بررسی امکان رفع چسبندگی تخم به‌وسیله آنزیم آلکالاز، اسیدتانیک و سدیم کلراید به‌جای محلول کاربامید در فرآیند تکثیر مصنوعی ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*)

- **نیلوفر محمدجعفری***: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- **محمدرضا ایمان‌پور**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۷

چکیده

تخم‌های بسیاری از ماهیان آب‌شیرین بعد از فعال‌سازی و تماس با آب حالت چسبنده پیدا می‌کنند که علت آن وجود مولکول‌های گلیکوپروتئینی در بخش خارجی آن‌هاست. چسبندگی تخم‌ها تحت شرایط تفریخ‌گاهی مطلوب نبوده و انباشتگی تخم‌های متصل به‌هم منجربه تلفات دراثر آنوکسی و رشد قارچ‌ها می‌شود. بنابراین یکی ازمراحل تکثیرمصنوعی این قبیل‌ماهیان ازجمله کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*)رفع چسبندگی تخم‌ها پیش از انکوباسیون می‌باشد. در این تحقیق به‌منظور رفع چسبندگی تخم‌های لقاح یافته ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) از سه ماده آنزیم آلکالاز، اسیدتانیک و سدیم کلراید استفاده شد و نتایج مربوط به درصد لقاح و نرخ تفریخ با روش متداول کارگاه (شست‌شوی تخم‌ها با محلول کاربامید) مقایسه شد. ۹غلظت از سدیم کلراید ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ٤۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر در سه زمان ۱۵، ۳۰ و ٦۰ دقیقه به‌کار گرفته شد. ۳ غلظت از اسیدتانیک ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر در سه زمان ۰/۵، ۲ و ۵ دقیقه به‌کار گرفته شد. هر سه غلظت در سه تکرار انجام شد. ۲۰ دقیقه پس از فعال‌سازی ۵۰ میلی‌لیتر آنزیم با غلظت ۲ میلی‌لیتر بر لیتر اضافه شده و در زمان‌های ٤۵، ٦۰، ۷۵ و ۹۰ ثانیه در معرض قرار گرفتند. در نهایت ٤ بار با آب هچری شست‌شو داده شده و به انکوباسیون انتقال داده شدند. نتایج در مورد رفع چسبندگی تخم‌ها به‌وسیله تیمار اسیدتانیک نشان داد که بهترین درصد لقاح (۹۹/۵۷) و نرخ تفریخ (۹۹/٤٦) مربوط به غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر در مدت زمان ۰/۵ دقیقه بود. در مورد رفع چسبندگی تخم‌ها به‌وسیله تیمار سدیم کلراید نشان داد که بهترین درصد لقاح (۸۷/۱) و نرخ تفریخ (۸٦/۲۸) مرتبط به غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر در مدت زمان ۳۰ دقیقه بود. بیش‌ترین درصد لقاح (۹۷/۵۲) و تفریخ (۹٦/۷۲) با آنزیم آلکالاز مربوط به تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر در مدت زمان ٤۵ ثانیه بود که به‌لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشتند (P<۰/۰۵).

کلمات کلیدی: کپورمعمولی، رفع چسبندگی، آنزیم آلکالاز، اسیدتانیک، سدیم کلراید

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: nm.jafari1371@gmail.com

مقدمه

تکثیر و پرورش آبزیان از فعالیت‌های اقتصادی با ارزش محسوب می‌شود. به‌طوری‌که صنعت پرورش ماهیان گرمابی در سال‌های اخیر یکی‌ازمهم‌ترین‌زیر بخش‌های شیلات است که به سرعت توسعه یافته و مورد توجه قرار گرفته است (سالنامه آماری شیلات ایران، ۱۳۹۱). دراین میان کپورمعمولی ازنظر کیفیت گوشت و تکثیر و پرورش آسان به‌عنوان یکی از مهم‌ترین ماهیان گرمابی به‌شمار می‌رود. یکی از فاکتورهای مهم در لقاح، کیفیت تخم‌های به‌دست آمده از مولدین می‌باشد (Lahnsteiner، ۲۰۰۰). در تکثیر مصنوعی که در کارگاه‌ها به‌کمک دست و در ظروف خاصی انجام می‌گیرد، خاصیت چسبندگی سبب به‌هم چسبیدن و توده‌ای شدن تخمک‌ها و تلفات به‌دلیل تاثیر قارچ‌ها در مرحله انکوباسیون شده، کاهش شدید تولید لارو را باعث می‌گردد (پوردهقانی و همکاران، ۱۳۹۱). کوریون چسبنده‌ای که در تخم‌های این ماهیان ایجاد می‌شود، امکان اتصال تخم‌ها به بسترهای مختلف را فراهم می‌آورد(Rhiel و Patzner، ۱۹۹۸). چسبندگی تخم‌ها در تخم‌ریزی طبیعی ماهیان یا در شرایط کنترل‌شده بر بسترهای مخصوص (آشیانه‌ها) دارای اهمیت است. با این وجود، چسبندگی در شرایطی که تخم‌ها در ابزارهای انکوباسیون انکوبه می‌شوند مطلوب نیست، به این دلیل که تخم‌ها به‌هم متصل شده و تولید توده‌ای جامد می‌کنند که تبادل گازی را با مشکل‌مواجه‌کرده و سبب رشد عوامل بیماری‌زا می‌شوند (Demska-zakes و همکاران، ۲۰۰۵). بنابراین یکی از مراحل تکثیر مصنوعی این قبیل ماهیان رفع چسبندگی تخم‌ها پیش از ورود به انکوباسیون می‌باشد (Linhart و همکاران، ۲۰۰۰). بنابراین بیوتکنیک تکثیر مصنوعی نیاز به بهینه‌سازی و نوآوری دارد. انواع روش‌های به‌کار رفته در مورد رفع چسبندگی را می‌توان به‌طور عمده به سه دسته تقسیم نمود: فیزیکی (شامل استفاده از ذرات رس، پودر تالک، نشاسته و ...)، شیمیایی (شامل استفاده از محلول‌ها مانند اسیدتانیک، کاربامید، شیر، سولفیت سدیم و ...) و آنزیمی (کاربرد آنزیم‌های پروتئاز نظیر تریپسین، α-کیموتریپسین، آلکالاز و ...) (کلوانی و همکاران، ۱۳۹۱). استفاده از روش‌های فیزیکی و شیمیایی زمان‌بر و با کارایی پایین است(Gela و همکاران، ۲۰۰۳). با این‌حال،روش‌های آنزیمی مورد استفاده که اغلب هزینه‌بر هستند، در مدت عرض چند دقیقه‌از چسبندگی تخم جلوگیری می‌کند(Linhart و همکاران، ۲۰۰۴؛ Zarski و همکاران، ۲۰۱۳). موثرترین این روش‌ها برای تخم‌های گونه‌های کپورماهیان به‌ویژه کپور معمولی وجود دارد و علت این است که تکثیر مصنوعی این گونه‌از سال ۱۹۵۰ در حال انجام است. برای دیگر گونه‌ها خصوصاً آن‌هایی که بیوتکنیک تکثیر مصنوعی آن‌ها طی چند سال اخیر ایجاد شده است، روش بهینه رفع چسبندگی هنوز در حال مطالعه است(Demska-zakes و همکاران، ۲۰۰۵).دراین مطالعه، مواد متفاوت(آنزیم آلکالاز،اسیدتانیک وسدیم کلراید) در رفع چسبندگی تخم ماهیان کپورمعمولی مورد استفاده قرار گرفت و تأثیر و کارایی آن‌ها در تکثیر مصنوعی مورد مقایسه قرار گرفت. هدف از انجام این تحقیق، افزایش راندمان تولید در مرحله انکوباسیون تکثیر مصنوعی کپورمعمولی می‌باشد.علاوه‌براین،نتایج حاصل از رفع چسبندگی تخم‌ها با روش متداول در کارگاه (شست‌وشو با گل رس) مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

مراحل میدانی: این پژوهش در بهار ۱۳۹۷ در مرکز تکثیر و پرورش ماهیان گرمابی حمیدرضا اسدی‌نیاکی در شهرستان گنبد واقع در خط نو شهرک شهیدبهشتی انجام شد. در این مطالعه تعداد ۵ مولد ماده کپورمعمولی با میانگین وزن اولیه ۴/۵ کیلوگرم و ۳ عدد مولد نر با میانگین وزن ۲/۵ کیلوگرم جهت انجام مراحل آزمایش تهیه شد و ماهیان مولد در حوضچه‌های فایبرگلاس با هوادهی ملایم به‌مدت یک هفته سازگار شدند. مولدین ماده کپورمعمولی با دوز تـزریق ۱۰ میکروگرم LHRH و ۴ سی‌سی متوکلوپرامید و ۱ سی‌سی کلسیم گلوکونات به‌ازای هر کیلوگرم وزن ماهی تزریق شد. میزان تزریق برای ماهیان نر نصف ماهیان ماده درنظر گرفته شد. پس از اسپرم‌گیری و تخمک‌گیری‌از ماهیان، اسپرم ماهیان نر و تخمک‌ماهیان‌ماده‌با یکدیگر ترکیب شدند و جهت انجام آزمایش هم‌سان‌سازی‌صورت گرفت. ۹ غلظت از سدیم کلراید ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر در سه زمان ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه به‌کار گرفته و سپس به انکوباتور منتقل شد. ۳ غلظت از اسیدتانیک ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر در سه زمان ۰/۵، ۲ و ۵ دقیقه به‌کار گرفته شد. هر سه غلظت در سه تکرار انجام شدند. تخم‌ها در طی مراحل شست و شو هم زده شدند. پس از اتمام این کار درجه سخت شدن تخم مشخص شد و سپس انکوبه شد. ۲۰ گرم تخم در یک ظرف ۲۵۰ میلی‌لیتر قرار داده شد، سپس ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد اضافه گردید. در زمان‌های ۲، ۴ و ۶ دقیقه پس از فعال‌سازی آب اضافی خارج و ۲۰ میلی‌لیتر آب هچری اضافه شد. ۸ دقیقه پس از فعال‌سازی ۵۰ میلی‌لیتر از آنزیم آلکالاز با غلظت ۲ میلی‌لیتر بر لیتر اضافه شد. ۲۰ دقیقه پس از فعال‌سازی ۵۰ میلی‌لیتر آنزیم با غلظت۲ میلی‌لیتر بر لیتر اضافه شده و در زمان‌های ۴۵، ۶۰، ۷۵ و ۹۰ ثانیه‌در معرض قرار گرفته‌شدند. در نهایت ۴ بار با آب هچری شست‌شو شده و به انکوباسیون انتقال داده شدند. محلول کاربامید با اضافه کردن ۳۰ گرم اوره و ۴۰ گرم نمک در ۱۰ لیتر آب تهیه و سپس به‌جای آب این محلول به تخمک و اسپرم

اضافه شد. به‌میزان ۲۵ درصد از حجم تخمک‌ها (به همراه اسپرم) به آن‌ها آب اضافه شد. مخلوط به آرامی توسط پر استریل هم زده‌شد. هم‌چنان که تخم‌ها هم زده شدند، محلول کاربامید به ظرف محتوی تخم‌ها و محلول کاربامید اضافه می‌شود و آب داخل ظرف خالی‌شده وتوسط محلول تازه جایگزین شد. پس از گذشت ۱ ساعت چسبندگی تخم‌ها برطرف شد (Billard و همکاران، ۱۹۹۵).

محاسبه درصد لقاح و تفریخ: تعداد کل تخم‌ها در هر روز شمارش‌شد. تخم‌های مرده شمارش شده و حذف شدند و سپس تعداد تخم‌های هچ شده نیز محاسبه شد. درصد لقاح و تفریخ تخم‌ها به صورت زیر محاسبه شد (Linhart و همکاران، ۲۰۰۳):

درصد لقاح: [تخم‌های مرده/(تخم‌های مرده-تعداد کل تخم‌ها)]×۱۰۰

درصد تفریخ: (تعداد کل تخم‌ها/تعداد لاروهای هچ شده) × ۱۰۰

آنالیز آماری: داده‌ها با استفاده از تجزیه واریانس یک‌طرفه (ANOVA) توسط نرم‌افزار SPSS مورد ارزیابی قرار گرفت. تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد در بین میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن صورت گرفت. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شد.

نتایج

نتایج در مورد رفع چسبندگی تخم‌ها به‌وسیله تیمار اسید تانیک: درجدول ۱ نشان‌داد که بهترین درصد لقاح (۹۹/۵۷) مربوط به‌تیمار ۱با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم درلیتر درمدت‌زمان ۰/۵ دقیقه‌بود، هم‌چنین کم‌ترین درصد لقاح مربوط به تیمار ۹ با غلظت ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر در مدت زمان ۵ دقیقه بود (P<۰/۰۵). بیش‌ترین نرخ تفریخ تخم‌ها (۹۹/۴۶) نیز مربوط به تیمار ۱ با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر در مدت زمان ۰/۵ دقیقه بود و کم‌ترین نرخ تفریخ (۹۸/۰۱) مربوط به تیمار ۸ با غلظت ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر در مدت زمان ۲ دقیقه بود (P<۰/۰۵).

نتایج رفع چسبندگی به‌وسیله آنزیم آلکالاز: نتایج در مورد رفع چسبندگی تخم‌ها به‌وسیله تیمار آنزیم آلکالاز در جدول ۲ نشان داد که بهترین درصد لقاح مربوط به تیمار ۱ با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر در مدت زمان ۴۵ ثانیه و بیش‌ترین نرخ تفریخ مربوط به تیمار ۱ با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر در مدت زمان ۴۵ ثانیه بود. هم‌چنین کم‌ترین درصد لقاح مربوط به‌تیمار۴ با غلظت ۵۰ میلی‌گرم‌درلیتر در مدت زمان ۹۰ ثانیه و کم‌ترین نرخ تفریخ نیز مربوط به تیمار ۴ با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر در مدت زمان ۹۰ ثانیه بود (P<۰/۰۵).

نتایج رفع چسبندگی به‌وسیله تیمار سدیم کلراید: نتایج در مورد رفع چسبندگی تخم‌ها به‌وسیله تیمار سدیم کلراید در جدول ۳و ۴ نشان داد که بهترین درصد لقاح مربط به تیمار با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر در مدت زمان ۳۰ دقیقه، هم‌چنین کم‌ترین میزان درصد لقاح مربوط به تیمار با غلظت ۱۰۰۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر در مدت زمان ۶۰ دقیقه بود (P<۰/۰۵). بهترین نرخ تفریخ مربوط به تیمار با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتردرمدت زمان ۳۰ دقیقه بود و کم‌ترین نرخ‌تفریخ مربوط به تیمار با غلظت ۱۰۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر در مدت زمان ۶۰ دقیقه بود (P<۰/۰۵).

جدول ۱: درصد لقاح و تفریخ در تیمارهای اسید تانیک

تیمارها	درصد لقاح	درصد تفریخ
شاهد	۷۶/۴۶±۰/۸۸^{b}	۶۵/۰۸±۰/۵۶^{f}
تیمار ۱	۹۹/۵۷±۰/۰۷^{a}	۹۹/۴۶±۰/۰۲^{ab}
تیمار ۲	۹۹/۵۱±۰/۲۱^{a}	۹۹/۲۶±۰/۰۲^{bc}
تیمار ۳	۹۹/۹۷±۰/۰۰۵^{a}	۹۹/۸۵±۰/۰۱^{a}
تیمار ۴	۹۹/۷۶±۰/۰۱^{a}	۹۹/۱۳±۰/۰۰۵^{bc}
تیمار ۵	۹۹/۵۶±۰/۰۲^{a}	۹۸/۵۱±۰/۰۳^{de}
تیمار ۶	۹۹/۰۲±۰/۰۱^{a}	۹۸/۱۸±۰/۰۲^{de}
تیمار ۷	۹۹/۱۵±۰/۰۰۸^{a}	۹۸/۷۳±۰/۰۲^{cd}
تیمار ۸	۹۹/۳۴±۰/۰۴^{a}	۹۸/۰۱±۰/۰۱^{e}
تیمار ۹	۹۹/۷۶±۰/۰۱^{a}	۹۸/۵۲±۰/۰۲^{de}

حروف انگلیسی غیرمشترک در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) می‌باشد. داده‌ها به‌صورت (انحراف معیار± میانگین) می‌باشد.

جدول۲: درصد لقاح و تفریخ در تیمارهای آنزیم آلکالاز

تیمارها	درصد لقاح	نرخ تفریخ
شاهد	۷۶/۴۶±۰/۸۸^{b}	۶۵/۰۸±۰/۵۶^{c}
تیمار۱	۹۷/۵۲±۰/۲^{a}	۹۶/۷۲±۰/۰۴^{a}
تیمار۲	۹۸/۱۵±۰/۸^{a}	۹۷/۵۱±۰/۱۲^{a}
تیمار۳	۹۷/۵۳±۰/۱۷^{a}	۹۶/۷۵±۰/۵^{a}
تیمار۴	۹۶/۶۱±۰/۱۹^{a}	۹۵/۳۳±۰/۲۳^{b}

حروف انگلیسی غیرمشترک در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) می‌باشد. داده‌ها به‌صورت (انحراف معیار± میانگین) می‌باشد.

جدول ۳: درصد لقاح در تیمارهای سدیم کلراید

غلظت	زمان		
(میلی‌گرم/لیتر)	۱۵	۳۰	۶۰
۰	//////////////	//////////////	۷۶/۴۶±۰/۸۸^{e}
۲۵	۶۲/۱۸±۰/۴۳^{m}	۶۰/۴۹±۰/۵^{n}	۵۶/۹۶ ±۰/۶۲^{o}
۵۰	۶۵/۴۷ ±۰/۸۳^{jk}	۶۹/۵۰±۰/۰۵^{i}	۶۴/۷۰±۰/۶^{kl}
۱۰۰	۶۸/۹۱±۰/۲۱^{i}	۷۱/۰±۰۹/۶۴^{h}	۷۳/۴۷ ±۰/۲۹^{g}
۲۵۰	۷۴/۶۹±۰/۱^{fg}	۷۵/۱۲ ±۰/۰۶^{ef}	۷۸/۲۰±۰/۱۱^{d}
۵۰۰	۷۸/۹۸±۰/۲^{d}	۸۲/۸ ±۰/۴۱^{bc}	۸۲/۳۴±۰/۸۶^{c}
۱۰۰۰	۸۴/۸۰ ±۰/۰۸^{b}	۸۷/۱±۰/۵۱^{a}	۸۵/۷۵±۰/۵^{a}
۲۰۰۰	۷۴/۲۸±۰/۵^{fg}	۷۰/۴±۰/۱۹^{hi}	۶۹/۴۷±۰/۵^{i}
۴۰۰۰	۶۲/۹۲±۰/۷^{lm}	۶۵/۸۳±۰/۲۱^{j}	۶۶/۲۰±۰/۲۴^{j}
۱۰۰۰۰	۵۱/۸±۰/۹^{p}	۵۰/۷±۰/۳^{qr}	۴۹/۳۴±۰/۵^{r}

حروف انگلیسی غیرمشترک در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) می‌باشد. داده‌ها به‌صورت (انحراف معیار± میانگین) می‌باشد.

جدول۴: نرخ تفریخ در تیمارهای سدیم کلراید

غلظت (میلی‌گرم/لیتر)	زمان (دقیقه) ۱۵	۳۰	۶۰
۰(شاهد)	////////////////	////////////////	۶۵/۸۰±۰/۵۶^{i}
۲۵	۶۱/۶۳±۰/۴۵^{k}	۵۹/۸۷±۰/۴۶^{l}	۵۵/۸۴ ±۰/۸۳^{m}
۵۰	۶۴/۶۵±۱/۰۵^{ij}	۶۷/۱۰ ±۰/۰۷^{h}	۶۳/۱۱ ±۰/۶۱^{jk}
۱۰۰	۶۷/۹۲±۰/۲۱^{h}	۷۰/۱۴ ±۰/۷^{g}	۷۲/۴۵ ±۰/۳^{f}
۲۵۰	۷۳/۶۸ ±۰/۰۹^{ef}	۷۴/۵۵ ±۰/۳۷^{e}	۷۷/۸۰ ±۰/۲^{d}
۵۰۰	۷۸/۱۶ ±۰/۳^{d}	۸۱/۸ ±۰/۴۴^{bc}	۸۱/۱۷ ±۰/۶^{c}
۱۰۰۰	۸۳/۷۰ ±۰/۰۹^{b}	۸۶/۲۸ ±۰/۷^{a}	۸۵/۹۳±۱/۰۹^{a}
۲۰۰۰	۷۳/۲۱ ±۰/۵۵^{ef}	۶۹/۳۶ ±۰/۱۹^{gh}	۶۸/۵۱±۰/۵۳^{h}
۴۰۰۰	۶۲/۲۷ ±۰/۵۳^{k}	۶۴/۷۸ ±۰/۲۵^{i}	۶۵/۱۰±۰/۳^{i}
۱۰۰۰۰	۵۱/۲۷ ±۱/۰۵^{n}	۴۹/۸ ±۰/۳^{n}	۴۷/۹۹ ±۰/۰۹^{o}

حروف انگلیسی غیرمشترک در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) می‌باشد. داده‌ها به‌صورت (انحراف معیار± میانگین) می‌باشد.

جدول ۵: مقایسه بهترین درصد لقاح و تفریخ بین گروه‌های تیمار و شاهد

	درصد تفریخ	درصد لقاح
بهترین شاهد	۷۶/۴۶ ±۰/۸۸	۶۵/۰±۰۸/۵۶
بهترین آنزیم آلکالاز	۹۷/۵۲±۰/۲	۹۶/۷۲±۰/۰۴
بهترین اسید تانیک	۹۹/۵۷±۰/۰۷	۹۹/۴۶±۰/۰۲

حروف انگلیسی غیرمشترک در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) می‌باشد. داده‌ها به‌صورت (انحراف معیار± میانگین) می‌باشد.

بحث

رفع چسبندگی تخم‌ها در تولیدمثل مصنوعی کنترل شده در ماهیان آب‌شیرین مرحله‌ای بحرانی است(Linhart و همکاران،۲۰۰۳). برای رفع چسبندگی تخم‌های لقاح یافته ماهیان مواد زیادی تاکنون به‌کار رفته است که مشابهت‌های زیادی بین نتایج حاصله از آن تحقیقات و نتایج این تحقیق وجود دارد.در این آزمایش رفع چسبندگی تخم‌های لقاح یافته ماهی کپورمعمولی با استفاده از اسیدتانیک با موفقیت انجام شد. حداقل مدت زمان لازم برای انجام دادن این عمل ۰/۵ دقیقه بود که در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر این ماده حاصل شد. از نظر درصد تفریخ نیز بهترین نتایج نیز در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد که از نتایج سایر گروه‌ها بالاتر بود. از این دیدگاه می‌توان گفت غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسیدتانیک برای رفع چسبندگی تخم‌های کپورمعمولی مناسب است. هم‌چنین Al Hazza و Hussein (۲۰۰۳) این ماده را برای رفع چسبندگی تخم‌های باربوس حمری (*Barbus luteus*) مورد استفاده قرار دادند. به این صورت که بعد از لقاح، محلول ۰/۳٪ نمک به نسبت ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول نمک به‌ازای ۱ کیلوگرم تخم به آن‌ها افزوده شد. بعد از ۲ دقیقه به‌هم زدن، تخم‌ها آب‌کشی شده و به‌مدت ۱۵ ثانیه وارد محلول اسیدتانیک با غلظت ۱ گرم بر لیتر می‌شوند.بعداز این‌مدت تخم‌هارا با آب تفریخ‌گاه‌شسته و وارد انکوباتور می‌کنند که به‌لحاظ رفع چسبندگی مشابه این تحقیق می‌باشد. Demska-zakesو همکاران(۲۰۰۵) سه غلظت متفاوت اسیدتانیک را در سه زمان متفاوت به‌منظور اطلاع از غلظت و زمان بهینه برای رفع چسبندگی تخم‌های ماهی سوف سفید (*Sander lucioperca*) مورد آزمایش قرار دادند. تخم‌های لقاح یافته سوف‌سفید بعد شست‌شو با آب، به‌مدت ۰/۵، ۲ و ۵ دقیقه در معرض اسیدتانیک با غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر قرار گرفتند و مشاهده شد که بهترین نتیجه در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر در زمان ۵ دقیقه و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر در زمان ۲ دقیقه و نیز ۵ دقیقه حاصل شد که به‌لحاظ غلظت مورد نظر برای رفع چسبندگی با نتایج این تحقیق مشابهت دارد. از طرف دیگر در مطالعه اثر اسیدتایک بر تخم‌های سوف سفید نشان داده شده که غلظت اسیدتانیک و زمان مواجه بر فرآیند سخت شدن تخم‌های سوف سفید، بر میزان حذف چسبندگی و بقاء جنین تاثیر دارد، زیرا اسیدتانیک به‌دلیل کاهش زمان مورد نیاز برای رفع چسبندگی که باعث کاهش زمان مورد نیاز برای هم زدن تخم‌ها می‌گردد باعث کاهش میزان تخم‌های شکسته در ماهی تکثیر شده می‌گردد که در نتیجه باعث کاهش از بین رفتن تخم‌ها می‌گردد که با نتایج حاصل از این تحقیق مشابه است. Geldhauser (۱۹۹۵) نیز از اسیدتانیک به‌منظور رفع چسبندگی تخم‌های لای‌ماهی(*Tinca tinca*) استفاده نموده است. با توجه به متفاوت بودن ماهی و میزان چسبندگی تخم‌ها بعداز لقاح در دو گونه نتایج حاصل از آن تحقیق با تحقیق حاضر از نظر تاثیر غیر مضراسیدتانیک بر روی لاروهای حاصله و هم‌چنین تاخیر در فرآیند تخم‌گشایی مطابقت دارد. نتایج حاصل از شست‌وشوی تخم‌ها با سدیم کلراید نشان می‌دهد که تخم‌های تیمار شده با نمک در غلظت بین ۱۰۰-۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر دارای بهترین نتایج بودند. بهترین نرخ تفریخ(۸۵/۹۳) در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر در مدت زمان ۳۰ ثانیه و بهترین درصد لقاح (۸۷/۱ و ۸۵/۷۵) نیز مربوط به تیمارهای با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتردر زمان‌های ۳۰ و ۶۰ ثانیه بود که این نتایج دقیقاً با یافته‌های مربوط به Rasowo و همکاران (۲۰۰۷) منطبق می‌باشد. Phelpsو Walser(۱۹۹۳)دریافتندکه تیمار تخم‌های ماهی کوی (Coi carp) با سدیم کلراید در غلظت بین ۱۰۰۰-۲۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر به‌مدت ۶۰ دقیقه باعث بهبود نرخ تفریخ در مقایسه با گروه شاهد که از غلظت ۵۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده کرد، می‌شود که‌این غلظت‌برای تخم مضر بود و باعث کاهش نرخ تفریخ می‌گردید. Froelich و Engelhardt (۱۹۹۶) دریافتند که تیمار تخم‌های گربه ماهی اروپایی (*Silurus* glanis) به‌وسیله سدیم کلراید در غلظت‌های ۰-۵۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر دارای

بالاترین میزان نرخ تفریخ بود. هم‌چنین Schnick و همکاران (۱۹۸۹) گزارش دادند که سدیم کلراید در غلظت ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر باعث از بین رفتن هرگونه باکتری بر روی سطح تخم ماهی می‌شود، این محققان هم‌چنین اظهار کردند که غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر از سدیم‌کلراید می‌تواند منجر به درمان تخم‌ها شود، ولی تنها برای مدت زمانی کوتاه و نه بیش‌تر از ۳۰ ثانیه. ولی Clada و همکاران (۲۰۰۴) برخلاف پژوهش قبلی بیان داشتند که در غلظت‌های بالاتر از ۳۰۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر از نمک، مانع از رشد قارچ‌ها در تخم خرچنگ‌های است تاکیدی نشد و برای موثر بودن به غلظت‌های بسیار بالاتر مورد نیاز است. هم‌چنین Rasowo و همکاران (۲۰۰۷) بیان داشتند که تیمار تخم‌ها به‌وسیله سدیم‌کلراید در غلظت ۱۰۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر باعث کاهش نرخ تفریخ و پایین آمدن بازدهی در فرآیند رفع چسبندگی می‌شود که این نتایج با یافته‌های حاصل از این تحقیق مطابقت دارد، زیرا در این پژوهش پایین‌ترین نرخ لقاح (۳۴/ ۴۹٪) و پایین‌ترین درصد لقاح (۴۸٪) مربوط به غلظت ۱۰۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر در مدت زمان ۶۰ ثانیه بود. با توجه به نتایج پژوهش‌های ذکر شده می‌توان اظهار نمود که استفاده از سدیم کلراید در غلظت‌های متفاوت با توجه به نوع و گونه می‌تواند مختلف باشد. با توجه به این نتایج می‌توان گفت که استفاده از سدیم‌کلراید در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر می‌تواند جایگزین مناسبی به‌جای محلول کاربامید باشد. هم‌چنین نمک نسبت به محلول کاربامید دارای قیمت پایین‌تری نیز می‌باشد. در این پژوهش رفع چسبندگی تخم‌های لقاح یافته ماهی کپورمعمولی با استفاده از آنزیم آلکالاز نیز با موفقیت انجام شد. با توجه به یکسان بودن غلظت‌ها (۲۰ میلی‌گرم در لیتر) بالاترین درصد لقاح در این آزمایش ۹۷/۵۲٪ بود که در زمان ۴۵ ثانیه به‌دست آمد. بالاترین نرخ تفریخ نیز ۹۶/۷۲٪ بود که در زمان ۴۵ثانیه به‌دست آمد. از این دیدگاه می‌توان گفت که غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر از آنزیم آلکالاز برای رفع چسبندگی تخم‌های ماهی کپورمعمولی مناسب است. براساس تحقیقات Linhart و همکاران (۲۰۰۳)، استفاده از آنزیم در رفع چسبندگی تخم‌های ماهیان چنان‌چه حتی از نظر درصد بازماندگی تفاوت نشان ندهد، به‌علت کاهش محسوس مدت زمان انجام پروسه رفع چسبندگی، نسبت به روش‌های سنتی دارای مزیت است. استفاده از آنزیم الکالاز در مورد ماهی کپورمعمولی زمان لازم برای فرآیند رفع چسبندگی را از ۷۰ دقیقه در روش سنتی (شست‌وشو با پودر شیر) به ۲۱ دقیقه کاهش داده است (Linhart و همکاران، ۲۰۰۳)، درحالی‌که از نظر میزان بازماندگی بین دو روش مذکور تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. هم‌چنین کاربرد آنزیم در رفع چسبندگی تخم‌های گربه‌ماهی اروپایی (*Silurus glanis*) نشان داد که زمان رفع چسبندگی این تخم‌ها نیز با کاربرد آنزیم از ۳۰ به ۳ دقیقه کاهش می‌یابد (Linhart و همکاران، ۲۰۰۲). کاهش مدت زمان رفع چسبندگی در صورت به‌کارگیری آنزیم (۴۵ ثانیه در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر در مقابل حدود ۶۰ دقیقه در روش سنتی) در یافته‌های حال از این تحقیق نیز مشاهده شد. علت کاهش ضخامت لایه ژلاتینی در تماس با آنزیم آلکالاز ماهیت گلیکوپروتئینی این لایه است که آنزیم آلکالاز به منزله پروتئاز، در تماس با آن مانند حلال عمل می‌کند. این بخش از نتایج با یافته‌های Cherr و Clark (۱۹۸۴) و کلوانی و همکاران (۱۳۹۲) هماهنگ بود، زیرا این محققان دریافته بودند که لایه ژلاتینی در ماهیان (خاویاری) به‌نوعی به پروتئاز شبه تریپسین عکس‌العمل نشان می‌دهد. طبق انتظار نیزهر چه غلظت انزیم بیش‌تر باشد، حل شدن لایه ژلاتینی نیز سریع‌تر انجام می‌شود (کلوانی و همکاران، ۱۳۹۲). استفاده از آنزیم در تکثیر گربه ماهی اروپایی و نیز لای ماهی علاوه بر کاهش زمان دست‌کاری تخم‌ها (از ۱ ساعت در روش شست‌وشو با شیر و رس و نیز رس تنها در گربه‌ماهی به چند دقیقه) افزایش میزان بازماندگی را نیز به‌همراه دارد (Linhart و همکاران، ۲۰۰۳). در مورد لای ماهی غلظت و زمان مناسب کاربرد آنزیم آلکالاز ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مدت ۲ دقیقه است که در این صورت نرخ تفریخ به ۸۸/۱٪ رسید. این در حالی است که در همین شرایط کاربرد روش سنتی شیر و گل رس به نرخ تفریخ ۳۰٪ انجامید، ضمن این‌که مدت زمان لازم برای رفع چسبندگی در روش سنتی حدود ۶۰ دقیقه و در روش آنزیمی ۲ دقیقه بوده است (Linhart و همکاران، ۲۰۰۰). در این آزمایش در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش معنی‌دار میزان بازماندگی نسبت به‌روش سنتی مشاهده شد و میزان آن ۹۶/۷۲٪ بوده است. بنابراین، استفاده از آنزیم آلکالاز با غلظت ۲۰ میلی‌گرم درلیتر در مدت زمان ۴۵ ثانیه در رفع چسبندگی تخم‌های ماهی کپورمعمولی موجب افزایش درصد بازماندگی (نرخ تفریخ) می‌شود. بنابراین می‌توان گفت رفع چسبندگی تخم‌های ماهی کپورمعمولی با محلول آنزیم آلکالاز موفقیت‌آمیز است و بهترین غلظت برای این عمل ۲۰ میلی‌گرم درلیتر است. شست‌وشوی تخم‌ها با محلول ۲۰ میلی‌گرم درلیتر آنزیم تریپسین طی مدت زمان ۴۵ ثانیه به‌طور کامل چسبندگی تخم‌ها را رفع می‌کند و منجر به بازماندگی برابر با ۹۶/۷۲٪ می‌شود. این روش رفع چسبندگی از نظر بیولوژیک قابلیت جانشینی روش شست‌وشو با محلول کاربامید را دارا است. با توجه به مقایسه نتایج به‌دست آمده در آزمایشات مختلف انجام شده در زمینه رفع چسبندگی می‌توان در مورد روش بهینه رفع چسبندگی تخم‌ها برای هر گونه اظهار نظر نمود. در اکثر آزمایشات انجام شده، برای قضاوت در مورد مناسب بودن و قابل اجرا بودن روش‌های مختلف رفع چسبندگی عمدتاً فاکتورهای زمان، کمیت لاروهای تفریخ شده و نیز هزینه مواد درنظر گرفته شده‌اند (کلوانی و همکاران، ۱۳۹۲). در مورد فاکتور زمان می‌توان اظهار کرد

چنان‌چه روشی بتواند مدت زمان لازم برای رفع چسبندگی را کاهش دهداز این‌نظر مناسب‌تر است(کلوانی و همکاران، ۱۳۹۲).درروش‌های سنتی رفع چسبندگی مانند استفاده از محلول کاربامید و یا استفاده از نمک،مدت‌زمان طولانی انجام‌فرآیندازنکات منفی این‌روش‌هامی‌باشد. مزیت عمده کاربرد روش‌های آنزیمی و استفاده از اسیدتانیک،کاهش قابل توجه مدت‌زمان دست‌کاری تخم‌ها می‌باشد. کمیت لاروهای تولید شده‌از فاکتورهای اصلی روش رفع چسبندگی می‌باشد به‌عنوان‌مثال در این آزمایش گرچه سدیم کلراید قادر است چسبندگی تخم‌های ماهی کپورمعمولی را برطرف نماید، اما لاروهای تولید شده در این روش در تعداد بسیار کم‌تری از این تخم‌ها مشاهده شد. بنابراین استفاده از محلول آنزیم و اسیدتانیک از این لحاظ نیز می‌تواند جایگزین بسیار مناسب‌تری از سدیم کلراید و محلول کاربامید باشد. در نهایت برای اجرای هر یک از روش‌های رفع چسبندگی در مقیاس وسیع باید به هزینه انجام کار نیز توجه داشت (Al Hazza و Hussein، ۲۰۰۳). با توجه‌به نتایج حاصل از ۴ روش‌متفاوت برای‌رفع چسبندگی‌تخم‌ها که در بالا ذکر گردید، درمقایسه بین‌آنزیم آلکالاز و اسیدتانیک، استفاده از اسیدتانیک به‌دلیل هزینه پایین‌تر، نرخ تفریخ بالاتر منطقی به‌نظر می‌رسد. هم‌چنین به‌دلیل مدت زمان قابل قبول و کم‌تر نسبت به محلول‌کاربامید و سدیم‌کلراید استفاده ازاسیدتانیک‌در تکثیر مصنوعی کپورمعمولی نسبت به دو روش ذکر شده نیز ارجحیت دارد.

تقدیر و تشکر

از سرکار خانم زهرا روحی و جناب آقای سعید اسدی‌نیاکی به‌دلیل همکاری‌های صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. **پوردهقانی، ک.، شکرکار، م.، کاظمی، ر.، وهاب‌زاده، ح.، ضیائی، م. و جلیل‌پور، ج.، ۱۳۹۱.** رفع چسبندگی تخم در تکثیر مصنوعی ماهیان خاویاری به‌وسیله کائولن، گچ و تالک. مجله توسعه آبزی‌پروری. سال ۶، شماره ۱، صفحات ۱ تا ۱۰.

۲. **کلوانی‌نیتلی، ب.، مجازی‌امیری، ب.، کلباسی، م. و نوری، ا.، ۱۳۹۱.** مروری بر روش‌های نوین در رفع چسبندگی تخم‌های لقاح یافته ماهیان. مجله بوم‌شناسی آبزیان. دوره ۲، شماره۲، صفحات ۱ تا ۱۸.

۳. **کلوانی‌نیتلی، ب.، مجازی‌امیری، ب.، کلباسی، م. و نوری، ا.، ۱۳۹۲.** مطالعه تطبیقی اثر آنزیم تریپسین و روش متدوال گل‌شویی در حذف لایه چسبنده تخم لقاح یافته تاس‌ماهی ایرانی. نشریه شیلات مجله منابع طبیعی ایران. صفحات ۱۰۹ تا ۱۲۲.

۴. **Al Hazza, R. and Hussein, A., 2003.** Stickness elimination of Himri Barbel (*Barbus luteus*, Heckel) eggs. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. Vol. 3, pp: 47-50.

۵. **Billard, R.; Cosson, G.; Perchec, G. and Linhart, O., 1995**. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. Aquaculture. Vol. 129, pp: 95-112.

۶. **Celada, J.D.; Carral, J.M.; Saez-Royuela, M.; Melendre, P.M. and Aguilera, A., 2004.** Effects of differen antifungal treatments on artificial incubation of the astacid crayfish (*pacifastacus leniusculus*) eggs. Aquaculture. Vol. 239, pp: 249-256.

۷. **Cherr, G.N. and Clark, W.H., 1984.** Jelly release in the eggs of the white sturgeon (*Acipenser transmontatus*). An enzymatically mediated event. Journal of Experimental zoology. Vol. 230, No. 1, pp: 145-149.

۸. **Demska-zakes, K.; Zake, Z. and Raszuk, J., 2005.** The use of tannic acid to removal adhesiveness from pikeperch (*Sander lucioperca*) eggs. Aquaculture Research. Vol. 36, pp: 1458-1464.

۹. **Froelich, S.L. and Engelhardt, T., 1996.** Comprative effects of formalin and salt treatment on hatch rate of koi carp eggs. Porog. Fish-Cult. Vol. 58, pp: 209-211.

۱۰. **Gela, D.; Linhart, O.; Flajshans, M. and Rodina, M., 2003.** Egg incubation time and hatching success in tench *Tinca tinca* related to the procedure of egg stickiness elimination. Journal of Applied Ichthyology. Vol. 19, pp: 132-133.

۱۱. **Geldhauser, F., 1995**. Some aspects of embryonic and larvae development of tench (*Tinca tinca*). Polskie Archiwum Hydrobiologii. Vol. 42, pp: 1-2.

۱۲. **Lahnsteiner, F., 2000.** Morphological, Physiological and biochemical parameters characterizing the over ripening of rainbow trout eggs. Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 23, pp: 107-118.

۱۳. **Linhart, O.; Gela, D.; Flajshans, M.; Duda, P.; Rodina, M. and Novak, V., 2000.** Alcalase enzyme treatment for elimination of egg stickness in tench (*Tinca tinca*). Aquaculture. Vol. 191, pp: 303-308.

۱۴. **Linhart, O.; Stech, L.; Svarc, J.; Rodina, M.; Audebert, J.P.; Grecu, J. and Billard, R., 2002.** The culture of the European catfish (*Silurus glanis*) in Czech Republic and in France. Aquatic Living Resources. Vol. 15, pp: 139-144.

۱۵. **Linhart, O.; Rodina, M.; Gela, D.; Kocour, M. and Rodriguez, M., 2003.** Improvement of common carp artificial reproduction using enzyme for elimination of egg stickness. Aquatic Living Resources. Vol. 16, pp: 450-456.

۱۶. **Linhart, O.; Gela, D.; Rodina, M. and Kocour, M.,** 2004. Optimization of artificial propagation in European catfish, Silurus glanis. Aquaculture. Vol. 235, pp: 619–632.

۱۷. **Phelps, R.P. and Walser, C.A., 1993.** Effects of sea salt on the hatching of channel catfish eggs. J. Aquat. Anim. Health Vol. 5, pp: 205-207.

۱۸. **Rasowo, J.; Elijah Okoth, O. and Chege Ngugi, C., 2007.** Effects of formaldehydeT sodium chloride, potassium permanganate and hydrogen peroxide on hatch rate of African catfish (*Clarias gariepinus*). Aquaculture. Vol. 269, pp: 271-277.

۱۹. **Riehl, R. and Patzner, R.A., 1998.** Minereview: The modes of egg attachment in teleost fishes. Italian Journal of Zoology. Vol. 65, No. 1, pp: 415-420.

۲۰. **Schnick, R.A.; Meyer, F.P. and Gray, D.L., 1989.** A guide to approved chemicals in fish and fishery resource management. University of Arkansas Cooperative Exention Service, Little Rock. AR. 22 p.