مجله شیلات
سال سوم، شماره چهارم، زمستان ۸۸

گزارش کوتاه علمی

امکان جایگزینی تانن بجای خاک رس در فرآیند تکثیر مصنوعی فیل ماهی (*Huso huso*)

*سیدحمید حسینی[۱]، شعبانعلی نظامی[۲]، حسین خارا[۳] و سیدعلی‌اکبر علی‌محمدی[۴]

[۱]دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، [۲]موسسه تحقیقات شیلات ایران، [۳]استادیار گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، [۴]مرکز تکثیر، پرورش و بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری شهید مرجانی گرگان

چکیده

فیل ماهی (*Huso huso*) بزرگترین ماهی خاویاری دریای خزر می‌باشد. با توجه به‌طولانی بودن سن بلوغ و از بین رفتن مکان‌های تخم‌ریزی، تکثیر مصنوعی این ماهیان در سال‌های اخیر رواج یافته است. یکی از مراحل تکثیر مصنوعی فیل ماهی مرحله رفع چسبندگی تخم‌ها بوسیله سوسپانسیون خاک رس می‌باشد که زمانی طولانی از روند تکثیر مصنوعی را شامل می‌شود. تانن ماده‌ای است که می‌تواند به‌عنوان جایگزین مناسب مطرح باشد. به همین دلیل در فصل تکثیر مصنوعی سال ۱۳۸۷ از سه عدد مولد ماده فیل ماهی استفاده شد. پس از تخم‌کشی و تکثیر مصنوعی تخم‌های لقاح یافته هر مولد به ۸ قسمت تقسیم شده و در قالب یک تیمار (تانن به میزان ۰/٦۲۵ گرم در ۱/۲۵ لیتر آب) و یک شاهد (سوسپانسیون ۱۰ درصد خاک‌رس) و هرکدام با چهار تکرار مورد شستشو قرارگرفتند. براساس نتایج به‌دست آمده مدت زمان شستشو برای تیمار تانن ۱/۵ دقیقه ولی برای خاک رس ٤۵ دقیقه بود. درصد لقاح در مرحله گاسترولا، درصد قارچ‌زدگی، درصد تفریخ و درصد بازماندگی لارو تا زمان جذب کیسه زرده دارای اختلاف معنی‌دار بین گروه تیمار و شاهد بود. بنابراین با جایگزینی تانن به‌جای خاک رس ضمن صرفه‌جویی در زمان و هزینه، صدمه کمتری به تخم‌های لقاح یافته وارد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: تانن، خاک رس، فیل ماهی، *Huso huso*.

مقدمه

ماهیان خاویاری از با ارزشترین و قدیمی‌ترین ماهیان دریای خزر می‌باشند. این ماهیان جز ماهیان آنادروم بوده و برای تولیدمثل نیاز به آب شیرین دارند، زیرا اسپرم آنها توان زیست در آب‌های شور دریاها و دریاچه‌ها را ندارند (۱). در چندین سال گذشته با توجه به از بین رفتن مکان‌های تخم‌ریزی طبیعی اقدام به تکثیر مصنوعی این ماهیان گردیده است.

یکی از مراحل تکثیر مصنوعی این ماهیان، مرحله رفع چسبندگی از تخم‌های لقاح یافته می‌باشد، به‌طوری‌که در سال ۱۹۱٤، درژاوین از سوسپانسیون خاک رس برای رفع چسبندگی تخم‌های لقاح یافته استفاده نمود. هم اکنون نیز در کارگاه‌های تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری از این سوسپانسیون استفاده می‌گردد (۱).

مشکل این روش طولانی بودن زمان رفع چسبندگی است که این زمان بیشتر از٤۰ دقیقه می‌باشد. در این مدت به هم‌زدن تخم‌ها توسط کارگران باعث شکسته شدن آنها می‌گردد. در نتیجه این تخم‌ها مستعد آلودگی به نوعی قارچ به نام ساپرولگنیا می‌شوند که باعث از بین بردن تخم‌های ناسالم و حتی تخم‌های سالم می‌گردد (خاک رس اتوکلاو گردیده بود).

با توجه به اینکه تاس ماهیان (بسته به گونه) بعد از هر تخم‌ریزی به‌مدت زمانی معادل ۵-۲ سال زمان نیاز دارند تا دوباره تخم‌ریزی نمایند، باید برای سالم نگه داشتن تخم آنها حداکثر تلاش انجام گیرد. به‌دلیل کم بودن مولد گونه با ارزش فیل ماهی (*Huso huso*)، این

*- مسئول مکاتبه: hamid.hosseini1982@gmail.com

گونه در این تحقیق انتخاب گردید تا با جایگزین نمودن ماده یا موادی که زمان رفع چسبندگی را کاهش دهد، کیفیت تکثیر بهبود یابد.

مواد و روش‌ها

در فصل تکثیر مصنوعی (فروردین ۱۳۸۷) سه فیل‌ماهی ماده و شش مولد فیل ماهی نر انتخاب شدند (نسبت ۲:۱). سپس عملیات تزریق برای مولدین ماده و نر به‌ترتیب در دو و یک مرحله طبق روش مرسوم انجام شد (۱). تخم‌کشی از مولدین ماده به روش برش شکم صورت پذیرفت (٤). در مرحله بعد، تخمک‌های فیل‌ماهی را توزین نموده (برای تیمار و شاهد) و سپس تخمک‌های هر مولد ماده به ۸ قسمت (٤ تا ۵۰۰ گرم برای تیمار (تانن) و ٤ تا ۵۰۰ گرم برای شاهد (خاک رس) تقسیم شدند. قبل از تخم‌کشی، اسپرم‌گیری و تعیین کیفیت اسپرم از لحاظ کمی و کیفی از مولدین نر انتخابی صورت گرفت (۳). سپس تخمک‌ها توسط اسپرم رقیق شده با آب، مخلوط گردید. مخلوط تخم و اسپرم برای مدت ٤/۵ دقیقه به هم زده شد تا لقاح یابند (لقاح نیمه مرطوب) (۳). سپس تخم‌های لقاح یافته توسط تانن (تیمار) و خاک رس (شاهد) به‌منظور رفع چسبندگی مورد شستشو قرار گرفت.

برای رفع چسبندگی تخم‌های شاهد از سوسپانسیون ۱۰٪ خاک رس (۱) و برای رفع چسبندگی تخم‌های تیمار از تانن استفاده گردید (تانن ماده‌ای پودری شکل به رنگ زرد فام می‌باشد که از پوست بلوط بدست آمده بود) (۱۲)، به‌صورتی که ۰/٦۲۵ گرم از این ماده در ۱/۲۵ لیتر آب شیرین داخل سطل مخلوط (این مقدار قبلاً فقط به‌صورت آزمایشی صورت گرفته بود) و به تخم‌های لقاح یافته درون لگن اضافه شد. سپس محتویات لگن که شامل تخم‌های لقاح یافته و محلول تانن بود، به‌مدت ۹۰ ثانیه بهم زده شد تا رفع چسبندگی از تخم‌ها انجام شود، سپس تخم‌های داخل لگن توسط آب شیرین تازه چند بار شستشو داده و به انکوباتورهای یوشچنکو انتقال داده شد. تعیین درصد لقاح در مرحله ٤ بلاستومری و در مرحله گاسترولا با توجه به دمای آب و نمودار دتلاف تعیین گردید (۹).

بعد از گاسترولا به‌منظور جلوگیری از رشد قارچ ساپرولگنیا تخم‌ها توسط مالاشیت سبز ضدعفونی گردیدند (۲). برای عملیات قارچ‌زدایی از دو روش مکانیکی و شیمیایی استفاده گردید (۲).

زمان تفریخ و طول مدت دوره انکوباسیون در فیل‌ماهی توسط نمودارهای دتلاف تعیین گردید (۹).

پس از تخم‌گشایی لاروها توزین گردید، سپس از لاروهای حاصل از تخم‌های شستشو شده توسط تانن و خاک رس به‌طور مجزا نمونه‌های تصادفی برای هر یک (تیمار و شاهد) به میزان ۲۲۰ گرم برداشته و به ونیروهای جداگانه اضافه گردید. در هنگام ریختن لاروها به ونیروها باید هم دما کردن آب ونیرو و آب داخل سطل محتوی لاروها که از آب انکوباسیون گرفته شده، انجام گیرد تا استرس به لاروهای تازه تفریخ شده کمتر وارد شود. میزان بازماندگی لارو تا شروع تغذیه فعال تعیین شد.

شروع تغذیه فعال در لاروها با دیده شدن ماده ملانین پوربکا (مدفوع اولیه لارو) یا با دیده شدن عارضه کانی‌بالیسم در فیل‌ماهی تعیین می‌شود. معمولاً ۲٤ ساعت قبل از شروع تغذیه فعال در لاروها مقداری غذا به‌صورت آزمایشی به ونیرو اضافه می‌شود.

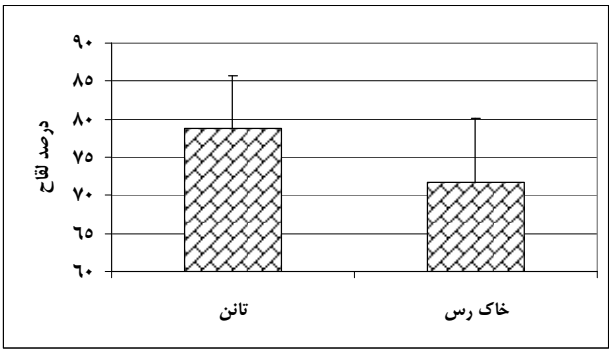
تا ۷۲ ساعت بعد از ورود لارو به ونیرو عملیات سیفون کردن انجام نمی‌گیرد تا لارو به شرایط ونیرو عادت نماید. بعد از گذشت زمان یاد شده اقدام به سیفون کردن ونیروها به‌صورت مجزا گردید. عملیات سیفون کردن یک بار در شبانه‌روز صورت پذیرفت تا محیط ونیرو عاری از لاروهای مرده که خود عاملی برای عفونت‌های ثانویه می‌باشند، گردد. لاروهای مرده بعد از هر بار سیفون کردن شمارش و از تعداد کل کسر شد تا میزان بازماندگی لارو در هر ونیرو به‌صورت مجزا محاسبه گردد.

برای تست نرمال بودن داده‌ها از آزمون Shapiro- Wilk's W استفاده شده است. برای مقایسه بین دو تیمار (تانن و خاک رس) از نظر فاکتورهای مورد بررسی، در صورت نرمال بودن داده‌ها از آزمون T-Test و در صورت نرمال نبودن از آزمون Mann-Whitney

استفاده شده است. جهت انجام آنالیزهای آماری از برنامه SPSS 13 و جهت رسم نمودارهای مربوطه از برنامه Excel 2003 استفاده شده است.

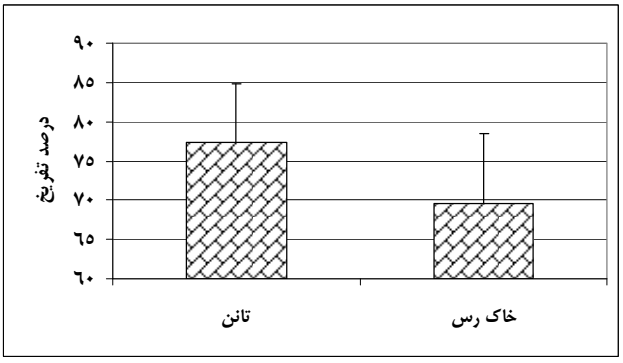
نتایج

نتایج حاصل از تعیین درصد لقاح در مرحله گاسترولا، درصد تفریخ تخم‌ها، تعداد و درصد تخم‌های قارچ‌زده و درصد بازماندگی لاروها تا زمان جذب کیسه زرده به‌ترتیب در شکل‌های ۱ تا ۵ آمده است. با توجه به نتایج بین گروه تیمار و شاهد در تمام موارد مذکور اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($P<۰/۰۵$).



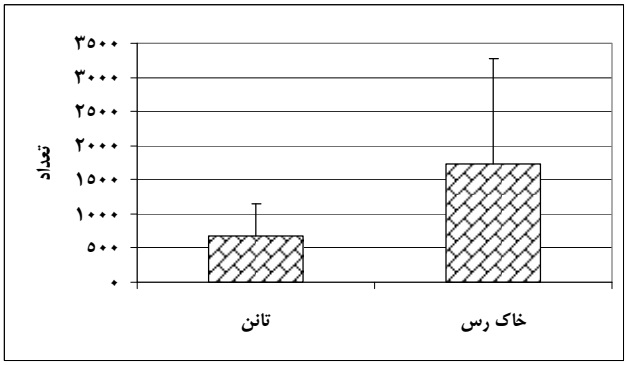
شکل ۱- درصد لقاح گاسترولا فیل ماهی با محلول تانن و سوسپانسیون خاک رس

با توجه به آزمون T-Test، بین دو روش رفع چسبندگی تخم‌های لقاح یافته اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد sig =۰/۵۸۱



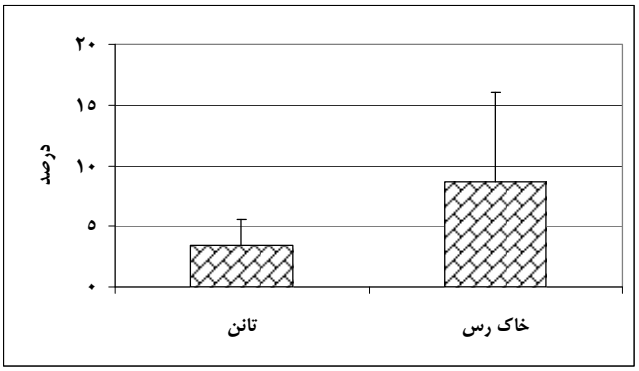
شکل ۲ – میزان درصد تفریخ تخم‌های فیل ماهی با محلول تانن و سوسپانسیون خاک رس

با توجه به آزمون T-Test، بین دو روش رفع چسبندگی تخم‌های لقاح یافته اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد sig = ۰/٤۷۰



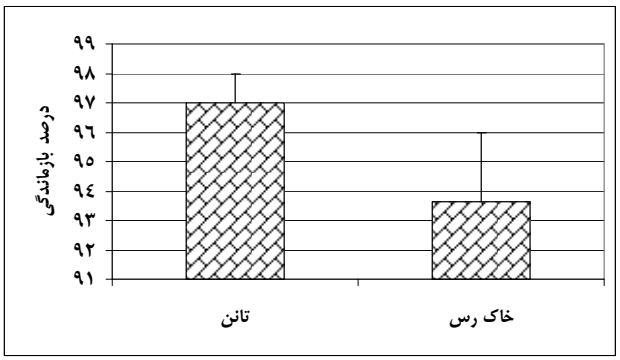
شکل ۳- مقایسه میزان تخم‌های قارچ زده فیل ماهی با محلول تانن و سوسپانسیون خاک رس

با توجه به آزمون T-Test، بین دو روش رفع چسبندگی تخم‌های لقاح یافته اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد sig = ۰/۰۰۷



شکل ٤ – میزان درصد تخم‌های قارچ‌زده فیل ماهی با محلول تانن و سوسپانسیون خاک رس

با توجه به آزمون T-Test، بین دو روش رفع چسبندگی تخم‌های لقاح یافته اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد sig = ۰/۱۹۸



شکل ٥- مقایسه میزان درصد بازماندگی لارو تا شروع تغذیه فعال فیل ماهی با محلول تانن و سوسپانسیون خاک رس با توجه به آزمون Mann-Whitney Test، بین دو روش از نظر درصد بازماندگی لارو تا شروع تغذیه فعال اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده می‌گردد sig = ۰/٤۹٥

بحث و نتیجه‌گیری

برای رفع چسبندگی تخم‌های لقاح‌یافته ماهیان خاویاری تاکنون مواد مختلفی به‌کار رفته است. با توجه به نتایج حاصله، از نظر درصد لقاح در مرحله گاسترولا، درصد تفریخ تخم‌ها، تعداد و درصد تخم‌های قارچ‌زده و درصد بازماندگی لاروها تا زمان جذب کیسه زرده بین تیمار و شاهد اختلاف معنی‌دار مشاهده می‌گردد ($P<۰/۰۵$).

یکی از مباحث اصلی در این تحقیق کاهش زمان مورد نیاز برای رفع چسبندگی در تاس ماهیان می‌باشد.

در تاس ماهی‌سفید (*Acipenser transmontanus*)، هر دو تیمار اوره / نمک یا سولفیت‌سدیم که با تیمار اسیدتانیک ادامه یافت، موفقیت‌آمیز بودند (۸). در تحقیق مذکور استفاده از اوره/نمک یا سولفیت‌سدیم بدون شستشوی متعاقب با اسیدتانیک نسبتاً چسبندگی را رفع نمود. با این حال چسبندگی در تخم‌ها طی مدت ۲۰-۱۵ دقیقه بازگشت کرد و نیاز به تیمارهای بیشتری پیدا کرد. این داده‌ها نشان دادند که مواد ژله‌ای بیشتری در طول زمان ممکن است از پوشش تخم‌ها رها شود (۸).

در مقایسه به نظر می‌رسد تیمار اوره / نمک + اسیدتانیک بر روی مقدار زیادی تخم با توجه به درصد تکامل طبیعی، از تیمار سولفیت سدیم موفق‌تر باشد (۸).

همچنین Demska-Zakęś و همکاران (۲۰۰۵) از محلول‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسیدتانیک به‌منظور رفع چسبندگی تخم‌های لقاح یافته سوف سفید استفاده نمودند. این محققین به‌دنبال بهترین میزان تانن برای رفع چسبندگی بودند. در این تحقیق بهترین میزان تانن برای رفع چسبندگی ۰/٦۲٥ گرم در ۱/۲٥ لیتر آب به‌مدت ۹۰ ثانیه تعیین شد. از طرفی در مطالعه اثر اسیدتانیک بر تخم‌های سوف سفید نشان داده

شد که غلظت اسیدتانیک و زمان مواجهه، بر فرآیند سخت شدن تخم‌ها، میزان حذف چسبندگی و بقاء جنین مؤثر است، زیرا اسیدتانیک به‌دلیل کاهش زمان مورد نیاز برای رفع چسبندگی و در نتیجه کاهش زمان مورد نیاز برای هم زدن تخم‌ها موجب کاهش میزان تخم‌های شکسته در ماهی تکثیر شده می‌گردد که به دنبال آن میزان تخم‌های مستعد برای نشستن قارچ ساپرولگنیا کاهش می‌یابد و در نتیجه باعث کاهش از بین رفتن تخم‌ها می‌گردد که مطابق با نتایج حاصل از این تحقیق است.

موضوعی که باید بیشتر مطالعه گردد این است که تفریخ اولیه تخم‌های لقاح یافته شستشو شده توسط تانن در فیل‌ماهی تکثیر شده به‌مدت ۲/۵–۲ ساعت دیرتر از تفریخ اولیه در تخم‌های لقاح یافته شستشو شده توسط خاک رس انجام شد که این می‌تواند به‌دلیل شستشوی کامل لایه ژله‌ای دور تخم باشد، زیرا در این تحقیق مشاهده گردید که تخم‌های شستشو شده توسط تانن به مراتب شفاف‌تر و براق‌تر از تخم‌های شستشو شده توسط سوسپانسیون خاک رس بودند. با توجه به این که تاس‌ماهیان در آب‌های نسبتاً ژرف در رودخانه‌ها تخم‌ریزی می‌نمایند این می‌تواند یکی از دلایل برای دیر شدن زمان تفریخ در تخم‌های شستشو شده توسط تانن باشد، اما تفریخ انبوه در تخم‌های لقاح‌یافته شستشو شده توسط تانن زودتر از تخم‌های لقاح یافته شستشو شده توسط خاک رس، انجام پذیرفت.

تشکر و قدر دانی

از کلیه دست اندرکاران و پرسنل و کارگران کارگاه تکثیر و پرورش شهید مرجانی که در تمامی مراحل تحقیق ما را یاری نموده‌اند، قدردانی می‌شود. همچنین از راهنمایی‌های آقای مهندس فرشاد ماهی‌صفت در مسائل و کارهای آماری این تحقیق کمال تشکر و سپاس را داریم.

منابع

۱– آذری تاکامی، ق. کهنه شهری، م.، ۱۳۵۳. تکثیر مصنوعی و پرورش ماهیان خاویاری. انتشارات دانشگاه تهران. ۲۹۸ صفحه.

۲– آذری تاکامی، ق.، ۱۳۷٦. مدیریت بهداشتی و روش های پیشگیری درمان بیماری‌های ماهی .انتشارات پریور. ۳۰٤ صفحه.

۳– دتلاف، ت.ا.، گینزبورگ، آ.اس، شمال هایسون، او.آی. ترجمه: نظری، ر. عبدالحی، ح و مخدومی، ن.م.، ۱۳۸۵. انتشارات معاونت تکثیر و پرورش آبزیان. ٤۲۲ صفحه.

٤– کیوان، ا.، ۱۳۸۱. مقدمه‌ای بر بیوتکنولوژی پرورش ماهیان خاویاری (در استخرها، حوضچه‌ها، قفس‌ها و آبگیرها). مرکز انتشارات علمی دانشگاه آزاد اسلامی لاهیجان. ۲۷۰ صفحه.

۵– کازانچف ،ا.ان. ترجمه: شریعتی، ا.، ۱۳۷۳. ماهیان دریای خزر و حوضه آبریز آن. شرکت سهامی شیلات ایران. ۱۷۱ صفحه .

6.Cherr. G.N. and Clark, W.H., 1985. Gamete interaction in the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*: a morphological and physiological review Environ fishes 14(1), 11-22.

7.Conte, F.S., et al. 1988. Hatchery Manual for the White Sturgeon. O.H.N.R., University of califprnia, Pub 3322, 104 p.

8.Demeska-zake, K., Zdxislaw, Z. and Rodzuk. J., 2005. The use of tannic acid to remove adhesiveness from pick perch, *Sander lucioperca*, eggs. Department of Ichthyology, University of Wariia and Mazury 5, 710-718.

9.Dettlaff, T.A., Ginsburg, O.A. and Schmalhausen, O.I., 1993. "Sturgeon fishes, developmental Biology Aquaculture. Spring – vergio. 300 p.

10.Dettlaff, T.A., Ginsburg, O.A. and Schmalhausen, O.I., 1993. "Sturgeon fishes, Translated in English by Vassetsky Publication: Springer-Verlag (Germany), pp. 25-40.

11.Dorshove, S.I., Clark, W.H., Luttes, P.B., Seawallow, R.L., BEER, K.E., McGuire, A.B. and Cocharn, M.D., 1983. Artificial propagation of the white sturgeon *Acipenser transmontanus*. Aquaculture 32, 93-104.

12.Haslam, E., 1966. Chemistry of vegetableTannins. Academic press, London, UK, 179 p.

13.Kowtal, G.V., Clark, W.H., Jr. and Cherr, G.N., 1986.Elimination of adhesiveness in egg from The white sturgeon, *Acipenser transmontanus*: Chemical treatment of fertilized eggs, Aquaculture 55, 139-143.
14.Krise, W.F., BulkowskiGumming, L., Shellmean, D.A., Krause, K.A. and Gould, R.W., 1986. Increasedwalleye egg hatch and larvae survival after protease treatment of eggs. The progressive Fish – culturist 48, 95-100.

The examination of Tanon replacement to Clay in artificial propagation process of Beluga (Huso huso)

S.H. Hosseini[1], Sh.A. Nezami[2], H. Khara[3] and S.A. Alimohhamodi[4]

[1]Fisheries MS graduated, Islamic Azad University, Lahijan Branch, [2]Iranian Fisheries Research Organization, [2]Assistant Prof., Dept. of Fisheries, Islamic Azad University, Lahijan Branch, [4]Reproduction, Rearing and Restocking of Sturgeon Fish Centre of Shahid Marjani, Gorgan

Abstract

Beluga (*Huso huso*) is the biggest sturgeon fish in Caspian Sea. Artificial propagation of Beluga has significantly emerged in recent years due to the prolonged maturation age and destroied breeding grounds .One of the artificial propagation stage is removing egg adhesiveness by using clay suspension. It can be done by utilizing some water to make 10 percent clay suspension, and washing the fertilized eggs for 30- 45 minutes to remove the adhesiveness. This process is time-taking while Tanoan can be a good replacement for it. 3 brooder females of Beluga used in propagation season 2008. After breeding and artificial propagation, each brood stock divided into 8 portions: treatment (0.625gr Tanon in 1.25 liter water) and control (10 percent clay suspension) ; each group was washed with 4 replicate. According to the results, washing time for Tanoan is 1 minute and 30 seconds but for clay is 45 minute. The fertilization rate in washed eggs in Gastrula stage by Tanoan and clay suspension are 78.7 and 71.6 percent respectively. Fungal infected percent are 3.40 and 8.70 respectively, hatching rate 77.32 and 69.57, and larvae survival rates to yolk sac resumption are 96.39 and 92.38 respectively. The replacement of Tanoan would save time and could reduce the possible expenses in the process and also a few number of fertilize eggs re-exposed to the possible threat of being damaged. It will also increase the larvae survival rates in propagation.

Keywords: Tanon; Clay; Beluga; *Huso huso*.

*- Corresponding Author; Email: hamid.hosseini1982@gmail.com