعه دیده در زمان های ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ ثانیه به شکل معنی داری بیشتر از اسپریم شاهد بوده است. بیشترین میزان DNA دنباله کامت در زمان ۱۵۰

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

تیمار	خطای استاندارد \pm میانگین	حداقل	حداکثر
شاهد	$9/02 \pm 0/85^d$	0/13739	29/578
H ₃₀	$40/46 \pm 1/93^b$	1/87919	92/3142
H ₆₀	$32/79 \pm 1/69^c$	2/20945	84/059
H ₉₀	$32/27 \pm 1/96^c$	0/26178	85/1394
H ₁₂₀	$41/79 \pm 1/35^b$	3/50363	91/8727
H ₁₅₀	$48/97 \pm 1/96^a$	9/26448	92/1139

OM در زمان ۱۵۰ ثانیه مشاهده گردید. شاخص اولیو در دو تیمار H₆₀ و H₉₀ از بقیه تیمارها (غیر از شاهد) کمتر بود به طوری که این دو تیمار با بقیه تیمارها اختلاف معنی داری داشتند. بر اساس نتایج حاصله، با افزایش زمان، به طور نسبی شاخص اولیو افزایش یافته است (جدول ۴).

جهت مقایسه میانگین شاخص اولیو (OM) در زمان های مختلف و بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی دار 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 معنی داری بیشتر از اسپرم شاهد بوده است. بیشترین میزان شاخص

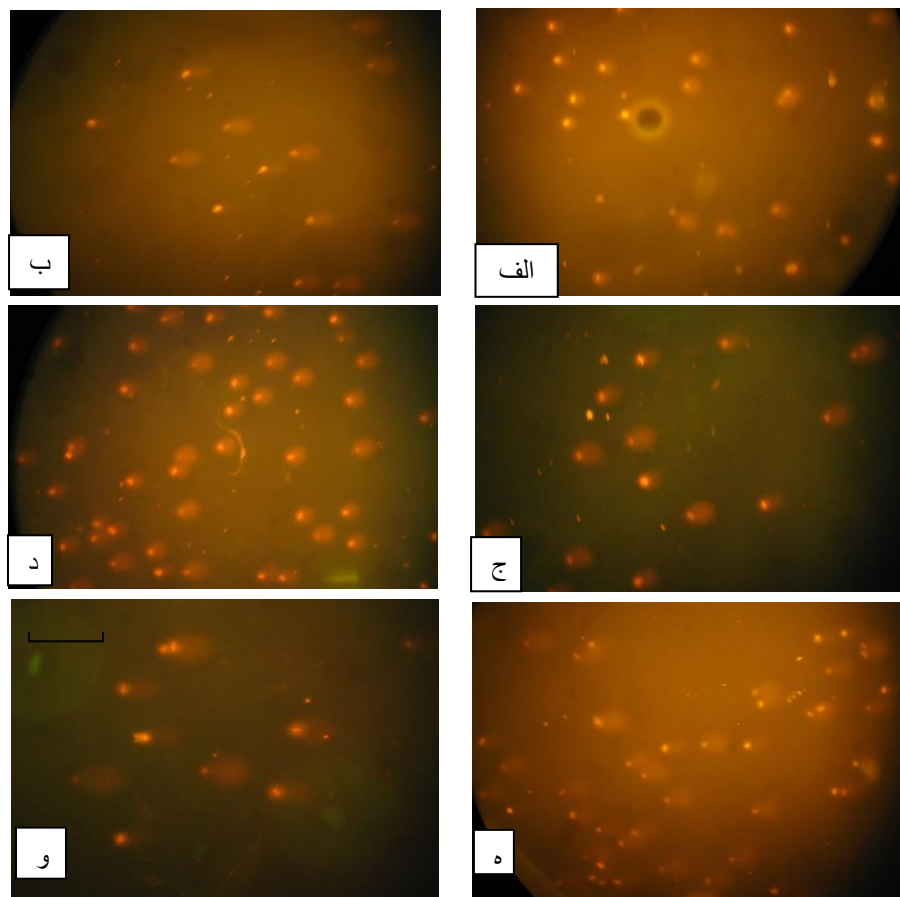
جدول ۴: میانگین شاخص OM در تیمارهای زمانی مختلف

تیمار	خطای استاندارد \pm میانگین	حداقل	حداکثر
شاهد	0.90 ± 0.85^d	۰/۰۰۱۶۵	۳/۹۳۶۸۳
H ₃₀	19.31 ± 1.93^b	۱/۰۸۷۶۹	۶۷/۲۸۷۸
H ₆₀	13.44 ± 1.69^c	۰/۵۷۵۸۴	۴۵/۸۸۴۱
H ₉₀	15.08 ± 1.96^{bc}	۰/۰۲۶۸۱	۵۴/۱۰۱
H ₁₂₀	18.15 ± 1.35^b	۱/۲۸۴۳۱	۷۱/۰۳۹۱
H ₁₅₀	27.27 ± 1.96^a	۲/۷۲۸۹۲	۶۸/۹۹۴

و طی زمان های مختلف تابش اشعه UV در شکل ۵ (الف- و) آمده است.

الکتروفورز سلول های انفرادی اسپرم

نمونه تصاویر به دست آمده حاصل از الکتروفورز ژل های حاوی اسپرم و نمونه اثر دنباله در اسپرم شاهد



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)

به منظور بررسی دقیق تر تاثیر زمان در معرض اشعه UV بر روی اسپرم تاسماهی سبیری، 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 معنی‌داری در میزان خروج لارو بین تیمارهای هاپلوئید H₃₀ و H₆₀ و همچنین در بین تیمارهای H₉₀ و H₁₂₀ وجود

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 هر تویگ به وضوح در آن نشان داده که شدت تخریب در ۹۰ ثانیه اشعه دهی (تصویر "د") کمتر از سایر زمان‌ها می‌باشد.

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

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.

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

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 آبی‌پروری در غیر فعال سازی ژنوم اسپرم آبزیان جهت تولید نتاج ماده در تاسماهیان و سایر آبزیان می‌باشد. از این پروسه که گاینوژنیز نامیده می‌شود در تهیه نقشه ژنتیکی، مطالعات اثرات لکوس‌های 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، گاینوژنیز بین گونه‌ای می‌تواند در احیای گونه‌های آنها استفاده شود (Grunina *et al.*, 2011; Saber *et al.*, 2014). القای موفق گاینوژنیز 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). به‌طور کلی به منظور القای ماده زایی (گاینوژنیز) می‌توان از اسپرم غیرفعال ژنتیکی هومولوگ و یا هترولوگ استفاده نمود. ولی در تاسماهیان که در نقطه بحرانی انقراض قرار دارند، 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.

یکی از پارامترهای مهم در اسپرم قبل از تابش اشعه، تراکم بهینه و بعد از تابش اشعه، حرکت مستقیم آن می باشد. اگر تراکم اسپرم یا غلظت آن بیشتر از مقدار بهینه باشد، ممکن است که اشعه UV نتواند به اسپرمهای قرار گرفته در لایه های پایینی نفوذ نماید که در این هنگام اسپرم اشعه دیده حتی در بالاترین شدت اشعه حاوی اسپرماتوزوا در لایه های پایین است که دارای جذب پایینی از UV می باشد (Lebeda *et al.*, 2014). اگر تراکم اسپرم یا غلظت آن کمتر از مقدار بهینه باشد، افزایش چشمگیری در شکستگی DNA اسپرم ایجاد می شود. در نتیجه منجر به کاهش چشمگیر تحرک اسپرم شده و ممکن نیست که چنین اسپرمی مناسب برای گاینوزنیز 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 بستگی دارد (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 داده شده کاهش داشت. 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، سبب گردید که این مدت زمان به عنوان بهترین زمان تابش اشعه مدنظر قرار گیرد. 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 می باشد. علت اصلی کاهش تحرک در اسپرم UV داده شده، تاثیر اشعه بر روی کل حجم اسپرماتوزوا است که نه تنها DNA اسپرم را تخریب می کند بلکه سیستم تحرک و یا آکروزوم را به شدت از بین می برد. 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 می گردد. Don و Avtalion (۱۹۹۳) اظهار کردند که اشعه UV می تواند کروماتین اسپرماتوزوا را از فشردگی خارج کرده و عامل اصلی تخریب غشای سیتوپلاسمی و پوشش هسته ای باشد و در غیرفعال سازی هسته نر عمل کند. Xu و همکاران (۲۰۰۷) در ماهی کراکرزرد (*Pseudosciaena crocea*) به این نتیجه اشاره کردند که با افزایش شدت و مدت تابش اشعه UV، تحرک اسپرم نیز کاهش می یابد.

در سال های اخیر به منظور ارزیابی کیفیت اسپرم تاسماهیان، علاوه بر تحرک، شاخص های متنوعی همچون بررسی میزان تخریب غشاها (Horváth *et al.*, 2011; Dorsey *et al.*, 2008; *al.*، تخریب DNA (برادران نویری و حسن زاده صابر، ۱۳۹۷ Ciereszko *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2006; *et al.*، ارزیابی های میزان عوامل ممانعت کننده 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 بچه ماهیان تولید شده (Glogowski *et al.*, 2002) مورد توجه قرار

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 گاینوزنز 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 معرفی نماید (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 می‌باشد. 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 غیرفعال سازی DNA با میزان تحرک بهینه در اسپرم تاسماهی سبیری باشد. در مطالعه صورت گرفته توسط Saber و همکاران (۲۰۱۴) در غیرفعال سازی ژنوم اسپرم تاسماهی سبیری 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 تفریح 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 گاینوزنز 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 پدیری مفید باشد ولی کارآیی ۹۰ ثانیه اشعه‌دهی بهتر است.

در بررسی صورت گرفته بر غیرفعال سازی ژنوم پدیری در ماهی قزل آلالی 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 گاینوزنز در این ماهی می‌باشد. 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 می‌شود (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

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 توجهی 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 (*Ictalurus punctatus*) (Goudie et al., 1995)، باس دریایی (Felip et al., 1999)، فلاندر (Luckenbach et al., 2004) و توربوت (Piferrer et al., 2004) مشاهده گردیده است.

در این بررسی، میزان تفریح 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 تفریح شده در تیمار هاپلوئید نشان دهنده عدم توانایی تاثیر اسپرم UV داده شده بر فعالیت تخم می‌باشد. تعداد کم لارو بوجود آمده در تیمارهای هاپلوئید این مطالعه، دارای سندرم هاپلوئیدی بودند که در همان ابتدای زندگی از بین رفتند که این سندرم هاپلوئیدی در تاسماهی سفید (VanEennaam et al., 1996)، بستر (هیبرید فیلماهی ♀ × استرلیاد ♂) (Omoto et al., 2005)، تاسماهی استرلیاد (Fopp-

درصد شکستگی DNA وجود داشت. به نظر می‌رسد که کیفیت اسپرم بر حسب نوع گونه و شرایط فیزیولوژیک، به میزان زیادی تابع زمان می‌باشد 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 می‌گردد. از طرفی کیفیت و میزان تحرک اسپرم دریافتی از جنس نر نیز مهم می‌باشد.

در بعضی از گونه ها در زمان بهینه کردن شدت اشعه و زمان در معرض قرار گیری اشعه، یک پدیده پارادوکس به نام "اثر هر توئیگ" وجود دارد که در آن میزان بازماندگی جنین ها با افزایش شدت اشعه و زمان در معرض، به تدریج کاهش می‌یابد تا به صفر برسد ولی بعد یک افزایش در میزان بازماندگی حاصل می‌گردد. چنین اثری در قزل آلائی 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 تفریح تخم هاپلوئید در این مطالعه اذعان می‌دارد که بهترین زمان قرارگیری اسپرم هترولوگ تحت اشعه UV با شدت ۴۷۳ میکرووات / سانتی متر مربع به مدت ۹۰ ثانیه می‌باشد که در راستای نتایج حاصل از منحنی شبه هر توئیگ می‌باشد. بالاترین میزان لقاح در نتایج هاپلوئید در این مدت تابش اشعه در مقایسه با شاهد و

کامت برای تعیین درصد شکستگی DNA اسپرم غیرفعال ژنتیکی و آزمایش توانایی لقاح و تفریح، بهترین دوز اشعه ۴۲۵۷ ژول بر متر مربع در مدت زمان ۹۰ ثانیه با شدت ۴۷۳ میکرووات/سانتی متر مربع می‌باشد. بنابراین اسپرم تاسماهی سبیری غیرفعال شده ژنتیکی می‌تواند در مطالعات گاینوژنیز 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 خصوصاً ریاست وقت بخش که در انجام این تحقیق نهایت همکاری را داشته‌اند تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. برادران نویری، ش.، حسن زاده صابر، م.، ۱۳۹۷. روش های ارزیابی کیفیت اسپرم ماهیان. نشریه توسعه آبی 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 ژینوژنیز در تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و فیلماهی (*Huso huso*). موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۷۰ صفحه.

(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 گربه ماهی، اثر هر توینگ را مشاهده کرده و لاروهای تفریح 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 تفریح و یا در مراحل اولیه لاروی، قبل از شروع تغذیه می‌میرند. هرچند ممکن است تعداد خیلی کمی از لاروهای هاپلوئید زایا در بعضی از تیلایها 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 می‌تواند 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

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., Szyrka, 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
 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 هترولوگک 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 قلبیایی. *ژنتیک نوین*، ۳(۳)، 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.

- 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 baster 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 baster 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

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. *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 \times *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.

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.
- 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.