بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد چهارم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹٤
http://japu.gau.ac.ir

تکثیر ماهیان نارس قره برون با استفاده از روش کاشت هورمون LHRH-A

*سید امین میرهاشمی رستمی[۱]، کوروش امینی[۱]، فاطمه خانی[۲] و حامد کلنگی‌میاندره[۳]
[۱]مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آب‌های داخلی گرگان، [۲]دانشجوی دکتری شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۳]استادیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۲۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۳/۲٦

چکیده

ماهیان خاویاری دریای خزر به‌دلیل ویژگی‌های منحصر بفردشان دارای ارزش اقتصادی بالایی می‌باشند. تاسماهی ایرانی به لحاظ استحصال خاویار و گوشت یکی از ماهیان پرارزش دریای خزر قلمداد می‌گردد. امروزه امکان تکثیر طبیعی این ماهی از بین رفته است و یکی از روش‌های تکثیرمصنوعی استفاده از هورمون LHRH-A می‌باشد. این تحقیق با هدف بررسی تکثیر ماهیان نارس قره‌برون با استفاده از روش کاشت هورمون LHRH-A با همکاری مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آب‌های داخلی گرگان در مرکز تکثیر و پرورش شهید مرجانی آق‌قلا صورت گرفت. در این تحقیق سه تیمار آزمایشی هورمون (۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکروگرم/ کیلوگرم وزن بدن) و یک تیمار کنترل در نظر گرفته شد. تکثیر مصنوعی در مراکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری انجام شد. نتایج نشان داد بین درصد لقاح و تفریخ تخم‌ها بین گروه کنترل و تیمارهای ۲ (۱۵ µg) و ۳ (۲۰ µg) اختلاف معنی‌دار وجود دارد. با افزایش هورمون تا ۱۵ g/kgµ درصد لقاح نیز افزایش یافت و پس از آن تا دوز g/kgµ ۲۰ روند نزولی پیدا نمود. با این‌حال این کاهش منتج به ایجاد اختلاف معنی‌دار نگردید. همچنین ارتباط خطی مثبتی بین درصد تفریخ و میزان افزایش دوز هورمون تا ۱۵ g/kgµ نیز وجود داشت. در مجموع کاشت هورمون LHRH-A به مقدار ۱۵ میکروگرم بر کیلوگرم در این پروژه تأثیر مثبت روی

*مسئول مکاتبه: rostamy_a@yahoo.com

روند بهبود جنسی تاسماهی ایرانی داشت. بر اساس مستندات ارائه شده می‌توان اظهار داشت که کاشت هورمون LHRH-A به مقدار ١٥ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تأثیر مثبتی بر روی روند بهبود جنسی تاسماهی ایرانی (قره‌برون) داشته است.

واژه‌های کلیدی: کاشت هورمون، LHRH-A، قره برون نارس، رسیدگی جنسی

مقدمه

ماهیان خاویاری موجود در دریای خزر به‌واسطه ارزش اقتصادی ناشی از ویژگی‌های منحصر بفردشان همواره نقش بسزائی در مناسبات اجتماعی و اقتصادی کشورهای حاشیه دریای خزر در سطح ملی و منطقه‌ای و حتی بین‌المللی داشته‌اند. لذا از دیرباز این کشورها (عمدتاً جمهوری اسلامی ایران و روسیه) همواره برنامه‌های خاصی در خصوص حفظ ذخایر آن در قالب کمیسیون‌های مشترک ارائه و اجراء نموده‌اند. به لحاظ این‌که عمده پراکنش ماهی قره‌برون یا تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) در حوزه جنوبی دریای خزر و سواحل کشور ما بوده، این‌گونه در حقیقت گونه بومی کشور ما محسوب می‌گردد. این ماهی جایگاه ویژه‌ای در ترکیب و میزان صید ماهیان خاویاری در کشور ما دارد و جدای از این امر، یکی از ماهیان پرارزش دریای خزر قلمداد می‌گردد که به لحاظ استحصال خاویار و گوشت از اهمیت تجاری بالایی برخوردار است.

امروزه بنا به دلایل مختلف از جمله تخریب شرایط بوم شناختی، صید بی‌رویه ماهیان مولد در فصل مهاجرت به رودخانه‌ها و به تبع آن امکان تکثیر طبیعی این ماهی نیز از بین رفته است (هولچیک[1]، ١٩٨٠) و شاهد کاهش میزان صید این ماهی (همانند سایر گونه‌های خاویاری دریای خزر) در آمار صید سالانه کشور می‌باشیم به همین دلیل فرآیند تکثیر و پرورش مصنوعی ماهیان خاویاری مخصوصاً گونه قره‌برون به‌عنوان پدیده‌ای اجتناب‌ناپذیر جایگاه ویژه‌ای در استراتژی توسعه فعالیت‌های شیلاتی کشور قرار دارد. از این رو سابقه تکثیر مصنوعی این‌گونه به‌همراه سایر گونه‌های ماهیان خاویاری موجود در دریای خزر، به‌صورت متمرکز به سال ١٣٥٠ برمی‌گردد که طی آن هر ساله تعداد کثیری از بچه ماهی به‌منظور ترمیم ذخایر به دریا رهاسازی می‌گردد.

1- Holcik

علی‌رغم توجهات ویژه‌ای که زیربخش‌های اجرایی شیلات در زمینه افزایش راندمان تولید این ماهیان انجام داده‌اند، امروزه تکثیر مصنوعی این ماهیان با مشکل جدیدی روبرو گردیده است. چنان‌که در سال‌های اخیر علاوه‌بر کاهش تعداد مولدین ماهی قره‌برون صید شده، درصد ماهیان نامناسب برای تکثیر مصنوعی (ضریب پلاریزاسیون ائوسیت بالاتر از IP>10) حالت فزاینده‌ای پیدا نموده است و این امر موجب گشته که انجام تکثیر مصنوعی این ماهیان براساس روش‌های مرسوم در مراکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری با مشکل روبرو گردد و بیم آن می‌رود که در سال‌های آتی با کاهش شدید مولدین مناسب و یا حتی فقدان آن روبرو شویم. دلایل بالا بودن شاخص ضریب پلاریزاسیون ائوسیت این ماهیان هرچه که باشد، موید این امر است که بالانس هورمون‌های جنسی در ماهی مخدوش گردیده و لذا ماهی در زیر مراحل پیشرفته مرحله ٤ جنسی دچار توقف شده و قادر نخواهد بود این مرحله را که نهایتاً منجر به اوولاسیون می‌گردد را پشت سر بگذارد. بنا به دلایل فوق‌الذکر و همچنین وجود شرایط متغیر دریای خزر و تأثیر عوامل انسانی در آن، ایجاب می‌نماید که وضعیت فیزیولوژیک این ماهیان پرارزش همیشه تحت کنترل بوده و نرماتیوهای تکثیر و پرورش مصنوعی آنان مورد اصلاح و یا حتی تغییر قرار گیرد (امینی، ۱۳۸۵).

یکی از روش‌هایی که در این‌گونه موارد می‌تواند به ایجاد تغییرات شرایط هورمونی مؤثر واقع گردد استفاده از هورمون LHRH-A می‌باشد که امروزه به‌طور وسیعی در تکثیر مصنوعی انواع ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرد.

تاکنون موفقیت استفاده از LHRH-A و آنالوگ‌های آن در القای رسیدگی نهایی اووسیت و اوولاسیون در بیش از ۳۰ گونه ماهی گزارش شده است (زوهر و میلوناس[1]، ۲۰۰۱). این هورمون دارای ماهیت پپتیدی بوده و مستقیماً از هیپوتالاموس آزاد گشته و بر روی آزادسازی GTH از هیپوفیز تأثیر می‌گذارد. در خصوص ماهیانی که شرایط مساعد (IP>10) را دارا نمی‌باشند نمی‌توان از روش‌های معمولی هورمون‌تراپی (تزریق) استفاده نمود و در این‌گونه از موارد خاص لازم است میزان هورمون موردنظر با تأخیر و به آرامی و طی مدت زمانی نسبتا طولانی وارد بدن ماهی شود تا از اعمال شوک به ماهی جلوگیری گردد. بنابراین بهترین روش پیشنهادی در این‌گونه موارد می‌تواند روش کاشت هورمون (Implantation) باشد؛ چرا که با این روش هورمون موردنظر (LHRH-a) به‌صورت

1- Zohar and Mylonas

بطنی و با فرصت زمانی نسبتاً طولانی و متناسب با نیاز ماهی وارد بدن شده و موجب عدم تغییر ناگهانی در فعل و انفعالات هورمونی ماهی گشته و از طرف دیگر دستکاری (Handling) ماهی را در زمان تأثیر هورمون به حداقل می‌رساند و این امر تأثیر مهمی در جهت عدم ایجاد استرس به ماهی خواهد داشت بنابراین می‌تواند کمک مؤثری به بهبود روند تکامل جنسی ماهی در خلال انجام هورمون تراپی نماید. مطالعات بسیاری در این زمینه درخصوص ماهیان مختلف از جمله ماهیان نر هالیبوت آتلانتیک توسط ورمرسن[1] و همکاران (٢٠٠٠) و درخصوص ماهی توربوت (Turbot) با نام علمی (*Scophthalamus maximus L.*) توسط موگنیر[2] و همکاران (١٩٩٩) و بسیار موارد دیگر صورت گرفته و در تمامی این مطالعات عملکرد هورمون‌تراپی با روش کاشت هورمون بسیار موفقیت‌آمیز بوده است ولی تاکنون گزارشی درخصوص اعمال این روش جهت تکثیر مصنوعی و در حقیقت پیش‌رس کردن گونه‌های مختلف ماهیان خاویاری گزارش نگردیده است. با توجه به موارد ذکر شده در مورد اهمیت این‌گونه ارزشمند و نیز اختلالات به‌وجود آمده در فرآیند تکثیر طبیعی این گونه و نیز اثرات مثبت احتمالی LHRHA و نبود مطالعه کافی در این مورد، در تحقیق حاضر به بررسی تکثیر ماهیان نارس قره برون با استفاده از روش کاشت هورمون LHRH-A پرداختیم.

مواد و روش کار

مکان و زمان: عملیات اجرایی این طرح از فصل تکثیر سال ١٣٨٦ با همکاری مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آب‌های داخلی گرگان و مرکز تکثیروپرورش ماهی شهید مرجانی شهرستان آق‌قلا استان و در محل مرکز شهید مرجانی انجام گرفت. کلیه مراحل انجام شده در این تحقیق در مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی گرگان صورت گرفت.

تهیه ماهی: تهیه مولدین با ضریب قطبیت هسته (PI) بالاتر از ١٠، از طریق نمونه‌برداری از تخمک ماهیان و تعیین فاصله هستک از قطب حیوانی سلول تخمک با استفاده از روش دتلاف[3] و همکاران (١٩٩٣) صورت گرفت. مولدین از میان مولدین منتقل شده از دریا به مرکز شهید مرجانی که در

1- Vermeirssen
2- Mugnier
3- Dettlaff

شرایط موجود و براساس روش‌های جاری در آن مرکز غیرقابل استفاده برای تکثیر مصنوعی بودند، انتخاب گردیدند.

تهیه هورمون و کاشت قالب‌های هورمونی: هورمون مورد استفاده در این تحقیق هورمون LHRH-A ساخت کارخانه سیگما امریکا و به‌صورت ویال‌های ۱ گرمی بوده و نحوه ساخت قالب‌های هورمون بر اساس روش لی[1] و همکاران (۱۹۸٦) انجام گرفت (در قالب‌های هورمونی ساخته شده برای تیمار شاهد فقط از کلسترول استفاده گردید و هیچ‌گونه هورمون به آن اضافه نشد).

کاشت هورمون در بدن ماهی براساس تیمارهای طراحی شده به‌وسیله دستگاه کاشت هورمون/ ایمپلنتر[2] انجام گرفت. با ایجاد چند تغییر جزئی در ایمپلنترهای پزشکی (مختص مصارف انسانی، جنس استیل، ضد زنگ و ضد حساسیت)، از قالب‌های هورمونی که با قطر ۲ میلی‌متر تنظیم گردید و قابلیت استفاده جهت انجام کاشت هورمون در پوست و عضله ماهی را پیدا نمود، استفاده شد.

تیماربندی: در این پروژه سه تیمار آزمایشی و یک تیمار کنترل (شاهد) براساس میزان هورمون (میکروگرم) به ازای وزن بدن (کیلوگرم) به‌صورت زیر در نظر گرفته شد: تیمار ۱ (۱۰ میکروگرم/ کیلوگرم وزن بدن)، تیمار ۲ (۱۵ میکروگرم/ کیلوگرم وزن بدن)، تیمار ۳ (۲۰ میکروگرم/ کیلوگرم وزن بدن) و تیمار ٤ (شاهد -۰ میکروگرم/ کیلوگرم وزن بدن).

شرایط تزریق و دوره رسیدگی: فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب مورد استفاده در تمام مدت انجام تحقیق در استخرهای نگهداری مولدین و سالن‌های تکثیر و انکوباسیون مرکز تکثیر شهید مرجانی روزانه کنترل و ثبت گردید. تشخیص رسیدگی ماهی مولدین (نر و ماده) و مناسب بودن آن جهت انجام تکثیر مصنوعی براساس روش‌های مرسوم و جاری در مراکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری کشور انجام شد. محل دقیق کاشت هورمون ٤ تا ۵ سانتی‌متر پایین‌تر از سومین و یا چهارمین صفحات استخوانی پشتی ماهی قره‌برون و عمق ۲ تا ۳ سانتی‌متری عضله پشتی بود. کنترل و نظارت دائمی ماهی در کل دوره به دقت انجام شد.

تکثیر مصنوعی: تکثیر مصنوعی متناسب با روش‌های موجود در مراکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری به‌صورت استحصال تخمک، استحصال اسپرم، نمونه‌برداری از تخمک‌های خارج شده از

1- Lee
2- Implanter

ماهیان جهت تعیین هم‌آوری کاری و نسبی، وزن حجمی، مطالعات بافت‌شناسی، تلقیح تخمک‌ها و اسپرم (بر اساس روش‌های مرسوم در مراکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری)، شستشوی تخم‌ها برای از بین بردن چسبندگی و کنترل دوره انکوباسیون جهت ثبت رکوردهای مربوط به درصد لقاح و درصد تفریخ تخم انجام گردید.

بررسی‌های آماری: مطالعه حاضر براساس طرح ساده کاملاً تصادفی با سه تکرار برای هر تیمار (صفر -١٠-١٥-٢٠) انجام گرفت. به‌منظور تجزیه و تحلیل آماری، درصد لقاح و میزان درصد تفریخ روش آماری ANOVA یک طرفه با استفاده از نرم‌افزار SPSS به‌کار گرفته شد. برای مقایسه میانگین تیمارهای مختلف از آزمون دانکن و دانت ٣ استفاده گردید. کلیه جداول و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel تهیه گردید.

نتایج

کیفیت آب: در زمان انجام پروژه حداقل و حداکثر درجه حرارت آب انکوباتور و حوضچه‌های مولدین و پرورش لارو به‌ترتیب ١/١±١٦/٥ و ٠/٥±٢٣/٨ درجه سانتی‌گراد بود. در خصوص pH حداکثر و حداقل میزان در انکوباتور و حوضچه‌های مولدین و پرورش لارو به‌ترتیب برابر ٠/١± ٧/٩ و ٠/٠±٨/٧ بود. در مورد اکسیژن محلول در انکوباتور و حوضچه‌های مولدین و پرورش لارو حداقل و حداکثر میزان به‌ترتیب ٠/٨± ٥ میلی‌گرم در لیتر و ٠/٨± ٨/١ میلی‌گرم در لیتر گزارش شد. نوسانات تمامی فاکتورهای مذکور در دامنه‌ای متناسب با نیازهای مولدین، تخم‌ها و لاروهای قره‌برون بود.

سن، وزن و طول بدن مولدین ماده قره‌برون: در ابتدا نرمال بودن توزیع داده‌ها از طریق تست آماری کورتسیس (Kurtosis) تأیید شد. ماهیان مورد استفاده در این پروژه به لحاظ مشخصه‌های طول، وزن و سن و شاخص قطبیت هسته (PI) در یک دامنه تغییرات و نوسانات قرار داشت. هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری در سطح (٥ درصد =α) بین متوسط سن ماهیان مولد مورد استفاده در تیمارهای مختلف وجود نداشت. کل ماهیان مورد استفاده در تیمارهای مختلف به لحاظ وزن در یک دامنه قرار گرفته و اختلاف معنی‌داری (٥ درصد =α) بین وزن ماهیان در این تیمارها مشاهده نشد.

جدول ۱– سن، وزن، طول بدن مولدین ماده فرموون، میانگین شاخص قطیت، نرخ لقاح و تفریخ تخم.

تیمار	میانگین کل طول (سانتی‌متر) ±SD	میانگین وزن نهایی (کیلوگرم) ±SD	میانگین سن (سال) ±SD	میانگین شاخص قطیت (PI)±SD				نرخ لقاح (درصد) ±SD	نرخ تفریخ (درصد) ±SD	میانگین کل لارو ±SD
				قبل از کاشت هورمون	۲۴ ساعت پس از کاشت	۴۸ ساعت پس از کاشت	۷۲ ساعت پس از کاشت			
تیمار یک (۱۰ میکروگرم/ کیلوگرم)	۱۶۸/۶۷± ۱۱/۸۹۰	۲۶/۱۷± ۱/۹۰	۱۸/۶۰± ۱/۵۰	۱۱/۰۱± ۰/۴۴	۵/۸۶± ۰/۶۰	۴/۸۳± ۰/۹۵	۴/۱۶± ۱/۱۰	۲۶/۶۶± ۴/۶	۲۴/۱۳± ۴/۱۸	۷۳۵۷۷± ۴۲۴۸
تیمار دو (۱۵ میکروگرم/ کیلوگرم)	۱۸۱/۳۳± ۱۳/۳۱۷	۳۱/۵۰± ۵/۲۲	۱۸/۰۰± ۱/۰۰	۱۲/۶۵± ۰/۴۵	۰	۰	۰	۷۸/۳۳± ۱۳/۸۷	۸۵/۳۳± ۹/۰۷	۱۷۹۴۳± ۱۰۱۹۰
تیمار سه (۲۰ میکروگرم/ کیلوگرم)	۱۶۳/۳۳± ۱۱/۵۴۷	۳۱/۶۷± ۵/۱۳	۲۰/۰۰± ۳/۰۰	۱۳/۳۳± ۲/۰۰	۱/۳۳± ۰/۳۰	۰	۰	۶۸/۳۳± ۴/۱۶	۶۸/۳۳± ۷/۶۴	۱۱۷۶۷۱± ۳۱۵۶۷
تیمار چهار (شاهد) (۰ میکروگرم/ کیلوگرم)	۱۶۳/۳۳± ۱۱/۵۸۳	۳۱/۸۰± ۴/۵۳	۱۸/۳۰± ۱/۵۰	۱۲/۳۱± ۱/۰۵	۱۱/۴۶± ۰/۳۸	۱۱/۰۳± ۰/۲۳	۱۰/۸۷± ۰/۲۹	۰	۰	۰

درصد لقاح و درصد تفریخ تخم‌ها: نتایج به‌دست آمده از تست‌های آماری درصد لقاح نشان داد که بین گروه کنترل و تیمارهای ۲ و ۳ (۱۵ g/kgμ و ۲۰ g/kg μ) اختلاف معنی‌دار وجود داشت در حالی‌که بین تیمار کنترل و تیمار ۱ (۱۰ g/kgμ) و همچنین بین تیمارهای ۲ و ۳ هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

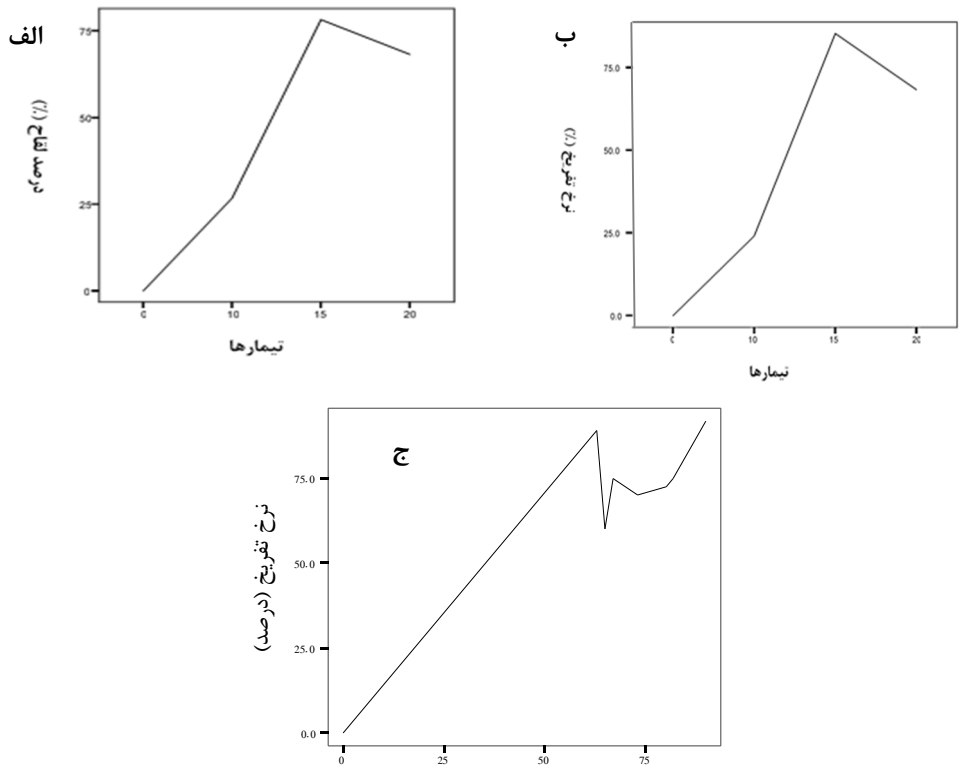
آنالیز آماری چند جانبه در خصوص میانگین درصد تفریخ در ماهیان قره‌برون اختلاف معنی-داری بین میانگین درصد تفریخ بین تیمار کنترل (شاهد) و تیمارهای ۲ و ۳ در سطح (۵ درصد =α) نشان داد در حالی‌که بین تیمار ۱ و تیمار کنترل و نیز بین تیمار ۲ و ۳ اختلاف معنی‌دار وجود نداشت.

تعداد لاروهای تولید شده: براساس نتایج حاصل اختلاف معنی‌دار در تعداد لاروهای تولید شده به ازای هر ماهی مولد در تیمارهای مختلف وجود داشت و این اختلاف فقط در تیمار شاهد و تیمار ۲ مشاهده گردید. در سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

همبستگی و ارتباط متغیرهای بین تیمارهای مختلف: ضرایب همبستگی درصد لقاح با تیمارهای مختلف نشانگر این امر بود که همبستگی مثبتی در این ارتباط وجود دارد و با افزایش میزان هورمون درصد لقاح نیز بالاتر رفته است و این افزایش تا میزان دوز ۱۵ g/kgμ ادامه داشته و بعد از آن تا دوز ۲۰ g/kgμ روند نزولی پیدا نموده اگر چه این کاهش منتج به ایجاد اختلاف معنی‌دار نگردید (نمودار الف (۱)).

نتایج مشابهی در خصوص درصد تفریخ در تیمارهای مختلف نیز مشاهده گردید. ارتباط خطی مثبتی بین درصد تفریخ و میزان افزایش دوز هورمون تا ۱۵ g/kgμ وجود داشت. با افزایش میزان دوز هورمون در تیمارهای مختلف درصد تفریخ هم افزایش داشته و این افزایش تا دوز ۱۵ g/kgμ ادامه یافت و سپس با شیبی ملایم روند نزولی پیدا کرد (نمودار ب و ج).

بیوتکنیک تکثیر ماهی قره‌برون ماده با روش کاشت هورمون LHRH-A: نتایج به‌دست آمده از این تحقیق قطعا به‌عنوان دستورالعمل مربوط به روش کاشت هورمون LHRH-A به‌منظور تکثیر در مراکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری ایران در خصوص ماهیان مولد نارس PI>۱۰ قابل استفاده خواهد بود.



شکل ۱- نمودار اثر تیمارها بر درصد لقاح، درصد تفریخ و اثر توام لقاح و تفریخ. الف) تغییرات و نوسانات درصد لقاح تخم ماهی قره‌برون در تیمارهای مختلف هورمون کاشته شده، ب) تغییرات درصد تفریخ تخم ماهی قره‌برون در تیمارهای مختلف هورمون کاشته شده، ج) همبستگی بین درصد لقاح و تفریخ تخم ماهی قره‌برون در تیمارهای مختلف هورمون کاشته شده.

جدول ۲- مشخصات بعضی از شاخص‌های مربوط به راندمان تکثیر ماهیان خاویاری در ماهیان تکثیر شده در تیمارهای ۲ و ۳ و ماهیان تکثیر شده در شرایط مراکز تکثیر ماهیان خاویاری.

ردیف	درصد ماهیان جواب داده	متوسط IP	متوسط درصد لقاح	متوسط درصد تفریخ	متوسط تولید لارو به ازای هر مولد
ماهیان تیمار ۲	۱۰۰ درصد	۱۲/٦٥±۰/٤٥	۷۸/۳۳±۱۳/۸۷	۸٥/۳± ۹/۰۷	۱۷۹٤۳٤±۱۰۱۹
ماهیان تیمار ۳	۱۰۰ درصد	۱۳/۳٦±۲/۳	٦۸/۳۳± ٤/۱٦	٦۸/۳۳ ±۷/٦٤	۱۱۷٦۷۱±۳۱٥٦
ماهیان تکثیر شده	۸۱/٥ درصد	۸-۱۰	٦٥ درصد	٥۹/٦	۹۳٦٦۰±۲۱۸٥

(گزارشات سالانه معاونت تکثیر و پرورش آبزیان شیلات)

جدول ٣- بیوتکنیک تکثیر ماهی قره‌برون ماده با روش کاشت هورمون LHRH-A

مشخصات مولدین	متوسط طول بدن cm	١٨١/٣٣± ١٣/٣١٧	درصد ماهیان جواب داده شده به تکثیر کاشت هورمون	١٠٠ درصد
	متوسط وزن (kg)	٣١/٥٠±٥/٢٢	مشخصه‌های تکثیر	متوسط درصد لقاح ١١٣/٨٧±٧٨/٣٣
	متوسط سن (سال)	١٨±١		متوسط درصد تفریخ ٨٥/٣٣±٩/٠٧
	متوسط ضریب قطبیت هسته IP	١٢/٦٥±٠/٤٥		تعداد لارو در هر گرم ٤٣-٤٥
	متوسط وزن تخمدان (کیلوگرم)	٤/٨		تعداد لارو به ازای هر مولد ١٠١٩٠٨± ١٧٩٤٣٤
	تعداد تخمک قابل شمارش در هر گرم	٤٠-٤٣		دوز هورمون (کاشت‌شده) (میکروگرم بر کیلوگرم) ٢٠-١٥
	هماوری کاری تعداد (تخمک به ازای هر مولد)	٢١٠٠٠٠-٢٢٠٠٠		مدت زمان رسیدگی نهایی ماهی (ساعت) ٣٦-٤٦
	هم آوری نسبی (تعداد تخمک به ازای هر کیلوگرم وزن بدن)	٦٥٠٠٠-٧٠٠٠٠		

بحث

بر اساس مستندات ارائه شده می‌توان اظهار داشت که کاشت هورمون LHRH-A به مقدار ١٥ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تأثیر مثبتی بر روی روند بهبود جنسی تاسماهی ایرانی (قره‌برون) داشته چرا که در این پروژه تمامی ماهیان مورد استفاده در تیمارهای آزمایشی به‌جز تیمار ١ در اثر انجام این عمل به مرحله رسیدگی نهایی و نهایتاً تخم‌ریزی رسیدند و هدف اصلی این پروژه که بررسی تأثیر کاشت هورمون LHRH-A بر روی القای رسیدگی نهایی جنسی در این ماهی بوده محقق گردید. این دستاورد با نتایج به‌دست آمده در موارد مشروحه ذیل مشابهت داشته ولی از آن‌جایی که ماهیان مورد استفاده در این پروژه اولاً از خانواده ماهیان خاویاری بوده و ثانیاً فقط جنس ماده آن مورد آزمایش قرار گرفته بود لذا در بعضی از موارد مغایرت‌ها و عدم تطابق کامل نتایج به‌دست آمده مشاهده گردید.

انجام موفقیت‌آمیز القای رسیدگی جنسی و تخم‌ریزی با استفاده از این هورمون در ماهی آزاد اقیانوس اطلس *Salmo salar* (کیریم و گلب[1]، ١٩٨٤)، ماهی سیم *Sparus aurats* (باربارو[2] و

1- Crim and Geleb
2- Barbaro

همکاران، ۱۹۹۷)، ماهی Turbot (موگنیر و همکاران، ۱۹۹۹)، Black sea bass (برلینسکی[1] و همکاران، ۲۰۰۵) از جمله فعالیت‌هایی بوده که به‌طور کامل روی ماهیان استخوانی انجام گرفته و نکته مهم این‌که در خصوص کاشت هورمون LHRH-A به‌منظور القائ رسیدگی جنسی در ماهیان خاویاری و تکثیر مصنوعی هیچ‌گونه اطلاعات ثبت شده‌ای یافت نشد.

میزان دوز هورون کاشته شده: نتایج حاصل از این پروژه نشان داد که کاشت هورمون در تیمارهای ۱، ۲ و ۳ موجب القای رسیدگی جنسی در ماهی قره‌برون در این آزمایش گردید و تیمار ۲ و ۳ در مقایسه با تیمار ۱ بهترین اثر را نشان داد در حالی‌که تمامی ماهیان مورد استفاده در تیمارهای ۲ و ۳ به مرحله بلوغ نهایی و تخم‌ریزی رسیدند ولی از تیمار ۱ فقط یک ماهی توانست مراحل نهایی منتهی به تخم‌ریزی را سپری نماید. عدم رسیدگی جنسی و تخم‌ریزی دو ماهی در تیمار ۱ نشانگر این واقعیت بوده که میزان دوز هورمون به مقدار ۱۰ g/kgµ برای القای اوولاسیون کافی نبوده و این میزان دوز برای انجام تکثیر مصنوعی کافی نمی‌باشد.

مدت زمان لازم جهت رسیدگی کامل جنسی و تخم‌ریزی ماهیان پس از کاشت هورمون: اگر چه از این شاخص به‌صورت رسمی به‌عنوان عامل مزیت و برتری یک روش نمی‌توان استفاده نمود ولی از آن‌جایی که ماهیت این پروژه کاربردی بوده و نتایج حاصل از آن می‌تواند به‌عنوان یک دستورالعمل اجرایی مورد استفاده بخش اجرا قرار گیرد لذا جهت اعمال مدیریت بهینه این شاخص می‌تواند نقش نسبتاً تعیین‌کننده‌ای داشته باشد. در تیمار ۱ یکی از ماهیان به کاشت هورمون پاسخ داد و مدت زمان پاسخ‌دهی کامل این ماهی و تخم‌ریزی آن حدوداً ٤٠ ساعت پس از کاشت هورمون بود. در تیمار ۲ دو ماهی (تکرار) بعد از ٤٦ ساعت و یک ماهی بعد از ۵۱ ساعت به مرحله تخم‌ریزی رسیدند که تقریباً هم زمانی نسبتاً قابل قبولی را در خود نشان دادند. در تیمار ۳ هر سه ماهی (تکرار) پس از ۳٦ ساعت به مرحله تخم‌ریزی رسیدند. این همزمانی رسیدگی به‌صورت کامل انجام گرفت لذا تیمار ۳ از این حیث حائز بهترین نتیجه گردید.

درصد لقاح: میزان درصد لقاح به‌صورت انفرادی در تمامی تیمارها نشانگر این امر بود که نرخ درصد در برخی از تکرارها بالا بوده و از میان رکوردهای ثبت شده در تیمارهای مختلف بیشترین مقدار در تیمار ۲ (۱۵ g/kgµ) مشاهده گردید. از طرفی می‌بایست در نظر داشت که پایین‌تر بودن نسبی میزان

1- Berlinsky

درصد لقاح در بقیه تیمارها تا حدودی تحت تأثیر کیفیت اسپرم ماهیان انتخاب شده بود و از آن‌جایی که انجام عملیات تکثیر مصنوعی در این پروژه متأثر از شرایط موجود در مرکز تکثیر و پرورش بوده لذا هیچ‌گونه دخل و تصرفی در زمینه انتخاب مولدین نر نمی‌توانست صورت پذیرد. نکته قابل ذکر دیگر این‌که در تیمار ١ از آن‌جایی که دو ماهی (تکرار) نتوانستند بعد از کاشت هورمون به مراحل پایانی (تخمریزی) برسند، بنابراین در محاسبه میانگین درصد لقاح بنا به‌دلیل مشابه تا حدود زیادی پایین‌تر نشان داده شده است از این‌رو با توجه به این‌که بالاترین میزان درصد لقاح مربوط به تیمار ٢ و برابر ٧٨/٣٣±١٣/٨٧ و پایین‌ترین میزان مربوط به تیمار ١ و برابر ٢٦/٦٦±٤/٦ و میزان درصد لقاح تیمار ٣، ٦٨/٣٣±٤/١٦ بود، لذا در خصوص این مشخصه هم می‌توان بیان نمود که بهترین تیمار، تیمار ٢ بوده است، اگر چه با توجه به نزدیک بودن نتایج بین تیمار ٢ و ٣ و پایین بودن انحراف معیار تیمار ٣ و عدم وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها نمی‌توان درصد لقاح به‌دست آمده در تیمار ٣ را نیز از نظر دور داشت.

درصد تفریخ: درصد تفریخ تخم‌های ماهیان در تیمارهای مختلف به‌صورت انفرادی از میزان قابل قبولی برخوردار بوده و بعضاً دارای رکوردهای بسیار بالاتری از مقادیر ثبت شده در شرایط موجود در مراکز تکثیر و پرورش می‌باشند و در محاسبه میانگین‌ها این مقادیر در تیمارهای مختلف هم جنس به‌دلیل عدم جواب‌دهی دو قطعه ماهی مولد در تیمار ١ به طرز شدیدی کاهش پیدا نموده‌اند، آنالیزهای آماری تنها موید وجود اختلاف معنی‌دار بین دو گروه آزمایشی ٢ و ٣ و تیمار شاهد بوده و هیچ‌گونه اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای ١، ٢ و ٣ وجود نداشت. با توجه به‌این نتایج و عدم وجود اختلاف در میزان انحراف معیار، متوسط مقادیر درصد تفریخ در تیمار ٢ و ٣ به‌عنوان بهترین تیمار منتخب به لحاظ درصد تفریخ می‌توان از تیمار ٢ و ٣ نام برد که هیچ‌گونه برتری نسبت به یکدیگر ندارند، لازم به توضیح است که بالاترین درصد میزان تفریخ ٩/٠٧ ±٨٥/٣٣ مربوط به تیمار ٢ و پایین‌ترین میزان ٢٤/١٣±٤/١٨ مربوط به تیمار ١ و متوسط درصد تفریخ تیمار ٣ برابر ٦٨/٣٣±٧/٦٤ بوده است.

تعداد لاروهای تولید شده به ازای هر مولد: بشترین لارو تولید شده در تیمار ٢ (١٧٩٤٣٤±١٠١٩) بود مشاهده گردید عدد بوده و کمترین تعداد با میزان ٧٣٥٧٧±٤٢٤٨ عدد مربوط به تیمار ١ و متوسط تعداد لارو در تیمار ٣ برابر ١١٧٦٧١±٣١٥٦ بود و از آن‌جایی که آنالیزهای آماری فقط بین تیمار ٢ و تیمار کنترل را واجد اختلاف معنی‌دار نشان داد و بین سایر تیمارها اختلافی وجود نداشته لذا تیمار ٢

در تعداد میزان لارو نیز نسبت به سایر تیمارها برتری محسوسی داشته و می‌تواند به‌عنوان بهترین تیمار در خصوص این شاخص مطرح گردد. در مجموع بررسی‌های فوق می‌توان اظهار داشت که تیمار ۲ (۱۵ g/kgμ) بهترین نتایج را در برداشته و به‌عنوان تیمار برتر نسبت به دو تیمار دیگر معرفی می‌گردد.

همبستگی و ارتباط بین متغیرهای مختلف در تیمارها: بررسی‌های آماری در این آزمایش نشان داد که بین میزان دوز هورمون تاسقف ۱۵ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ماهی، شاخص‌های درصد لقاح، درصد تفریخ و تعداد لاروهای تولید شده رابطه خطی مثبت وجود داشته بدین معنی که افزایش میزان دوز هورمون LHRH-A باعث بالا رفتن و بهبود درصد لقاح، درصد تفریخ و میزان لارو تولید شده به ازای هر مولد گشته ولی اگر دوز این هورمون از ۱۵ g/kgμ تا میزان ۲۰ g/kgμ افزایش نماید این ارتباط تا حدود زیادی منتفی گشته اگر چه اختلاف معنی‌داری ایجاد نمی‌نماید. لذا می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً افزایش دوز هورمون از ۱۵ g/kgμ به بالاتر و تا مرز ۲۰ g/kgμ تأثیر چندانی در نتیجه نهایی تخم‌ریزی و راندمان تکثیر و پرورش ماهی قره برون نخواهد داشت.

براساس بررسی‌های فوق می‌توان این‌گونه برداشت نمود که مطابق شاخص‌های فنی و مؤثر در نرماتیو تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری براساس روش پیشنهادی در این پروژه، بهترین دوز برای القای تحریک جنسی و رساندن ماهی به مرحله تخم‌ریزی دوز ۲۰ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ماهی (تیمار ۲) بود، اگرچه بین این تیمار و تیمار ۳ اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ولی مورد دیگری که در اثبات برتری تیمار ۲ به تیمار ۳ می‌تواند مدنظر قرار گیرد بحث هزینه‌های انجام طرح می‌باشد که با توجه به بالا بودن قیمت هورمون LHRH-A مورد استفاده در این پروژه (Sigma) هزینه کلی طرح با اجرای کاشت هورمون LHRH-A بر اساس تیمار ۲ g/kgμ ۱۵ پایین‌تر بوده و این امر در توجیه اقتصادی این پروژه و معرفی تیمار ۲ به‌عنوان تیمار برتر می‌تواند نقش مهمی را ایفا نماید.

مقایسه تطبیقی نرماتیوهای تکثیر و پرورش حاصل از روش کاشت هورمون جهت تکثیر مصنوعی ماهی قره‌برون با روش‌های مرسوم جاری در مراکز تکثیر ماهیان خاویاری: اساساً مقایسه نرماتیوهای حاصل از این دو روش در قالب یک کار منظم آماری و بصورت همزمان مقدور نیست و فقط می‌توان یک مقایسه تطبیقی از شاخص‌های موثر در فرایند تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری آن هم در جهت تأثیر و یا رد نتایج حاصل از روش کاشت هورمون انجام داد. زیرا ماهیان مورد استفاده

در روش کاشت هورمون در این پروژه از میان ماهیانی انتخاب گردید که به‌هیچ عنوان در روش‌های مرسوم و جاری در مراکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری کشور قابل تکثیر نمی‌باشند. از میان ماهیانی انتخاب گردیدند که دارای ضریب پلاریزاسیون (PI) بالاتر از ١٠/٥ بوده و این‌گونه ماهیان در شرایط فعلی به‌دلیل این‌که به تزریق هورمون جهت انجام تخم‌ریزی پاسخ مثبت نمی‌دهند در چرخه تکثیر مصنوعی و تولید خارج می‌گردند. معمولاً ماهیانی در این مراکز تکثیر می‌گردند که دارای PI حدود ٨ باشند لذا از دستاوردهای بزرگ و مهم این پروژه ابداع و انتخاب روش بوده که بر اساس آن ماهیان نارس PI بالاتر از ١٠ علاوه‌بر این‌که مورد تکثیر مصنوعی واقع گردد در ارائه نرماتیوهای تکثیر و پرورش شرایط به مراتب مطلوبتری را نسبت به مولدین تکثیر شده در شرایط جاری مراکز از خود نشان دهند، نکته مهم دیگر این‌که با توجه به کاهش نسل ماهیان خاویاری و روند روبه تزاید تعداد ماهیان نارس نسبت به ماهیان رسیده اگر تکثیر ماهیان خاویاری فقط متکی به روش‌های معمول باشد عملاً متوقف می‌گردد و اجرای این پروژه راه حل اساسی در جهت احیا ذخایر و بازسازی و ترمیم ذخایر این‌گونه‌ها در معرض خطر ماهیان خاویاری را پیش رو بخش اجرا خواهد گذاشت.

از آن‌جایی که شرایط یکسان در جهت اجرای عملیات تکثیر مصنوعی برای هر دو روش مورد مقایسه وجود داشته لذا نتایج حاصل از اجرای روش کاشت هورمون LHRH-A را نشان داده، علاوه‌بر این‌که ماهیانی را که در روش معمول قابلیت انجام عملیات تکثیر مصنوعی بر روی آنان وجود ندارد مورد تکثیر مصنوعی قرار گرفتند و به لحاظ شاخص‌های مهم تکثیر و پرورش دارای کیفیت به مراتب بهتری از روش معمول نیز شدند و نکته قابل توجه دیگر این‌که اگر چه در مرحله درصد لقاح تفاوت بسیار فاحش نمی‌باشد ولی در مراحل بعدی یعنی درصد تفریخ و تعداد لارو تولید شده به ازای هر مولد همان‌گونه که در جدول نیز مشاهده می‌گردد اختلاف بسیار چشمگیر بوده و این امر می‌تواند ناشی از اثرات مناسب کاشت هورمون و ورود تدریجی هورمون به بدن ماهی باشد که تأثیرات خود را در بهبود راندمان در مراحل بعدی نشان داده است.

نتیجه‌گیری کلی

روش کاشت هورمون در خصوص ماهیانی که حتی دارای ضریب قطبیت هسته آن‌ها PI کمتر از ١٠ نیز باشد قابل اجرا بوده و با عنایت به این‌که جذب هورمون به بدن ماهی و تحریک سیستم فیزیولوژیک بدن ماهی با تانی و به‌صورت نسبتاً طولانی مدت (نسبت به تزریق هورمون) صورت

می‌گیرد، لذا می‌توان بیان نمود که درصد لقاح و درصد تفریخ و بازماندگی لارو در مراحل بعدی مقاطع تکثیر و پرورش تحت تأثیر این روش راندمان بهتری خواهد یافت.

روش مورد استفاده در حقیقت تأثیرات کوتاه‌مدت کاشت هورمون را در بلوغ نهایی و تخم‌ریزی ماهیان نشان داد و الزاما در خصوص ماهیان مولدی که در مرحله ٤ جنسی هستند به‌علت عدم بالانس هورمونی و زیر مراحل پیشرفته مرحله ٤ به ٥ را می‌توانند طی کنند کارایی داشته است. لذا از تکنیک کاشت هورمون با اثر طولانی مدت می‌توان در خصوص پیش‌رس نمودن سایر ماهیان که در مراحل جنسی پایین‌تر از مرحله ٤ و در مرحله زرده‌سازی می‌باشد نیز استفاده نمود و در این رابطه ماهیان خاویاری پرورشی که به‌منظور مولدسازی مورد پرورش قرار می‌گیرند می‌توانند بهترین کاندید برای استفاده از روش کاشت هورمون باشند که به‌منظور عملی نمودن این هدف نیاز است با توجه به نوع گونه‌های نسبت به تنظیم نمودن میزان دوز موردنیاز هورمون در قالب یک پروژه با فرایند و روش کاری متفاوت اقدام نمود.

منابع

1. Barbaro, A., Francescon, A., Bozzato, G., Merlin, A., Belvedere, P., Colombo, L. 1997. Induction of spawning in gilthead seabream, *Sparus aurata* by long-acting GnRH agonist and its effects on egg quality and daily timing of spawning. Aqua. 154: 349–359.
2. Berlinsky, D.L., William King, V., Lawrence, J. 2005. The use of luteinizing hormone releasing hormone analogue for ovulation induction in black sea bass,*Centropristisstriata*. J. Aquaculture., volume 250, Pp: 813-822.
3. Crim, L.W., and Glebe, B.D. 1984. Advancement and synchrony of ovulation in Atlantic salmon with pelleted LHRH analog. Aquaculture, 43: 47-56.
4. Dettlaff, T.A., Ginsburg, A., and Schmalhausen, O.I. 1993. Sturgeon Fishes development biology and aquaculture. Berlin, Heidelberg, New york, Springer_Verlag, 300p.
5. Holcik, J. 1989. Freshwater fishes of Europe. Volume I, part II, General introduction to Fishes and Acipenseriformes. Wiesbaden, Aula Verlag, 469p.
6. Lee, C.S., Tamaru, C.S., and Kelley, C.D. 1986. Technique for making chronic–release LHRH-A and 17α–Methyl testosterone pellets for intramuscular implantation in Fishes. J. aquaculture, 59: 161-168.
7. Mugnier, C.M., Guennoc, M., Lebegue, E., Fostier, A., Breton, B. 1999. Induction and synchronisation of spawning in cultivated turbot_*Scophthalmus*

maximus broodstock by implantation of a sustained-release GnRH-a pellet. Aqua. 181: 241–255.
8. Vermeirssen, E.L.M., Shields, R.J., Mazorra de Quero, C., Scott, A.P. 2000. Gonadotrophin-realeasing hormone agonist raises plasma concentrations of progestogens and enhances milt fluidity in male Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Fish Physiol. Biochem. 22: 77–87.
9. Zohar, Y., and Mylonas, C.C. 2001. Endocrine manipulation of spawning induction in cultured fish from hormone to gene. Aqua, 197: 99-139.