

بررسی امکان رفع چسبندگی تخم به وسیله آنزیم آلکالاز، اسیدتانیک و سدیم کلراید به جای محلول کاربامید در فرآیند تکثیر مصنوعی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

- نیلوفر محمدجعفری*: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- محمدرضا ایمان پور: 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 آب شیرین بعد از فعال‌سازی و تماس با آب حالت چسبندگی پیدا می‌کنند که علت آن وجود مولکول‌های گلیکوپروتئینی در بخش خارجی آن‌هاست. چسبندگی تخم‌ها تحت شرایط تفریخ گاهی مطلوب نبوده و انباشتگی تخم‌های متصل به هم منجر به تلفات در اثر آنوکسی و رشد قارچ‌ها می‌شود. بنابراین یکی از مراحل تکثیر مصنوعی این قبیل ماهیان از جمله کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) رفع چسبندگی تخم‌ها پیش از انکوباسیون می‌باشد. در این تحقیق به منظور رفع چسبندگی تخم‌های لقاح یافته ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) از سه ماده آنزیم آلکالاز، اسیدتانیک و سدیم کلراید استفاده شد و نتایج مربوط به درصد لقاح و نرخ تفریخ با روش متدوال کارگاه (شست‌شوی تخم‌ها با محلول کاربامید) مقایسه شد. 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 به کار گرفته شد. ۳ غلظت از اسیدتانیک ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر در سه زمان ۲، ۵ و ۱۰ دقیقه به کار 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 ۴۵، ۶۰، ۷۵ و ۹۰ ثانیه در معرض قرار گرفتند. در نهایت ۴ بار با آب هجری شست‌شو داده شده و به انکوباسیون انتقال داده شدند. نتایج در مورد رفع چسبندگی تخم‌ها به وسیله تیمار اسیدتانیک نشان داد که بهترین درصد لقاح (۹۹/۵۷) و نرخ تفریخ (۹۹/۴۶) مربوط به غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر در مدت زمان ۰/۵ دقیقه بود. در مورد رفع چسبندگی تخم‌ها به وسیله تیمار سدیم کلراید نشان داد که بهترین درصد لقاح (۸۷/۱) و نرخ تفریخ (۸۶/۲۸) مرتبط به غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر در مدت زمان ۳۰ دقیقه بود. بیش‌ترین درصد لقاح (۹۷/۵۲) و تفریخ (۹۶/۷۲) با آنزیم آلکالاز مربوط به تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر در مدت زمان ۴۵ ثانیه بود که به لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشتند ($P < 0/05$).

کلمات کلیدی: کپور معمولی، رفع چسبندگی، آنزیم آلکالاز، اسیدتانیک، سدیم کلراید



مقدمه

حال مطالعه است (Demska-zakes و همکاران، ۲۰۰۵). در این مطالعه، مواد متفاوت (آنزیم آلکالاز، اسیدتانیک و سدیم کلراید) در رفع چسبندگی تخم ماهیان کپور معمولی 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 کپور معمولی می‌باشد. علاوه بر این، 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 اسدی نیاکی در شهرستان گنبد واقع در خط نو شهرک شهیدبهشتی انجام شد. در این مطالعه تعداد ۵ مولد ماده کپور معمولی 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 به مدت یک هفته سازگار شدند. مولدین ماده کپور معمولی با دوز تزریق 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 در نظر گرفته شد. پس از اسپرم‌گیری و تخم‌گیری از ماهیان، اسپرم ماهیان نر و تخم‌های ماهیان ماده با یکدیگر ترکیب شدند و جهت انجام آزمایش هم‌سان‌سازی صورت 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 ۲، ۵ و ۱۰ 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 غلظت ۲ میلی‌لیتر بر لیتر اضافه شده و در زمان‌های ۴۵، ۶۰، ۷۵ و ۹۰ ثانیه در معرض قرار گرفته شدند. 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

تکثیر و پرورش آبزیان از فعالیت‌های اقتصادی با ارزش محسوب می‌شود. به طوری که صنعت پرورش ماهیان گرمابی در سال‌های اخیر یکی از مهم‌ترین زیر بخش‌های شیلات است که به سرعت توسعه یافته و مورد توجه قرار گرفته است (سالنامه آماری شیلات ایران، ۱۳۹۱). در این میان کپور معمولی از نظر 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 به هم چسبیدن و توده‌ای شدن تخمک‌ها و تلفات به‌دلیل تأثیر 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 کنترل شده بر بسترهای مخصوص (آشپانه‌ها) دارای اهمیت است. با این وجود، چسبندگی در شرایطی که تخم‌ها در ابزارهای انکوباسیون انکوبه می‌شوند مطلوب نیست. به این دلیل که تخم‌ها به هم متصل شده و تولید توده‌ای جامد می‌کنند که تبادل گازی را با مشکل مواجه کرده 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 این حال، روش‌های آنزیمی مورد استفاده که اغلب هزینه‌بر هستند، در مدت عرض چند دقیقه از چسبندگی تخم جلوگیری می‌کند (Linhart و همکاران، ۲۰۰۴؛ Zarski و همکاران، ۲۰۱۳). مؤثرترین این روش‌ها برای تخم‌های گونه‌های کپور ماهیان به‌ویژه کپور معمولی وجود دارد و علت این است که تکثیر مصنوعی این گونه‌ها از 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



۳ و ۴ نشان داد که بهترین درصد لقاح مربوط به تیمار با غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر در مدت زمان ۳۰ دقیقه، هم‌چنین کم‌ترین میزان درصد لقاح مربوط به تیمار با غلظت ۱۰۰۰۰ میلی گرم در لیتر در مدت زمان ۶۰ دقیقه بود ($P < 0/05$). بهترین نرخ تفریح مربوط به تیمار با غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر در مدت زمان ۳۰ دقیقه بود و کم‌ترین نرخ تفریح مربوط به تیمار با غلظت ۱۰۰۰۰ میلی گرم در لیتر در مدت زمان ۶۰ دقیقه بود ($P < 0/05$).

جدول ۱: درصد لقاح و تفریح در تیمارهای اسید تانیک

تیمارها	درصد لقاح	درصد تفریح
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±۰/۰۳ ^a	۹۸/۵۱±۰/۰۳ ^{de}
تیمار ۶	۹۹/۰۲±۰/۰۱ ^a	۹۸/۱۸±۰/۰۳ ^{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 نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) می‌باشد. داده‌ها به صورت (انحراف معیار ± میانگین) می‌باشد.

جدول ۲: درصد لقاح و تفریح در تیمارهای آنزیم آلکالاز

تیمارها	درصد لقاح	نرخ تفریح
شاهد	۷۶/۴۶±۰/۸۸ ^b	۶۵/۰۸±۰/۵۶ ^c
تیمار ۱	۹۷/۵۲±۰/۲ ^a	۹۶/۷۲±۰/۰۴ ^a
تیمار ۲	۹۸/۱۵±۰/۸ ^a	۹۷/۵۱±۰/۱۲ ^a
تیمار ۳	۹۷/۵۳±۰/۱۷ ^a	۹۶/۷۵±۰/۵ ^a
تیمار ۴	۹۶/۶۱±۰/۱۹ ^a	۹۵/۳۳±۰/۲۳ ^b

حروف انگلیسی غیرمشترک در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) می‌باشد. داده‌ها به صورت (انحراف معیار ± میانگین) می‌باشد.

جدول ۳: درصد لقاح در تیمارهای سدیم کلراید

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

حروف انگلیسی غیرمشترک در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) می‌باشد. داده‌ها به صورت (انحراف معیار ± میانگین) می‌باشد.

افزوده شد. به میزان ۲۵ درصد از حجم تخمک‌ها (به همراه اسپرم) به آن‌ها آب اضافه شد. مخلوط به آرامی توسط پراسترل هم زده شد. هم‌چنان که تخم‌ها هم زده شدند، محلول کاربامید به ظرف محتوی تخم‌ها و محلول کاربامید اضافه می‌شود و آب داخل ظرف خالی شده و توسط محلول تازه جایگزین شد. پس از گذشت ۱ ساعت چسبندگی تخم‌ها برطرف شد (Billard و همکاران، ۱۹۹۵).

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

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

آنالیز آماری: داده‌ها با استفاده از تجزیه واریانس یک طرفه (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 به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شد.

نتایج

نتایج در مورد رفع چسبندگی تخم‌ها به وسیله تیمار اسید

تانیک: در جدول ۱ نشان داد که بهترین درصد لقاح (۹۹/۵۷) مربوط به تیمار ۱ با غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر در مدت زمان ۰/۵ دقیقه بود، هم‌چنین کم‌ترین درصد لقاح مربوط به تیمار ۹ با غلظت ۱۵۰۰ میلی گرم در لیتر در مدت زمان ۵ دقیقه بود ($P < 0/05$). بیش‌ترین نرخ تفریح تخم‌ها (۹۹/۴۶) نیز مربوط به تیمار ۱ با غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر در مدت زمان ۰/۵ دقیقه بود و کم‌ترین نرخ تفریح (۹۸/۰۱) مربوط به تیمار ۸ با غلظت ۱۵۰۰ میلی گرم در لیتر در مدت زمان ۲ دقیقه بود ($P < 0/05$).

نتایج رفع چسبندگی به وسیله آنزیم آلکالاز: نتایج در مورد

رفع چسبندگی تخم‌ها به وسیله تیمار آنزیم آلکالاز در جدول ۲ نشان داد که بهترین درصد لقاح مربوط به تیمار ۱ با غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر در مدت زمان ۴۵ ثانیه و بیش‌ترین نرخ تفریح مربوط به تیمار ۱ با غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر در مدت زمان ۴۵ ثانیه بود. هم‌چنین کم‌ترین درصد لقاح مربوط به تیمار ۴ با غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر در مدت زمان ۹۰ ثانیه و کم‌ترین نرخ تفریح نیز مربوط به تیمار ۴ با غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر در مدت زمان ۹۰ ثانیه بود ($P < 0/05$).

نتایج رفع چسبندگی به وسیله تیمار سدیم کلراید: نتایج

در مورد رفع چسبندگی تخم‌ها به وسیله تیمار سدیم کلراید در جدول



جدول ۴: نرخ تفریخ در تیمارهای سدیم کلراید

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

حروف انگلیسی غیرمشترک در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار ($P < 0/05$) می باشد. داده ها به صورت (انحراف معیار ± میانگین) می باشد.

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

درصد تفریخ	درصد لقاح
بهترین شاهد	۶۵/۰ ± ۰/۸۵۶
بهترین آنزیم آلکالاز	۹۶/۷۲ ± ۰/۰۴
بهترین اسید تانیک	۹۹/۴۶ ± ۰/۰۲

حروف انگلیسی غیرمشترک در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار ($P < 0/05$) می باشد. داده ها به صورت (انحراف معیار ± میانگین) می باشد.

بحث

رفع چسبندگی تخم ها در تولیدمثل مصنوعی کنترل شده در ماهیان آب شیرین مرحله ای بحرانی است (Linhardt و همکاران، ۲۰۰۳). برای رفع چسبندگی تخم های لقاح یافته ماهیان مواد زیادی تاکنون به کار رفته است که مشابهت های زیادی بین نتایج حاصله از آن تحقیقات و نتایج این تحقیق وجود دارد. در این آزمایش رفع چسبندگی تخم های لقاح یافته ماهی کپور معمولی 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 میلی گرم در لیتر این ماده حاصل شد. از نظر درصد تفریخ نیز بهترین نتایج در غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر به دست آمد که از نتایج سایر گروه ها بالاتر بود. از این دیدگاه می توان گفت غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر اسیدتانیک برای رفع چسبندگی تخم های کپور معمولی مناسب است. هم چنین Al Hazza و Hussein (۲۰۰۳) این ماده را برای رفع چسبندگی تخم های باربوس حمیری (*Barbus luteus*) مورد استفاده قرار دادند. به این صورت که بعد از لقاح، محلول ۰/۳٪ نمک به نسبت ۱۰۰ میلی لیتر محلول نمک به ازای ۱ کیلوگرم تخم به آن ها افزوده شد. بعد از ۲ دقیقه به هم زدن، تخم ها آب کشی شده

و به مدت ۱۵ ثانیه وارد محلول اسیدتانیک با غلظت ۱ گرم بر لیتر می شوند. بعد از این مدت تخم ها را با آب تفریخ گاه شسته و وارد انکوباتور می کنند که به لحاظ رفع چسبندگی مشابه این تحقیق می باشد. Demska-zakes و همکاران (۲۰۰۵) سه غلظت متفاوت اسیدتانیک را در سه زمان متفاوت به منظور اطلاع از غلظت و زمان بهینه برای رفع چسبندگی تخم های ماهی سوف سفید (*Sander lucioperca*) مورد آزمایش قرار دادند. تخم های لقاح یافته سوف سفید بعد شست شو با آب، به مدت ۰/۵، ۲ و ۵ دقیقه در معرض اسیدتانیک با غلظت های ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میلی گرم در لیتر قرار گرفتند و مشاهده شد که بهترین نتیجه در غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر در زمان ۵ دقیقه و ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر در زمان ۲ دقیقه و نیز ۵ دقیقه حاصل شد که به لحاظ غلظت مورد نظر برای رفع چسبندگی با نتایج این تحقیق مشابهت دارد. از طرف دیگر در مطالعه اثر اسیدتانیک بر تخم های سوف سفید نشان داده شده که غلظت اسیدتانیک و زمان مواجهه بر فرآیند سخت شدن تخم های سوف سفید، بر میزان حذف چسبندگی و بقاء جنین تاثیر دارد، زیرا اسیدتانیک به دلیل کاهش زمان مورد نیاز برای رفع چسبندگی که باعث کاهش زمان مورد نیاز هم زدن تخم ها می گردد باعث کاهش میزان تخم های شکسته در ماهی تکثیر شده می گردد که در نتیجه باعث کاهش از بین رفتن تخم ها می گردد که با نتایج حاصل از این تحقیق مشابه است. Geldhauser (۱۹۹۵) نیز از اسیدتانیک به منظور رفع چسبندگی تخم های لای ماهی (*Tinca tinca*) استفاده نموده است. با توجه به متفاوت بودن ماهی و میزان چسبندگی تخم ها بعد از لقاح در دو گونه نتایج حاصل از آن تحقیق با تحقیق حاضر از نظر تاثیر غیر مضر اسیدتانیک بر روی لاروهای حاصله و همچنین تاخیر در فرآیند تخم گشایی مطابقت دارد. نتایج حاصل از شست و شوی تخم ها با سدیم کلراید نشان می دهد که تخم های تیمار شده با نمک در غلظت بین ۱۰۰-۲۰۰۰ میلی گرم در لیتر دارای بهترین نتایج بودند. بهترین نرخ تفریخ (۸۵/۹۳) در غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر در مدت زمان ۳۰ ثانیه و بهترین درصد لقاح (۸۷/۱ و ۸۵/۷۵) نیز مربوط به تیمارهای با غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر در زمان های ۳۰ و ۶۰ ثانیه بود که این نتایج دقیقاً با یافته های مربوط به Rasowo و همکاران (۲۰۰۷) منطبق می باشد. Phelps و Walser (۱۹۹۳) دریافتند که تیمار تخم های ماهی کوی (Coi carp) با سدیم کلراید در غلظت بین ۱۰۰۰-۲۵۰۰ میلی گرم در لیتر به مدت ۶۰ دقیقه باعث بهبود نرخ تفریخ در مقایسه با گروه شاهد که از غلظت ۵۰۰۰ میلی گرم در لیتر استفاده کرد، می شود که این غلظت برای تخم مضر بود و باعث کاهش نرخ تفریخ می گردید. Froelich و Engelhardt (۱۹۹۶) دریافتند که تیمار تخم های گربه ماهی اروپایی (*Silurus glanis*) به وسیله سدیم کلراید در غلظت های ۰-۵۰۰۰ میلی گرم در لیتر دارای



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 نیز هر چه غلظت آنزیم 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 به همراه دارد (Linhardt 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 این که مدت زمان لازم برای رفع چسبندگی در روش سنتی حدود ۶۰ دقیقه و در روش آنزیمی ۲ دقیقه بوده است (Linhardt و همکاران، ۲۰۰۰). در این آزمایش در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش معنی‌دار میزان بازماندگی نسبت به روش سنتی مشاهده شد و میزان آن ۹۶/۷۲٪ بوده است. بنابراین، استفاده از آنزیم آلکالاز با غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر در مدت زمان ۴۵ ثانیه در رفع چسبندگی تخم‌های ماهی کپور معمولی موجب افزایش درصد بازماندگی (نرخ تفریخ) می‌شود. بنابراین می‌توان گفت رفع چسبندگی تخم‌های ماهی کپور معمولی با محلول آنزیم آلکالاز موفقیت‌آمیز است و بهترین غلظت برای این عمل ۲۰ میلی‌گرم در لیتر است. شست‌وشوی تخم‌ها با محلول ۲۰ میلی‌گرم در لیتر 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 در نظر گرفته شده‌اند (کلوانی و همکاران، ۱۳۹۲). در مورد فاکتور زمان می‌توان اظهار کرد

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 سدیم کلراید 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 سدیم کلراید 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 (۴۹/۳۴٪) 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 سدیم کلراید 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 کپور معمولی 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 ۴۵ ثانیه به‌دست آمد. از این دیدگاه می‌توان گفت که غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر از آنزیم آلکالاز برای رفع چسبندگی تخم‌های ماهی کپور معمولی مناسب است. براساس تحقیقات Linhardt 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 آلکالاز در مورد ماهی کپور معمولی زمان لازم برای فرآیند رفع چسبندگی را از ۷۰ دقیقه در روش سنتی (شست‌وشو با پودر شیر) به ۲۱ دقیقه کاهش داده است (Linhardt و همکاران، ۲۰۰۳)، در حالی که 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 (Linhardt و



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.; Perchee, 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 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. **Demka-zakes, K.; Zake, Z. and Raszuk, J., 2005.** The use of tannic acid to removal adhesiveness from pikeperch 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 stickiness 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 stickiness. 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. 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.

چنانچه روشی بتواند مدت زمان لازم برای رفع چسبندگی را کاهش دهد از این نظر مناسبتر است (کلوانی و همکاران، ۱۳۹۲). در روشهای سنتی رفع چسبندگی مانند استفاده از محلول کاربامید و یا استفاده از نمک، مدت زمان طولانی انجام فرآیند از نکات منفی این روشها می باشد. مزیت عمده کاربرد روشهای آنزیمی و استفاده از اسیدتانیک، کاهش قابل توجه مدت زمان دست کاری تخمها می باشد. کمیت لاروهای تولید شده از فاکتورهای اصلی روش رفع چسبندگی می باشد به عنوان مثال در این آزمایش گرچه سدیم کلراید قادر است چسبندگی تخمهای ماهی کپور معمولی 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 می تواند 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 توجه به نتایج حاصل از ۴ روش متفاوت برای رفع چسبندگی تخمها که در بالا ذکر گردید، در مقایسه بین آنزیم آلکالاز و اسیدتانیک، استفاده از اسیدتانیک به دلیل هزینه پایینتر، نرخ تفریح بالاتر منطقی به نظر می رسد. همچنین به دلیل مدت زمان قابل قبول و کمتر نسبت به محلول کاربامید و سدیم کلراید استفاده از اسیدتانیک در تکثیر مصنوعی کپور معمولی نسبت به دو روش ذکر شده نیز ارجحیت دارد.

تقدیر و تشکر

از سرکار خانم زهرا روحی و جناب آقای سعید اسدی نیایک به دلیل همکاریهای صمیمانه تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

۱. پوردهقانی، ک.؛ شکرکار، م.؛ کاظمی، ر.؛ وهابزاده، ح.؛ ضیائی، م. و جلیل پور، ج.، ۱۳۹۱. رفع چسبندگی تخم در تکثیر مصنوعی ماهیان خاوباری به وسیله کائولن، گچ و تالک. مجله توسعه آبی پروری. سال ۶، شماره ۱، صفحات ۱ تا ۱۰.
۲. کلوانی، ن. ب.؛ مجازی امیری، ب.؛ کلباسی، م. و نوری، ا.، ۱۳۹۱. مروری بر روشهای نوین در رفع چسبندگی تخمهای لقاچ یافته ماهیان. مجله بومشناسی آبزیان. دوره ۲، شماره ۲، صفحات ۱ تا ۱۸.
۳. کلوانی، ن. ب.؛ مجازی امیری، ب.؛ کلباسی، م. و نوری، ا.، ۱۳۹۲. مطالعه تطبیقی اثر آنزیم تریپسین و روش متدوال گل شویی در حذف لایه چسبنده تخم لقاچ یافته تاس ماهی ایرانی. نشریه شیلات مجله منابع طبیعی ایران. صفحات ۱۰۹ تا ۱۲۲.

