دانشگاه گیلان

تولیدمثل کنترل شده
سوف حاج طرخان وحشی

راهنمای مرکز تکثیر

چاپ اول

مرکز نشر دانشگاه گیلان

مترجمین

بهرام فلاحتکار | استاد دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان

عرفان اکبری نرگسی | کارشناس ارشد تکثیر و پرورش آبزیان

تولیدمثل کنترل شده سوف حاج طرخان وحشی راهنمای مرکز تکثیر • بهرام فلاحتکار • عرفان اکبری نرگسی

دانشگاه گیلان

Controlled Reproduction of Wild Eurasian Perch

A hatchery manual

University of Guilan Press

Authors

• Daniel Żarski • Ákos Horváth • Gergely Bernáth
• Sławomir Krejszeff • János Radóczi • Katarzyna Palińska Żarska
• Zoltán Bokor • Krzysztof Kupren • Béla Urbány

Translators

• Bahram Falahatkar, PhD
• Erfan Akbari Nargesi, MSc

ISBN:978-600-153-257-3

تولید مثل کنترل شده
سوف حاج طرخان وحشی
راهنمای مرکز تکثیر

تألیف

زارسکی، دانیل... [ودیگران]

ترجمه

دکتربهرام فلاحتکار

استاد دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان

عرفان اکبری نرگسی

کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان

مرکز نشر دانشگاه گیلان

۱۴۰۰

شابک: ۳ ـ۲۵۷ ـ ۱۵۳ ـ ۶۰۰ ـ ۹۷۸

عنوان و نام پدیدآور	: تولید مثل کنترل شده سوف حاج طرخان وحشی / تالیف دنیل زارسکی...[و دیگران]؛ ترجمه بهرام فلاحتکار، عرفان اکبری‌نرگسی.
مشخصات نشر	: رشت: دانشگاه گیلان، انتشارات، ۱۴۰۰.
مشخصات ظاهری	: ۱۲۹ ص.
شابک	: 978-600-153257-3
وضعیت فهرست نویسی	: فیپا
یادداشت	: عنوان اصلی: Controlled Reproduction of Wild Eurasian Perch : A hatchery manual.
موضوع	: حیوان‌ها -- بوم‌شناسی Animal ecology فیزیولوژی Physiology بوم‌شناسی آبزیان Aquatic ecology رویان‌شناسی Embryology ماهی‌ها Fishes حیات وحش Wildlife*
شناسه افزوده	: زارسکی، دانیل
شناسه افزوده	: Żarski, Daniel
شناسه افزوده	: فلاحتکار، بهرام، ۱۳۵۳ -، مترجم
شناسه افزوده	: اکبری نرگسی، عرفان، ۱۳۷۱-
شناسه افزوده	: دانشگاه گیلان. انتشارات
رده بندی کنگره	: QH۵۴۱
رده بندی دیویی	: ۵۹۱/۵۲
شماره کتابشناسی ملی	: ۸۵۲۴۸۰۶
اطلاعات رکورد کتابشناسی	: فیپا

مرکز نشر دانشگاه گیلان

نام کتاب	:	تولید مثل کنترل شده سوف حاج طرخان وحشی (راهنمای مرکز تکثیر)
مؤلفان	:	زارسکی، دانیل... [ودیگران]
مترجمان	:	دکتر بهرام فلاحتکار، عرفان اکبری نرگسی
ویراستار علمی	:	دکتر میر مسعود سجادی
ویراستار ادبی	:	فرشته گلچین راد
طراح جلد	:	سمیرا محمودی
نوبت چاپ	:	اول، ۱۴۰۰
ناشر	:	مرکزنشر دانشگاه گیلان
شمارگان	:	۱۰۰۰ جلد

* هر گونه چاپ و تکثیر صرفاً در اختیار مرکز نشر دانشگاه گیلان است.*

فهرست

تقدیر و تشکر مولفین ..... **ح**

حمایت مالی تألیف کتاب ..... **ح**

پیشگفتار مترجمین ..... **ز**

مقدمه **۱**

منابع **۷**

صید، حمل‌ونقل مولدین و پیشگیری از بیماری‌ها **۱۱**

صید مولدین **۱۱**

حمل‌ونقل مولدین **۱۲**

پیشگیری از بیماری‌ها **۱۴**

منابع **۱۵**

دستکاری‌های حین تکثیر و انتخاب مولدین **۱۶**

پیشینه علمی **۱۶**

شرایط نگهداری مولدین **۱۶**

پارامترهای کیفی آب **۱۷**

تشخیص جنسیت **۱۸**

دستکاری‌های تکثیر **۱۹**

اطلاعات پایه در مورد بیهوشی **۲۰**

بیهوشی ۲۱

تشخیص جنسیت **۲۳**

توصیه‌های عملی **۲۵**

منابع ۲۶

تعیین مراحل رسیدگی تخمک‌ها ۲۷

پیشینه علمی ۲۷

مراحل رسیدگی تخمک‌ها ۲۸

موارد خاص اختلال در مرحله رسیدگی نهایی تخمک ۳۲

ناهنجاری‌های قبل از شکست هسته ۳۲

ناهنجاری‌های بعد از شکست هسته ۳۴

ارزیابی عملی مرحله رسیدگی در مولدین ماده ۳۶

منابع ۳۸

تحریک رسیدگی تخمک و اسپرم ۴۰

پایه و اساس استفاده از روش تحریک هورمونی ۴۰

دستکاری‌های نوری- دمایی ۴۱

پیشینه علمی تحریک هورمونی ۴۲

مقررات مربوط به استفاده از عوامل القای تخم‌ریزی در اروپا ۴۲

از چه ناحیه‌ای ماهی را تزریق کنیم؟ ۴۳

تحریک هورمونی مولدین ماده ۴۵

آماده‌سازی عامل هورمونی- **hCG** ۴۵

آماده‌سازی عامل هورمونی- **GnRH** ۴۵

تحریک هورمونی مولدین نر ۴۶

نکات عملی ۴۶

دستکاری‌های نوری- دمایی ۴۶

تحریک هورمونی ۴۷

جمع‌آوری گامت‌ها ۵۰

ویژگی گامت‌ها ۵۰
تعیین لحظه رهاسازی تخمک‌ها ۵۲
جلوگیری از رهاسازی خود به خودی تخمک‌ها ۵۴
توصیه‌های عملی ۵۷
تشخیص لحظه رهاسازی تخمک‌ها ۵۷
جمع‌آوری تخمک‌ها ۵۹
جمع‌آوری اسپرم ۶۰
روش جمع‌آوری اسپرم ۶۲
منابع ۶۳
نگهداری کوتاه و بلندمدت گامت‌ها ۶۵
پایه و اساس ذخیره‌سازی گامت‌ها ۶۵
نگهداری کوتاه‌مدت ۶۵
انجماد اسپرم ۶۶
نگهداری کوتاه‌مدت تخمک‌ها در سوف حاج طرخان ۶۸
نکات عملی ذخیره‌سازی کوتاه‌مدت تخمک‌های سوف حاج طرخان ۶۸
نگهداری کوتاه‌مدت اسپرم ۶۹
روش ذخیره‌سازی اسپرم ۷۰
انجماد و انجماد زدایی ۷۰
روش انجماد و انجمادزدایی ۷۳
منابع ۷۴
ارزیابی کیفیت گامت ۷۷
چگونه کیفیت گامت را تعیین کنیم؟ ۷۷
روش‌های ارزیابی کیفیت گامت ۷۸

عوامل کارگاهی تأثیرگذار بر کیفیت گامت ۷۹
ارزیابی کیفیت تخمک ۸۰
ارزیابی کیفیت تخمک‌ها به روش ریخت‌شناسی ۸۱
اولین تقسیم‌ها و ریخت‌شناسی بلاستومر ۸۲
نکات عملی ارزیابی کیفیت تخمک ۸۳
میزان بقای جنین ۸۴
سنجش کیفیت اسپرم از طریق ارزیابی تحرک ۸۶
منابع ۸۹
لقاح آزمایشگاهی ۹۳
پیشینه علمی ۹۳
روش فنی لقاح آزمایشگاهی ۹۳
فعال‌سازی گامت‌ها ۹۴
محلول‌های فعال‌سازی ۹۵
نسبت اسپرم به تخمک ۹۷
جنبه‌های عملی لقاح آزمایشگاهی ۹۹
انکوباسیون و تخم‌گشایی ۱۰۴
پیشینه علمی ۱۰۴
توسعه جنینی ۱۰۵
تأیید موفقیت لقاح ۱۰۵
دستگاه‌های انکوباسیون ۱۰۸
شرایط انکوباسیون ۱۱۰
تخم‌گشایی ۱۱۲
پرورش اولیه لاروها (توصیه‌های کلی) ۱۱۳

منابع ۱۱۴
تکثیر پیش از موعد (تکثیر خارج از فصل) ۱۱۶
پیشینه علمی ۱۱۶
آخرین پیشرفت‌های علمی در زمینه "تخم‌ریزی پیش از موعد" سوف حاج طرخان ۱۱۸
توصیه‌های عملی ۱۲۰
مدیریت مولدین ۱۲۰
دستکاری نوری-دمایی ۱۲۲
تحریک رهاسازی تخمک و اسپرم ۱۲۲
منابع ۱۲۳
پیوست‌ها ۱۲۵
پیوست ۱ ..... ۱۲۵
پیوست ۲ ..... ۱۲۷

تقدیر و تشکر مؤلفین

نویسندگان این کتاب بر خود لازم می‌دانند برای بررسی‌های دقیق و پیشنهادهای مناسب پروفسور پاتریک کستمونت (Patrick Kestemont, University of Namur, Belgium) و پروفسور پاسکال فونتین (Pascal Fontaine, University of Lorraine, France) که در آماده‌سازی نهایی محتوای کتاب نقش بسزایی داشتند صمیمانه تشکر نمایند.

حمایت مالی تألیف کتاب

آماده‌سازی این کتاب بر مبنای پروژه "توسعه فناوری القای تخم‌ریزی و راهنمای مرکز تکثیر سوف حاج طرخان (*Perca fluviatilis*) (E!8028 PERCAHATCH)" و تحت برنامه حمایتی EUREKA (EUREKA funding programme) تأمین مالی شده است.

این پروژه توسط شرکت Szabolcsi Halászati (Nyíregyháza, Hungary) با همکاری نزدیک دانشگاه Szent Istvan (Gödöllő, Hungary) (تحت حمایت صندوق تحقیقات ملی، توسعه و نوآوری مجارستان با شماره پروژه EUREKA_HU_12-1-2012-0056) و دانشگاه Warmia and Mazury (Olsztyn, Poland) انجام شد. سایر حمایت‌های مالی نویسندگان توسط COST Action (1205 AQUAGAMETE) و مرکز تحقیقات عالی (11476-3/2016/FEKUT) تأمین شده است.

پیشگفتار مترجمین

سوف حاج طرخان یکی از گونه‌های معروف خانواده سوف ماهیان تلقی می‌گردد که دارای اهمیت اکولوژیک و زیست‌محیطی فراوانی است، به‌طوری‌که در هرم غذایی به‌دلیل گوشت‌خوار بودن در بالاترین قسمت‌ها قرار دارد و سبب کنترل بیولوژیک جمعیت سایر ماهیان در پیکره‌های آبی می‌گردد.

این ماهی مورد علاقه بسیاری از افراد در زمینهٔ صید ورزشی و تجاری است و به همین دلیل در کنار مواردی نظیر از بین رفتن مکان‌های مناسب تخم‌ریزی و بروز آلودگی‌ها و تخریب زیستگاه‌ها جمعیت‌های طبیعی آن‌ها در برخی نقاط کاهش یافته است. بنابراین در این مکان‌ها برای رسیدن به یک جمعیت پایدار و حفظ آن می‌بایست جمعیت این گونه از طرق مختلفی نظیر تکثیر کنترل‌شده و رهاسازی بچه ماهیان حاصله و یا ایجاد شرایط و بسترهای مناسب برای تخم‌ریزی احیا گردد.

در کنار این موارد، تقاضای زیاد برای مصرف این‌گونه به‌دلیل ارزش غذایی بالا، خوش‌خوراکی و گوشت سفید و کم استخوان سبب توسعه روش‌های تکثیر و پرورش ماهی سوف حاج طرخان شده است. طی سال‌های اخیر، روش‌های تکثیر نیمه مصنوعی و مصنوعی و حتی خارج از فصل و روش‌های مختلف پرورش به‌صورت گسترده، نیمه متراکم و متراکم و حتی متراکم در سیستم‌های مداربسته در حال توسعه بوده است. با توجه به پیشرفت‌هایی که در حوزه تکثیر و پرورش ماهی سوف حاج طرخان صورت گرفته است به‌نظر می‌رسد این گونه به‌عنوان یک ماهی مناسب با تنوع‌بخشی در آبزی‌پروری به افزایش تولید کمک شایان توجهی نماید، اما هنوز گام‌های زیادی در راه رشد و توسعه پرورش متراکم این گونه باقی است.

کشور ایران نیز با دارا بودن این گونهٔ بومی در مناطق شمالی کشور به‌خصوص تالاب‌های انزلی و امیرکلایه دارای پتانسیل‌های مطلوبی برای آبزی‌پروری سوف حاج طرخان در پیکره‌های آبی مختلف می‌باشد. اما صید بی‌رویه، آلودگی‌های شدید و تخریب محل‌های زادوولد و رشد آن‌ها باعث کاهش جمعیت در بسیاری از مناطق شده است که نیاز به عزم جدی برای تکثیر و رهاسازی بچه ماهیان با هدف بازسازی و حفظ ذخایر طبیعی این گونه ارزشمند است.

نظر به پیشرفت‌های جدی که در امر تکثیر و القای تولیدمثل ماهی سوف حاج طرخان شده است کتابی با عنوان تکثیر کنترل‌شده سوف حاج طرخان با مدیریت دکتر دنیل زارسکی که یکی از محققان تولیدمثل این ماهی است در سال ۲۰۱۷ به رشته تحریر در آمد و با توجه به علاقه‌مندی به تکثیر این گونه در ایران و رابطه دوستانه با ایشان، کتاب حاضر به زبان فارسی ترجمه شد تا محققان، دست‌اندرکاران و علاقه‌مندان به تکثیر و آبزی‌پروری این ماهی از مطالب موجود در این کتاب بتوانند بهره‌مند شوند.

کتاب حاضر دارای ۱۱ فصل شامل مقدمه، صید، حمل‌ونقل مولدین و پیشگیری از بیماری‌ها، دستکاری‌های حین تکثیر و انتخاب مولدین، بیهوشی، تعیین مراحل رسیدگی تخمک‌ها، تحریک رسیدگی تخمک و اسپرم، جمع‌آوری گامت‌ها، نگهداری کوتاه و بلندمدت گامت‌ها، ارزیابی کیفیت گامت، لقاح آزمایشگاهی، انکوباسیون و تخم‌گشایی و درنهایت تکثیر پیش از موعد (تکثیر خارج از فصل) می‌باشد که بسیاری از بخش‌ها به‌صورت کاملاً کاربردی نگارش شده و دارای تصاویری گویا برای درک بهتر موضوعات در فصول مختلف می‌باشد.

با توجه به وجود ماهی سوف حاج طرخان به‌صورت طبیعی در آب‌های کشور و توجه به حفظ و بازسازی ذخایر این گونه و ذکر این نکته که این ماهی را می‌توان به‌راحتی در سیستم‌های مختلف آبزی‌پروری مورد پرورش قرار داد امید است اطلاعات ارائه‌شده در این ترجمه بتواند در راستای اهداف ذکر شده مورد استفاده کلیه علاقه‌مندان در این حوزه قرار گیرد.

بهرام فلاحتکار- عرفان اکبری نرگسی

تابستان ۱۴۰۰

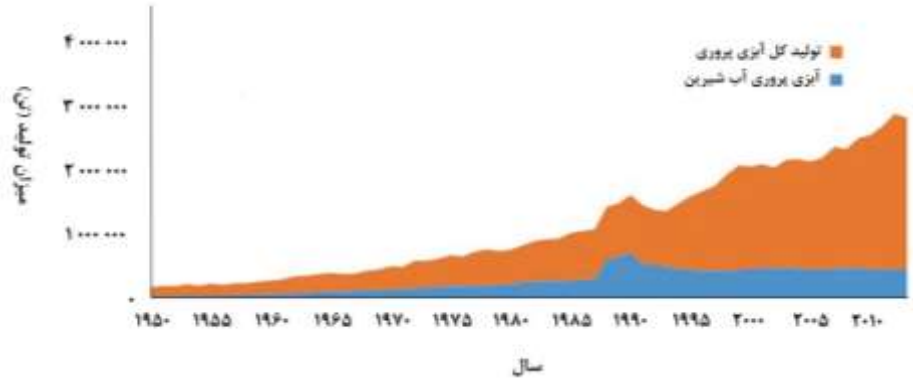
۱ مقدمه

تولیدات آبزی‌پروری آب شیرین در اروپا در دو دهه گذشته دچار رکود بوده است، درحالی‌که تولیدات مرتبط با آب شور و لب شور روند رو به رشدی را نشان می‌دهند (شکل ۱-۱). این موضوع از این واقعیت ناشی می‌شود که بیش از ۷۵ درصد از تولیدات آبزی‌پروری آب شیرین بر دو گونه متکی است: کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، که از سال ۱۹۹۵ سطح تولیدات آن‌ها در رکود بوده و در حدود ۳۵۰ هزار تن در سال در نوسان بوده است (آمار FAO). احتمالاً علت اصلی این موضوع تقاضای نسبتاً ثابت بازار برای این دو گونه است چراکه باید با افزایش عرضه محصولات با کیفیت بالایی که از آبزی‌پروری دریایی نشأت می‌گیرند رقابت کنند. برای مقابله با رقابت روزافزون پرورش دریایی، نیاز به افزایش فوری تنوع تولیدات در خشکی می‌باشد (Fontaine 2004; Fontaine et al. 2009). با این‌حال، سیستم‌های مرسوم تولید (استخرهای خاکی و مزارع جریان‌دار قزل‌آلا) برای تولید مؤثر گونه‌ها، به غیر از آن‌هایی که به‌طورمعمول در این سیستم‌ها پرورش می‌یابند کافی نیستند. در این راستا، سیستم‌های آبزی‌پروری مداربسته (RAS[1]) که برای پرورش متراکم گونه‌هایی که در خشکی به‌صورت بسیار محدود تولید می‌شوند یا حتی پرورش آن‌ها در مزارع مرسوم امکان‌پذیر نیست، به‌عنوان ابزاری بسیار کاربردی مطرح می‌باشند. این سیستم‌ها افزایش پایدار سطح تولید (از طریق کاهش مصرف آب، مدیریت مؤثر پسماند، افزایش سطح بهداشت و مدیریت بیماری‌ها) را نزدیک به بازار هدف فراهم می‌کنند (Martins et al. 2010). متأسفانه با اینکه تکنولوژی سیستم RAS شناخته شده و توسعه یافته است، اما در چند دهه گذشته میزان رشد تولیدات آبزی‌پروری در این زمینه هنوز بسیار کند بوده است. به‌تازگی عنوان شده که ساختار صنعت آبزی‌پروری آب شیرین (که اغلب شامل شرکت‌های کوچک است) نوآوری و سرمایه‌گذاری در تکنولوژی‌های جدید را محدود می‌کند، درحالی‌که عامل ضروری برای رشد تولیداتی از این نوع، سرمایه‌گذاری بالا (Nielsen et al. 2015) و توسعه پایدار فن‌آوری‌های تولید می‌باشد (برای اطلاعات بیشتر در مورد وضعیت فعلی و چشم‌انداز آبزی‌پروری سوف حاج طرخان توصیه می‌کنیم که به Overton et al. 2015 و Steenfeldt et al. 2015 مراجعه کنید).

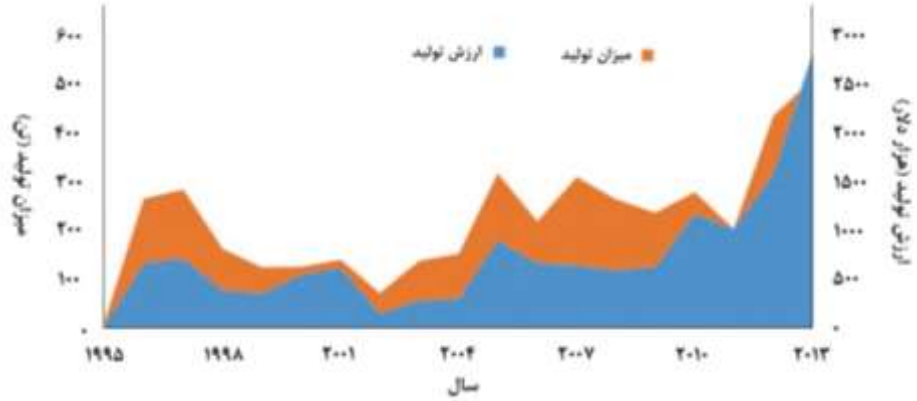
1. Recirculation aquaculture systems

از طرف دیگر، تولید در سیستم RAS نیز به‌دلیل نبود پروتکل‌های تولید واضح و استاندارد، برای بهره‌گیری کامل از پتانسیل بالای این نوع فناوری تولید محدود می‌باشد. این موارد در پروتکل‌های تکثیر که اولین قدم برای تولید مؤثر و مبنای هر مرحله دیگر از روند پرورش می‌باشند نیز وجود دارد.

از میان گونه‌های ماهیان آب شیرین که برای تنوع آبزی‌پروری آب شیرین در اروپا مورد استفاده قرار می‌گیرد می‌توان به ماهی سوف حاج طرخان (*Perca fluviatilis*) به‌عنوان یکی از امیدوارکننده‌ترین کاندیدهای نوظهور اشاره کرد (Fontaine et al. 2009; Steenfeldt et al. 2015). میزان تولید جهانی این گونه در سال ۲۰۱۳ بیش از ۲۹ هزار تن بوده است (آمار FAO). درحالی‌که صید نوع وحشی آن در طول مدت ۳۰ سال پایدار مانده است، تولید آن در بخش آبزی‌پروری روند رو به رشدی را نشان می‌دهد و برای اولین بار در سال ۲۰۱۳ به بیش از ۵۰۰ تن (آمار FAO) رسیده است که ارزش تولیدی آن بیش از ۲/۸ میلیون دلار و میانگین قیمت هر کیلوگرم حدود ۵/۵ دلار تعیین شده است (شکل ۱-۲، آمار FAO). این امر به‌وضوح نشان می‌دهد که تولید متراکم این گونه در آغاز مسیر توسعه خود قرار دارد و بازار تقاضا هنوز اشباع نشده است (Fontaine et al. 2009; Overton et al. 2015). بازار اروپا برای این گونه به‌طور کامل توسط Toner (۲۰۱۵) توصیف‌شده است.



شکل ۱-۱. میزان تولیدات آبزی‌پروری در اروپا (تولید کل و تولید در آب شیرین) بر طبق آمار FAO



شکل ۱-۲. میزان و ارزش تولید سوف حاج طرخان (طبق آمار FAO)

ویژگی‌های زیستی (به‌عنوان‌مثال سرعت رشد پایین در شرایط دمایی طبیعی، حساسیت به کیفیت آب و عوامل بیماری‌زا) و رفتاری سوف حاج طرخان به‌عنوان عوامل محدودکننده طی تولید متراکم در سیستم‌های تولید مرسوم (سیستم‌های باز و نیمه‌باز) مطرح هستند. با این‌حال، این عوامل در هنگام پرورش در سیستم RAS مشکلی ایجاد نمی‌کنند (Fontaine 2004). این امر منجر به مطالعات گسترده در زمینه تولیدمثل کنترل‌شده (Kucharczyk et al. 1996b; Kouril et al. 1997; Sulistyo et al. 1998; Kucharczyk et al. 1998) و جنبه‌های تولید متراکم در سیستم RAS شده است (Fontaine et al. 1996, 1997). اولین تلاش‌های موفقیت‌آمیز، نیاز به توسعه پروتکل‌های پرورش متراکم لارو (Mélard et al. 1996) و امکان تغذیه با غذاهای ترکیبی را مشخص نمود (Kestemont et al. 1996; Fiogbé et al. 1996). در آغاز قرن ۲۱ جنبه‌های مختلف پرورش لارو (Abi-Ayad et al. 2000; Tamazouzt et al. 2000; Cuvier-Péres et al. 2001; Baras et al. 2003) و همچنین فناوری‌های تولید بچه‌ماهیان جوان مورد بررسی قرار گرفت (Xu and Kestemont 2002; Mandiki et al. 2004).

همچنین اولین تلاش‌ها برای رشد مولدین سوف حاج طرخان در شرایط کنترل‌شده (Jourdan et al. 2000) و دستکاری شرایط محیطی برای کنترل چرخه تولیدمثلی انجام گرفت (Migaud et al. 2002; Wang et al. 2006). علاوه بر این، کارهای فشرده‌ای با هدف توسعه پروتکل تکثیر

(Migaud et al. 2004) و نیازمندی‌های تغذیه‌ای (Henrotte et al. 2010a, b) در مولدین اهلی‌شده انجام شده است (Fontaine et al. 2015 را نیز مشاهده کنید).

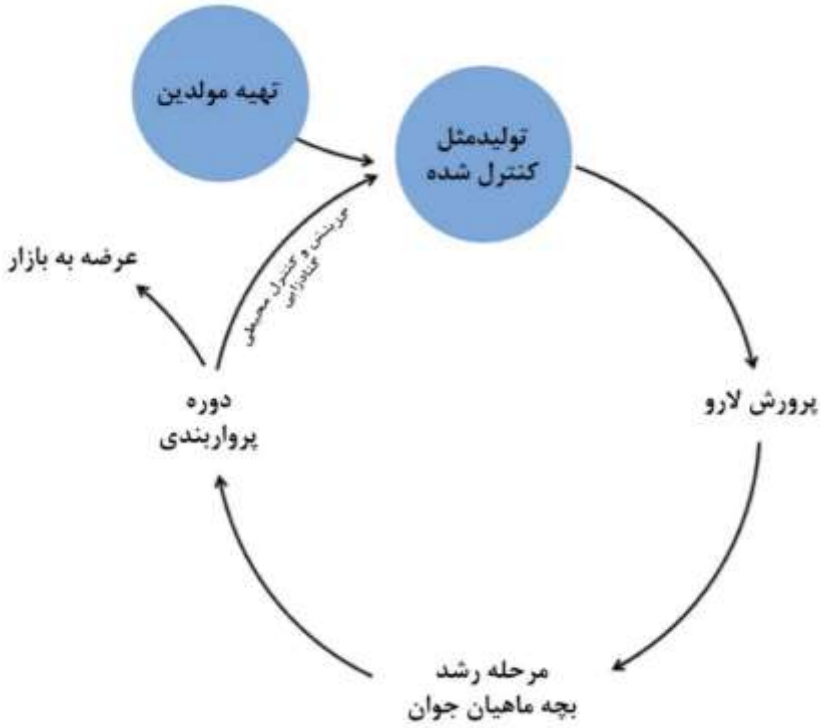
به‌تازگی تلاش‌های چشمگیری به تحقیق در زمینهٔ فرایند اهلی‌سازی (Douxfils et al. 2011a, b) و بهینه‌سازی پروتکل‌های القای توسعه گنادی و تخم‌ریزی اختصاص داده شده است (Abdulfatah et al. 2011, 2013). اما با وجود همه این تلاش‌ها، هنوز هیچ پروتکل شفافی برای تکثیر وجود ندارد و در ماهی‌های اهلی‌شده نیز به‌ندرت مطالعه‌ای انجام‌گرفته است. با اینکه تولید سوف حاج طرخان در سیستم RAS امکان‌پذیر است ولی به‌علت اینکه عموماً تخم‌هایی با کیفیت پایین/ یا متغیر مشاهده می‌شود کل چرخه تولید این ماهی در سیستم RAS با راندمان پایین انجام می‌گیرد. در مقابل، فعالیت‌های تحقیقاتی گسترده‌ای به‌منظور توسعه پروتکل‌های تخم‌ریزی مولدین وحشی (و/ یا پرورش‌یافته در استخر) که به‌راحتی در دسترس بودند انجام‌شده و شرایط نامناسب نگهداری بر نتایج تکثیر تأثیرگذار نبودند. بنابراین مطالعات در زمینه تولیدمثل کنترل‌شده نمونه‌های وحشی همیشه اولین قدم به سمت تولید متراکم آبزی‌پروری است، زیرا این امکان را فراهم می‌کند که نحوهٔ اثربخشی مکانیزم‌های تولیدمثل کنترل‌شده را درک کنیم (Policar et al. 2008; Szczerbowski et al. 2009; Rónyai and Lengyel 2010; Żarski et al. 2011a, 2011b).

تعداد ذینفعان علمی و حرفه‌ای که درگیر کار با سوف ماهیان هستند بازتاب کننده محبوبیت این خانواده است. افزایش علاقه‌مندی به پرورش ماهی سوف در اروپا منجر به تشکیل گروهی (پرورش ماهی سوف اروپایی) در انجمن آبزی‌پروری اروپا در سال ۲۰۱۲ شد. ویرایش و انتشار کتاب "زیست‌شناسی و پرورش سوف ماهیان" در سال ۲۰۱۵ بیانگر اهمیت این مبحث می‌باشد. همچنین تحقیق در زمینه سوف ماهیان از طریق تأمین بودجه توسط COST Action تحت عنوان FA1205 AQUAGAMETE انجام می‌گیرد که به مباحث ویژه گامت‌زایی و تولیدمثل می‌پردازد. نویسندگان کتابچه فعلی نیز از شرکت‌کنندگان فعال در این زمینه هستند.

تولیدمثل کنترل‌شده می‌تواند به‌عنوان یک مداخله انسانی در فرایند تولیدمثل تعریف شود (Woynarovich and Horvath 1980) که به‌وسیله مجموعه‌ای از تکنیک‌ها منجر به تولید فرزندانی باکیفیت‌بالا می‌شود. این تکنیک‌ها معمولاً تمامی پروتکل ها با هدف القای رسیدگی نهایی گنادها و تخم‌ریزی و همچنین مدیریت گامت‌ها و انکوباسیون تا زمان تخم‌گشایی را شامل می‌شوند (Żarski et al. 2015b). در کتابچه حاضر، دانش فعلی موجود در مورد اولین مراحل تولید متراکم آبزی‌پروری مرتبط با فراهم کردن مولدین از محیط‌های وحشی (محیط‌های شبه وحشی مانند استخرهای خاکی) و تکثیر مصنوعی سوف حاج طرخان گردآوری شده است (شکل ۱-۳). با این‌حال، این کتابچه یک مرور معمولی بر مطالب و تحقیقات قبلی نیست. در کنار شرح مختصر پایه

و اساس و پیشینه علمی نهفته در پشت هر یک از مراحل تولیدمثل کنترل‌شده، تمامی مطالب با استفاده از دانش فعلی ما به‌صورت گسترده به‌وسیله توصیه‌های علمی ویژه تکمیل شده است و می‌تواند به‌عنوان بهترین گزینه که امکان تکثیر موفقیت‌آمیز سوف حاج طرخان را میسر می‌کند در نظر گرفته شود. نکته‌ای که باید تأکید شود این است که در تمامی روندها و روش‌های توصیف‌شده از مولدین وحشی و یا پرورش‌یافته در استخر، به‌عنوان مدل استفاده‌شده است. این امر سبب می‌شود تا حد امکان از تأثیر شرایط محیطی و همچنین جنبه‌های تغذیه‌ای که بر روی کیفیت گامت‌ها تأثیر منفی می‌گذارند جلوگیری شود. البته اثر منفی گرمایش جهانی و همچنین برخی اختلالات محیطی دیگر نباید از عوامل تنظیم‌کننده کارایی تخم‌ریزی ماهیان وحشی مستثنی شوند. در ضمن، در مقایسه نتایج تولیدمثل جمعیت‌های مختلف یا یک جمعیت در طول سال‌های مختلف، همیشه باید بالاترین سطح نقد در نظر گرفته شود. علاوه بر این، لازم به ذکر است که هیچ‌یک از پروتکل‌های توصیف‌شده، احتمال واکنش‌های فیزیولوژیک متفاوت جمعیت‌های اهلی‌شده (پرورش‌یافته در سیستم RAS) به مراحلی خاص از پروتکل تکثیر را در نظر نگرفته‌اند. این موضوع باید قبل از به‌کارگیری روش‌های توصیف‌شده در اینجا جهت تولید تجاری ذخیره‌های پرورشی مورد توجه قرار گیرد. با این‌وجود امیدواریم که این کتابچه راهنمای ارزشمندی باشد تا امکان درک بهتر مشکلات مرتبط با تکثیر مصنوعی این گونه، آشنایی با روش‌های خاص توسعه‌یافته و کاربردی به‌روز و همچنین امکان تشخیص گره‌های اصلی تولیدمثل کنترل‌شده را فراهم سازد.

با وجود این‌واقعیت، پروتکل‌های ارائه‌شده در اینجا ابتدا باید با ذخیره‌های پرورش‌یافته در سطوح مختلف اهلی‌سازی به‌خصوص با ذخیره‌های ژنتیکی متفاوت سازگار شوند (Teletchea and Fontaine 2014)، ما امیدواریم که مجموعه اطلاعات ارائه‌شده در ادامه سبب توسعه مؤثر پرورش متراکم سوف حاج طرخان شود.



شکل ۱-۳. جنبه‌های پرداخته‌شده در کتابچه حاضر (دایره‌های آبی) از میان کل فرآیند تولید متراکم آبزی‌پروری با به‌کارگیری ماهی‌های وحشی (یا پرورش‌یافته در استخر) به‌عنوان مدل

راهنمای حاضر بخشی از پروژه PERCAHATCH (E!8028) بوده که تحت حمایت طرح EUREKA آماده‌سازی شده است (برای اطلاعات بیشتر به www.eurekanetwork.org مراجعه کنید). این پروژه توسط شرکت Szabolcsi Halászati (به نمایندگی آقای János Radóczi) با همکاری نزدیک دانشگاه Szent Istvan (Gödöllő, Hungary) و دانشگاه Warmia and Mazury (Olsztyn, Poland) آغاز شد. ساختار این مشارکت این امکان را فراهم نمود تا به‌طور دقیق، حرفه‌ای و مؤثر، بسیاری از پروتکل‌های توضیح داده‌شده در کتابچه حاضر مورد ارزیابی قرار گیرند. در برخی موارد، پروتکل‌ها بر اساس داده‌های منتشرنشده هستند، زیرا قبل از اجرای پروژه بسیاری از داده‌های جمع‌آوری‌شده هنوز در مرحله آماده‌سازی برای چاپ بودند.

با این‌وجود، تمام مراحل و توصیه‌های گنجانده‌شده در اینجا به لطف همکاری نزدیک با شرکت Szabolcsi Halászati ارزیابی شده که در این طرح به مجموعه‌ای از توصیه‌های کاربردی تبدیل شده است. بااین‌حال، اگرچه در این کتابچه پروتکل‌هایی توصیه شده‌اند که در بین پروتکل‌های آزمایش شده بهترین نتایج را داشته‌اند، اما توصیه می‌شود با در نظر گرفتن این موضوع که همیشه اثر تجمعی وقایع قبلی در طول زندگی ماهی بر تولیدمثل اثر می‌گذارند از مراحل توصیف شده به‌طور منتقدانه پیروی شده و در نظر داشته باشید که یک پروتکل مؤثر و قابل تکرار باید به‌طور مداوم در شرایط تکثیر محلی بهبود یابد.

منابع

Abdulfatah A, Fontaine P, Kestemont P, Gardeur J-N, Marie M (2011) Effects of photothermal kinetics and amplitude of photoperiod decrease on the induction of the reproduction cycle in female Eurasian perch *Perca fluviatilis*. Aquaculture 322–323:169–176. doi:10.1016/j. aquaculture.2011.09.002

Abdulfatah A, Fontaine P, Kestemont P, Milla S, Marie M (2013) Effects of the thermal threshold and the timing of temperature reduction on the initiation and course of oocyte development in cultured female of Eurasian perch *Perca fluviatilis*. Aquaculture 376–379:90–96. doi:10.1016/j. aquaculture.2012.11.010

Abi-Ayad SMEA, Kestemont P, Mélard C (2000) Dynamics of total lipids and fatty acids during embryogenesis and larval development of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). Fish Physiol Biochem 23:233–243. doi:10.1023/A:1007891922182

Baras E, Kestemont P, Mélard C (2003) Effect of stocking density on the dynamics of cannibalism in sibling larvae of *Perca fluviatilis* under controlled conditions. Aquaculture 219:241–255. doi:10.1016/S0044-8486(02)00349-6

Cuvier-Péres A, Jourdan S, Fontaine P, Kestemont P (2001) Effects of light intensity on animal husbandry and digestive enzyme activities in sea bass *Dicentrachus labrax* post-larvae. Aquaculture 202:317–328. doi:10.1016/S0044-8486(01)00781-5

Douxfils J, Mandiki SNM, Marotte G, Wang N, Silvestre F, Milla S, Henrotte E, Vandecan M, Rougeot C, Mélard C, Kestemont P (2011a) Does domestication process affect stress response in juvenile Eurasian perch *Perca fluviatilis*? Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol 159:92–99. doi:10.1016/j.cbpa.2011.01.021

Douxfils J, Mathieu C, Mandiki SNM, Milla S, Henrotte E, Wang N, Vandecan M, Dieu M, Dauchot N, Pigneur LM, Li X, Rougeot C, Mélard C, Silvestre F, van Doninck K, Raes M, Kestemont P (2011b) Physiological and proteomic evidences that domestication process differentially modulates the immune status of juvenile Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) under chronic confinement stress. Fish Shellfish Immunol 31:1113–1121. doi:10.1016/j. fsi.2011.10.001

Fiogbé ED, Kestemont P, Mélard C, Micha JC (1996) The effects of dietary crude protein on growth of the Eurasian perch *Perca fluviatilis*. Aquaculture 144:239–249. doi:10.1016/ S0044-8486(96)01293-8

Fontaine P (2004) L'elevage de la perche commune, une voie de diversification pour l'aquaculture continentale. Prod Anim 17:189–193.

Fontaine P, Tamazouzt L, Capdeville B (1996) Growth of the Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) reared in floating cages and in water recirculated system: first results. J Appl Ichthyol 12:181–184.

Fontaine P, Gardeur JN, Kestemont P, Georges A (1997) Influence of feeding level on growth, intraspecific weight variability and sexual growth dimorphism of Eurasian perch *Perca fluviatilis* L. reared in a recirculation system. Aquaculture 157:1–9.

Fontaine P, Legendre M, Vandeputte M, Fostier A (2009) Domestication of new species and sustainable development in fish culture. Cah Agric 18:119–124. doi:10.1684/agr.2009.0293

Fontaine P, Wang N, Hermelink B (2015) Broodstock management and control of the reproductive cycle. In: Kestemont P, Dąbrowski K, Summerfelt RC (eds) Biology and culture of percid fishes. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 103–122.

Henrotte E, Kaspar V, Rodina M, Psenicka M, Linhart O, Kestemont P (2010a) Dietary n-3/n-6 ratio affects the biochemical composition of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) semen but not indicators of sperm quality. Aquac Res 41:e31–e38. doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02452.x

Henrotte E, Mandiki RSNM, Prudencio AT, Vandecan M, Mélard C, Kestemont P (2010b) Egg and larval quality, and egg fatty acid composition of Eurasian perch breeders (*Perca fluviatilis*) fed different dietary DHA/EPA/AA ratios. Aquac Res 41:e53–e61. doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02455.x

Jourdan S, Fontaine P, Boujard T, Vandeloise E, Gardeur J, Anthouard M, Kestemont P (2000) Influence of daylength on growth, heterogeneity, gonad development, sexual steroid and thyroid levels, and N and P budgets in *Perca fluviatilis*. Aquaculture 186:253–265. doi:10.1016/ S0044-8486(99)00357-9

Kestemont P, Mélard C, Fiogbé E, Vlavonou R, Masson G (1996) Nutritional and animal husbandry aspects of rearing early life stages of Eurasian perch *Perca fluviatilis*. J Appl Ichthyol 12:157–165

Kouril J, Linhart O, Relot P (1997) Induced spawning of perch by means of a GnRH analogue. Aquac Int 5:375–377.

Kucharczyk D, Kujawa R, Mamcarz A, Skrzypczak A, Wyszomirska E (1996) Induced spawning in perch, *Perca fluviatilis* L. using carp pituitary extract and HCG. Aquac Res 27:847–852. doi:10.1046/j.1365-2109.1996.t01-1-00802.x

Kucharczyk K, Mamcarz S, Wyszomirska E (1998) Induced spawning in perch, *Perca fluviatilis* L., using FSH + LH with pimozide or metoclopramide. Aquac Res 29:131–136. doi:10.1046/j.1365-2109.1998.00949.x

Mandiki SNM, Houbart M, Babiak I, Vandeloise E, Gardeur JN, Kestemont P (2004) Are sex steroids involved in the sexual growth dimorphism in Eurasian perch juveniles? Physiol Behav 80:603–609. doi:10.1016/j.physbeh.2003.10.016

Martins CIM, Eding EH, Verdegem MCJ, Heinsbroek LTN, Schneider O, Blancheton JP, D'Orbcastel ER, Verreth JAJ (2010) New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: a perspective on environmental sustainability. Aquac Eng 43:83–93. doi:10.1016/j. aquaeng.2010.09.002

Mélard C, Baras E, Mary L, Kestemont P (1996) Relationships between stocking density, growth, cannibalism and survival rate in intensively cultured larvae and juveniles of perch (*Perca fluviatilis*). Ann Zool Fenn 33:643–651

Migaud H, Fontaine P, Sulistyo I, Kestemont P, Gardeur JN (2002) Induction of out-of-season spawning in Eurasian perch *Perca fluviatilis*: effects of rates of cooling and cooling durations on female gametogenesis and spawning. Aquaculture 205:253–267. doi:10.1016/ S0044-8486(01)00675-5

Migaud H, Gardeur JN, Kestemont P, Fontaine P (2004) Off-season spawning of Eurasian perch *Perca fluviatilis*. Aquac Int 12:87–102. doi:10.1023/B:AQUI.0000017190.15074.6c

Nielsen R, Asche F, Nielsen M (2015) Restructuring European freshwater aquaculture from family-owned to large-scale firms – lessons from Danish aquaculture. Aquac Res n/a-n/a. doi:10.1111/are.12836

Overton JL, Toner D, Policar T, Kucharczyk D (2015) Commercial production: factors for success and limitations in European percid fish culture. In: Kestemont P, Dąbrowski K, Summerfelt RC (eds) Biology and culture of percid fishes. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 881–890

Policar T, Kouril J, Stejskal V, Hamackova J (2008) Induced ovulation of perch (*Perca fluviatilis* L.) by preparations containing GnRHa with and without metoclopramide. Cybium 32:308

Rónyai A, Lengyel SA (2010) Effects of hormonal treatments on induced tank spawning of Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.). Aquac Res 41:e345–e347. doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02465.x

Steenfeldt S, Fontaine P, Overton JL, Policar T, Toner D, Falahatkar B, Horváth Á, Ben KI, Hamza N, Mhetli M (2015) Current status of Eurasian percid fishes aquaculture. In: Kestemont P, Dąbrowski K, Summerfelt RC (eds) Biology and culture of percid fishes. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 817–841

Sulistyo I, Fontaine P, Rinchard J, Gardeur JN, Migaud H, Capdeville B, Kestemont P (1998) Reproductive cycle and plasma levels of steroids in male Eurasian perch *Perca fluviatilis*. Aquat Living Resour 11:101–110. doi:10.1016/S0990-7440(00)00146-7

Szczerbowski A, Kucharczyk D, Mamcarz A, Łuczyński MJ, Targońska K, Kujawa R (2009) Artificial off-season spawning of Eurasian perch *Perca fluviatilis* L. Archive 17:95–98

Tamazouzt L, Chatain B, Fontaine P (2000) Tank wall colour and light level affect growth and survival of Eurasian perch larvae (*Perca fluviatilis* L.). Aquaculture 182:85–90. doi:10.1016/ S0044-8486(99)00244-6

Teletchea F, Fontaine P (2014) Levels of domestication in fish: implications for the sustainable future of aquaculture. Fish Fish 15:181–195. doi:10.1111/faf.12006

Toner D (2015) The market for Eurasian perch. In: Kestemont P, Dąbrowski K, Summerfelt RC (eds) Biology and culture of percid fishes. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 865–879

Wang N, Gardeur JN, Henrotte E, Marie M, Kestemont P, Fontaine P (2006) Determinism of the induction of the reproductive cycle in female Eurasian perch, *Perca fluviatilis*: identification of environmental cues and permissive factors. Aquaculture 261:706–714. doi:10.1016/j. aquaculture.2006.08.010

Woynarovich E, Horvath L (1980) The artificial propagation of warm-water finfishes – a manual for extension. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome Xu X, Kestemont P (2002) Lipid metabolism and FA composition in tissues of Eurasian perch *Perca fluviatilis* as influenced by dietary fats. Lipids 37:297–304

Żarski D, Bokor Z, Kotrik L, Urbanyi B, Horvلth A, Targońska K, Krejszeff S, Palińska K, Kucharczyk D (2011a) A new classification of a preovulatory oocyte maturation stage suitable for the synchronization of ovulation in controlled reproduction of Eurasian perch *Perca fluviatilis* L. Reprod Biol 11:194–209. doi:10.1016/S1642-431X(12)60066-7

Żarski D, Palińska K, Targońska K, Bokor Z, Kotrik L, Krejszeff S, Kupren K, Horváth Á, Urbányi B, Kucharczyk D (2011b) Oocyte quality indicators in Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L., during reproduction under controlled conditions. Aquaculture 313:84–91. doi:10.1016/j. aquaculture.2011.01.032

Żarski D, Horváth A, Held JA, Kucharczyk D (2015) Artificial reproduction of percid fishes. In: Kestemont P, Dąbrowski K, Summerfelt RC (eds) Biology and culture of percid fishes, 1st edn. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 123–161

۲ صید، حمل‌ونقل مولدین و پیشگیری از بیماری‌ها

صید مولدین

دو روش برای صید مولدین سوف حاج طرخان وجود دارد. در روش اول، صید از پیکره‌های آب‌های طبیعی و در روش دیگر صید از استخرهای خاکی (برای مثال مزارع کپور، مزارع پرورش توأم و مخازن سدها) صورت می‌گیرد. مولدین را در مزارع کپور می‌توان هم در فصل بهار و هم در فصل پاییز صید نمود. مولدین صیدشده در فصل بهار باید سریعاً به مرکز تکثیر منتقل شوند و مراحل کنترل تخم‌ریزی در آن‌ها فوراً آغاز می‌شود. مولدین صیدشده در فصل پاییز می‌توانند به استخرهای زمستان‌گذرانی منتقل‌شده و تا فصل بهار نگهداری شوند یا می‌توانند به مرکز تکثیر منتقل شوند و در تکثیر خارج از فصل (تا چند ماه قبل از فصل تکثیر: برای اطلاعات بیشتر به فصل ۱۱ مراجعه کنید) مورد استفاده قرار گیرند. اگر ماهی‌ها فصل زمستان را در استخرهای زمستان-گذرانی سپری کنند، باید مقدار کافی از غذاهای طبیعی برای تغذیه در اختیار آن‌ها قرار گیرد [ماهی‌های کوچک مانند ماهی کلمه (common roach) و ماهی ریز نقره‌ای (sunbleak)].

بهتر است مولدین سوف در فصل بهار از آب‌های طبیعی صید شوند. در این زمان، ماهی‌ها در مکان‌های تخم‌ریزی در کنار یکدیگر جمع می‌شوند و این امکان وجود دارد که تعداد قابل‌توجهی از مولدین در مدت زمانی کوتاه صید شوند. می‌توان از انواع تجهیزات صیادی برای صید مولدین در محیط‌های طبیعی استفاده نمود. با این‌حال، به علت آسیبی که به ماهی‌ها وارد می‌شود استفاده از تورهای گوشگیر پیشنهاد نمی‌شود. بهترین نتیجه هنگامی حاصل می‌شود که از تله‌ها[1] یا تورهای کشیدنی[2] استفاده شود.

1. Traps
2. Drag nets

صرف‌نظر از مکان صید، مولدین سوف باید از نشاط و سرزندگی، سلامت، رشد کافی و وضعیت مناسب برخوردار باشند. هنگامی‌که در آب نگهداری می‌شوند باید حرکات بدنی کافی داشته باشند و به محرک‌های خارجی به‌طور طبیعی واکنش نشان دهند. از نظر سلامتی، ماهی‌ها باید هیچ‌گونه علائم خارجی از بیماری‌ها مانند علائم قارچی یا انگلی که با چشم غیرمسلح قابل رویت باشد نداشته باشند. آن‌ها باید از ساختار بدنی، دهان، آبشش و باله مناسب برخوردار باشند. به‌غیراز موارد بیان‌شده، نباید علائم کم‌خونی داشته باشند و یا نشانه‌های آسیب مکانیکی در قسمت‌های مختلف بدن آن‌ها (به‌خصوص در قسمت دهان) وجود داشته باشد.

حمل‌ونقل مولدین

توصیه می‌شود از مخازن دارای سیستم اکسیژن‌رسانی در هنگام انتقال مولدین استفاده شود. مخازن انتقال باید از موادی ساخته شده باشند که برای سلامت ماهی‌ها خطری ایجاد نکنند. لبه‌ها و دیواره‌های کناری باید کاملاً صاف باشند تا موجب صدمات مکانیکی به پوست ماهی‌ها نشوند. برای اکسیژن‌رسانی آب باید از مخازن هوای فشرده استفاده کرد. سیستم اکسیژن‌رسانی باید دارای لوله‌های هوارسانی با سطح کاملاً صاف باشند. نازل‌های هوا باید شرایط اکسیژن‌رسانی به‌کل حجم آب را فراهم سازند. تجهیزات کمکی (توری‌ها، سطل‌ها، مخازن و غیره) باید ضدعفونی شوند. آب مورد استفاده برای انتقال ماهی‌ها باید فاقد کلر و آمونیاک باشد. برای حمل‌ونقل می‌توان از آب طبیعی (از حوضچه یا دریاچه‌ای که قبل از انتقال، ماهی‌ها در آن نگهداری می‌شدند) یا آب لوله‌کشی (اگر فاقد کلر باشد و بعد اکسیژن‌رسانی) استفاده نمود. اختلاف دمای آب بین مخازنی که ماهی‌ها قبل از حمل‌ونقل در آن نگهداری می‌شدند و مخازن انتقال ماهی‌ها نباید از ۲ درجه سانتی‌گراد بیشتر باشد. اگر تعداد مولدین سوف برای حمل‌ونقل کم باشد می‌توان از کیسه‌های پلی‌اتیلنی برای انتقال آن‌ها استفاده نمود.

انتقال مولدین سوف باید حداکثر طی ۲۴ ساعت انجام گیرد. بهتر است ماهی‌هایی که برای حمل‌ونقل انتخاب شده‌اند در مخزنی که قسمتی از آن با آب پرشده است قرار داده شده و وزن‌کشی شوند. پس از وزن‌کشی، ماهی‌ها باید به مخازن انتقال یا کیسه‌های پلی‌اتیلنی منتقل شوند. مخازن انتقال باید قبل از بارگیری با ماهی به میزان یک‌سوم از گنجایش و پس از بارگیری به میزان دوسوم از گنجایش خود با آب پر شوند.

کیسه‌های پلی‌اتیلنی باید نصف گنجایش خود با آب پرشده، سپس ماهی‌ها بارگیری شوند. در ادامه، هوای موجود در کیسه‌ها باید کاملاً خارج شود، سپس اکسیژن به درون کیسه‌ها اضافه‌شده و

محکم بسته شوند. فرایند بارگیری باید به‌صورت پیوسته، ملایم و با ظرافت کامل انجام گیرد تا به ماهی‌ها ضربه‌ای وارد نشده و موجب آسیب‌دیدگی آن‌ها نشود.

در هنگام انتقال ماهی‌ها، باید از حرکات سریعی که سبب ایجاد موج در مخزن آب یا لبریز شدن آب از دیواره‌ها می‌شود جلوگیری شود. همچنین بسیار مهم است که در هنگام انتقال، دمای آب مخزن افزایش پیدا نکند. اگر مدت زمان انتقال یا میزان بارگیری ماهی‌ها بیش از میزان توصیه شده در جدول ۲-۱ باشد، لازم است در هنگام انتقال، آب مخزن تعویض گردد. برای این منظور، آب باید به‌آرامی در سطح مخزن اضافه شود. پس از رسیدن به مقصد، تخلیه ماهی‌ها باید طبق همان قوانین بیان شده برای بارگیری انجام گیرد. مهم‌تر از همه اینکه، دمای آب مخزن انتقال و محیط جدید معرفی ماهی‌ها باید متعادل شود (هم‌دما کردن).

میزان ماهی‌هایی که در هر مرحله می‌توان توسط مخازن حمل نمود بستگی به شرایط ماهی دارد (برای مثال به نحوه دستکاری ماهی‌ها قبل از حمل‌ونقل بستگی دارد)، با این‌حال عمدتاً به دمای آب و مدت زمان انتقال بستگی دارد. توده ماهی نسبت به واحد حجم آب انتخاب می‌شود. تا به امروز هیچ راهنمایی در مورد حمل‌ونقل مولدین سوف حاج طرخان تدوین نشده است. بنابراین برای انجام عملیات حمل‌ونقل این ماهی‌ها توصیه می‌شود از دستورالعمل مربوط به ماهی سوف معمولی (*Sander lucioperca*) استفاده شود (جداول ۲-۱ و ۲-۲).

جدول ۲-۱. شرایط مورد نیاز برای انتقال ۵ تا ۲۰ ساعته ماهی‌ها در مخازن دارای منبع اکسیژن‌رسانی

وزن هر قطعه	**مقدار ماهی (کیلوگرم) در ۱۰۰۰ لیتر آب در دماهای مختلف**				
ماهی (گرم)	**۰–۵ °C**	**۵–۸ °C**	**۸–۱۰ °C**	**۱۰–۱۵ °C**	**۱۵–۲۰ °C**
کمتر از ۱۰۰	۵۰۰-۱۰۰	۴۰-۸۰	۳۰-۶۰	۲۴-۴۸	۲۰-۴۰
۲۰۰–۱۰۰	۱۰۰-۱۲۵	۸۰-۱۰۰	۶۰-۷۵	۴۸-۶۰	۴۰-۵۰
۵۰۰–۲۰۰	۱۲۵-۱۷۵	۱۰۰-۱۴۰	۷۵-۱۰۵	۶۰-۸۴	۵۰-۷۰
۱۰۰۰–۵۰۰	۱۷۵-۲۰۰	۱۴۰-۱۶۰	۱۰۵-۱۲۰	۸۴-۹۶	۷۰-۸۰
۱۰۰۰	۲۵۰	۲۰۰	۱۵۰	۱۲۰	۱۰۰
۱۷۰۰–۱۰۰۰	۲۷۵-۲۸۸	۲۲۰-۲۳۰	۱۶۵-۱۷۳	۱۳۲-۱۳۸	۱۱۰-۱۱۵

جدول ۲-۲. مقدار ماهی قابل انتقال (به کیلوگرم) در کیسه‌های ۴۰ لیتری حاوی ۲۰ لیتر آب و ۲۰ لیتر اکسیژن

دما (°C)	زمان انتقال (به ساعت)									
	۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵	۴۰	۴۵	۵۰
۵	۱/۸	۱/۸	۱/۸	۱/۸	۱/۸	۱/۸	۱/۶	۱/۴	۱/۳	۱/۲
۱۰	۱/۸	۱/۸	۱/۸	۱/۳	۱/۰	۰/۹۳	۰/۸	۰/۷	۰/۶۲	۰/۵۶
۱۵	۱/۸	۱/۸	۱/۸	۱/۳	۱/۰	۰/۹۳	۰/۸	۰/۷	۰/۶۲	۰/۵۶
۲۰	۱/۸	۱/۸	۱/۴	۱/۰	۰/۹	۰/۷۵	۰/۶۴	۰/۵۶	۰/۵	۰/۴۵

پیشگیری از بیماری‌ها

اولین اقدام بعد از حمل‌ونقل ماهی‌ها به مرکز تکثیر باید بررسی خصوصیات ظاهری آن‌ها باشد. ایجاد خراش و زخم در مولدین سوف به‌خصوص بعد از صید از آب‌های آزاد شایع است. میزان این صدمات به روش صید و نحوه دستکاری و رفتار با ماهی‌ها بستگی دارد. همه جراحات باید در اسرع وقت ضدعفونی شوند، زیرا زمینه‌ای برای عفونت هستند و می‌توانند منجر به مرگ مولدین شوند. محلول آبی Gentian violet برای ضدعفونی توصیه می‌شود. این محلول معمولاً در داروخانه‌ها در دسترس است و بی‌خطر می‌باشد، زیرا برای استفاده انسانی در نظر گرفته‌شده است. بزرگ‌ترین مزیت آن، روش استفاده آسان است. این محلول باید در نقاط زخمی و آسیب‌دیده استفاده شود، مشابه همان حالتی که در زخم و آسیب‌دیدگی پوستی انسان‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. یک‌بار ضدعفونی ممکن است مؤثر نباشد و ماهی‌ها باید در هر بار انتقال ضدعفونی شوند.

در هنگام بررسی ظاهری ماهی‌ها باید به وضعیت سلامت آن‌ها توجه شود. تمامی ناهنجاری‌های ظاهری و بیشتر انگل‌ها می‌توانند مانعی برای تخم‌ریزی در ماهی‌ها باشند. بنابراین در صورت مشاهده هرگونه علائم هشداردهنده باید سریعاً به دامپزشک اطلاع داده شود. دامپزشک باید وضعیت سلامت ماهی‌ها را ارزیابی نموده و بر روند درمان آن‌ها نظارت داشته باشد. توصیه نمی‌شود ماهی‌ها را بدون نظارت حرفه‌ای درمان کنید زیرا عدم آگاهی در مورد دارویی خاص یا استفاده نادرست از داروها می‌تواند منجر به اثرات نامطلوب گردد. برای کسب اطلاعات بیشتر در

مورد عفونت‌های انگلی و همچنین سایر بیماری‌ها در سوف به Rodger و Phelps (۲۰۱۵) و Behrmann-Godel و Brinker (۲۰۱۶) مراجعه نمایید.

به‌منظور جبران اثرات منفی استرس ناشی از حمل‌ونقل و انتقال، می‌توان از ۱ تا ۲ کیلوگرم کلرید سدیم به ازای هر مترمکعب آب در مخازن تخم‌ریزی استفاده نمود. این عمل باید برای اولین بار بلافاصله بعد از انتقال مولدین به مرکز تکثیر انجام گیرد. استفاده‌های بعدی باید در فواصل یک‌هفته‌ای مدنظر قرار گیرد.

منابع

Behrmann-Godel J, Brinker A (2016) Biology and ecologyu of perch parasites. In: Couture P, Pyle G (eds) Biology of perch. CRC Press, Boca Raton, pp 193–229

Berka R (1986) The transport of live fish. a review. EIFAC technical paper 48. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, p 52

Rodger HD, Phelps NBD (2015) Percid fish health and disease. In: Kestemont P, Dąbrowski K, Summerfelt RC (eds) Biology and culture of percid fishes. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 799–813

۳ دستکاری‌های حین تکثیر و انتخاب مولدین

پیشینهٔ علمی

تولیدمثل موفق تا حد زیادی به شرایط کلی مولدین بستگی دارد. از جمله این شرایط می‌توان به میزان رسیدگی مولدین (آماده بودن یا نبودن ماهی برای تخم‌ریزی) و همچنین وضعیت سلامت ماهی اشاره نمود. وضعیت سلامتی هنگامی‌که از ماهی‌های وحشی و پرورش‌یافته در استخر استفاده می‌شود اهمیت ویژه‌ای دارد، زیرا عملیات صید و برداشت می‌تواند آسیب‌های پوستی ایجاد کنند و به‌علت استرس ایجاد شده باعث تغییر پاسخ ایمنی شوند. این قضیه به‌نوبه خود شرایطی را ایجاد می‌کند که باعث انواع مختلفی از عفونت‌ها (به‌خصوص قارچی و باکتریایی) می‌شود که می‌تواند منجر به تلفات شدید مولدین شود. حتی اگر مولدی که از شرایط نامناسبی برخوردار است (برای مثال بروز برخی آسیب‌های خارجی، فرسایش باله، کمبود یا کدورت زیاد موکوس، فلس‌های کدر یا نسبتاً سفید) تا زمان عملیات تخم‌ریزی زنده بماند، باید به احتمال زیاد انتظار داشت که کیفیت گامت‌های تولیدی از چنین مولدی بسیار پایین باشد. بنابراین، انتخاب ماهی‌ها برای فرآیند تولیدمثل یکی از مراحل کلیدی در طی عملیات تولیدمثل کنترل‌شده می‌باشد. بااین‌حال، اگر انتخاب ماهی‌ها برای تولیدمثل کنترل‌شده به‌درستی انجام شده باشد هم هنوز چندین دستکاری قبل از به‌دست آوردن گامت‌ها وجود دارد که باید روی ماهی‌ها اعمال شود. هر عملیات دستکاری یک عامل استرس‌زا است که احتمال کاهش سطح سلامتی در ماهی‌ها را ایجاد می‌نماید. به همین علت، دانش در مورد اصول اساسی دستکاری‌های تکثیر به‌همراه برخی روش‌های پیشگیری از بیماری‌ها (جزئیات بیشتر در فصل ۲ بیان شده است) از نقطه نظر تجاری از اهمیت انکارناپذیری برخوردار است.

برای کسب جزئیات بیشتر در ارتباط با پیشینه علمی تولیدمثل کنترل‌شده سوف ماهیان توصیه می‌شود به Żarski و همکاران (۲۰۱۵) مراجعه نمایید.

شرایط نگهداری مولدین

مولدین سوف حاج طرخان (خصوصاً انواع وحشی و پرورش‌یافته در استخر) نسبت به نگهداری در شرایط کنترل‌شده بسیار حساس می‌باشند. علاوه بر دستکاری‌های مکرر، ماهی‌ها به‌صورت

مداوم در شرایط تراکم‌های غیرطبیعی که یک عامل استرس‌زا می‌باشد قرار می‌گیرند (Bly et al. 1997). بنابراین، شرایط نگهداری مولدین برای تولیدمثل کنترل‌شده باید به‌طور دقیق مورد بررسی قرار گیرد. ماهی‌ها طبق اندازه‌ای که دارند باید در مخازنی با حجم کل ۳۰۰ لیتر (برای ماهی‌هایی با میانگین وزن ۱۵۰ گرم) تا حداکثر ۱۰۰۰ لیتر نگهداری شوند. مخازن بزرگ به‌هیچ‌وجه پیشنهاد نمی‌شوند به‌علت اینکه صید ماهی‌ها در این مخازن با تور دستی دشوار است و تعقیب طولانی[1] آن‌ها برای صید نیز یک عامل استرس‌زای دیگر می‌باشد. مخازن باید دارای سطوحی کاملاً صاف باشند و نباید هیچ‌گونه جسمی در آن‌ها غوطه‌ور باشد. استفاده از مخازنی که ماهی‌ها بتوانند در قسمت‌هایی از آن مخفی شوند (حفره‌ها، لوله‌های خروجی و غیره) پیشنهاد نمی‌شود زیرا ماهی‌ها تمایل به تجمع در چنین مکان‌هایی دارند و این عمل می‌تواند منجر به آسیب‌های پوستی در آن‌ها شود (به‌وسیله اجسام غوطه‌ور و خار باله یکدیگر). روشنایی تا حد امکان باید در کل سطح مخزن اعمال شود تا از تجمع ماهی‌ها در قسمت‌های تاریک‌تر مخزن جلوگیری شود. نور نباید خیلی شدید باشد و همچنین میزان نور در سطح مخزن نباید بیشتر از ۳۰۰ لوکس باشد.

با این‌حال، بهتر است که ماهی‌های وحشی و پرورش‌یافته در استخر در شرایط تاریکی نگهداری شوند (کمتر از ۵۰ لوکس). به‌خصوص به‌علت اینکه دوره نوری در رسیدگی نهایی تخمک و تخم‌ریزی نقشی جزئی دارد (برای مشاهده جزئیات به فصل ۵ مراجعه نمایید) و در تاریکی مداوم ماهی‌ها کمتر تحریک می‌شوند (رفتاری آرام تر دارند) که احتمالاً استرس را محدود می‌کند. مخازن باید دارای فیلترهای مکانیکی و بیولوژیک (از بین بردن آمونیوم و نیتریت) و آب با دمایی ثابت باشند. جریان آب باید به‌گونه‌ای باشد که سبب شود کل حجم آب حداقل در طی یک ساعت تعویض گردد. دمای آب باید کاملاً کنترل شود. به‌طور مستقیم در مخازن نگهداری باید دمایی ثابت (۰/۲ ± درجه سانتی‌گراد) بین ۱۰ تا ۱۶ درجه سانتی‌گراد فراهم باشد و دستیابی به دماهای بالاتر باید در کمتر از ۶ ساعت امکان‌پذیر باشد.

پارامترهای کیفی آب

برای مولدین سوف باید سیستم مداربسته آب با برقراری شرایط مناسب محیطی فراهم باشد. خصوصیات فیزیکوشیمیایی عنوان‌شده در ادامه باید در زمان نگهداری ماهی‌ها فراهم باشند:

- دمای آب: ۵ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد

1. Long chasing

- پی‌اچ: ۷ تا ۷/۵
- میزان کل نیتروژن آمونیاکی (CA): کمتر از ۰/۰۱۲۵ میلی‌گرم در هر دسی مترمکعب
- نیتریت نیتروژنی (NO2-N): کمتر از ۰/۰۰۵ میلی‌گرم در هر دسی مترمکعب
- اکسیژن‌رسانی (حداقل به میزان ۸۰ درصد اشباعیت)
- راندمان فیلتراسیون مکانیکی و بیولوژیک: میزان کل مواد معلق کمتر از ۱ میلی‌گرم در هر دسی مترمکعب

تشخیص جنسیت

در مراحل انتهایی کنترل تولیدمثل، جدا کردن ماهی‌ها از نظر جنسیت می‌تواند مفید باشد. این امر از تعامل‌های احتمالی فرومون‌ها بین مولدین نر و ماده جلوگیری می‌کند (Żarski 2012) و به‌نوبه خود باعث می‌شود پروتکل تخم‌ریزی از قابلیت اطمینان و پیش‌بینی بیشتری برخوردار باشد. به همین‌علت است که تشخیص جنسیت یک جنبه مهم از فرایند کنترل تولیدمثل می‌باشد. با این‌حال، در سوف حاج طرخان هیچ‌گونه تفاوت ظاهری از لحاظ جنسیت وجود ندارد. این امر سبب می‌شود شناسایی ماهی‌های نر از ماده به‌وسیلهٔ خصوصیات ظاهری فقط در طول فصل تخم‌ریزی امکان‌پذیر باشد. در این زمان، مولدین ماده معمولاً محوطه شکمی متورمی دارند و مولدین نر نیز با فشار آرام به ناحیه شکمی مقدار کمی اسپرم رهاسازی می‌کنند (شکل ۳-۱). ویژگی آزادسازی اسپرم ممکن است در برخی موارد بسیار مفید باشد زیرا ماهی‌های نر وحشی و پرورش‌یافته در استخر ممکن است حتی در زمستان نیز مقداری اسپرم رهاسازی کنند (Alavi et al. 2010). با این‌حال، حتی در این مورد نیز امکان تشخیص جنسیت کماکان با محدودیت مواجه است. این امر همچنین در ماهی‌های پرورشی نگهداری شده در شرایط تراکم بالا (در سیستم‌های مداربسته) هنگامی‌که دو جنس اغلب از لحاظ ظاهری بسیار شباهت دارند نیز صادق می‌باشد. با این‌وجود، تشخیص جنسیت باید با دقت بسیار زیاد و بدون در نظر گرفتن منشأ تهیه ماهی‌ها انجام گیرد.

یکی از روش‌های آسان برای تأیید جنسیت در ماهی‌ها استفاده از کاتتر است (Ross 1984; Smith et al. 2014). برای این منظور، کاتتر باید به آرامی وارد منفذ تناسلی ماهی شود و در صورت امکان به‌وسیله مکش سرنگ متصل به کاتتر، از گناد نمونه‌برداری انجام گیرد (به‌همراه جزئیات در فصل ۴ توضیح داده شده است). استفاده از کاتتر اگر به‌درستی انجام گیرد معمولاً برای ماهی خطری ندارد و با اطمینان می‌توان چندین بار قبل از تخم‌ریزی از این روش استفاده نمود (Żarski et al. 2011).

شکل ۳-۱. محوطه شکمی تقریباً متورم در مولد ماده (شکل بالا) و یک مولد نر با اندازه یکسان با اسپرم رهاشده کم اما قابل مشاهده در قسمت منفذ تناسلی (پس از فشار آرام به ناحیه شکمی قابل رؤیت است) (شکل پایین) (عکس از Z. Bokor)

دستکاری‌های تکثیر

در طی فرایند تکثیر کنترل‌شده، ماهی‌ها معمولاً در معرض عوامل استرس‌زای مختلف قرار می‌گیرند. این امر در مورد تغییرات مکرر محیط نگهداری ماهی‌ها (شامل رژیم حرارتی- نوری، حبس در مخازن نگهداری و غیره) و همچنین تمامی دستکاری‌های لازم صدق می‌کند.

بسته به هدف هر عملیات دستکاری، ماهی‌ها ممکن است فقط بین مخازن جابه‌جا شوند (به‌وسیله تور دستی و یا با دست) و یا در معرض دستکاری‌های خاصی مانند استفاده از کاتتر، تزریق یا تخم‌کشی قرار گیرند. درک این نکته حائز اهمیت است که صرف‌نظر از نوع دستکاری، هر عملیات دستکاری بسیار استرس‌زا است و سبب از بین رفتن مکانیکی موکوس از روی پوست ماهی‌ها می‌شود. این موضوع به‌خصوص هنگام دستکاری‌ها زمانی که ماهی مستقیماً در ارتباط با میزکار، لباس و غیره قرار دارد رخ می‌دهد. با توجه به اینکه موکوس اولین خط دفاعی ماهی است (Shephard 1994; Woof and Mestecky 2005)، باید توجه ویژه‌ای شود تا از برداشته شدن کامل موکوس جلوگیری شود، به‌ویژه به‌علت اینکه سوف گونه‌ای است که دارای لایه موکوس نازکی می‌باشد. علاوه بر این، هرگونه روشی که باعث افزایش تولید موکوس و کاهش استرس شود (مانند

حمام‌های کوتاه‌مدت کلریدسدیم) (Tacchi et al. 2015) باید به‌عنوان بخش مهمی از پروتکل دستکاری مدنظر قرار گیرد.

دستکاری ممکن است اثر منفی غیرمستقیم روی نتیجه عملیات تکثیر داشته باشد. به‌عنوان یک عامل استرس‌زای مستقیم، دستکاری (به‌خصوص اگر نادرست و یا بیش‌ازحد معمول انجام گیرد) ممکن است از طریق پاسخ‌های هورمونی ماهی به عامل استرس‌زا، روی کیفیت گامت‌ها اثر منفی بگذارد (Schreck et al. 2001; Barton 2002; Schreck 2010). پیشنهاد می‌شود برای محدودسازی اثرات منفی دستکاری‌ها قبل از هر فرآیند دستکاری از مواد بیهوش‌کننده استفاده شود (Kristan et al. 2012, 2014; Gomułka et al. 2015b). با این‌حال، استفاده از بیهوش‌کننده‌ها نباید فقط از منظر کاهش استرس استفاده شود، بلکه به‌عنوان یک روش ضروری قبل از هر دستکاری که ممکن است برای ماهی‌ها درد ایجاد کند باید استفاده گردد (به‌عنوان مثال تزریق هورمون) (Gomułka et al. 2015b). لازم به ذکر است که همه مواد بیهوش‌کننده دارای اجزایی هستند که بر فرآیند پاسخ به استرس تأثیر می‌گذارند و سبب تأثیر بر شاخص‌های خون‌شناسی و تغییرات تنظیم اسمزی می‌شوند (Kristan et al. 2012; Gomułka et al. 2014, 2015a)، اگرچه این اثرات بسته به نوع و قدرت ماده شیمیایی و گونه ماهی متفاوت است. بنابراین انتخاب یک ماده بیهوش‌کننده به گونه مورد نظر بستگی دارد (Gomułka et al. 2015b)، همچنین باید به مقررات ملی و یا قوانین منطقه‌ای نیز توجه شود.

اطلاعات‌پایه در مورد بیهوشی

بیهوشی در ماهی‌ها معمولاً با غوطه‌وری انجام می‌گیرد. به‌طور عملی، ماهی از مخزن نگهداری به مخزن کوچک‌تری که حاوی محلول بیهوشی و دارای منبع هوادهی است منتقل می‌شود. مواد بیهوش‌کننده معمولاً ۴ سطح مختلف از بیهوشی را ایجاد می‌کنند. این سطوح عبارتند از (Coyle et al. 2004):

- تسکین: تنفس و حرکات ماهی کاهش می‌یابد
- بیهوشی: از دست رفتن جزئی تعادل (هنوز واکنش به دستکاری وجود دارد)
- بی‌حسی جراحی: ماهی کاملاً تعادل خود را از دست می‌دهد و به دستکاری پاسخ نمی‌دهد
- مرگ: فرایند تنفسی و ضربان قلب متوقف شده و منجر به مرگ می‌شود

سطح بیهوشی به‌دست‌آمده به دوز ماده بیهوشی و مدت زمان در معرض قرارگیری با ماده بیهوشی بستگی دارد. به‌طورکلی دوزی از ماده بیهوشی مناسب است که در سریع‌ترین زمان پس از در معرض قرارگیری ماهی با ماده بیهوشی موجب دستیابی به سطح بیهوشی جراحی شود. این روش موجب کاهش زمانی می‌شود که ماهی می‌تواند به خود صدمه برساند و همچنین حجم کار مرکز تکثیر را هنگامی‌که تعداد ماهی‌ها زیاد است تسهیل می‌نماید. با این‌حال، Gilderhus و Marking (۱۹۸۷) نشان دادند که مدت زمان القا (زمان رسیدن به سطح بیهوشی جراحی) نباید کمتر از ۳ دقیقه باشد. مدت زمان القای کمتر ممکن است منجر به در معرض قرارگیری ماهی با دوز بالای ماده بیهوشی شود و درنتیجه دستیابی به سطح چهارم بیهوشی (مرگ) را تسریع می‌نماید. از طرفی مدت زمان القای بیشتر ممکن است مانع شود تا ماهی به‌درستی به سطح سوم بیهوشی برسد و در این حالت ممکن است هنوز به محرک واکنش نشان دهد (اگرچه بی‌حرکت باشد) که در هنگام دستکاری‌های تکثیر پذیرفتنی نیست. Gilderhus و Marking (۱۹۸۷) پیشنهاد نمودند که یک دوز ایمن باید دوزی در نظر گرفته شود که ماهی به‌مدت ۱۵ دقیقه بتواند در معرض آن قرار گیرد (بعد از دستیابی به سطح بیهوشی جراحی) و پس از آن نیز باید بتواند در آب عاری از مادۀ بیهوشی پس از تقریباً ۱۰ دقیقه به حالت عادی بازگردد.

اگرچه این نظریه علمی باید در هنگام انتخاب نوع و دوز ماده بیهوشی مدنظر قرار گیرد، اما قبل از انجام هر عملیات بیهوشی باید چگونگی رفتار و واکنش ماهی نسبت به شرایط خاص بیهوشی (هر ماهی وضعیت فیزیولوژیک خاصی دارد، وضعیت در دماهای متفاوت آب) مورد ارزیابی قرار گیرد و درصورت مشاهده هرگونه رفتار نگران‌کننده، متعادل‌سازی شرایط باید به‌سرعت انجام گیرد. در شرایط مشابه، تجربه کارکنان ممکن است در موفقیت کل عملیات بسیار تأثیرگذار باشد.

نکات عملی

بیهوشی

موارد مورد نیاز (شکل ۳-۲):

- مادۀ بیهوش‌کننده (پیشنهاد می‌شود از MS-222 یا سایر مواد دارای تری‌کائین‌متان-سولفونات (Tricaine methanesulfonate) استفاده شود)
- مخزن بیهوشی (برای سوف حداقل باید مخزن ۲۰ لیتری باشد، به‌شرط آنکه ۲۰ سانتی‌متر عمق داشته باشد)

- مخزن برای حمام کوتاه مدت در محلول نمکی (حمام نمک) با شوری ۵ قسمت در میلیون (۵ ppm)
- مخزن ریکاوری (مشابه یا بزرگ‌تر از مخزن مورد استفاده برای بیهوشی)
- سیستم هوادهی [برای فراهم ساختن هوادهی ملایم در همه مخازن، از جمله مخزن بیهوشی (به Stoskopf and Posner 2008 مراجعه شود)]

مهم

مقدار دوز MS-222 برای بیهوشی سوف حاج طرخان باید ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر باشد (در صورت خالص بودن ماده فعال)

روش:

۱. محلول بیهوشی را در مخزن بیهوشی آماده کنید.
۲. آب بدون ماده بیهوشی را در مخزن ریکاوری بریزید.
۳. برای هر دو مخزن، هوادهی ملایم فراهم کنید.
۴. ماهی‌ها را به آرامی از مخزن نگهداری به مخزن بیهوشی منتقل کنید.
۵. بعد از رسیدن ماهی به سطح بیهوشی جراحی، ماهی را به آرامی بردارید و تمامی دستکاری‌های لازم را با دقت انجام دهید.
۶. ماهی را در مخزن ریکاوری قرار دهید.
۷. بعد از ریکاوری کامل ماهی (برقرار شدن تعادل و تثبیت حرکات تنفسی)، آن‌را به مخزن نگهداری منتقل نمایید.

مهم

۱. دمای حمام حاوی ماده بیهوشی و همچنین دمای آب مخزن ریکاوری باید هم‌دما با مخزنی باشد که ماهی‌ها در آن نگهداری می‌شوند.
۲. دستکاری‌های موردنظر بر روی تمامی ماهی‌هایی که به‌طور هم‌زمان کاملاً بیهوش می‌شوند باید با سرعت انجام گیرد، با توجه به این موضوع که مدت زمان در معرض قرارگیری با ماده بیهوشی نباید بیش از ۱۰ دقیقه طول بکشد (حداکثر ۱۵ دقیقه).

۳. ماهی‌هایی که هنوز ریکاوری نشده‌اند به‌هیچ‌وجه نباید به مخزن نگهداری منتقل شوند تا اطمینان حاصل شود تا تمامی ماهی‌ها بعد از بیهوشی زنده مانده‌اند.
۴. بعد از ریکاوری و قبل از انتقال ماهی‌ها به مخزن نگهداری توصیه می‌شود که حمام کوتاه مدت در محلول نمکی انجام گیرد (برای اطلاعات بیشتر به فصل ۲ مراجعه نمایید)

شکل ۳-۲. مکان آماده‌سازی شده برای دستکاری مولدین سوف حاج طرخان (۱. حمام بیهوشی، ۲. مخزن ریکاوری، ۳. مخزن حمام کوتاه مدت با محلول نمکی). در طی دستکاری می‌توان به‌راحتی ماهی را از یک مخزن به مخزن دیگر انتقال داد (عکس از S. Krejszeff)

تشخیص جنسیت

موارد ضروری:

- کاتتر (جزئیات مربوط به کاتتر در فصل ۴ ارائه شده است)
- سرنگ (با حجم ۱۰ میلی‌لیتر)
- پارچه (به‌عنوان مثال حوله نرم یا پارچه نخی)
- دستمال کاغذی

- اتانول ۹۰ درصد (برای ضدعفونی کاتتر)
- محلول بیهوشی (به‌عنوان مثال MS-222 با دوز ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر)
- سکوی دستکاری (Benchtop) یا میز کار

روش:

۱. ماهی را بیهوش کنید (تا زمان رسیدن ماهی به سطح بیهوشی جراحی)
۲. ماهی را روی میز کار قرار دهید (بر روی یک پارچه مرطوب)، محوطه شکمی رو به بالا قرار گیرد.
۳. محوطه شکمی را به‌صورتی که انگشتان در دو طرف آن قرار دارند از قسمت باله شکمی به‌سمت منفذ تناسلی به آرامی فشار دهید.
۴. مولدین نر می‌توانند به‌وسیلهٔ خروج قطرات کوچک اسپرمی که از منفذ تناسلی خارج می‌شود شناسایی شوند (در قسمت مخرج، دومین منفذ از سمت سر ماهی منفذ تناسلی می‌باشد، همان‌طور که در شکل ۴-a۷ نشان داده شده است)
۵. اگر اسپرم ظاهر نشد، کاتتر (متصل به سرنگ) را در قسمت منفذ تناسلی ماهی قرار دهید و حداکثر تا نزدیک باله شکمی وارد نمایید.
۶. مولدین نر باید به‌وسیله نمونه کوچکی از اسپرم که وارد حفره کاتتر می‌شود شناسایی شوند، درحالی‌که شناسایی مولدین ماده باید به‌وسیله نمونه کوچکی از تخمک‌ها که وارد حفره کاتتر می‌شود انجام گیرد (شکل ۳-۳).
۷. اگر در ماهی خاصی نه اسپرم مشاهده شد و نه تخمک، ماهی مورد نظر باید نابالغ در نظر گرفته شود. در این حالت ماهی باید نشانه‌گذاری شود (به‌طوری‌که در جمعیت ماهی‌ها قابل شناسایی باشد، برای مثل با پلاک PIT) و باید به‌مدت یک تا دو هفته (بسته به دمای آب) با مولدین نر نگهداری شود و پس از این مدت، تشخیص جنسیت باید مجدداً تکرار شود.
۸. مولدین ماده باید در مخزن یا مخازن جداگانه نگهداری شوند، درحالی‌که مولدین نر و ماهی‌های نابالغ می‌توانند باهم در مخزن یا مخازن دیگر نگهداری شوند.

شکل ۳-۳. تخمک‌های قابل مشاهده در حفره کاتتر در زمان ارزیابی جنسیت ماهی (عکس از Z. Bokor)

توصیه‌های عملی:

در ماهی‌های بالغ آن‌هایی که نزدیک به تخم‌ریزی هستند (در ماهی‌های وحشی) یا آن‌هایی که برای تولیدمثل خارج از فصل انتخاب شده‌اند (برای مشاهده جزئیات به فصل ۱۱ مراجعه شود)، اسپرم ریزی مولدین نر می‌تواند نشان‌دهنده آغاز روند رسیدگی مولدین باشد. بنابراین اگر ماهی‌های نر اسپرمی نداشته باشند و امکان استفاده از کاتتر برای بیشتر ماهی‌ها وجود نداشته باشد (در میان گروه نماینده)، پیشنهاد می‌شود تمامی ماهی‌ها (نرها و ماده‌ها) تا زمانی که امکان تشخیص جنسیت در بیشتر آن‌ها وجود داشته باشد با هم نگهداری شوند. در طی این مدت پیشنهاد می‌شود دمای آب ۱۰ تا ۱۲ درجه سانتی‌گراد باشد و ماهی‌ها باید در شرایط کم‌نور ثابت (نور بیش از ۵۰ لوکس نباشد، در نمونه‌های وحشی و پرورش‌یافته در استخر) یا در شرایط نوری متغیر (۱۰ تا ۱۴ ساعت روشنایی در روز) نگهداری شوند. در این دما می‌توان ماهی‌ها را هر ۴ تا ۷ روز بررسی نمود (به مولدین بستگی دارد).

منابع

Alavi SMH, Rodina M, Hatef A, Stejskal V, Policar T, Hamáčková J, Linhart O (2010) Sperm motility and monthly variations of semen characteristics in *Perca fluviatilis* (Teleostei: Percidae). Czech J Anim Sci 55:174–182

Barton BA (2002) Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. Integr Comp Biol 42:517–525. doi:10.1093/icb/42.3.517

Bly JE, Quiniou SM, Clem LW (1997) Environmental effects on fish immune mechanisms. Dev Biol Stand 90:33–43

Coyle SD, Durborow RM, Tidwell JH (2004) Anesthetics in Aquaculture. South Reg Aquac Cent:1–6

Gilderhus PA, Marking LL (1987) Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals on rainbow trout. North Am J Fish Manag 7:288–292. doi:10.1577/1548-8659(1987)72.0.CO

Gomułka P, Wlasow T, Szczepkowski M, Misiewicz L, Ziomek E (2014) The effect of propofol anaesthesia on haematological and biochemical blood profile of European whitefish. Turk J Fish Aquat Sci 14:331–337. doi:10.4194/1303-2712-v14_2_04

۴ تعیین مراحل رسیدگی تخمک‌ها

پیشینهٔ علمی

سه مرحله اصلی در چرخه تکامل تخمدان ماهی سوف حاج طرخان کاملاً بالغ که طی دوران زندگی چندین بار تخم‌ریزی می‌کند (Iteroparous) و توسعه تخمک‌ها در تخمدان آن به‌صورت هم‌زمان (Synchronous) انجام می‌گیرد (یک دسته تخمک با وضعیت رسیدگی یکسان در تخمدان آن‌ها وجود دارد) قابل تشخیص است: رشد اولیه (تا مرحله واکنش قشری حبابچه‌ها)، رشد ثانویه (شامل مرحله ویتلوژنزیز ابتدایی و انتهایی) و رسیدگی نهایی تخمک‌ها (Khan and Thomas 1999; Fontaine et al. 2015). در سوف، شروع مرحله ویتلوژنزیز معمولاً در اوایل تیرماه تا اوایل مردادماه مشاهده می‌شود (Le Cren 1951; Długosz 1986). آغاز مرحله مهاجرت هسته به‌عنوان پایان مرحله رشد ثانویه در نظر گرفته می‌شود (پایان مرحله ویتلوژنزیز) (Żarski et al. 2012b). تمامی اقدامات در عملیات تولیدمثل کنترل‌شده هنگام آغاز مرحله رسیدگی نهایی تخمک (FOM) انجام می‌گیرد. برای جزئیات بیشتر به Fontaine و همکاران (۲۰۱۵) و Żarski و همکاران (۲۰۱۵) مراجعه شود. بنابراین، در این کتابچه تأکید بر مرحله رسیدگی نهایی تخمک و تمامی وقایع همراه آن خواهد بود.

مرحله رسیدگی نهایی فرایندی است که طی آن تعدادی تغییرات سلولی در تخمک‌ها رخ می‌دهد و در نهایت منجر به رهاسازی[1] تخمک‌هایی با قابلیت باروری می‌شود. در سوف حاج طرخان این فرآیند، مهاجرت هسته از مرکز تخمک به حاشیه سلولی (به‌سمت قطب حیوانی تخمک)، تجمیع قطرات چربی به‌صورت یک قطره بزرگ، مرحله شکست هسته و فرآیند جذب آب به‌وسیله همگن سازی زرده را شامل می‌شود (Patiño and Sullivan 2002; Nagahama and Yamashita 2008; Lubzens et al. 2010; Żarski et al. 2011a, b).

در سوف‌هایی که در شرایط کنترل‌شده نگهداری می‌شوند این فرایند ممکن است بیش از ۳۰ روز طول بکشد (به رژیم دمایی بستگی دارد) (Żarski 2012). از منظر تولید تجاری، مدت زمان نسبتاً طولانی این فرایند نامطلوب بوده و بسیار مشکل‌ساز است. حتی ماهی‌های یک جمعیت (ذخیره) نیز به‌طور ناهماهنگ به مرحله رسیدگی می‌رسند که این موضوع باعث ناهماهنگ شدن

1. Ovulation

عمل تخم‌ریزی می‌شود. این قضیه به‌نوبه خود اثر مستقیمی بر جنبه‌های عملی فرایند تولید دارد و آبزی‌پروران در این حالت ناچار هستند صرفاً بخش اندکی از تخم‌ها را مدیریت کنند، درنتیجه لاروها نیز در مدت زمان نسبتاً طولانی تخم‌گشایی خواهند شد. این امر ضرورت پرورش جداگانه دسته‌های مختلف لاروها را ایجاد خواهد نمود، در غیر این صورت موفقیت پرورش ممکن است به‌علت هم‌نوع‌خواری که یکی از جنبه‌های مشکل‌ساز پرورش لاروها در سوف ماهیان می‌باشد به‌طور جدی کاهش یابد (Mélard et al. 1996; Baras et al. 2003). بنابراین، به‌منظور تسریع فرآیند رسیدگی نهایی تخمک‌ها و دستیابی به بالاترین میزان هم‌زمانی رسیدگی در مولدین، برای اهداف تجاری از روش القای هورمونی استفاده می‌شود (Kucharczyk et al. 1996, 1998; Żarski et al. 2011a).

پیش‌بینی لحظه رهاسازی تخمک یک مانع جدی در تولیدمثل کنترل‌شده سوف ماهیان است زیرا ماهی‌ها به‌صورت هم‌زمان به مرحله رسیدگی نمی‌رسند (Żarski et al. 2011a, 2012b). با این‌حال، فاصله زمانی پاسخ‌دهی[1] بین استفاده از عامل هورمونی و رهاسازی تخمک‌ها کاملاً به هورمون مورد استفاده (نوع و دوز آن)، مرحله رسیدگی ماهی‌ها (یعنی مولد ماده در کدام مرحله خاص از رسیدگی نهایی قرار داشته باشد) در زمان القای هورمونی و رژیم دمایی اعمال‌شده بستگی دارد. بنابراین، حفظ دمای ثابت و ارزیابی دقیق مرحله رسیدگی مولدین ماده به‌طور قابل‌توجهی پیش‌بینی لحظه رهاسازی تخمک‌ها در طی تخم‌ریزی را تسهیل می‌نماید.

مراحل رسیدگی تخمک‌ها

برای تولیدمثل کنترل‌شده سوف حاج طرخان توصیه می‌شود از کلید شناسایی ۶ مرحله‌ای وضعیت رسیدگی مولدین ماده که مبتنی بر ریخت‌شناسی (وضوح، بعد از شفاف‌سازی سیتوپلاسم، ویژگی‌های داخل سلولی) تخمک‌ها پیش از رسیدگی نهایی آن‌ها است استفاده شود (Żarski et al. 2011a).

مراحل مختلف رسیدگی نهایی به‌وسیله مراحل خاص رسیدگی در سوف حاج طرخان مشخص‌شده است. خصوصیات ریخت‌شناسی [تشریح شده توسط Żarski و همکاران (۲۰۱۱a): ارائه‌شده در شکل ۴-۱] مشاهده‌شده پس از شفاف‌سازی سیتوپلاسم (روش شفاف‌سازی سیتوپلاسم در ادامه بیان‌شده است) شامل موارد زیر است:

1. Latency time

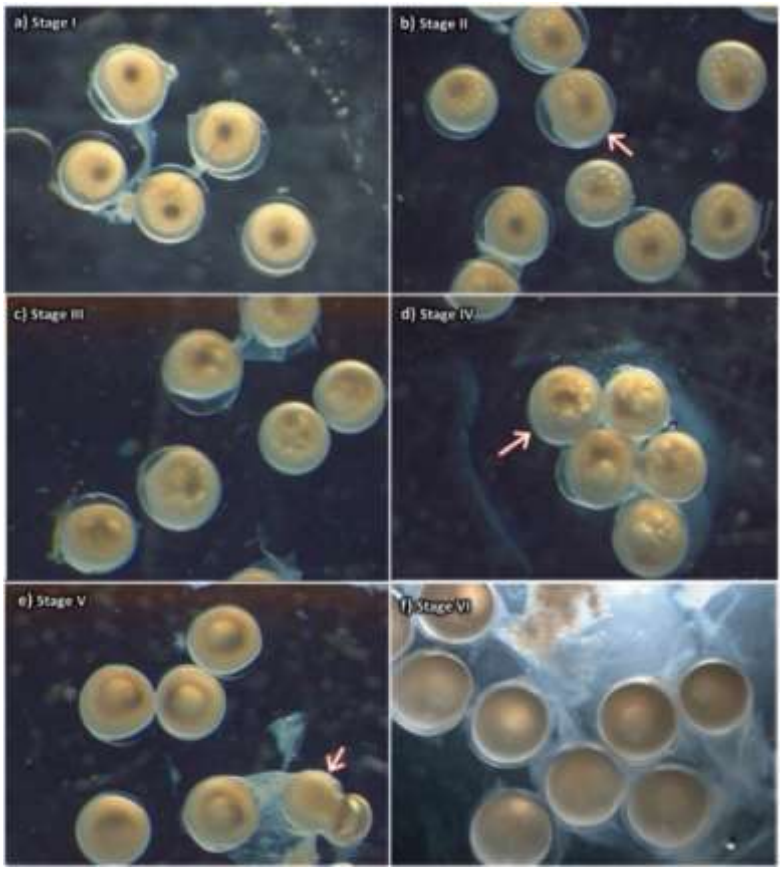
- مرحله ۱- هسته (نقطه تاریک در داخل تخمک) در موقعیت مرکزی قرار دارد یا اندکی به سمت حاشیه حرکت کرده است (به زاویه دید بستگی دارد)، سیتوپلاسم شفاف نیست و تقریباً در تمامی قسمت‌های تخمک دانه‌های ریز دیده می‌شود.
- مرحله ۲- هسته در موقعیت مرکزی قرار دارد یا اندکی به سمت لبه حرکت کرده و به‌وضوح به‌وسیله قطرات چربی قابل رویت، احاطه شده است.
- مرحله ۳- هسته به‌وضوح به‌سمت قطب حیوانی تخمک حرکت کرده و تشکیل قطره یا قطرات بزرگ چربی به‌راحتی قابل مشاهده است. قطرات چربی تشکیل شده از نظر اندازه برابر با هسته یا از آن کوچک‌تر می‌باشند.
- مرحله ۴- هسته به‌وضوح به‌سمت حاشیه تخمک حرکت کرده است و قطره بزرگ چربی (تقریباً به‌اندازه یک‌سوم قطر تخمک) ممکن است مشاهده شود. با این‌حال برخی قطرات کوچک هنوز وجود دارند.
- مرحله ۵- هسته به‌وضوح به‌سمت قطب حیوانی حرکت کرده و تنها یک قطره بزرگ چربی قابل مشاهده می‌باشد.
- مرحله ۶- هسته دیگر قابل مشاهده نیست (مرحله شکست هسته به پایان رسیده است) و یک قطره چربی قابل مشاهده است. در این مرحله، تخمک‌هایی که تازه جمع‌آوری شده‌اند (قبل از شفاف‌سازی سیتوپلاسم) کاملاً شفاف می‌باشند و پس از غوطه‌وری در محلول سرا (Serra's solution) کمی تیره می‌شوند (شفاف‌سازی به‌اندازه مرحله ۱ تا ۵ کارآمد نیست)، اگرچه قطره چربی به‌راحتی قابل مشاهده است.

مهم

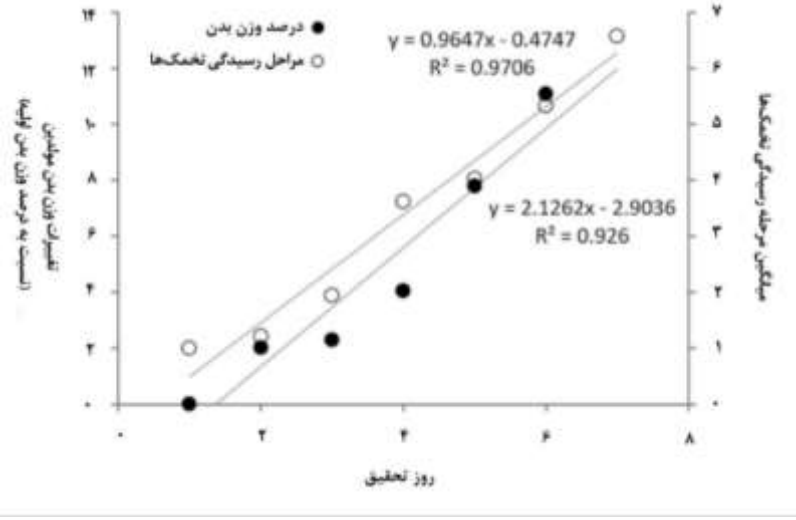
تعیین موقعیت هسته کاملاً به جهت قرارگیری تخمک نسبت به زاویه دید بستگی دارد. همچنین، با وارد آمدن فشار و تغییر ساختار داخلی تخمک در عملیات استفاده از کاتتر ممکن است مکان قرارگیری تخمک تغییر کند. برای تعیین دقیق مکان قرارگیری هسته لازم است در طی مشاهده میکروسکوپی تخمک را چرخانده و کج کنید.

شناسایی وضعیت رسیدگی مولدین ماده بر اساس ارزیابی مراحل رسیدگی تخمک تنها روشی است که تاکنون به‌طور دقیق امکان شناسایی مراحل مختلف رسیدگی در مولدین ماده را فراهم نموده است. هم‌راستا با تغییرات وزن مولدین ماده در طی دستیابی به مرحله رسیدگی (از مرحله رسیدگی ۱ تا ۵، ۱۱ درصد افزایش وزن می‌تواند مشاهده شود: شکل ۴-۲)، شاخص گنادی (GSI)

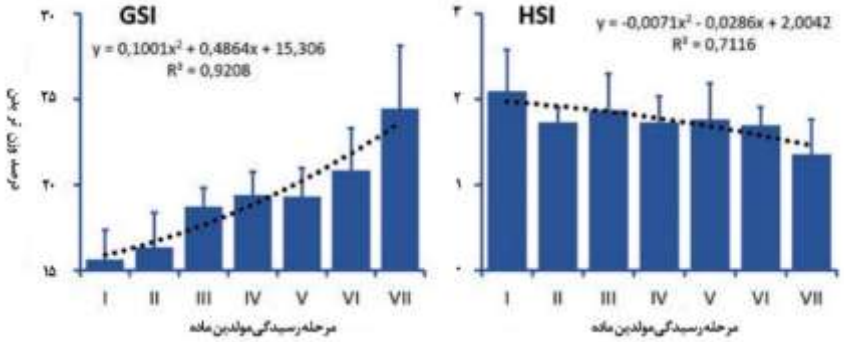
و شاخص کبدی (HSI) ماهیان در طی فرآیند رسیدگی نهایی تخمک به‌صورت پویا در حال تغییر است (شکل ۴-۳)، درحالی‌که شاخص وضعیت ثابت باقی می‌ماند (شکل ۴-۴). این موضوع نشان می‌دهد که بر پایه ویژگی‌های بیرونی و همچنین تجزیه‌وتحلیل ریخت‌شناسی، مرحله رسیدگی نهایی قابل پیش‌بینی نیست.



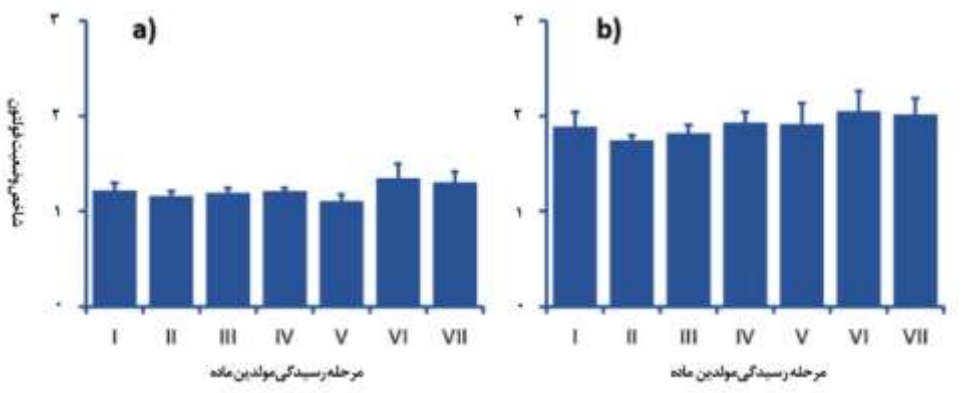
شکل ۴-۱. تصاویر تخمک‌ها قبل از رهاسازی (عکس‌برداری شده زیر لوپ) که نشان‌دهنده مراحل مختلف رسیدگی تخمک‌ها (۱ تا ۶) در سوف حاج طرخان است (ماهی‌ها از دریاچه Sasek Wielki لهستان و تخمک‌ها طی عملیات تکثیر خارج از فصل به‌وسیله کاتتر نمونه‌برداری شده‌اند، میانگین وزن ۱۲۲ ± ۴۶۷ گرم). فلش‌ها در تصویر b و d نشانگر آن است که تخمک می‌تواند در مرحله ۳ قرار داشته باشد. درحالی‌که، فلش تصویر e بیانگر این موضوع است که تخمک در طی عملیات نمونه‌برداری به‌وسیلهٔ کاتتر آسیب دیده است (عکس از D. Żarski). زمان پاسخ‌دهی (بین تزریق هورمون و رهاسازی تخمک‌ها) در جدول ۶-۲ گزارش شده است. (a: مرحله ۱، b: مرحله ۲، c: مرحله ۳، d: مرحله ۴، e: مرحله ۵، f: مرحله ۶)



شکل ۴-۲. رابطه بین میانگین وزن بدن و مرحله بلوغ تخمک طی آزمایش تعیین مرحله بلوغ تخمک. رهاسازی تخمک خارج از فصل تکثیر به‌وسیلهٔ القا انجام گرفته است. روز اول، روز تزریق گنادوتروپین انسانی است (hCG: ۵۰۰ واحد بین‌المللی به ازای کیلوگرم وزن بدن). وزن اولیه درواقع وزن مولدین در هنگام تزریق hCG است (Żarski et al. 2011a)



شکل ۴-۳. تغییرات شاخص گنادی (GSI: Żarski et al. 2012b) و شاخص کبدی (HSI: داده‌های منتشرنشده، Żarski D.) طی فرآیند رسیدگی نهایی تخمک سوف حاج طرخان. شاخص‌های مربوط به مرحله هفت (VII، تخمک‌های رهاسازی شده) با در نظر گرفتن وزن تخمک‌های رهاسازی شده (به روش تخم‌کشی دستی) محاسبه‌شده است



شکل ۴-۴. شاخص وضعیت فولتون (روش محاسبه: $K = 100 \times W\ L^{-3}$، W وزن بدن به گرم و L نیز طول ماهی به سانتی‌متر می‌باشد) اندازه‌گیری شده برای طول کل (شکل a) و طول استاندارد (شکل b). شاخص‌های مربوط به مرحله هفت (VII، تخمک‌های رهاسازی شده) با در نظر گرفتن وزن تخمک‌های رهاسازی شده (به روش تخم‌کشی دستی) محاسبه شده است

موارد خاص اختلال در مرحله رسیدگی نهایی تخمک

در برخی موارد ممکن است فرایند رسیدگی نهایی تخمک مختل شود (توسط برخی عوامل مستقل، مانند استرس). این وضعیت معمولاً به تغییرات غیرعادی تخمک‌ها در طی رسیدگی نهایی منجر می‌شود. در چنین مواردی توان توسعه تخمک‌های رهاسازی شده کاهش می‌یابد که معمولاً به‌صورت میزان لقاح پایین و ناهنجاری‌ها در توسعه جنینی و لاروی منعکس می‌شود. مثال بسیار خوب از مختل شدن روند رهاسازی تخمک‌ها وجود قطرات ریز و متلاشی‌شده چربی در تخمک-های رهاسازی شده است که بیانگر کیفیت پایین تخمک‌ها می‌باشد (Żarski et al. 2011b). اگرچه ممکن است کیفیت تخمک بعد از رهاسازی تعیین شود، اما در برخی موارد امکان تشخیص این ناهنجاری‌ها قبل از رهاسازی تخمک‌ها نیز وجود دارد.

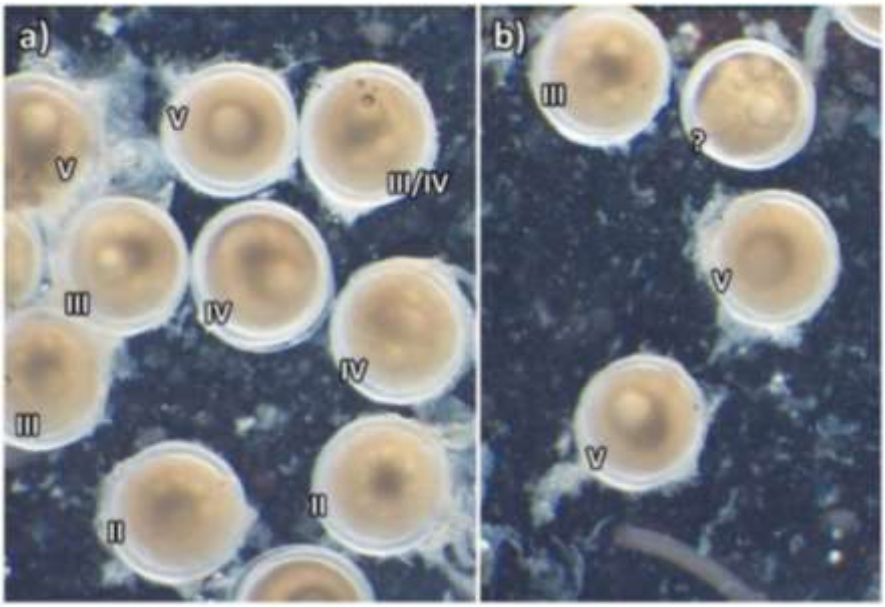
ناهنجاری‌های قبل از شکست هسته

مشخص نمودن هرگونه ناهنجاری در طی فرایند رسیدگی نهایی تخمک (قبل از شکست هسته) بسیار دشوار است. در این مرحله بیان ویژگی ریخت‌شناسی مشاهده‌شده ناشی از روند بلوغ کند تخمک‌ها و یا مختل شدن فرایند رسیدگی بسیار دشوار است. مختل شدن روند بلوغ فقط در

مواردی قابل تشخیص است که نمونه‌های تخمک از یک مولد ماده باشد و مراحل رسیدگی متفاوتی در آن مشخص شود و مراحل رسیدگی مشابه یکدیگر نباشند (شکل ۴-۵). در این حالت توصیه می‌شود مولد ماده مورد نظر از مراحل بعدی عملیات تولـیدمثل کنترل‌شده حذف گردد، زیـرا تخمک‌های رهاسازی شده از این مولد به احتمال زیاد سبب تولید تخم‌هایی با کیفیت بسیار پایین خواهند شد.

مهم

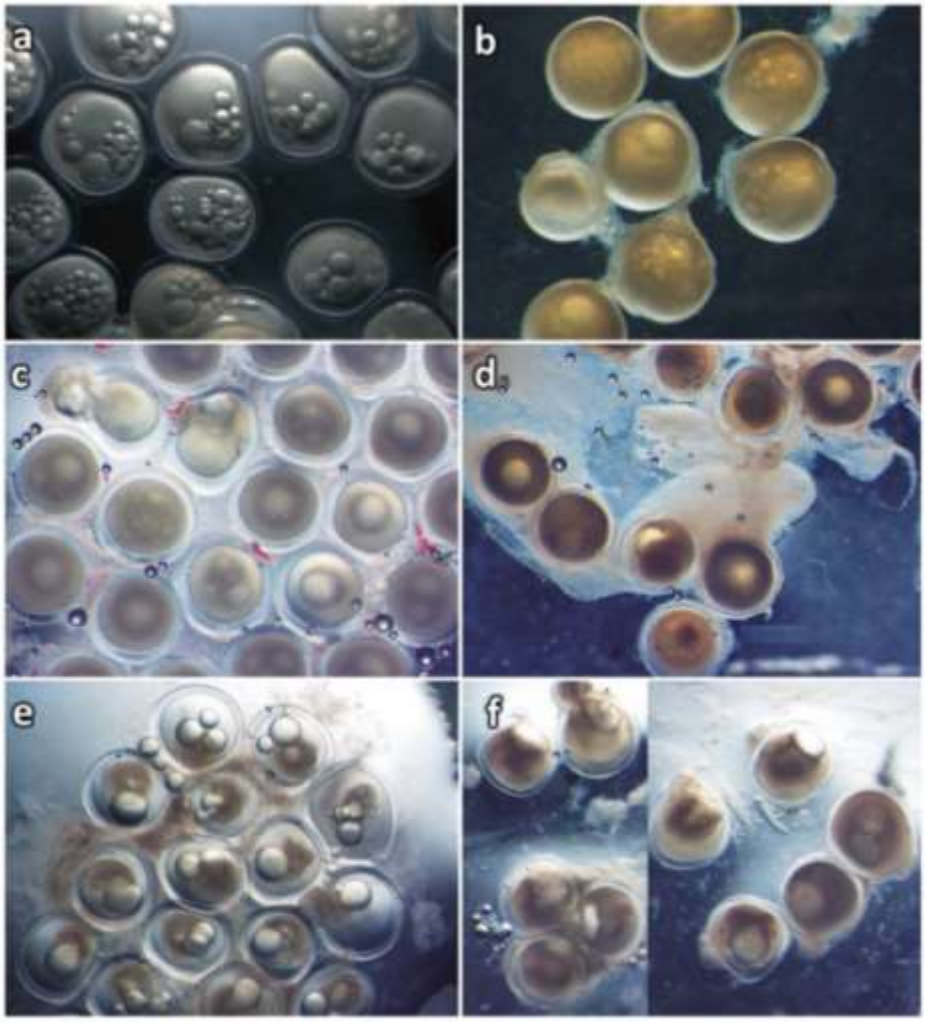
مراحل رسیدگی نزدیک به هم مشاهده شده در تخمک‌های یک مولد ماده باید عادی در نظر گرفته شود، زیرا در بسیاری از موارد تخمک‌ها به‌طور کاملاً هم‌زمان بالغ نمی‌شوند.



شکل ۴-۵. نمونه‌هایی از تخمک‌های دو مولد ماده مختلف (a و b) که هر تخمک مرحله رسیدگی متفاوتی را نشان می‌دهد. هر دو ماهی از دریاچه Sasek Wielki لهستان صید شده‌اند. تخمک‌ها در طی عملیات تکثیر خارج از فصل به‌وسیله کاتتر نمونه‌برداری شده‌اند. اعداد رومی نشانگر مراحل رسیدگی خاص تخمک می‌باشند (طبق طبقه‌بندی پیشنهادی Żarski و همکاران، ۲۰۱۱a). علامت سؤال نشان‌دهنده این است که تخمک مورد نظر طبقه‌بندی نشده است (این تخمک هیچ‌گونه نشانه‌ای از آسیب به‌وسیله کاتتر را نمایش نمی‌دهد و به‌طور طبیعی دارای ناهنجاری ظاهری است) (عکس از D. Żarski)

ناهنجاری‌های بعد از شکست هسته

ناهنجاری‌های فرایند رسیدگی نهایی قبل از رهاسازی تخمک‌ها به سادگی بعد از مرحله شکست هسته قابل تشخیص هستند. به‌طورکلی، شکست هسته نشانگر تکمیل مرحله رسیدگی نهایی تخمک است و بیانگر قرار داشتن تخمک در مرحله قبل از رهاسازی می‌باشد. بنابراین، هرگونه ویژگی سلولی غیرعادی در تخمک‌ها در این مرحله به‌وضوح نشان می‌دهد که فرآیند رسیدگی نهایی به‌طور جدی مختل شده است و با بالاترین احتمال، نشان‌دهنده کیفیت پایین در تخمک‌ها است. پس از شکست هسته، ویژگی‌های ریخت‌شناسی را می‌توان قبل (زیرا تخمک‌ها معمولاً شفاف هستند) یا بعد از غوطه‌وری در محلول سرا شناسایی نمود. در تخمک‌های غوطه‌ور نشده در محلول سرا، دو شاخص اصلی قطرات چربی متلاشی‌شده و زرده داخلی آسیب‌دیده و دیگر ناهنجاری‌ها قابل شناسایی است (شکل ۴-۶a، c و e). بعد از غوطه وری تخمک‌ها در محلول سرا، قطرات چربی متلاشی‌شده و همچنین آسیب‌ها و ناهنجاری‌های داخلی سلولی کماکان قابل مشاهده است (شکل ۶-۴b، d و f). در واقع پس از شکست هسته، دیگر غوطه‌وری تخمک‌ها در محلول سرا ضروری نیست. با این‌حال، در برخی موارد غوطه‌وری می‌تواند برای اطمینان از عدم وجود هسته مفید باشد.



شکل ۴-۶. تصاویر نمونه‌های تخمک قبل (a، c و e) و بعد (b، d و f) از غوطه‌وری در محلول شفاف‌سازی. تصاویر a و b نمونه تخمک را بعد از شکست هسته نشان می‌دهند که در آن‌ها قطرات چربی متلاشی‌شده قابل مشاهده است. تصاویر c و d تخمک‌ها را در مراحل مختلف بلوغ نشان می‌دهند (برخی بعد از شکست هسته) و بعضی از آسیب‌های داخلی بعد از غوطه‌وری در محلول شفاف‌سازی قابل مشاهده است. تصاویر e و f به وضوع آسیب‌های داخلی و متلاشی شدن زرده تخمک‌ها را به نمایش می‌گذارند (عکس از D. Żarski)

ارزیابی عملی مرحله رسیدگی در مولدین ماده

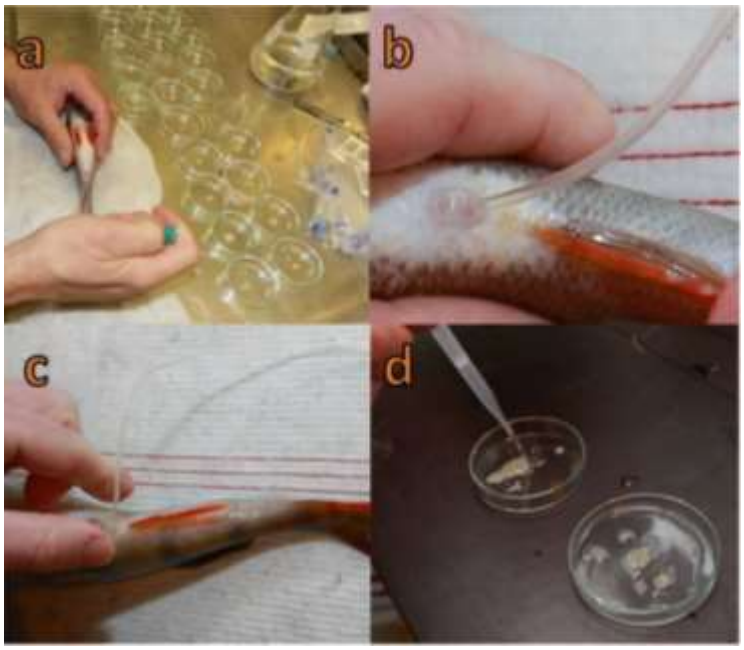
موارد موردنیاز:

- کاتتر: از میان کاتترهای موجود توصیه می‌شود از لوله‌های تغذیه ارتجاعی (جنس پلی وینیل کلراید (PVC) با سختی تقریبی A80) کودکان (برای تغذیه داخلی کودکان و نوزادان) با ویژگی‌های مشخص‌شده استفاده شود: اندازه CH-06 (قطر ۲ میلی‌متر)، طول ۴۰۰ میلی‌متر، انتهای مسدود شده و گرد با دو دهانه باز سطحی نزدیک به انتها، مجهز به اتصال‌دهنده به سرنگ‌های استاندارد
- سرنگ با حجم ۱۰ میلی‌لیتر
- پتری‌دیش‌های (Petri dish) شماره‌گذاری شده (پلاستیکی یا شیشه‌ای)
- محلول شفاف‌سازی سرا (ترکیبات: اتانول ۷۰ تا ۹۶ درصد، فرمالدهید ۳۴ تا ۴۰ درصد و اسید استیک ۹۵ درصد به‌ترتیب به نسبت‌های ۱:۳:۶)
- سطل‌های پلاستیکی شماره‌گذاری شده (با حداقل حجم ۱۲ لیتر) برای نگهداری کوتاه مدت ماهی‌ها (هرچه تعداد سطل‌ها بیشتر باشد تعداد ماهی‌های قابل ارزیابی در یک زمان مشخص بیشتر خواهد بود)
- دستمال کاغذی
- اتانول ۹۰ درصد (برای ضدعفونی کاتتر)
- محلول بیهوشی (برای مثال MS-222 با دور ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر)
- سکوی دستکاری (میز کار)

روش‌های ارزیابی:

- سطل‌ها را به ترتیب قرار دهید (برای نگهداری کوتاه مدت ماهی‌ها) و آن‌ها را با آب پر کنید (با همان آب مخزن نگهداری ماهی‌ها)
- قبل از عملیات استفاده از کاتتر، هر ماهی باید بیهوش شود
- پس از اینکه هر ماهی بیهوش شد آن‌را از محلول بیهوشی خارج نمایید و روی میز کار قرار دهید و کاتتر را به آرامی در منفذ تناسلی وارد نمایید (تقریباً ۲ تا ۳ سانتی‌متر- به اندازه ماهی بستگی دارد) (شکل ۴-۷ b و c)

- با کشیدن سرنگ متصل به کاتتر از تخمک‌ها (تقریباً ۳۰ تا ۵۰ تخمک) نمونه‌برداری نمایید
- ماهی را برای ریکاوری در اولین سطل قرار دهید
- کاتتر را از سرنگ جدا کرده و با اعمال فشار معکوس با دقت نمونه تخـمک‌ها را در پتری‌دیش اول تخلیه نمایید
- بلافاصله بعد از ریختن محلول سرا روی تخمک‌ها آن‌ها را به آرامی هم بزنید و پتری‌دیش را بپوشانید (شکل ۴-۷ d)
- مراحل ۳ تا ۷ را با توجه به این موضوع که هر پتری‌دیش به یک مولد ماده اختصاص دارد تکرار نمایید
- نمونه‌ها را به‌وسیلهٔ لوپ طبق کلیدهای شناسایی بیان‌شده ارزیابی نمایید



شکل ۴-۷. بررسی اجمالی روش استفاده از کاتتر: (a). آماده‌سازی میزکار برای استفاده از کاتتر برای چندین ماهی (هر پتری‌دیش برای نمونه تخمک‌های یک ماهی ماده متفاوت استفاده می‌شود) و عملیات استفاده از کاتتر در یک مولد ماده سوف حاج طرخان، (b). قرار دادن مناسب کاتتر در قسمت منفذ تناسلی، (c). نمونه تخمک کشیده شده به درون حفره کاتتر، (d). اضافه کردن محلول شفاف‌سازی به نمونه تخمک (عکس از S. Krejszeff)

مهم

۱. تخمک‌ها معمولاً به‌طور هم‌زمان بالغ نمی‌شوند. بنابراین، در زمان قرار دادن یک مولد ماده در مرحله‌ای خاص همیشه باید اکثریت تخمک‌های نمونه‌برداری شده (بیش از ۵۰ درصد آن‌ها) بیانگر آن مرحله خاص باشند.
۲. قبل از نمونه‌برداری توجه داشته باشید که کاتتر خشک و استریل باشد.
۳. در حین بیهوشی از قوانین بیان‌شده در فصل ۳ پیروی نمایید.

منابع

Baras E, Kestemont P, Mélard C (2003) Effect of stocking density on the dynamics of cannibalism in sibling larvae of *Perca fluviatilis* under controlled conditions. Aquaculture 219:241–255. doi:10.1016/S0044-8486(02)00349-6

Długosz M (1986) Oogeneza i cykl rocznego rozwoju gonad wybranych gatunków ryb w zbiornikach o odmiennych warunkach termicznych. Acta Acad Agric Techn Olst, Prot Aquarum Piscat 14:1–68

Fontaine P, Wang N, Hermelink B (2015) Broodstock management and control of the reproductive cycle. In: Kestemont P, Dąbrowski K, Summerfelt RC (eds) Biology and culture of percid fishes. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 103–122

Khan IA, Thomas P (1999) Ovarian cycle, Teleost Fish. In: Knobil E, Neill JD (eds) Encyclopedia of reproduction. Academic Press, San Diego, pp 552–564

Kucharczyk D, Kujawa R, Mamcarz A, Skrzypczak A, Wyszomirska E (1996) Induced spawning in perch, *Perca fluviatilis* L. using carp pituitary extract and HCG. Aquac Res 27:847–852. doi:10.1046/j.1365-2109.1996.t01-1-00802.x

Kucharczyk K, Mamcarz S, Wyszomirska E (1998) Induced spawning in perch, *Perca fluviatilis* L., using FSH + LH with pimozide or metoclopramide. Aquac Res 29:131–136. doi:10.1046/j.1365-2109.1998.00949.x

Le Cren ED (1951) The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). J Anim Ecol 20:201–219. doi: masse poids taille methodologie

Lubzens E, Young G, Bobe J, Cerdà J (2010) Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. Gen Comp Endocrinol 165:367–389. doi:10.1016/j.ygcen.2009.05.022

Mélard C, Baras E, Mary L, Kestemont P (1996) Relationships between stocking density, growth, cannibalism and survival rate in intensively cultured larvae and juveniles of perch (*Perca fluviatilis*). Ann Zool Fenn 33:643–651

Nagahama Y, Yamashita M (2008) Regulation of oocyte maturation in fish. Develop Growth Differ 50:S195–S219. doi:10.1111/j.1440-169X.2008.01019.x

Patiño R, Sullivan CV (2002) Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. Fish Physiol Biochem 26:57–70. doi:10.1023/A:1023311613987

Żarski D (2012) First evidence of pheromonal stimulation of maturation in Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L., females. Turk J Fish Aquat Sci 12:771–776

Żarski D, Bokor Z, Kotrik L, Urbanyi B, Horváth A, Targońska K, Krejszeff S, Palińska K, Kucharczyk D (2011a) A new classification of a preovulatory oocyte maturation stage suitable for the synchronization of ovulation in controlled reproduction of Eurasian perch *Perca fluviatilis* L. Reprod Biol 11:194–209. doi:10.1016/S1642-431X(12)60066-7

Żarski D, Palińska K, Targońska K, Bokor Z, Kotrik L, Krejszeff S, Kupren K, Horváth Á, Urbányi B, Kucharczyk D (2011b) Oocyte quality indicators in Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L., during reproduction under controlled conditions. Aquaculture 313:84–91. doi:10.1016/j. aquaculture.2011.01.032

Żarski D, Krejszeff S, Horváth Á, Bokor Z, Palińska K, Szentes K, Łuczyńska J, Targońska K, Kupren K, Urbányi B, Kucharczyk D (2012a) Dynamics of composition and morphology in oocytes of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L., during induced spawning. Aquaculture 364–365:103–110. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.07.030

Żarski D, Kucharczyk D, Targońska K, Palińska K, Kupren K, Fontaine P, Kestemont P (2012b) A new classification of pre-ovulatory oocyte maturation stages in pikeperch, *Sander lucioperca* (L.), and its application during artificial reproduction. Aquac Res 43:713–721. doi:10.1111/j.1365-2109.2011.02879.x

Żarski D, Horváth A, Held JA, Kucharczyk D (2015) Artificial reproduction of percid fishes. In: Kestemont P, Dąbrowski K, Summerfelt RC (eds) Biology and culture of percid fishes, 1st edn. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 123–161

۵ تحریک رسیدگی تخمک و اسپرم

پایه و اساس استفاده از روش تحریک هورمونی

در بسیاری از گونه‌های ماهیان پرورشی دستیابی به گامت‌های با کیفیت بدون تحریک هورمونی در مراحل نهایی رسیدگی امکان‌پذیر نمی‌باشد (Donaldson 1996; Mañanós et al. 2008). با این‌حال، در سوف ماهیان ثابت شده است که استفاده از دستکاری‌های نوری-دمایی برای تحریک رسیدگی گامت‌ها در مراحل انتهایی و درنتیجه دستیابی به تخم‌ریزی رضایت‌بخش کافی است (Müller-Belecke and Zienert 2008). با این‌وجود، در این حالت فرایند تخم‌ریزی معمولاً طولانی شده و ممکن است چندین هفته به طول بیانجامد (اغلب در حدود یک ماه). بنابراین ممکن است در طی عملیات تولید تجاری عواقب منفی جدی ایجاد نماید. تخم‌ریزی طولانی مدت می‌تواند منجر به تفاوت اندازه بیش از حد در لاروها شود که باعث هم‌نوع‌خواری خواهد شد (Kestemont et al. 2003; Baras et al. 2003) و به‌نوبه خود سختی کار در طی پرورش را افزایش می‌دهد. بنابراین، تحریک هورمونی یک ابزار کارآمد برای هم‌زمانی تخم‌ریزی و کاهش طول دوره تخم‌ریزی در مولدین اهلی‌شده می‌باشد.

در ماهی‌های وحشی و پرورش‌یافته در استخر نیز گزارش شده است که استفاده از تحریک هورمونی برای دستیابی به گامت‌ها کاملاً ضروری نیست (Rónyai and Lengyel 2010). با این‌وجود، تخم‌ریزی موفق بدون تحریک هورمونی کاملاً به مرحله رسیدگی و وضعیت ماهی بستگی دارد. به‌طورکلی، ماهی‌ها در صورت نگهداری در شرایط مطلوب تخم‌ریزی در مرحله VI بدون هیچ‌گونه تیماری تمایل به رهاسازی گامت‌ها دارند (در دمای ۱۲ تا ۱۶ درجه سانتی‌گراد، دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی)، اگرچه در این مورد لحظه تخم‌ریزی غیر قابل پیش‌بینی است.

همچنین حتی اگر ماهی در مرحله رسیدگی VI قرار داشته باشد به احتمال زیاد تخمک‌های خود را رهاسازی نمی‌کند و این امر می‌تواند با سطوح استرس موجود در ارتباط باشد. بنابراین در ماهی‌های وحشی و پرورش‌یافته در استخر، پیشنهاد می‌شود حتی درصورتی‌که ماهی در مراحل پیشرفته رسیدگی قرار داشته باشد نیز از روش تحریک هورمونی استفاده شود. جدای از اینکه این روش موجب هم‌زمانی تخم‌ریزی می‌شود، این امکان را فراهم می‌کند که لحظه تخم‌ریزی پیش-

بینی شود. در موارد ضروری نیز امکان جمع‌آوری تخمک خشک برای مراحل بعدی تولیدمثل کنترل‌شده را امکان‌پذیر می‌نماید.

در صورت علاقه‌مندی به جزئیات بیشتر در مورد جنبه‌های عملی تولیدمثل کنترل‌شده و همچنین مدیریت مولدین (سوف ماهیان اهلی و وحشی) توصیه می‌شود به Fontaine و همکاران (۲۰۱۵) و Żarski و همکاران (۲۰۱۵) مراجعه نمایید.

دستکاری‌های نوری-دمایی

در عملیات تولیدمثل کنترل‌شده، باید به دستکاری دقیق و کافی شرایط نوری و دمایی توجه ویژه‌ای شود. به‌خوبی ثابت شده است که شرایط نوری مداوم[1] ممکن است موجب مهار رسیدگی گنادها در سوف حاج طرخان شود (Migaud et al. 2003). از طرفی، دما یک عامل تعدیل‌کننده سرعت فرآیند رسیدگی است و می‌تواند روی کیفیت گامت‌ها تأثیر بگذارد (Anguis and Cañavate 2005; Targońska et al. 2014). دامنه دمایی ۱۰ تا ۱۶ درجه سانتی‌گراد می‌تواند دمای بهینه تخم‌ریزی در سوف حاج طرخان در نظر گرفته شود، درحالی‌که، دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و یا ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی می‌تواند مناسب باشد (Żarski et al. 2015). با این‌حال، ماهی‌های وحشی و پرورش‌یافته در استخر باید در شرایط کم‌نور یا روشنایی ثابت (طی دوره روشنایی) نگهداری شوند و شدت نور موجود در سطح آب باید حداکثر ۳۰۰ لوکس در نظر گرفته شود. تنظیم دما طی عملیات تولیدمثل کنترل‌شده باید با سرعت انجام گیرد.

توصیه عملی:

پس از تزریق هورمون بهتر است به‌جای نگهداری ماهی‌ها در دماهای بالا از دماهای پایین استفاده شود. درجه حرارت‌های بالا می‌تواند بر کیفیت تخمک‌ها تأثیر منفی بگذارد (Targońska et al. 2010, 2012).

1. Continuous lamination

پیشینهٔ علمی تحریک هورمونی

تحریک مراحل نهایی رسیدگی گامت‌ها با استفاده از تأثیر عوامل خارجی بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد (HPG) امکان‌پذیر می‌باشد (Mylonas and Zohar 2000). در مراکز تکثیر، هورمون‌تراپی شامل روش‌هایی است که به‌وسیلهٔ آن‌ها فرآیند رسیدگی را با تأثیر بر دو قسمت مختلف محور HPG کنترل می‌نمایند. روش اول، تحریک ترشح گنادوتروپین‌های داخلی از هیپوفیز با استفاده از آماده‌سازی هورمون‌های آزادکننده گنادوتروپین (GnRH) و دومین روش تحریک استروئیدوژنز گنادی به‌وسیلهٔ استفاده از گنادوتروپین‌ها با منشأ خارجی (GtH) است (Donaldson 1996; Mylonas et al. 2010).

در سوف حاج طرخان انواع هورمون‌ها به‌طور آزمایشی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (برای جزئیات بیشتر به Żarski و همکاران (۲۰۱۵) مراجعه کنید). با توجه به داده‌های منتشرشده می‌توان نتیجه گرفت که دو نوع از هورمون‌ها در تحریک هر دو جنس مؤثر هستند. این هورمون‌ها آنالوگ‌های GnRH (GnRHa) و گنادوتروپین جفت انسان (hCG) را شامل می‌شوند. بنابراین، از این پس فقط استفاده از این دو نوع هورمون مورد توجه قرار خواهد گرفت.

مهم

برای تحریک هورمونی سوف حاج طرخان استفاده از مهارکننده‌های دوپامین ضروری نیست، زیرا مواد فعال GnRH و یا hCG به‌تنهایی برای القای تخم‌ریزی به‌اندازه کافی مناسب می‌باشند. از آنجاکه اثر مثبت استفاده از مهارکننده دوپامین در موفقیت تخم‌ریزی سوف حاج طرخان هرگز گزارش نشده است، این جنبه در این کتابچه نادیده گرفته شده است.

مقررات مربوط به استفاده از عوامل القای تخم‌ریزی در اروپا

در عملیات تحریک هورمونی سوف حاج طرخان فقط عوامل القای تخم‌ریزی شبه پپتیدی مورد استفاده قرار می‌گیرند. لازم به ذکر است که نیازی به استفاده از هیچ‌گونه هورمون استروئیدی وجود ندارد (برای دستیابی به نتایج مطلوب تخم‌ریزی) و استفاده از آن‌ها طبق آیین‌نامه‌ای خاص محدود شده است (دستورالعمل EC/97/2008). البته استفاده از عوامل توصیه‌شده (hCG یا GnRHa) و عوامل دارویی مشابه آن‌ها، مجاز می‌باشد (دستورالعمل EC/82/2001). در حقیقت، برای کنترل تولیدمثل سوف حاج طرخان استفاده از عوامل دارویی تهیه‌شده برای ماهی، حیوانات

دیگر و حتی انسان مجاز است، با این محدودیت که مـاهی‌های تحت تیمار و همچنین تخـم‌های به‌دست‌آمده برای مصرف انسانی مورد استفاده قرار نگیرند. این بدان معنی است که برای تولیدمثل کنترل‌شده سوف حاج طرخان، هر نوع از عوامل حاوی hCG یا GnRHa که به‌صورت رسمی ثبت شده باشند قابل استفاده می‌باشند.

مهم

قبل از استفاده از عوامل هورمونی (یا هر نوع دیگری از داروها)، با دامپزشک متخصص جهت بررسی امکان و شرایط استفاده از آن داروی خاص برای هدف مورد نظر خود مشورت نمایید.

از چه ناحیه‌ای ماهی را تزریق کنیم؟

ماهی‌ها معمولاً به‌صورت عضلانی یا داخل صفاقی تزریق می‌شوند. در تزریق عضلانی مکان‌های محدودی مثل عضلات پشتی یا دمی قابل تزریق هستند (Żarski et al. 2015). در این حالت، تزریق در پایه باله پشتی یا مخرجی انجام می‌گیرد. در تزریق داخل صفاقی، هورمون‌ها معمولاً در پایه باله شکمی که یکی از مکان‌های کم فلس در بدن می‌باشد انجام می‌گیرد. در مورد این موضوع که مکان تزریق در موفقیت استفاده از هورمون‌ها تأثیرگذار است هیچ مدرک علمی‌ای وجود ندارد. با این‌حال، تزریق عضلانی ممکن است باعث تراوش محلول مورد استفاده به خارج از بدن ماهی شود. بنابراین، به‌جای استفاده از تزریق عضلانی پیشنهاد می‌شود از روش تزریق داخل صفاقی استفاده شود، زیرا بسیار سریع و راحت می‌باشد. در هنگام تزریق، سوزن سرنگ باید تقریباً ۱ تا ۲ سانتی‌متر به داخل بدن ماهی فرو رود (به اندازه ماهی بستگی دارد) (شکل ۵-۱).

شکل ۵-۱. نمونه‌ای از تزریق صحیح به‌وسیله سرنگ (سوزن سرنگ ۲۰ میلی‌متر طول دارد) طی تزریق داخل صفاقی (عکس از S. Krejszeff)

مهم

تمامی تزریقات هورمونی باید به‌وسیله سرنگ و سوزن‌های استریل انجام گیرد.

تحریک هورمونی مولدین ماده

آماده‌سازی عامل هورمونی- hCG

hCG یک ترکیب آماده‌سازی شده به‌صورت تجاری است و به‌صورت یک ویال استریل که دارای ماده‌ای با قابلیت انحلال بالا است، در دسترس می‌باشد. هر ویال از مقدار مشخصی هورمون hCG که میزان آن به‌صورت واحد بین‌المللی (IU) بیان می‌شود تشکیل شده است. محتوای هر ویال باید قبل از استفاده به‌صورت جداگانه با محلول کلرید سدیم استریل (معمولاً محلول کلرید سدیم ۰/۷ تا ۰/۹ درصد) رقیق شود. فقط پس از رقیق‌سازی می‌توان محتوای ویال‌های مختلف را با هم ترکیب نمود (در صورت لزوم).

توصیه عملی:

مقدار دوز توصیه‌شده hCG برای سوف حاج طرخان ۵۰۰ واحد بین‌المللی به ازای کیلوگرم وزن بدن مولدین است. بنابراین، میزان رقیق‌سازی آن باید طبق فرمول زیر انجام شود:

$$X = y / 500$$

در این فرمول X حجم محلول نمکی (به میلی‌لیتر) است که باید برای هر ویال استفاده گردد. y نیز مقدار hCG موجود در یک ویال می‌باشد (بر اساس واحد بین‌المللی).

آماده‌سازی عامل هورمونی- GnRH

آنالوگ‌های GnRH معمولاً به شکل متبلور شده با قابلیت انحلال بالا به‌صورت ویال‌های استریل در دسترس می‌باشند. هر ویال از مقدار مشخصی از هورمون که معمولاً به‌صورت میکروگرم بیان می‌شود تشکیل شده است. محتوای هر ویال باید قبل از استفاده با محلول کلرید سدیم استریل (معمولاً محلول کلرید سدیم ۰/۷ تا ۰/۹ درصد) رقـیق شود. پس از رقیق‌سازی درصورت لزوم می-توان محتوای ویال‌های مختلف را با هم ترکیب نمود.

توصیه عملی:

مقدار دوز پیشنهادی GnRH برای سوف حاج طرخان ۱۰۰ میکروگرم به ازای کیلوگرم وزن بدن مولدین است. بنابراین، میزان رقیق‌سازی آن باید طبق فرمول زیر انجام شود:

$$X = y / 100$$

در این فرمول X حجم محلول نمکی (به میلی‌لیتر) است که باید برای هر ویال استفاده گردد. y نیز مقدار GnRHa موجود در یک ویال می‌باشد (بر اساس میکروگرم).

تحریک هورمونی مولدین نر

تحریک هورمونی در مولدین نر دقیقه مشابه روش بیان‌شده در مولدین ماده است. با این‌حال، یک جنبه مهم که باید به آن توجه شود این است که القای مولدین نر باید ۴ روز قبل از زمان عملیات اسپرم‌گیری انجام شود. این یک شرط ضروری برای جمع‌آوری اسپرم با کیفیت طی عملیات تکثیر خارج از فصل می‌باشد. کمترین تفاوت در فاصله زمانی رسیدگی مولدین می‌تواند اثر قابل ملاحظه‌ای بر حجم اسپرم تولیدی طی فصل تخم‌ریزی داشته باشد (Żarski و همکاران، منتشرنشده).

پیشنهاد می‌شود در سوف حاج طرخان، هم در طی فصل تخم‌ریزی و هم خارج از فصل تخم‌ریزی، هورمون‌ها در یک مرحله مورد استفاده قرار گیرند (تزریق یک مرحله‌ای):

hCG: ۵۰۰ واحد بین‌المللی به ازای هر کیلوگرم وزن بدن

GnRHa آزادماهیان: ۵۰ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن

GnRHa پستانداران: ۱۰۰ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن

نکات عملی

دستکاری‌های نوری- دمایی

پیشنهاد می‌شود قبل از تزریق، دمای نگهداری ماهی‌ها ۲ درجه سانتی‌گراد پایین‌تر از دمای تعیین‌شده برای تخم‌ریزی در نظر گرفته شود. نگهداری ماهی‌ها در دمای نسبتاً پایین باعث می‌شود

فرایند رسیدگی آن‌ها آهسته‌تر طی شود و درنتیجه از ناهم‌زمانی خیلی شدید مولدین ماده که ممکن است در مرکز تکثیر مشاهده شود جلوگیری گردد (Żarski ;Rónyai and Lengyel 2010 .(2012; Żarski et al. 2015

دما بعد از تزریق باید در سریع‌ترین زمان ممکن افزایش یابد (با اطمینان می‌توان ماهی‌ها را به مخزن یا سیستمی دیگر با ۲ درجه سانتی‌گراد دمای بیشتر منتقل نمود، بدون اینکه اثرات منفی داشته باشد). توصیه می‌شود قبل و پس از تزریق از رژیم نوری یکسانی استفاده شود.

نمونه‌ای از پروتکل

۱. تا زمانی‌که مولدین ماده به مرحله‌ای از رسیدگی که امکان تزریق هورمون برای آن‌ها وجود داشته باشد نرسیده باشند، باید در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند.
۲. بلافاصله بعد از تزریق، دما باید افزایش یابد و به ۱۲ درجه سانتی‌گراد برسد.
۳. ماهی‌ها را تا زمان تخم‌ریزی در شرایط تاریکی ثابت و دمای آب ۱۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید (به پیوست ۱ مراجعه نمایید).

تحریک هورمونی

موارد لازم:

- ماده بیهوش کننده و تمامی موارد ضروری مورد نیاز برای بیهوشی بی‌خطر ماهی‌ها (به فصل ۳ مراجعه کنید)
- آماده‌سازی هورمون (hCG یا GnRHa)
- محلول‌های نمکی استریل (کلرید سدیم ۰/۹ درصد)
- سرنگ‌های ۱ و ۲ میلی‌لیتر به همراه سرسوزن (ابعاد سوزن: قطر ۰/۷ میلی‌متر، طول ۳۰ میلی‌متر)
- ترازو با دقت ± ۱ گرم (حداکثر ± ۱۰ گرم)
- پارچه
- سکوی دستکاری (میز کار)

روش:

۱. عامل هورمونی را در محلول نمکی رقیق کنید، به‌صورتی‌که میزان هورمون مورد نیاز در ۱ میلی‌لیتر محلول آماده‌شده موجود باشد.
۲. ماهی را تا رسیدن به سطح بیهوشی جراحی در محلول بیهوشی قرار دهید.
۳. ماهی را وزن کنید.
۴. با استفاده از دوز موردنظر هورمون آماده‌شده، تزریق ماهی را انجام دهید.
۵. ماهی را در مخزن ریکاوری قرار دهید (به بخش روش بیهوشی در فصل ۳ مراجعه نمایید)
۶. ماهی را به مدت ۵ دقیقه در حمام نمک قرار دهید.
۷. ماهی را به مخزن نگهداری منتقل نمایید.

مهم

توصیه می‌شود القای هورمونی برای رهاسازی تخمک در سوف حاج طرخان طی فصل تخم‌ریزی در یک مرحله انجام گیرد (تزریق یک مرحله‌ای هورمون). برای مشاهده جزئیات مربوط به تحریک هورمونی خارج از فصل تولیدمثل به فصل ۱۱ مراجعه نمایید.

منابع

Anguis V, Cañavate JP (2005) Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a naturally fluctuating temperature regime. Aquaculture 243:133–145. doi:10.1016/j. aquaculture.2004.09.026

Baras E, Kestemont P, Mélard C (2003) Effect of stocking density on the dynamics of cannibalism in sibling larvae of *Perca fluviatilis* under controlled conditions. Aquaculture 219:241–255. doi:10.1016/S0044-8486(02)00349-6

Donaldson EM (1996) Manipulation of reproduction in farmed fish. Anim Reprod Sci 42:381–392. doi:10.1016/0378-4320(96)01555-2

Fontaine P, Wang N, Hermelink B (2015) Broodstock management and control of reproductive cycle. In: Kestemont P, Dąbrowski K, Summerfelt RC (eds) Biology and culture of percid fishes, principles and practices. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 103-122.

Kestemont P, Jourdan S, Houbart M, Mélard C, Paspatis M, Fontaine P, Cuvier A, Kentouri M, Baras E (2003) Size heterogeneity, cannibalism and competition in cultured predatory fish larvae: biotic and abiotic influences. Aquaculture 227:333–356

Mañanós E, Duncan N, Mylonas CC (2008) Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish. In: Cabrita E, Robles V, Herráez MP (eds) Methods in reproductive aquaculture. CRC Press, Boca Raton, pp 3–80

Migaud H, Mandiki R, Gardeur JN, Kestemont P, Bromage N, Fontaine P (2003) Influence of photoperiod regimes on the Eurasian perch gonadogenesis and spawning. Fish Physiol Biochem 28:395–397. doi:10.1023/B:FISH.0000030604.04618.d7

Müller-Belecke A, Zienert S (2008) Out-of-season spawning of pike perch (*Sander lucioperca* L.) without the need for hormonal treatments. Aquac Res 39:1279–1285. doi:10.1111/j.1365-2109.2008.01991.x

Mylonas CC, Zohar Y (2000) Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. Rev Fish Biol Fish 10:463–491. doi:10.1023/A:1012279814708

Mylonas CC, Fostier A, Zanuy S (2010) Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. Gen Comp Endocrinol 165:516–534. doi:10.1016/j.ygcen.2009.03.007

Rónyai A, Lengyel SA (2010) Effects of hormonal treatments on induced tank spawning of Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.). Aquac Res 41:e345–e347. doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02465.x

Targońska K, Kucharczyk D, Kujawa R, Mamcarz A, Żarski D (2010) Controlled reproduction of asp, *Aspius aspius* (L.) using luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) analogues with dopamine inhibitors. Aquaculture 306:407–410

Targońska K, Żarski D, Müller T, Krejszeff S, Kozłowski K, Demény F, Urbányi B, Kucharczyk D (2012) Controlled reproduction of the crucian carp *Carassius carassius* (L.) combining temperature and hormonal treatment in spawners. J Appl Ichthyol 28:894–899. doi:10.1111/ jai.12073

Targońska K, Żarski D, Kupren K, Palińska-żarska K, Mamcarz A, Kujawa R, Skrzypczak A, Furgała-Selezniow G, Czarkowski TK, Hakuć-Błażowska A, Kucharczyk D (2014) Influence of temperature during four following spawning seasons on the spawning effectiveness of common bream, *Abramis brama* (L.) under natural and controlled conditions. J Therm Biol 39:17– 23. doi:10.1016/j.jtherbio.2013.11.005

Żarski D (2012) First evidence of pheromonal stimulation of maturation in Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L., females. Turk J Fish Aquat Sci 12:771–776

Żarski D, Horváth A, Held JA, Kucharczyk D (2015) Artificial reproduction of percid fishes. In: Kestemont P, Dąbrowski K, Summerfelt RC (eds) Biology and culture of percid fishes, 1st edn. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 123–161

۶ جمع‌آوری گامت‌ها

ویژگی گامت‌ها

به‌عنوان یک ویژگی منحصربه‌فرد، تخمک‌های سوف حاج طرخان در زمان تخم‌ریزی به‌شکل ساختاری استوانه مانند به یکدیگر متصل می‌باشند که معمولاً این حالت آن‌ها رشته[1] یا روبان[2] نامیده می‌شود (Treasurer and Holliday 1981; Riehl and Patzner 1998; Probst et al. 2009; Formicki et al. 2009). این ساختار از یک پوشش ضخیم و ژله مانند که مستقیماً هر تخم را احاطه می‌کند تشکیل شده است (Formicki et al. 2009) (شکل ۶-۱). جالب توجه است که اندازه هر روبان (طول و عرض آن) کاملاً با اندازه مولدین ماده و همچنین تعداد تخمک‌های موجود در هر روبان ارتباط دارد (جدول ۶-۱). این ویژگی امکان تخمین تقریبی تعداد تخمک‌های جمع‌آوری شده از طبیعت یا مخازن تخم‌ریزی را فراهم می‌سازد (Rónyai and Lengyel 2010). تخمک‌های خشک (قبل از تماس با آب) در ساختار رشته مانند بسیار محکمی قرار دارند (شکل ۶-۲). این تخمک‌ها کاملاً شفاف هستند و قطره چربی آن‌ها قابل مشاهده است. تخم‌های متورم شده (بعد از تماس با آب) سوف حاج طرخان دارای یک پوشش ژله مانند ضخیم می‌باشند که اطراف سلول زرده و قطره چربی بزرگ را احاطه کرده است. بین لایه بیرونی و سلول زرده، فضای پری‌ویتلین درون تخم امکان چرخش آزاد جنین در هنگام رشد را فراهم می‌سازد.

اسپرماتوزوآ در ماهی‌ها سلول بسیار ساده‌ای است که پس از در معرض قرارگرفتن با آب فعال می‌شود (Aquasperm) و تا مدت زمان کوتاهی (تقریباً ۱ دقیقه) توانایی حرکت و بارورسازی دارد. الگوی کلی اسپرماتوزوآ در اکثر ماهیان استخوانی یکسان می‌باشد، اگرچه در بین گروه‌های طبقه‌بندی‌شده مختلف تفاوت‌هایی قابل مشاهده است. طبق الگوی کلی، این سلول‌ها از یک سر تقریباً گرد یا کمی کشیده که هسته درون آن قرار دارد، یک قسمت میانی کم‌وبیش توسعه‌یافته با یک یا چند میتوکندری که انرژی حرکتی را فراهم می‌سازد و ناحیه دمی که به آن تاژک[3] گفته می‌شود تشکیل شده است (Stoss 1983). قسمت سر اسپرماتوزوآ در سوف نسبت به قسمت میانی

1. Strand
2. Ribbon
3. Axoneme or Flagellum

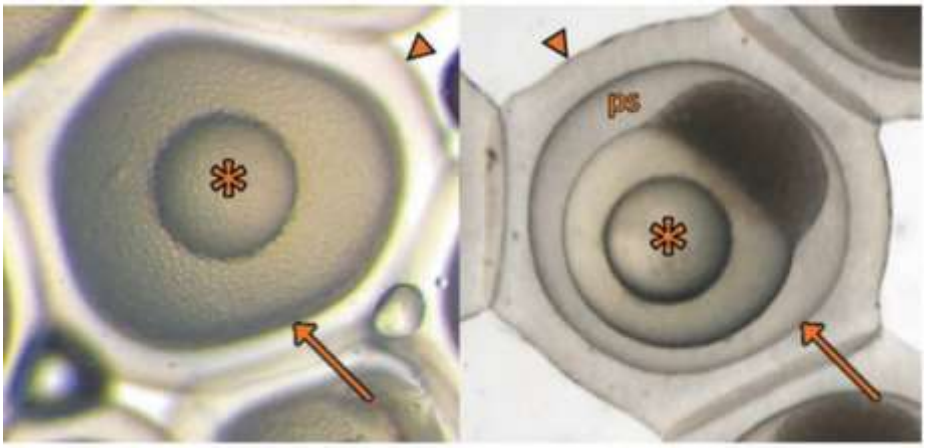
بسیار کوچک که از یک میتوکندری تشکیل شده است به‌صورت نامتقارن قرار دارد (Lahnsteiner et al. 1995).

جدول ۶-۱. رابطه بین طول روبان‌ها و تعداد تخمک‌های موجود در آن‌ها

طول روبان تخمک (سانتی‌متر)	۵۰	۷۵	۱۰۰	۱۲۵	۱۵۰	۱۷۵	۲۰۰
تعداد تخمک‌ها ($\times 10^3$)	۶	۱۲	۱۷/۵	۲۳/۵	۲۹/۵	۳۵/۵	۴۱/۵

بر اساس Gillet و همکاران (۱۹۹۵)

شکل ۶-۱. نمای کلی روبان‌های تخم سوف حاج طرخان (a و b) و تصویر میکروسکوپی ساختار روبانی تخم‌ها که اتصال آن‌ها به یکدیگر را نشان می‌دهد (c) (تصویر a، b و c به ترتیب از: S.Krejszeff، D. Żarski و K. Palińska-Żarska)



شکل ۶-۲. تخمک‌های رهاسازی شده سوف حاج طرخان قبل (تصویر چپ) و بعد (تصویر راست) از فعال‌سازی. فلش: مکان قرارگیری لایه جنینی داخلی، سرفلش: لایه zona radiata externa، ستاره: قطره چربی، ps: فضای پری‌ویتلین در تخم متورم شده (برای جزئیات بیشتر به Schaerlinger و Żarski (۲۰۱۵) مراجعه نمایید) (عکس از D. Żarski)

تعیین لحظه رهاسازی تخمک‌ها

یکی از جنبه‌های مهم تولیدمثل کنترل‌شده در مولدین ماده سوف حاج طرخان تشخیص زمان دقیق استحصال تخمک‌ها می‌باشد. لازم به تأکید است که حتی بدون حضور مولدین نر نیز مولدین ماده می‌توانند تخمک‌های خود را به‌صورت خودبه‌خودی در مخازن رهاسازی نمایند (Rónyai and Lengyel 2010; Żarski et al. 2011). این مورد به‌ویژه در ماهی‌های وحشی و پرورش‌یافته در استخر مشاهده می‌شود. در برخی موارد در ماهیان پرورشی حالت فوق رسیدگی قابل مشاهده است (Migaud et al. 2004). این قضیه نشان می‌دهد که ماهی‌های اهلی‌شده در برخی مواقع می‌توانند تخمک‌های رسیده را درون تخمدان خود نگه‌دارند. با این‌حال، مکانیزم‌های ایجادکننده این حالت کماکان نامشخص است. با این‌وجود، در تمامی موارد تشخیص دقیق زمان رهاسازی تخمک‌ها یکی از موانع تولیدمثل کنترل‌شده در این گونه است.

به‌طورکلی، زمان پاسخ‌دهی مولدین بعد از اعمال تیمار هورمونی در سوف حاج طرخان بین چند ساعت تا ۷ روز متغیر است (Żarski et al. 2015) و کاملاً به مرحله رسیدگی ماهی بستگی دارد. به همین دلیل، تعیین سطح رسیدگی هر مولد ماده یک مرحله بسیار مهم در کل عملیات

تخم‌ریزی است. طبق نظر Żarski و همکاران (۲۰۱۱)، به‌طورکلی در دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد هر مرحله از رسیدگی تقریباً باید در فواصل ۲۴ ساعته رخ دهد. با توجه به ارزیابی‌های عملی انجام‌شده در جمعیت‌های مختلف مولدین وحشی (Żarski و همکاران، منتشرنشده)، زمان پاسخ‌دهی مولدین ممکن است بر اساس جدول زیر قابل پیش‌بینی باشد (جدول ۶-۲):

جدول ۶-۲. فاصله زمانی پاسخ‌دهی بین اعمال تیمار هورمونی و رهاسازی تخمک‌ها در مولدین سوف حاج طرخان در دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد

مرحله رسیدگی در لحظه	زمان پاسخ‌دهی (پس از تزریق هورمون)	
تزریق هورمون	ساعت	روز
مرحله ۱	۱۰۴-۱۶۸	۶-۷
مرحله ۲	۷۱-۱۱۵	۵
مرحله ۳	۵۵-۷۶	۴
مرحله ۴	۳۸-۵۶	۳
مرحله ۵	۲۴-۴۹	۲
مرحله ۶	۶-۲۶	۱

مهم

زمان پاسخ‌دهی عنوان‌شده در جدول ۶-۲ مربوط به دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. دماهای پایین‌تر و بالاتر به‌ترتیب موجب طولانی‌تر شدن و یا کاهش زمان پاسخ‌دهی مولدین خواهند شد. همچنین، زمان پاسخ‌دهی ممکن است در جمعیت‌های مختلف و شرایط پرورشی مختلف متفاوت باشد.

با توجه به داده‌های ارائه‌شده در جدول ۶-۲ باید درنظر داشته باشید که زمان پاسخ‌دهی (با توجه به عامل هورمونی مورد استفاده و همچنین جمعیت مولدین) ممکن است در برخی موارد بین ماهی‌هایی که در سطوح رسیدگی نزدیک قرار دارند هم‌پوشانی داشته باشد. این موضوع احتمالاً از این واقعیت ناشی می‌شود که همه تخمک‌ها معمولاً به‌طور هم‌زمان بالغ نمی‌شوند (برای مشاهده جزئیات بیشتر به فصل ۴ مراجعه کنید). از نظر حساسیت به استرس و واکنش به عامل هورمونی،

تنوع فردی بسیار زیادی بین مولدین ماده مختلف وجود دارد. همچنین لازم به تأکید است که ماهی‌ها در اندازه‌ها و سطوح اهلی‌شدگی مختلف ممکن است نسبت به پروتکل‌های تکثیر خاص واکنش متفاوتی نشان دهند (Krejszeff et al. 2009, 2010; Cieśla et al. 2013) که این قضیه به‌نوبه خود پیش‌بینی لحظه رهاسازی تخمک‌ها را دشوارتر خواهد نمود. بنابراین، پاسخ‌دهی هر ماهی در سطح رسیدگی خاص پس از تزریق هورمون باید در هر جمعیت به‌صورت جداگانه و با رویکرد منتقدانه به موارد بیان‌شده انجام گیرد. با این‌وجود، در یک جمعیت خاص که برای اولین بار تخم‌ریزی می‌نمایند، زمان‌بندی کلی فرآیند رسیدگی نهایی تخمک ارائه‌شده در جدول ۶-۲ می‌تواند در ارتباط با زمان پاسخ‌دهی مولدین یک تخمین تقریبی ارائه نماید.

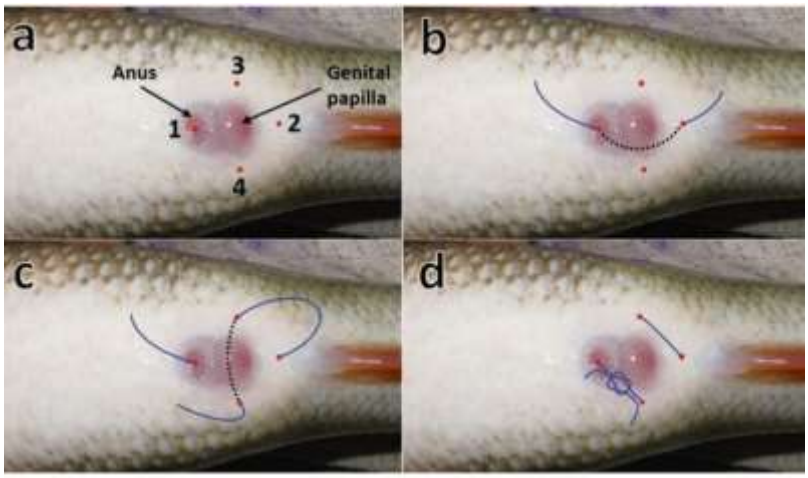
یکی از بیشترین فاصله‌های پاسخ‌دهی بین تزریق هورمون و رهاسازی تخمک‌ها (حدوداً ۶۴ ساعت) در ماهی‌هایی که در سطح رسیدگی ۱ قرار دارند مشاهده شده است. این امر احتمالاً به این دلیل است که سطح رسیدگی ۱ نمایانگر سطوح ابتدایی فرآیند رسیدگی نهایی تخمک‌ها و همچنین سطوح نهایی فرآیند ویتلوژنزیز می‌باشد (Żarski et al. 2011, 2012). می‌توان این فرضیه را مطرح نمود که پس از تزریق هورمون، در برخی موارد قبل از آغاز مرحله رسیدگی نهایی، تخمک‌ها باید مرحله ویتلوژنزیز را تکمیل نمایند. با این‌حال، این تنها یک نظریه علمی است که در آینده به بررسی‌های دقیق‌تری نیاز دارد.

جلوگیری از رهاسازی خودبه‌خودی تخمک‌ها

پدیده تخم‌ریزی خودبه‌خودی (رهاسازی خودبه‌خودی تخمک‌ها از تخمدان) در سوف ماهیان نیاز به توسعه روش‌های نگهداری تخمک‌ها در تخمدان را ایجاد نمود. در ماهی سوف حاج طرخان جلوگیری موفقیت‌آمیز از آزادسازی تخمک‌ها مهم می‌باشد، زیرا در برخی موارد ماهی‌ها ممکن است طی مراحل معمول دستکاری تخمک‌های خود را رهاسازی نمایند (برای مثال هنگام گرفتن در تور و خارج کردن مولدین از مخازن نگهداری). بنابراین، اگرچه می‌توان زمان رهاسازی تخمک‌ها را دقیقاً پیش‌بینی نمود و یا لحظه دقیق آن را در یک ماهی تشخیص داد، اما هنوز هم خطر رهاسازی تخمک‌ها در آب وجود دارد. اگرچه، طی دستکاری‌ها امکان بارورسازی تخمک‌های رهاسازی شده به‌صورت خودبه‌خودی وجود دارد (برای جزئیات بیشتر به فصل ۹ مراجعه کنید)، اما از نقطه‌نظر کنترل فرآیند لقاح هر روشی که امکان جلوگیری از هدررفت تخمک‌ها را فراهم نماید بسیار مفید خواهد بود.

در سوف حاج طرخان تنها یک روش قابل اجرا در شرایط عملیات تکثیر گزارش شده است که این روش، بخیه ملایم منفذ تناسلی به‌وسیلهٔ نخ جراحی می‌باشد. به‌عنوان مثال، معمولاً این روش با هدفی مشابه طی عملیات تکثیر در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) مورد استفاده قرار می‌گیرد (Woynarovich and Horvath 1980). با این‌حال، برخلاف کپور معمولی در سوف حاج طرخان نیازی به بخیه محکم منفذ تناسلی نیست و تنها گره جزئی ناحیه تناسلی کفایت می‌کند. این روش در سوف حاج طرخان که تخمک‌های آن به‌صورت روبانی درون تخمدان قرار دارد بسیار راحت‌تر از گونه‌هایی انجام می‌گیرد که دسته‌های تخمک‌های جدا از هم را در تخمدان نگهداری می‌کنند. روش پیشنهادی بخیه در شکل ۶-۳ و ۶-۴ ارائه شده است.

یکی از مشکلات استفاده از روش دوختن به‌صورت معمول در مراکز تکثیر، حجم کار سنگین است که می‌تواند باعث افزایش هزینه‌های تولید شود. بااین‌حال، دلیل استفاده از این روش، کنترل فرایند تولیدمثل مولدین ماده با ارزشی می‌باشد که قرار است به‌وسیله مولد یا مولدین نر خاصی تلقیح شوند. همچنین، این راه حل از لحاظ‌تجاری در مولدین بسیار با ارزش یا مولدین ماده خاص به‌ویژه مولدین با اندازه بزرگ‌تر بسیار مفید است. بنابراین، با وجود نیاز به تلاش بیشتر در این روش، دوختن منفذ تناسلی در برنامه‌های خاص تکثیر و همچنین در فعالیت‌های علمی زمانی که لزوماً باید از تخمک‌های مولدی خاص استفاده شود بسیار با اهمیت است.



شکل ۶-۳. روش بخیه زدن منفذ تناسلی در مولدین ماده سوف حاج طرخان: (a). محل‌هایی که باید به‌وسیله سوزن سوراخ شوند با نقطه‌های قرمز مشخص شده است و اعداد عنوان‌شده ترتیب سوراخ کردن را نشان می‌دهد (اعداد ۱ و ۳ نقاطی را نشان می‌دهد که سوزن وارد بدن می‌شود، اعداد ۲ و ۴ نیز نقاط خروج سوزن از بدن را نمایش می‌دهد)، (b). بخیه اول (سوزن از منفذ مخرجی وارد می‌شود و دقیقاً در ابتدای شروع باله مخرجی خارج می‌شود)، (c). بخیه دوم (سوزن از یک‌طرف بدن وارد و از سمت دیگر خارج می‌شود، تقریباً با فاصله ۵ میلی‌متری از منفذ تناسلی)، (d). نخ محکم می‌شود، ابتدا (قسمت سوراخ ۱) و انتهای نخ (قسمت سوراخ ۴) باید به‌هم گره زده شوند (عکس از S. Krejszeff)

شکل ۶-۴. مولد ماده سوف حاج طرخان با منفذ تناسلی بخیه زده شده (قبل از محکم کردن نخ) (عکس از S. Krejszeff)

مهم

بخیه منفذ تناسلی یک روش دستکاری زیان‌آور است. قبل از تصمیم‌گیری برای استفاده از این روش با دامپزشک متخصص و یا کمیته اخلاق محلی برای دریافت مجوزهای لازم و یا شرایط و ضوابط استفاده از این روش ارتباط برقرار نمایید.

توصیه‌های عملی:

۱. پس از بخیه منفذ تناسلی و بازکردن آن (هنگام بررسی رهاسازی تخمک‌ها)، توصیه نمی‌شود که مجدداً منفذ را بخیه بزنید، بنابراین قبل از بازکردن بخیه اطمینان حاصل نمایید که بدون عوارض بیشتری امکان تخم‌کشی فراهم باشد.
۲. همیشه از نخ و سوزن (سوزن‌های تیز) استریل استفاده نمایید. توصیه می‌شود از نخ جراحی و سوزن خمیده متصل به آن استفاده نمایید که به‌راحتی از داروخانه‌ها و مراکز فروش لوازم پزشکی قابل تهیه می‌باشند.
۳. اندازه سوزن را با توجه به‌اندازه ماهی انتخاب نمایید.
۴. نخ نباید خیلی نازک باشد زیرا بافت را پاره می‌کند.

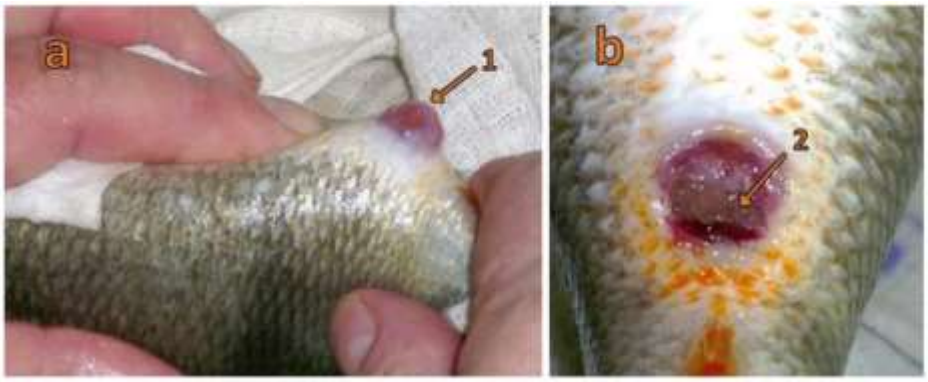
تشخیص لحظه رهاسازی تخمک‌ها

صرف‌نظر از اینکه ماهی‌ها بخیه شده یا نشده باشند، تشخیص زمانی که تخمک‌ها قابل استحصال می‌باشند بسیار مهم است. در حال حاضر به‌جز روش ارزیابی توسط افراد باتجربه، هیچ روش معتبری برای تشخیص مناسب زمان استحصال وجود ندارد. به‌طورکلی، قاعده بر این است که اگر تخمک‌ها به‌راحتی رهاسازی نمی‌شوند نباید عملیات تخم‌کشی انجام شود. نیاز به تأکید است که تخم‌کشی پیش از موعد برای ماهی بسیار مضر است (به علت اینکه فشار بیشتری در ناحیه شکمی مورد نیاز است) و تخمک‌هایی که قبل از زمان مناسب (تخمک‌هایی با سطح مناسب رسیدگی) استحصال شوند در اغلب موارد از کیفیت پایین‌تری برخوردارند. با این‌حال، در سوف حاج طرخان تخمک‌های آزادسازی شده اغلب به‌وسیله یک غشای خاص در منفذ تناسلی از محیط بیرونی جدا می‌شوند (شکل ۶-۵a). در بسیاری از موارد، آمادگی ماهی‌ها می‌تواند بیش از حد مورد ارزیابی قرار گیرد و یا دست‌کم گرفته شود.

در حالت اول، فشار روی شکم (در حالتی که تلاش برای تخم‌کشی انجام می‌گیرد)، باعث پاره شدن غشا شده و ممکن است موجب تماس قسمت بازشده منفذ تناسلی با محیط بیرونی شود که می‌تواند سبب تماس بخش ابتدایی روبان تخمک‌ها با آب شود (شکل ۶-۵b). با این‌حال، این موضوع هیچ مشکلی برای کیفیت تخمک‌ها و قابلیت لقاح آن‌ها ایجاد نمی‌کند و فقط بخش ابتدایی روبان تخمک‌ها باید جداسازی شود (زیرا امکان فعال‌سازی تخمک‌ها وجود دارد). در مواردی که ارزیابی تخمک‌ها دست‌کم گرفته می‌شود (تخم‌کشی انجام نمی‌گیرد، درصورتی‌که باید انجام بگیرد)، به احتمال زیاد اگر بخیه منفذ تناسلی انجام نگرفته باشد ماهی به‌صورت خودبه‌خودی تخم‌ریزی خواهد کرد.

توصیه عملی:

بهتر است تخمک‌ها درون بدن ماهی برای چندین ساعت باقی بمانند (اگر منفذ تناسلی دوخته شده باشد) تا اینکه تخم‌کشی خیلی زودتر از موعد انجام بگیرد (برای جزئیات بیشتر به فصل ۸ مراجعه کنید).



شکل ۶-۵. تصویر ناحیه تناسلی یک مولد ماده سوف حاج طرخان: (a). غشای تناسلی (مشخص شده با فلش شماره ۱)، (b). باز شدن منفذ تناسلی مولد ماده پس از پاره شدن غشای تناسلی و خروج تخمک‌هایی که هنوز برای عملیات تخم‌کشی آماده نیستند (فلش شماره ۲ نشان‌دهنده بخش اول تخمک‌ها می‌باشد که به‌طور مستقیم با محیط بیرون در تماس است) (عکس از D. Żarski)

جمع‌آوری تخمک‌ها

هنگامی‌که مولدین ماده برای تخم‌ریزی آماده هستند، قسمت منفذ تناسلی ماهی‌ها باید به آرامی خشک شود (برای جلوگیری از تماس تخمک‌ها با آب) و طی عملیات تخم‌کشی روبان تخمک‌ها باید به‌طور مستقیم درون ظرف خشک ریخته شود (شکل ۶-۶). برای جلوگیری از خشک شدن تخمک‌ها، بلافاصله بعد از تخم‌کشی ظرف حاوی تخمک‌ها باید سریعاً پوشانده شود. مناسب‌ترین راه، استفاده از ظروف پلاستیکی کوچک دربدار (با حجم کل ۰/۵ تا ۱ لیتر) است که کار با آن‌ها ساده بوده و به‌راحتی در یخچال قرار می‌گیرند. توصیه می‌شود برای هر مولد ماده از یک ظرف جداگانه استفاده شود. بنابراین، تعداد ظرف کافی باید تهیه شود.

ازنقطه‌نظر تجاری هم‌آوری مولدین ماده یکی از مهم‌ترین پارامترها است، به این علت که امکان پیش‌بینی تعداد تخمک قابل استحصال از یک مولد خاص یا کل جمعیت مولدین موجود را میسر می‌سازد. با این‌حال، داده‌های منتشرشده قبلی بیانگر این موضوع است که هم‌آوری در جمعیت‌های مختلف متفاوت است و به‌طور خطی[1] با اندازه مولدین در ارتباط نیست (شکل ۶-۷). بااین‌وجود، برای تخمین نسبی می‌توان از داده‌های ارائه‌شده در جدول ۶-۳ استفاده نمود.

شکل ۶-۶. تخمک‌های سوف حاج طرخان طی عملیات تخم‌کشی. تخمک‌ها از کیفیت بالایی برخوردار هستند و از آنجایی‌که تخم‌کشی در لحظه مناسب در حال انجام است، تخمک‌ها بدون هیچ‌گونه کمکی در حال رهاسازی هستند (عکس از S. Krejszeff)

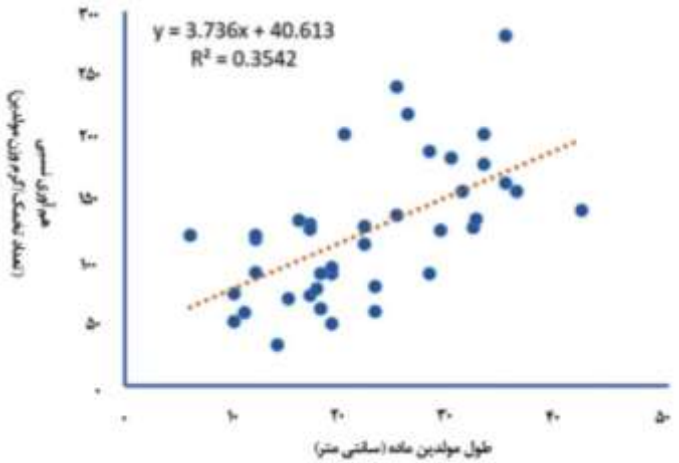
1. Linearly

جمع‌آوری اسپرم

مشکلی در استحصال اسپرم سوف حاج طرخان وجود ندارد، زیرا مولدین نر معمولاً حجم کافی اسپرم را رهاسازی می‌نمایند. بنابراین، استحصال اسپرم معمولاً با روش معمول اسپرم‌گیری انجام می‌گیرد که موجب جاری شدن اسپرم از مجرای اسپرم‌بر می‌شود. جمع‌آوری اسپرم معمولاً به‌وسیله سرنگ خشک انجام می‌گیرد (شکل ۶-۸)، اگرچه در مواردی از پیپت‌های آزمایشگاهی نیز استفاده می‌شود.

موارد مورد نیاز:

- تجهیزات بیهوشی (همان‌طور که در فصل ۳ توضیح داده شده است)
- سرنگ ۲ میلی‌لیتر
- پارچه
- دستمال کاغذی
- لوله‌ها یا ظروف دیگر برای ذخیره‌سازی اسپرم



نمودار ۶-۱. رابطه بین طول مولدین ماده و هم‌آوری نسبی (تعداد تخمک‌ها به ازای هر گرم وزن بدن مولد ماده) بر اساس داده‌های محققین مختلف [Thorpe (۱۹۹۷) و Fontaine و همکاران (۲۰۱۶)]

جدول ۶-۳. پارامترهای تولیدمثلی مولدین ماده سوف حاج طرخان. داده‌ها به‌صورت میانگین (همچنین به‌صورت محدود) بر اساس مطالعات موجود و داده‌های منتشرنشده ارائه شده‌اند و فقط باید به‌صورت تقریبی در نظر گرفته شوند

	میانگین	حداقل	حداکثر
هم‌آوری نسبی (تعداد تخمک‌ها به ازای هر گرم از وزن بدن ماده‌ها)	۱۲۳	۳۳	۲۸۱
تعداد تخمک‌ها در گرم	۵۰۰	۳۵۰	۷۰۰
شاخص گنادی (برحسب درصد وزن بدن)	۲۵	۳۱۹	۳۱

توصیه عملی:

- برای جلوگیری از بین رفتن کامل موکوس، ماهی‌ها نباید کاملاً خشک شوند. پاک کردن ملایم بدن با استفاده از یک پارچه مرطوب معمولاً کافی است.
- موکوس تخمک‌ها را فعال نمی‌کند، بنابراین در صورت تماس موکوس با تخمک‌ها، برای پاک‌سازی آن اقدامی نکنید.
- ناحیه سر و حفره آبششی را به‌طور کامل با پارچه بپوشانید، زیرا ممکن است طی عملیات تخم‌کشی حجم زیادی از آب از حفره آبششی آزاد شود و می‌تواند به ظرف حاوی تخمک‌ها راه پیدا کند.
- دقت کنید که عملیات تخم‌کشی نباید در اتاق گرم انجام گیرد و تخمک‌ها نباید درون ظرف گرم ریخته شوند. حداکثر دما برای دستکاری‌های مرتبط با تخم‌کشی ۱۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد.
- اگر برنامه‌ای برای لقاح سریع تخمک‌ها وجود ندارد، بلافاصله پس از تخم‌کشی تخمک‌ها را در مکان ذخیره‌سازی قرار دهید (برای نگهداری کوتاه‌مدت- برای جزئیات بیشتر به فصل ۷ مراجعه نمایید)

شکل ۶-۸. جمع‌آوری اسپرم سوف حاج طرخان به‌وسیله سرنگ خشک [ابتدا (تصویر سمت چپ) و انتهای (تصویر سمت راست) عملیات اسپرم‌گیری] (عکس از Z. Bokor)

روش جمع‌آوری اسپرم

- مولدین نر را بیهوش نمایید (طبق روش‌های بیان‌شده در فصل ۳).
- مولد نر را روی پارچه مرطوب قرار دهید.
- ناحیه تناسلی را به‌وسیله دستمال کاغذی پاک کنید.
- سرنگ را روی منفذ تناسلی قرار دهید.
- با ماساژ آرام ناحیه شکمی ماهی، عملیات اسپرم‌گیری را آغاز نمایید.
- اسپرم رهاسازی شده را به‌وسیله سرنگ جمع‌آوری نمایید.
- اسپرم را درون لوله یا ظرف منتقل نمایید.
- بلافاصله پس از اسپرم‌گیری، اسپرم جمع‌آوری شده را در مکان سرد قرار دهید (برای مثال یخچال یا ظرف حاوی یخ).

توصیه عملی:

برای جلوگیری از آلودگی اسپرم با ادرار، اسپرم در نظر گرفته‌شده برای نگهداری کوتاه‌مدت (برای بیش از چند ساعت) باید با کاتتر جمع‌آوری شود. این امر معمولاً پارامترهای کیفی اسپرم و طول دوره نگهداری را بهبود می‌بخشد (Sarosiek et al. 2016).

منابع

Cieśla M, Jończyk R, Gozdowski D, Śliwiński J, Rechulicz J, Andrzejewski W (2013) Changes in ide *Leuciscus idus* (L.) females' reproductive parameters after stimulation with carp pituitary homogenate (CPH) and Ovopel: the effect of domestication? Aquac Int 22:77–88. doi:10.1007/ s10499-013-9668-z

Fontaine P, Abdulfatah A, Teletchea F (2016) Reproductive biology and environmental determinism of perch reproductive cycle. In: Couture P, Pyle G (eds) Biology of perch. CRC Press, Boca Raton, pp 167–192

Formicki K, Smaruj I, Szulc J, Winnicki A (2009) Microtubular network of the gelatinous egg envelope within the egg ribbon of European perch, *Perca fluviatilis* L. Acta Ichthyol Piscat 39:147–151. doi:10.3750/AIP2009.39.2.10

Gillet C, Dubois JP, Bonnet S, Lacustre H, Nr IA (1995) Influence of temperature and size of females on the timing of spawning of perch, *Perca fluviatilis*, in Lake Geneva from 1984 to 1993 width (mm) length – width. Environ Biol Fish 42:355–363

Krejszeff S, Targońska K, Żarski D, Kucharczyk D (2009) Domestication affects spawning of the ide (*Leuciscus idus*)-preliminary study. Aquaculture 295:145–147. doi:10.1016/j. aquaculture.2009.06.032

Krejszeff S, Targońska K, Żarski D, Kucharczyk D (2010) Artificial reproduction of two different spawn-forms of the chub. Reprod Biol 10:67–74

Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T, Patzner RA (1995) Fine structure and motility of spermatozoa and composition of the seminal plasma in the perch. J Fish Biol 47:492–508. doi: http:// dx.doi.org/10.1006/jfbi.1995.0154

Migaud H, Fontaine P, Kestemont P, Wang N, Brun-Bellut J (2004) Influence of photoperiod on the onset of gonadogenesis in Eurasian perch *Perca fluviatilis*. Aquaculture 241:561–574. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.07.031

Probst WN, Stoll S, Hofmann H, Fischer P, Eckmann R (2009) Spawning site selection by Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) in relation to temperature and wave exposure. Ecol Freshw Fish 18:1–7. doi:10.1111/j.1600-0633.2008.00327.x

Riehl R, Patzner RA (1998) Minireview: the modes of egg attachment in teleost fishes. Ital J Zool 65:415–420

Rónyai A, Lengyel SA (2010) Effects of hormonal treatments on induced tank spawning of Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.). Aquac Res 41:e345–e347. doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02465.x

Sarosiek B, Dryl K, Krejszeff S, Żarski D (2016) Characterization of pikeperch (*Sander lucioperca*) milt collected with a syringe and a catheter. Aquaculture 450:14–16. doi:10.1016/j. aquaculture.2015.06.040

Schaerlinger B, Żarski D (2015) Evaluation and improvements of egg and larval quality in percid fishes. In: Kestemont P, Dabrowski K, Summerfelt RC (eds) Biology and culture of percid fishes. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 193–223

Stoss J (1983) Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: Hoar WS, Randall WH, Donaldson EM (eds) Fish physiology. Academic Press, New York, pp 305–350

Thorpe J (1977) Synopsis of biological data on the perch *Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758 and *Perca flavescens* Mitchill, 1814. FAO Fish Synop:1–138

Treasurer JW, Holliday FGT (1981) Some aspects of the reproductive biology of perch *Perca fluviatilis* L. A histological description of the reproductive cycle. J Fish Biol 18:359–376. doi:10.1111/j.1095-8649.1981.tb03778.x

Woynarovich E, Horvath L (1980) The artificial propagation of warm-water finfishes – a manual for extension. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome

Żarski D, Bokor Z, Kotrik L, Urbanyi B, Horváth A, Targońska K, Krejszeff S, Palińska K, Kucharczyk D (2011) A new classification of a preovulatory oocyte maturation stage suitable for the synchronization of ovulation in controlled reproduction of Eurasian perch *Perca fluviatilis* L. Reprod Biol 11:194–209. doi:10.1016/S1642-431X(12)60066-7

Żarski D, Krejszeff S, Horváth Á, Bokor Z, Palińska K, Szentes K, Łuczyńska J, Targońska K, Kupren K, Urbányi B, Kucharczyk D (2012) Dynamics of composition and morphology in oocytes of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L., during induced spawning. Aquaculture 364– 365:103–110. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.07.030

Żarski D, Horváth A, Held JA, Kucharczyk D (2015) Artificial reproduction of percid fishes. In: Kestemont P, Dąbrowski K, Summerfelt RC (eds) Biology and culture of percid fishes, 1st edn. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 123–161

۷ نگهداری کوتاه و بلندمدت گامت‌ها

پایه و اساس ذخیره‌سازی گامت‌ها

در بسیاری از گونه‌های پرورشی، هر دو جنس نر و ماده معمولاً به‌طور هم‌زمان رسیده نمی‌شوند. بنابراین، در برخی موارد لازم است گامت‌ها برای مدت زمان معینی ذخیره‌سازی شوند. این امر سبب می‌شود تا ذخیره‌سازی کوتاه و بلندمدت گامت‌ها در عملیات آبزی‌پروری بسیار با اهمیت باشد. حتی اگر پروتکل‌های تکثیر به‌طور معمول برای هم‌زمانی فرآیند تخم‌ریزی و اسپرم ریزی برنامه‌ریزی‌شده باشند، ذخیره‌سازی گامت‌ها می‌تواند کاربردهای عملی دیگری همانند جابه‌جایی گامت‌ها بین مراکز تکثیر مختلف را فراهم سازد. در همین راستا، اجرای این عمل به‌علت مشکلات تولیدمثلی ممکن است ضروری باشد (هنگامی‌که گامت‌های یک جنس از کیفیت پایینی برخوردار است و یا میزان اسپرم یا تخمک‌ها کافی نباشد) و یا برای دورگه‌گیری[1] بین جمعیت‌های مختلف (با منشأ مکانی متفاوت) که جابه‌جایی مولدین پرخطر یا غیرممکن است، نیاز به اجرای این‌کار وجود داشته باشد. از طرفی، ممکن است ذخیره‌سازی بلندمدت (برای مثال نگهداری در حالت انجماد[2]) امکان نگهداری گامت‌های جمعیت‌های ارزشمند را برای چندین دهه فراهم سازد.

نگهداری کوتاه‌مدت

هم اسپرم و هم تخمک بعد از رهاسازی دستخوش تغییرات برگشت‌ناپذیری می‌شوند، همانند روند رشد و کهولت که در داخل بدن نیز مشاهده می‌شود (به‌عنوان مثال در گنادهای ماهی زنده) (Kjørsvik et al. 1990; Bahre Kazemi et al. 2010; Samarin et al. 2011a, b). جالب است که گامت‌های ذخیره‌شده در داخل بدن[3] معمولاً عملکرد خود را خیلی دیرتر از انواع ذخیره‌شده پس از جمع‌آوری در شرایط آزمایشگاهی[4] از دست می‌دهند، حتی اگر در یک زمان به بلوغ برسند. در ماهیان استخوانی ذخیره‌سازی کوتاه‌مدت اسپرم بسیار آسان‌تر و امکان‌پذیرتر از ذخیره‌سازی تخمک‌ها می‌باشد. بسته به گونه مورد نظر، اسپرم ممکن است بعد از رقیق‌سازی در محلول

1. Crossbreed
2. Cryopreservation
3. in vivo
4. in vitro

جلوگیری از فعالیت (Bobe and Labbe 2008; Kowalski et al. 2014) و در دماهای پایین (حدود ۴ درجه سانتی‌گراد) به‌راحتی در یک دوره زمانی بین چند روز (تقریباً ۸۰ ساعت در گونه‌های گرم آبی مانند کپور معمولی، Ravinder et al. 1997) تا بیش از یک ماه (در گونه‌های سردآبی از جمله قزل‌آلای رنگین‌کمان، Mcniven et al. 1993) قابلیت ذخیره‌سازی داشته باشد. در مقابل، تخمک‌های کپور معمولی بعد از ۴ ساعت (Lahnsteiner et al. 2001) و قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از ۹ روز (Niksirat et al. 2007) توانایی لقاح را از دست می‌دهند. با این‌حال، ذخیره‌سازی کوتاه‌مدت تخمک‌ها در مراکز تکثیر قابل‌اجرا است و معمولاً هنگامی‌که تخمک‌ها بدون هیچ ماده افزودنی (رقیق‌کننده‌های ذخیره‌سازی) به استثنای مایع تخمدانی ذخیره می‌شوند، بهره‌وری بالاتری مشاهده می‌شود (معمولاً مایع تخمدانی بدون اثرگذاری منفی بر زمان ذخیره‌سازی تخمک‌ها از آن‌ها حفاظت می‌کند) (Bobe and Labbe 2008). این امر نشان می‌دهد که حساسیت تخمک‌های گونه‌های مختلف به فرآیند ذخیره‌سازی به‌طور قابل‌توجهی تفاوت دارد، درحالی‌که اسپرم معمولاً می‌تواند در مدت‌زمان طولانی‌تری ذخیره‌سازی شود. لازم به تأکید است که مدت‌زمان ذخیره‌سازی وابسته به دمای نگهداری است و معمولاً دماهای پایین‌تر امکان ذخیره‌سازی موفق طولانی‌تری را فراهم می‌سازند (Jensen and Alderdice 1984; Bobe and Labbe 2008; Samarin et al. 2011a, b; 2016a). با این‌حال، با توجه به نتایج داده‌های منتشرشده، به‌طورکلی مدت‌زمان ذخیره‌سازی موفق در ماهی‌هایی که در دماهای پایین‌تر تخم‌ریزی می‌کنند (مانند قزل‌آلای رنگین‌کمان) در مقایسه با گونه‌هایی که تخم‌ریزی در دماهای بالاتر را ترجیح می‌دهند بیشتر است (مانند کپور معمولی).

انجماد اسپرم

انجماد اسپرم در ماهی‌ها یک فن حمایت‌کننده است که طی آن اسپرم بعد از رقیق‌سازی به‌وسیلهٔ رقیق‌کننده‌های خاص و عوامل محافظت‌کننده از انجماد (عواملی که طی فرآیند انجماد از آسیب سلولی جلوگیری می‌نمایند) در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد منجمد می‌شود. بهترین نمونه‌ها پس از ارزیابی تحرک[1]، غلظت[2] و زنده‌مانی[3] انتخاب می‌شوند. رقیق‌کننده‌ها اغلب از قندها و نمک‌ها تهیه می‌شوند و اسمولالیته[4] محلول رقیق‌سازی در غیرفعال‌سازی برگشت‌پذیر

1. Motility
2. Concentration
3. Viability
4. Osmolality

اسپرماتوزوآ نقش مهمی ایفا می‌نماید. تحرک اسپرم در ماهیان سردآبی در شرایط اسمزی بالا[1] مهار می‌شود. عوامل محافظت‌کننده (عمدتاً الکل‌ها)، مواد شیمیایی داخل سلولی هستند و از غشا سلولی عبور می‌کنند (طی فرآیند متعادل‌سازی) و این امر یک عامل کلیدی در موفقیت فرایند انجماد است. ذخیره‌سازی سلـول‌ها در حضور عوامل محافظت‌کننده از انجماد داخل سلولی باید به‌علت اثرات سمی احتمالی آن‌ها محدود شود. نمونه‌های رقیق‌شده عمدتاً به نی‌های مخصوص[2] و ویال-های انجماد[3] منتقل می‌شوند. فرآیند انجماد به‌وسیله محفظه‌های عایق‌بندی شده دارای نیتروژن مایع یا فریزر کنترل‌کننده نرخ انجماد[4] قابل‌اجرا است. نرخ خنک‌سازی[5] و انجمادزدایی[6] فاکتورهای محدودکننده انجماد اسپرم بوده و خاص هر گونه[7] می‌باشند. درحالی‌که انجماد بیش‌ازحد سریع می‌تواند با ایجاد کریستال‌های یخ منجر به خسارت شوند، انجماد آهسته نیز می‌تواند منجر از دست رفتن آب سلول‌ها شود (Cloud and Patton 2008). انجمادزدایی پس از فرآیند ذخیره‌سازی نمونه-ها با توجه به اثراتی که بر ظرفیت بارورسازی اسپرم منجمدشده می‌گذارد، فاکتور مهمی است. در حال حاضر، از نظر مدت‌زمان نگـهداری هیچ‌گونه محدودیتی برای ذخیره‌سازی سلول‌ها در دماهای بسیار پایین وجود ندارد.

ذخیره‌سازی برودتی اسپرم ماهیان می‌تواند از تولیدمثل کنترل‌شده به‌طور مؤثری حمایت نماید (هم‌زمانی رهاسازی اسپرم و تخمک طی فصل تخم‌ریزی، حفظ نمونه‌های با کیفیت بالا و تسهیل مدیریت مولدین). پروتکل‌های خاص به‌طور عمده برای گونه‌های آب شیرین، به‌ویژه آزادماهیان، کپورماهیان، ماهیان خاویاری و گربه‌ماهیان توسعه داده شده است (Cabrita et al. 2010). در صورت علاقه‌مندی به پیشینه علمی تمام جنبه‌های اسپرم‌شناسی[8] و انجماد اسپرم در سوف ماهیان پیشنهاد می‌شود به Alavi و همکاران (۲۰۱۵) مراجعه نمایید.

در سال‌های اخیر چندین روش بسیار بنیادین خاص گونه‌ای برای انجماد اسپرم سوف حاج طرخان توسعه داده شده است (رقیق‌کننده‌ها، نسبت رقیق‌سازی، انجمادزدایی، تکنیک‌های انجماد، تکرارپذیری، موفقیت لقاح و غیره) (Rodina et al. 2008; Bernáth et al. 2015a, b) که اکنون گردآوری آن‌ها به‌صورت یک پروتکل کارآمد امکان‌پذیر شده است.

1. Hyperosmotic conditions
2. Straws
3. Cryovials
4. Controlled-rate freezer
5. Cooling
6. Thawing
7. Species-specific
8. Spermatology

نگهداری کوتاه‌مدت تخمک‌ها در سوف حاج طرخان

نگهداری کوتاه‌مدت تخمک‌ها در سوف حاج طرخان بسیار مهم است زیرا کل عملیات بررسی مولدین (بیهوشی، بخیه منفذ تناسلی، تخم‌کشی و جمع‌آوری اسپرم، بررسی کیفیت تخمک‌ها، تأیید کیفیت اسپرم و غیره) ممکن است تا ۲ ساعت طول بکشد. علاوه بر این، هنگامی‌که برای لقاح از اسپرم منجمد شده استفاده می‌شود یا زمانی که مولدین ماده با فاصله چند ساعته آماده می‌شوند، ذخیره‌سازی کوتاه‌مدت تخمک‌ها می‌تواند موجب تسهیل کار در مرکز تکثیر شود. در حالت دوم، برای هم‌زمان‌سازی دوره انکوباسیون تخمک‌های مولدین ماده مختلف، عملیات لقاح می‌تواند تنها یک‌بار انجام گیرد.

نکات عملی ذخیره‌سازی کوتاه‌مدت تخمک‌های سوف حاج طرخان

۱. از قرارگیری بلندمدت تخمک‌های استحصال‌شده با رطوبت بالا خودداری نمایید.
۲. پس از تخم‌کشی، سریعاً ظرف حاوی تخمک‌ها را با درپوش محکم بپوشانید.
۳. تخمک‌های مولدین ماده مختلف را در ظروف جداگانه نگهداری نمایید.
۴. از توصیه‌های مربوط به مدت‌زمان ذخیره‌سازی تخمک‌ها که در جدول ۷-۱ ارائه‌شده است پیروی نمایید.

جدول ۷-۱. حداکثر مدت‌زمان نگهداری کوتاه‌مدت تخمک‌های (تخمک‌های خشک) سوف حاج طرخان پس از تخم‌کشی

دمای ذخیره‌سازی (سانتی‌گراد)	مدت‌زمان ذخیره‌سازی (ساعت)
۴	۱۸
۸	۱۸
۱۲	۱۲

بر اساس مطالعه Samarin و همکاران (۲۰۱۶b)

مهم

مدت‌زمان ذخیره‌سازی در تخمک‌هایی با روبان‌های تکه‌تکه شده یا دارای کیفیت پایین ممکن است کوتاه‌تر باشد. برای جزئیات بیشتر به مطالعه Samarin و همکاران (۲۰۱۶b) مراجعه نمایید.

نگهداری کوتاه‌مدت اسپرم

در طول تولیدمثل کنترل‌شده سوف حاج طرخان اغلب نیاز است تا اسپرم‌ها برای مدت زمان کوتاهی (یا مدت زمان طولانی) ذخیره‌سازی شوند. عملیات اسپرم‌گیری از مولدین نر می‌تواند زودتر از تخم‌کشی مولدین ماده انجام گیرد و قابلیت بارورسازی اسپرم‌ها باید تا زمانی که تخمک‌ها در دسترس قرار گیرند حفظ شود. در سوف حاج طرخان این دوره می‌تواند چند دقیقه، چند ساعت یا حتی چندین روز طول بکشد. برای اهداف مختلف، رقیق‌کننده‌های متفاوتی برای استفاده در سوف حاج طرخان توسعه داده شده است. برای ارزیابی سریع کیفیت (چند دقیقه یا چندین ساعت)، اسپرم تازه نمونه‌برداری شده را می‌توان در محلول بافری نمکی (محلول جلوگیری از فعالیت اصلاح‌شده توسط Lahnsteiner) نگهداری نمود (Lahnsteiner 2011; Bernáth et al. 2015b). با این‌حال، اگر نیاز به نگهداری طولانی‌تر اسپرم سوف حاج طرخان باشد (حتی برای چند روز)، اسپرم باید در محلول بافری و یونی ویژه مانند محلول کوبایاشی (Kobayashi solution) نگهداری شود (Kobayashi et al. 2004; Sarosiek et al. 2013). در هر دو حالت، جهت کاهش اثرات منفی آلودگی اسپرم با ادرار، مدفوع و خون، رقیق‌کننده‌ها بسیار با اهمیت می‌باشند.

مهم

اسپرم در محلول جلوگیری از فعالیت اصلاح‌شده توسط Lahnsteiner در شرایط نگهداری خنک (در ۴ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۶ ساعت قابلیت ذخیره‌سازی دارد. با استفاده از محلول کوبایاشی (Kobayashi et al. 2004; Sarosiek et al. 2013) اسپرم تا بیش از ۴۸ روز قابلیت ذخیره‌سازی دارد. در طی مدت نگهداری، اکسیژن درون لوله‌ها یا ظروف نگهداری اسپرم باید تأمین شود. برای چند ساعت نگهداری، درب لوله‌ها می‌تواند باز باشد ولی طی چند روز ذخیره‌سازی، اکسیژن باید در لوله‌های درب بسته فراهم باشد. پیشنهاد می‌شود طی ذخیره‌سازی‌های طولانی‌تر، از دست دادن آب در نمونه‌های اسپرم مورد نظارت قرار گیرد و باید در فواصل چندساعته نمونه‌ها هم‌زده شوند. اگر نمونه‌ها بیش‌ازحد غلیظ شدند، با یک سمپلر که نوک سرسمپلر آن بریده‌شده باشد می‌توان به‌راحتی اقدامات لازم برای رقیق‌سازی نمونه‌ها را انجام داد. ضروری است تا سرسمپلرهای مورد استفاده برای هر نمونه تعویض شوند. امکان نگهداری موفقیت‌آمیز نمونه اسپرم رقیق نشده تا حداکثر ۱ ساعت وجود دارد (Bernáth et al. 2015b).

موارد لازم:

- قیچی (برای بریدن نوک سرسمپلرها، درصورت نیاز)
- یخچال یا شرایط دمایی سرد کنترل‌شده (۴ درجه سانتی‌گراد)
- محلول جلوگیری از فعالیت اصلاح‌شده توسط Lahnsteiner (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO4 × 7H2O, 1 mM CaCl2 × 2H2O, 20 mM Tris, pH 8) (Lahnsteiner 2011)
- محلول کوبایاشی (130 mM NaCl, 40 mM KCl, 2.5 mM CaCl2 × 2H2O, 1.5 mM MgCl2 × 6H2O, 2.5 mM NaHCO3, pH 9.5) (Kobayashi et al. 2004)
- لوله اپندورف، لوله آزمایش (به همراه درپوش)، پتری‌دیش (با قابلیت پوشاندن هر دو سمت)
- سمپلر به همراه سرسمپلر (اندازه آن‌ها به مقدار اسپرم و محلول‌ها بستگی دارد)

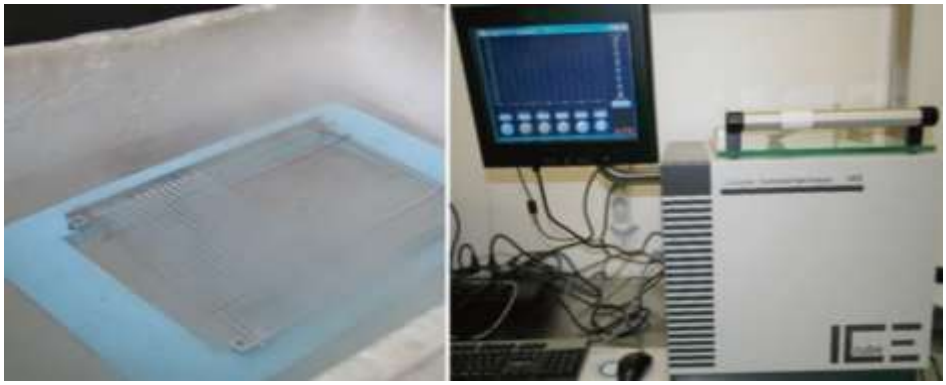
روش ذخیره‌سازی اسپرم

۱. اسپرم رقیق‌سازی نشده را سریعاً پس از جمع‌آوری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.
۲. ۹ واحد از محلول رقیق‌سازی (انتخاب نوع محلول با توجه به مدت زمان ذخیره‌سازی طبق توضیحات بیان‌شده در بالا) را در لوله اپندورف، لوله آزمایش و یا پتری‌دیش بریزید (با توجه به حجم نمونه اسپرم) (Sarosiek et al. 2013)
۳. سریعاً پس از اسپرم‌گیری، یک واحد از نمونه اسپرم را به ۹ قسمت از محلول رقیق‌سازی اندازه‌گیری شده اضافه نمایید (نسبت رقیق‌سازی ۹:۱) (Sarosiek et al. 2013)
۴. نمونه‌های رقیق‌شده را در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.

انجماد و انجمادزدایی

اسپرم جمع‌آوری‌شده طی عملیات تکثیر خارج از فصل را می‌توان با انجماد تا زمان استفاده در فصل تخم‌ریزی نگهداری نمود. بهترین نمونه‌ها [انتخاب‌شده به روش تجزیه‌وتحلیل اسپرم با استفاده از رایانه (CASA)، برای مشاهده به فصل ۸ مراجعه نمایید] را می‌توان بدون افت کیفیت در نیتروژن مایع ذخیره‌سازی نمود. فرآیند انجماد و انجمادزدایی مناسب برای دستیابی به بیشترین میزان لقاح با استفاده از اسپرم انجمادزدایی شده توسعه داده شده است. اسپرم را می‌توان در

محفظه‌هایی از جنس پلی استایرن[1] که با نیتروژن مایع پرشده است (برای نمونه‌های اسپرم با حجم کم یا در شرایط نمونه‌برداری) و یا در فریزرهای کنترل‌کننده نرخ انجماد (در صورت زیاد بودن حجم نمونه اسپرم‌های جمع‌آوری‌شده، Bernáth et al. 2016) منجمد نمود (شکل ۷-۱). استفاده از یک رقیق‌کننده پایه برای انجماد اسپرم سوف حاج طرخان کفایت می‌کند (Bernáth et al. 2015b).



شکل ۷-۱. انجماد در محفظه Styrofoam (تصویر سمت چپ) و فریزر کنترل‌کننده نرخ انجماد (تصویر سمت راست) (عکس از G. Bernath)

مهم

نمی‌توان قبل از فرایند انجماد، اسپرم را بیش از ۱ ساعت ذخیره‌سازی نمود. با توجه به غلظت اسپرم تازه جمع‌آوری‌شده، پیشنهاد می‌شود برای نمونه‌برداری از سرسمپلرهایی که نوک آن‌ها بریده‌شده استفاده شود. اسپرم رقیق‌شده با محلول رقیق‌سازی و محلول محافظت‌کننده را می‌توان قبل از فرآیند انجماد به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمود. با این‌حال، پس از فرآیند انجمادزدایی نگهداری از اسپرم بدون افت کیفیت تنها به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد امکان‌پذیر خواهد بود (Bernáth et al. 2015b). هنگام کار با نیتروژن مایع، استفاده از دستکش‌های ایمنی کار در شرایط انجماد[2]، روپوش و عینک مخصوص الزامی است. برای

1. Styrofoam
2. Cryogloves

انجمادزدایی اسپرم توصیه می‌شود از محلول یونی ساده‌ای که برای لقاح و بررسی تحرک اسپرم کاربرد دارد استفاده شود (50 mM NaCl, pH 8) (Lahnsteiner 2011; Bernáth et al. 2015b).

موارد لازم:

- سمپلر و سرسمپلر (با حجم: ۱۰۰-۱۰، ۱۰۰۰-۱۰۰ و ۵۰۰۰-۱۰۰۰ میکرولیتر)
- قیچی (برای بریدن نوک سرسمپلر و نی‌های مخصوص)
- لوله آزمایش یا لوله اپندورف برای اسپرم
- محفظه Styrofoam پرشده با نیتروژن مایع برای انجماد (با سطح ۳ تا ۴ سانتی‌متر)
- محفظه Styrofoam پرشده با نیتروژن مایع برای نگهداری موقت نمونه‌ها
- قاب نگهدارنده Styrofoam (ارتفاع ۳ سانتی‌متر)
- فریزر کنترل‌کننده نرخ انجماد
- متانول (به‌عنوان محافظت‌کننده طی فرآیند انجماد)
- محلول اصلاح‌شده تاناکا (Tanaka) (137 mM NaCl and 76.2 mM NaHCO3)
- نی‌های مخصوص با حجم ۰/۵ میلی‌لیتر
- پنس (با طول ۳۰ سانتی‌متر، برای دستکاری نی‌ها درون نیتروژن)
- جام[1] و عصاهای نگهدارنده[2] مخصوص (برای ذخیره اسپرم) برای نگهداری از نی‌های ۰/۵ میلی‌لیتری
- محفظه ذخیره دوجداره[3] (برای ذخیره اسپرم در نیتروژن مایع)
- حمام آبی (برای انجمادزدایی نی‌ها)
- دستمال کاغذی (برای خشک کردن نی‌ها قبل از قرار دادن در محفظه انجماد)
- زمان‌سنج (برای اندازه‌گیری زمان انجماد)
- نشانگرها (برای علامت‌گذاری نی، جام یا لوله‌ها)

1. Goblet
2. Cane
3. Storage dewar

روش انجماد و انجمادزدایی:

۱. اسپرم را با نسبت ۱۰:۱ به محلول تاناکا اضافه نمایید (در صورت لزوم از سرسمپلر نوک‌بریده استفاده کنید، برای هر نمونه از سرسمپلر جداگانه استفاده نمایید).
۲. متانول را به میزان ۱۰ درصد از حجم محلول نهایی به مخلوط اضافه نمایید.
۳. اسپرم رقیق‌شده را به آرامی مخلوط نمایید.
۴. نی‌ها را علامت‌گذاری نمایید (در صورت لزوم).
۵. سرسمپلر را به سمپلر ۵۰۰ میکرولیتر متصل کنید و نوک آن را در قسمت انتهای نی (جایی که پلیمر قرار دارد) ثابت کنید.
۶. سمپلر را تا رسیدن به قسمت توقف اول فشار دهید و نی ثابت نگه‌داشته‌شده را در همین وضعیت با سمپلر نگه‌دارید.
۷. انتهای باز نی (انتهای بدون پلیمر) را در نمونه رقیق‌شده قرار دهید.
۸. به آرامی پیستون سمپلر را آزاد کنید و نی را در یک حرکت مداوم طولانی پر کنید.
۹. نی پرشده، ثابت و سمپلر را باهم وارونه نمایید. پلیمر پس از تماس با اسپرم، ژله‌ای می‌شود.
۱۰. نی را با دستمال تمیز کنید.
۱۱. برای دستیابی به نی‌ها و نیتروژن از دستکش‌های مخصوص استفاده نمایید.
۱۲. هنگامی‌که برای انجماد از محفظه Styrofoam استفاده می‌کنید، آن‌را ۳ تا ۴ سانتی‌متر با نیتروژن پر کنید و نی‌ها را درون قاب شناور روی سطح (۳ سانتی‌متر بالاتر از سطح نیتروژن) به مدت ۳ دقیقه منجمد نمایید (درب محفظه بسته نشود) (Bernáth et al. 2015b)
۱۳. هنگامی‌که فرآیند انجماد را با فریزر کنترل‌کننده نرخ انجماد انجام می‌دهید، دستوراتی که در ادامه بیان می‌شود را برای دستگاه تنظیم نمایید. برنامه خنک‌سازی: از ۷/۵- تا ۱۶۰- درجه سانتی‌گراد، نرخ خنک‌سازی: ۵۶- درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، نمونه‌ها را یک دقیقه در دمای ۱۶۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌دارید (Bernáth et al. 2015a).
۱۴. نمونه‌ها را پس از پایان فرآیند انجماد به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در محفظه Styrofoam پر شده با نیتروژن نگه‌دارید (درب محفظه را بپوشانید).
۱۵. جام‌ها را علامت‌گذاری نمایید (در صورت لزوم) و بر روی عصای نگهدارنده قرار دهید.
۱۶. عصای نگهدارنده را به‌همراه جام‌ها درون نیتروژن قرار دهید و اجازه دهید تا جام‌ها کاملاً پر شوند.

۱۷. با استفاده از پنس نی‌های حاوی اسپرم رقیق‌شده را درون جام قرار دهید و سپس عصای نگهدارنده را درون محفظه دوجداره (پر از نیتروژن) منتقل نمایید.
۱۸. قبل از انجمادزدایی، حمام آبی را در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم نمایید.
۱۹. برای انجمادزدایی، نی را به‌وسیله پنس از جام خارج نمایید.
۲۰. با یک حرکت سریع، نی را به مدت ۱۳ ثانیه در حمام آبی قرار دهید.
۲۱. نی‌ها را از حمام آبی خارج نمایید و آن‌ها را به‌وسیله دستمال کاغذی خشک کنید (آب را به‌وسیله دستمال کاغذی از انتهای باز نی جمع کنید).
۲۲. انتهای باز نی را با انگشت مسدود کنید و سپس انتهای پلیمردار نی را قطع نمایید.
۲۳. به آرامی اسپرم را درون لوله بریزید.
۲۴. لوله را علامت‌گذاری کنید (در صورت لزوم)

منابع

Alavi SMH, Ciereszko A, Hatef A, Křišťan J, Dzyuba B, Boryshpolets S, Rodina M, Cosson J, Linhart O (2015) Sperm morphology, physiology, motility, and cryopreservation in Percidae. In: Kestemont P, Dąbrowski K, Summerfelt RC (eds) Biology and culture of Percid fishes. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 163–191

Bahre Kazemi M, Soltani M, Matinfar A, Abtahi B, Pusti I, Mohagheghi Samarin A, Mojazi Amiri B (2010) Biochemical and histological studies of over-ripened oocyte in the Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) to determine biomarkers for egg quality. Iran J Fish Sci 9:33–48

Bernáth G, Bokor Z, Kása E, Várkonyi L, Hegyi Á, Kollár T, Urbányi B, Żarski D, Radóczi Ifj J, Horváth Á (2015a) Comparison of two different methods in the cryopreservation of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) sperm. Cryobiology 70:76–78. doi:10.1016/j.cryobiol.2014.12.003

Bernáth G, Żarski D, Krejszeff S, Palińska-Żarska K, Bokor Z, Król J, Kollár T, Kucharczyk D, Urbányi B, Horváth Á (2015b) Optimization of conditions for the cryopreservation of Eurasian perch (*Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758) sperm. J Appl Ichthyol 31:94–98. doi:10.1111/ jai.12740

Bernáth G, Bokor Z, Żarski D, Várkonyi L, Hegyi Á, Staszny Á, Urbányi B, Radóczi Ifj J, Horváth Á (2016) Commercial-scale out-of-season cryopreservation of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) sperm and its application for fertilization. Anim Reprod Sci 170:170–177. doi:10.1016/j. anireprosci.2016.05.005

Bobe J, Labbe C (2008) Chilled storage of sperm and eggs. In: Cabrita E, Robles V, Herráez P (eds) Methods in reproductive aquaculture: marine and freshwater species. CRC Press, Boca Raton, pp 219–235

Cabrita E, Sarasquete C, Martínez-Páramo S, Robles V, Beirão J, Pérez-Cerezales S, Herráez MP (2010) Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. J Appl Ichthyol 26:623– 635. doi:10.1111/j.1439-0426.2010.01556.x

Cloud J, Patton S (2008) Basic principles of fish spermatozoa cryopreservation. In: Methods in reproductive aquaculture. CRC Press, pp 237–250

Jensen JOT, Alderdice DF (1984) Effect of temperature on short-term storage of eggs and sperm of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). Aquaculture 37:251–265. doi:10.1016/0044-8486(84)90158-3

Kobayashi T, Fushiki S, Ueno K (2004) Improvement of sperm motility of sex-reversed male rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by incubation in high-pH artificial seminal plasma. Environ Biol Fishes 69:419–425. doi:10.1023/B:EBFI.0000022904.35065.e8

Kjørsvik E, Mangor-Jensen A, Holmefjord I (1990) Egg quality in fishes. Adv Mar Biol 26:71–113

Kowalski RK, Cejko BI, Irnazarow I, Szczepkowski M, Dobosz S, Glogowski J (2014) Short-term storage of diluted fish sperm in air versus oxygen. Turk J Fish Aquat Sci 14:831–834. doi:10.4194/1303-2712-v14_3_26

Lahnsteiner F (2011) Spermatozoa of the teleost fish *Perca fluviatilis* (perch) have the ability to swim for more than two hours in saline solutions. Aquaculture 314:221–224. doi:10.1016/j. aquaculture.2011.02.024

Lahnsteiner F, Urbanyi B, Horvath A, Weismann T (2001) Bio-markers for egg quality determination in cyprinid fish. Aquaculture 195:331–352. doi:10.1016/S0044-8486(00)00550-0

Mcniven MA, Gallant RK, Richardson GF (1993) Fresh storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen using a non-aqueous medium. Aquaculture 109:71–82. doi:10.1016/0044-8486(93)90487-J

Niksirat H, Sarvi K, Mojazi Amiri B, Hatef A (2007) Effects of storage duration and storage media on initial and post-eyeing mortality of stored ova of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 262:528–531. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.10.031

Ravinder K, Nasaruddin K, Majumdar KC, Shivaji S (1997) Computerized analysis of motility, motility patterns and motility parameters of spermatozoa of carp following short-term storage of semen. J Fish Biol 50:1309–1328. doi:10.1111/j.1095-8649.1997.tb01655.x

Rodina M, Policar T, Linhart O, Rougeot C (2008) Sperm motility and fertilizing ability of frozen spermatozoa of males (XY) and neomales (XX) of perch (*Perca fluviatilis*). J Appl Ichthyol 24:438–442. doi:10.1111/j.1439-0426.2008.01137.x

Samarin AM, Amiri BM, Soltani M, Mohammad R (2011a) Effects of storage duration and storage temperature on viability of stored ova of kutum (*Rutilus frisii kutum*) in ovarian fluid. Afr J Biotechnol 10:12309–12314. doi:10.5897/AJB11.919

Samarin AM, Amiri BM, Soltani M, Nazari RM, Kamali A, Naghavi MR (2011b) Effects of post-ovulatory oocyte ageing and temperature on egg quality in kutum *Rutilus frisii kutum*. World Appl Sci J 15:14–18

Samarin AM, Blecha M, Uzhytchak M, Bytyutskyy D, Zarski D, Flajshans M, Policar T (2016a) Post-ovulatory and post-stripping oocyte ageing in northern pike, *Esox lucius* (Linnaeus, 1758), and its effect on egg viability rates and the occurrence of larval malformations and ploidy anomalies. Aquaculture 450:431–438. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.08.017

Samarin AM, Żarski D, Palińska-Żarska K, Krejszeff S, Blecha M, Kucharczyk D, Policar T (2016b) In vitro storage of unfertilized eggs of the Eurasian perch and its effect on egg viability rates and the occurrence of larval malformations. Animal:1–6. doi: 10.1017/S1751731116001361

Sarosiek B, Cejko BI, Kucharczyk D, Zarski D, Judycka S, Kowalski RK (2013) Short-term storage of perch (*Perca fluviatilis* L.) milt under cooling conditions. Reprod Biol. doi: 10.1016/j. repbio.2012.11.036

۸ ارزیابی کیفیت گامت

چگونه کیفیت گامت را تعیین کنیم؟

طبق تعریف، به توانایی بارورسازی اسپرم و لقاح تخمک‌ها که طی آن جنین طبیعی توسعه می‌یابد کیفیت گامت گفته می‌شود (Bobe and Labbé 2010). در آبزی‌پروری متراکم، کیفیت گامت جنبه بسیار با اهمیتی است که مستقیماً موفقیت تولید را تعیین می‌کند. گامت‌های با کیفیت، تولید لارو با کیفیت را تضمین می‌کنند. کیفیت گامت در آبزی‌پروری سوف ماهیان معمولاً بسیار متغیر است و به‌سختی قابل پیش‌بینی می‌باشد (Żarski et al. 2011, 2012). بنابراین، تلاش شده است تا عوامل مؤثر بر کیفیت گامت مشخص شوند. عنوان شده است که رژیم غذایی (Henrotte et al. 2010a, b)، شرایط محیطی (Migaud et al. 2004; Fontaine et al. 2006; Kucharczyk et al. 1996, 1998; Kouril et al. 1997; Targońska et al. 2014) و همچنین پروتکل تکثیر (Abdulfatah et al. 2011) عوامل تأثیرگذار اصلی هستند که مستقیماً بر توسعه گنادی، بلوغ و کیفیت گامت‌ها تأثیر می‌گذارند. این امر نشان می‌دهد که تنظیم کیفیت گامت‌ها به‌خصوص تخمک‌ها تحت‌تأثیر چندین عامل مختلف قرار دارند.

بیشترین تغییرات در موفقیت تخم‌ریزی سوف حاج طرخان معمولاً به‌علت پایین بودن کیفیت تخمک‌ها[1] است. بنابراین، مطالعات متعددی به اثر عوامل مؤثر بر قابلیت توسعه تخمک‌ها[2] پرداخته است که عمدتاً روی تغذیه و دستکاری‌های محیطی متمرکز بوده‌اند. با این‌حال، عوامل متعدد دیگری نیز می‌توانند کیفیت گامت را تحت‌تأثیر قرار دهند که از این جمله می‌توان به استرس و عوامل مرتبط با استرس اشاره نمود که بر کارایی هورمون‌های درگیر در سرعت دوره بلوغ گنادی اثر می‌گذارند (Schreck et al. 2001; Barton 2002; Milla et al. 2015).

در شرایط کارگاهی، روش‌هایی که به‌وسیلهٔ آن‌ها بتوان کیفیت گامت را در ابتدایی‌ترین مرحله ممکن تشخیص داد بسیار با اهمیت می‌باشند. این امر انتخاب گامت‌های با کیفیت را برای مراحل بعدی تولیدمثل کنترل‌شده به‌منظور اطمینان از دستیابی به بالاترین درصد لقاح امکان‌پذیر می‌سازد. راندمان پایین لقاح مشکلات متعددی ایجاد خواهد نمود، زیرا طی دوره انکوباسیون جنین-

1. Impaired quality of eggs
2. Developmental competence of eggs

های توسعه‌نیافته منبعی برای عفونت (عمدتاً باکتریایی، تک‌یاخته‌ای و قارچی) جنین‌های سالم خواهند بود و این امر می‌تواند به‌طور قابل‌توجهی کیفیت انکوباسیون را کاهش دهد. این موضوع به‌ویژه در سوف حاج طرخان بسیار با اهمیت است، زیرا تخم‌های این ماهی در ساختار روبان مانندی در کنار یکدیگر قرار داشته و امکان جداسازی تخم‌های سالم و ناسالم از یکدیگر وجود ندارد. با این‌حال، روش‌های تشخیص کیفیت گامت‌ها بسیار محدود می‌باشند.

کیفیت تخم و همچنین عوامل تعیین‌کننده کیفیت تخم سوف ماهیان به‌تازگی توسط Schaerlinger و Żarski (۲۰۱۵) مورد بررسی قرار گرفته‌اند که درصورت علاقه‌مندی می‌توانید جزئیات بیشتر پیشینهٔ علمی مرتبط با این موضوع را در این مطالعه مشاهده نمایید.

روش‌های ارزیابی کیفیت گامت

تاکنون تنها روش معتبر که امکان ارزیابی قابل قبول کیفیت گامت را فراهم می‌کند تنها برای اسپرم توسعه یافته است. اسپرماتوزوآ در ماهی‌ها تا زمانی‌که به‌طور مستقیم در تماس با آب قرار نگیرند، غیرفعال باقی می‌مانند. بنابراین، اسپرمی که در ظرف خشک جمع‌آوری شود (سرنگ یا لوله آزمایش) در مدت زمان معینی (برای جزئیات بیشتر به فصل ۷ مراجعه نمایید) بدون اینکه ظرفیت بارورسازی خود را از دست دهد قابلیت نگهداری دارد. با این‌حال، سلول‌های اسپرم بلافاصله پس از تماس با آب (یا هر عامل فعال‌کننده دیگر) تحت فعال‌سازی و تحرک قرار می‌گیرند. پارامترهای تحرک (مانند نرخ تحرک یا سرعت) و مدت زمان تحرک به‌شدت با کیفیت اسپرم مرتبط می‌باشند (Fauvel et al. 2010). همچنین، این ویژگی در شرایط کارگاهی به‌صورت ارزیابی چشمی تحرک، به‌عنوان یک روش استاندارد برای انتخاب اسپرم به‌منظور لقاح برای اهداف تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرد (Żarski et al. 2011). ارزیابی کیفیت تخمک بسیار دشوارتر است و شاخص‌های بسیار کمتری وجود دارند که امکان تشخیص کیفیت قابل قبول تخمک را فراهم می‌کنند (Schaerlinger and Żarski 2015).

اگرچه برخی پیشرفت‌ها را می‌توان در این حوزه دید، اما هنوز هم تعیین میزان زنده ماندن در مراحل خاص توسعه جنینی معتبرترین روش برای ارزیابی کیفیت تخمک‌ها است. این موضوع از این واقعیت ناشی می‌شود که کیفیت پایین تخمک می‌تواند ترکیب نامناسب زرده (ازجمله پروفایل آمینواسیدها) که درواقع منبع تغذیه‌ای جنین و لارو و همچنین پایه مولکولی تخمک (mRNA مادری و سطوح پروتئین) است را ایجاد نماید (Castets et al. 2012; Schaerlinger and Żarski 2015). بنابراین، بررسی وضعیت رشد و توسعه جنین (به‌عنوان مدرک کیفیت بالای تخم)

معتبرترین روش مورد استفاده در شرایط کارگاهی است. اخیراً Żarski و همکاران (۲۰۱۱) عنوان نمودند که برخی از خصوصیات ریخت‌شناسی تخمک‌ها که قبل از لقاح قابل‌اندازه‌گیری است می‌تواند ابزار کارآمدی در عملیات تولیدمثل کنترل‌شده سوف حاج طرخان باشد. لازم به ذکر است که با بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی تخمک‌های رهاسازی شده از تخمدان[1] به احتمال زیاد فقط امکان شناسایی تخمک‌هایی با کیفیت پایین وجود خواهد داشت. در مواقعی که خصوصیات ریخت‌شناسی تخمک‌ها تغییری نکند هیچ روش معتبری وجود ندارد تا امکان شناسایی کیفیت تخمک‌ها در سوف حاج طرخان را میسر نماید.

عوامل کارگاهی تأثیرگذار بر کیفیت گامت

عملاً همه مراحل تولیدمثل کنترل‌شده باید به‌عنوان عوامل احتمالی که بر کیفیت گامت تأثیر منفی می‌گذارند در نظر گرفته شوند، زیرا تمامی روش‌های تکثیر برای ماهی‌ها استرس‌زا هستند. علاوه بر این، در بسیاری از موارد ثابت‌شده است که نوع و دوز هورمون مورد استفاده برای تحریک تخم‌ریزی می‌تواند به‌طور مستقیم بر کیفیت اسپرم و تخمک تأثیر بگذارد که این موضوع در سوف حاج طرخان نیز به اثبات رسیده است (Kucharczyk et al. 1996, 1998; Kouril et al. 1997; Targońska et al. 2014). در شرایط کارگاهی باید به زمان استحصال گامت‌ها توجه ویژه‌ای نمود. این یک حقیقت ثابت شده است که تأخیر در زمان جمع‌آوری گامت‌ها (پس از اعمال تحریک هورمونی) می‌تواند علت استحصال گامت‌هایی با کیفیت پایین باشد. این امر ناشی از فوق رسیدگی تخمک‌ها (Lahnsteiner 2000; Samarin et al. 2008, 2011) یا کهولت اسپرم است (Cejko et al. 2012).

در نقطه مقابل، فرضیات موجهی در سوف ماهیان وجود دارد که نشان می‌دهد استحصال خیلی زود گامت‌ها (هم اسپرم و هم تخمک) می‌تواند موجب جمع‌آوری گامت‌هایی با کیفیت پایین شود (شکل ۸-۱). این امر به احتمال زیاد به‌علت استحصال گامت‌های نارس[2] است (هنگامی‌که امکان جمع‌آوری دستی آن‌ها وجود دارد ولی برای لقاح آماده نیستند)، اگرچه باید بررسی‌های بیشتری برای اثبات این فرضیه انجام گیرد. با این‌وجود، باید به این موضوع توجه کرد که زمان مناسب جمع آوری گامت‌ها یک عامل کلیدی در تولیدمثل موفقیت‌آمیز می‌باشد. درواقع از نقطه‌نظر علمی این

1. Ovulated eggs
2. Premature

دو جنبه از تولیدمثل کنترل‌شده باید یکی در نظر گرفته شوند، زیرا تغییر در کارایی تخم‌ریزی می‌تواند بر کیفیت گامت‌ها اثر بگذارد.

ارزیابی کیفیت تخمک

روش‌ها و امکاناتی که از نظر زیست‌شناسی امکان تعیین کیفیت تخمک‌ها قبل از لقاح را فراهم سازند بسیار محدود می‌باشند. یکی از روش‌هایی که می‌توان با استفاده از آن تخمک‌هایی با کیفیت پایین را در سوف حاج طرخان شناسایی نمود، ارزیابی خصوصیات ریخت‌شناسی تخمک‌ها به‌وسیله لوپ می‌باشد. با این‌حال، هیچ روشی وجود ندارد که با احتمال زیاد و قابل قبولی تخمک‌های با کیفت بالا را مشخص نماید.

توصیه عملی:

برای ارزیابی کیفیت تخمک‌ها به‌روش ریخت‌شناسی به‌جای استفاده از میکروسکوپ‌های نوری که معمولاً بزرگنمایی آن‌ها خیلی زیاد است از لوپ استفاده می‌شود. استفاده از لوپ‌هایی که قابلیت عبور نور از درون جسم و امکان تنظیم بزرگنمایی را فراهم می‌کنند برای اهداف تجاری بسیار مناسب است. امروزه می‌توان لوپ‌های مدرن (با تمام ویژگی‌های بیان‌شده) را با قیمتی کمتر از ۵۰۰ یورو (تقریباً ۵۵۰ دلار) خریداری نمود.

شکل ۸-۱. نمونه‌ای از فرایند تخم‌کشی در هنگام نارس بودن تخمک‌ها. (a): غشای تناسلی هنگام بررسی میزان رسیدگی پاره شده است (همان‌طور که در شکل ۶-۵ نشان داده شده بود)، (b): تخمک‌ها فقط با اعمال فشار زیاد به ناحیه شکمی قابل استحصال می‌باشند، (c): پس از تخم‌کشی، شکل روبان مانند معمول تخمک‌ها مشاهده نمی‌شود و تخمک‌ها به‌صورت انبوه کنار هم قرار دارند (عکس از D. Żarski)

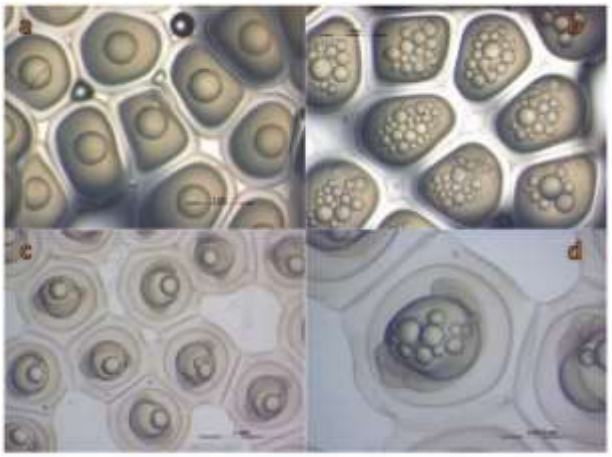
ارزیابی کیفیت تخمک‌ها به روش ریخت‌شناسی

قطعه‌قطعه بودن قطرات چربی[1]

قطعه‌قطعه بودن قطرات چربی در تخمک‌های رهاسازی شده شاخص خوبی برای شناسایی تخمک‌هایی با کیفیت پایین است (Żarski et al. 2011). ارزیابی کیفیت باید قبل از تماس و یا بلافاصله بعد از تماس تخمک‌ها با آب انجام گیرد، زیرا طی فرآیند جذب آب، قطعات چربی می‌توانند در یک قطعه واحد ادغام شوند. با این‌حال، در بسیاری از موارد قطرات چربی حتی طی توسعه جنینی نیز قابل مشاهده می‌باشند (شکل ۸-۲).

مهم

وجود یک قطره چربی شاخص کیفیت بالای تخمک‌ها نیست.



شکل ۸-۲. تخمک‌های خشک (a و b) و جنین‌های درحال توسعه (c و d) در سوف حاج طرخان. (a): تخمک‌های خشک با کیفیت بالا به‌همراه فقط یک قطره چربی، (b): تخمک‌های خشک با کیفیت پایین به‌همراه قطرات چربی قطعه‌قطعه، (c): جنین‌های درحال توسعه با کیفیت بالا که عمدتاً دارای یک قطره چربی می‌باشند، (d): جنین‌های با کیفیت پایین به‌همراه قطرات چربی قطعه‌قطعه (بر اساس مطالعه Żarski و همکاران (۲۰۱۱)) (عکس از D. Żarski)

1. Fragmentation of oil droplets

انواع مختلف تغییرات ریخت‌شناسی

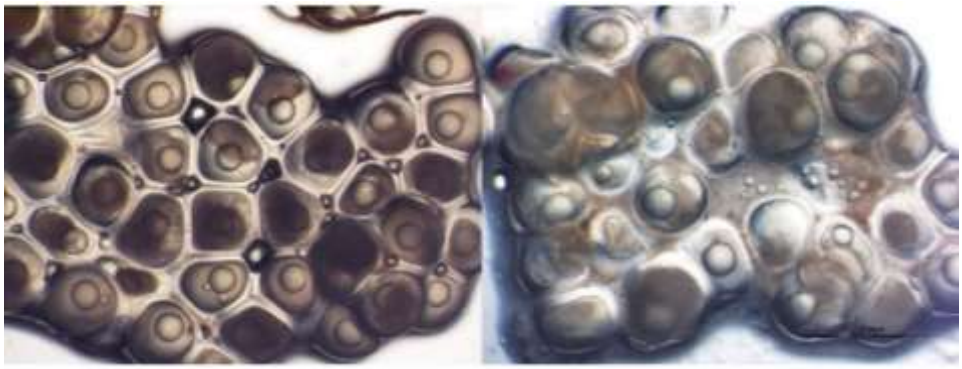
به‌طورکلی، مشاهده بصری (مانند رنگ) بیش‌ازحد به تصور ذهنی اپراتور بستگی دارد و نمی‌توان آن‌را به‌عنوان شاخصی قابل اعتماد برای تعیین کیفیت در نظر گرفت. گزارش شده است که وجود تخمک‌های سفید (مات) در دسته تخمک‌ها و یا قطعه‌قطعه بودن ساختار روبان تخمک‌ها می‌توانند به‌عنوان شاخصی برای پایین بودن کیفیت تخمک‌ها در نظر گرفته شوند (Dabrowski et al. 1994; Castets et al. 2012; Schaerlinger and Żarski 2015). با این‌حال، با وجود تشخیص آسان نشانه‌های احتمالی پایین بودن کیفیت، توصیه می‌شود مشاهدات ماکروسکوپی جهت تعیین هرگونه تغییرات احتمالی ریخت‌شناسی با استفاده از لوپ انجام گیرد تا کیفیت پایین تخمک‌ها تأیید شده و یا درصد تخمک‌هایی که دارای ویژگی‌های غیرطبیعی هستند برآورد شود. این نوع ارزیابی ریخت‌شناسی معمولاً به‌صورت کاملاً واضح می‌تواند با اطمینان بالایی کیفیت پایین تخمک‌ها را مشخص نماید (شکل ۸-۳).

اولین تقسیم‌ها[1] و ریخت‌شناسی بلاستومر[2]

به‌طورکلی، تخم‌های سالم و قابل توسعه همیشه قابلیت توسعه خود را در یک مرحله خاص به نمایش می‌گذارند (Alix et al. 2013; Schaerlinger and Żarski 2015) که این قابلیت در اولین مرحله تقسیم سلولی تخمک‌های لقاح یافته قابل مشاهده است. معمولاً همیشه این سؤال وجود دارد که در چه زمانی درنهایت جنین به یک لارو طبیعی تبدیل می‌شود، زیرا وقوع اولین تقسیم (تقسیم‌ها) فقط اطلاعاتی در مورد اینکه تخمک لقاح یافته یا خیر نمایان می‌سازد. با این‌وجود، در حال حاضر در برخی گونه‌های ماهیان استخوانی گزارش شده است که ریخت‌شناسی بلاستومر می‌تواند شاخص قابل‌اطمینانی برای کیفیت تخم‌ها در نظر گرفته شود (Shields et al. 1997). اگرچه این جنبه هنوز در سوف حاج طرخان مورد مطالعه قرار نگرفته است ولی می‌تواند به‌عنوان یک روش احتمالی برای ارزیابی کیفیت تخم مدنظر قرار گیرد. با این‌حال، لازم به تأکید است که قابلیت اعتماد به این روش هنوز نیاز به تأیید اعتبار بیشتری است، به‌خصوص در برخی موارد که تقسیم غیرطبیعی سلولی ممکن است تأثیری در موفقیت نهایی انکوباسیون نداشته باشد (Vallin and Nissling 1998). اگرچه تقسیمات اولیه یا ریخت‌شناسی بلاستومر قبل از لقاح قابل ارزیابی نیست، اما این روش هنوز می‌تواند یک ابزار مفید برای مراکز تکثیر و کارهای علمی باشد،

1. Cleavages
2. Blastomere

به‌خصوص به‌علت اینکه تخمک‌ها در شرایطی خاص ممکن است برای چندین ساعت بدون اثر منفی روی کیفیت ذخیره‌سازی شوند (به فصل ۷ مراجعه شود). برای استفاده از چنین شاخص‌هایی به‌منظور برآورد سریع کیفیت تخمک، روش‌هایی که در ادامه عنوان می‌شوند باید استفاده شوند.



شکل ۸-۳. نمونه‌هایی از تغییرات ریخت‌شناسی مختلف در تخمک‌های تازه رهاسازی شده با کیفیت پایین قبل از تماس با آب. عدم شفافیت و آسیب‌دیدگی داخلی ساختار زرده در برخی از تخمک‌ها قابل مشاهده است (با شکل ۸-۲a مقایسه شود) (عکس از D. Żarski)

نکات عملی ارزیابی کیفیت تخمک

موارد لازم:

- ظرف حاوی تخم که برای ذخیره‌سازی کوتاه‌مدت آماده باشد (همان‌طور که در فصل ۷ توضیح داده شد)
- لوپ
- پتری‌دیش
- محلول فعال‌سازی (به فصل ۹ مراجعه کنید)
- آب مورد استفاده در مرکز تکثیر (آب کارگاه)
- نمونه اسپرم با کیفیت بالا (میزان تحرک حداقل ۸۰ درصد)

روش ارزیابی:

۱. یک نمونه تخمک را که دارای حداقل ۱۰۰ تخمک باشد بردارید (تقریباً از وسط روبان تخمک‌ها نمونه‌برداری کنید). تخمک‌های باقیمانده را در شرایط ذخیره‌سازی کوتاه‌مدت نگه دارید (به فصل ۷ مراجعه کنید).
۲. تخمک‌های نمونه‌برداری شده را در پتری‌دیش قرار دهید.
۳. محلول فعال‌سازی را در پتری‌دیش حاوی تخمک‌ها بریزید.
۴. نمونه تخمک‌ها را کاملاً درون محلول فعال‌سازی در سطح پتری‌دیش پخش نمایید.
۵. ۱۵ ثانیه پس از اضافه کردن محلول فعال‌سازی نمونه اسپرم را اضافه نمایید (اسپرم باید بیش از میزان مورد نیاز اضافه گردد. بدین منظور، ۱۰ برابر مقدار توصیه شده در فصل ۹ اسپرم اضافه نمایید).
۶. تخم‌ها را به مدت ۳ دقیقه در پتری‌دیش هم بزنید (برای مثال با سرسوزن، احتیاط کنید که به تخم‌ها آسیبی وارد نشود).
۷. مخلوط آب و اسپرم را با آب تمیز کارگاه تعویض نمایید.
۸. پتری‌دیش را در مکانی قرار دهید که دمای انکوباسیونی بین ۱۵ تا ۱۶ درجه سانتی‌گراد را فراهم کنید (بالاترین میزان توصیه شده که آغاز تقسیم اولیه را تسریع می‌نماید).
۹. بعد از تقریباً ۲ ساعت، وقوع تقسیم سلولی اولیه و یا ریخت‌شناسی بلاستومر را بررسی نمایید (شکل ۸-۴).

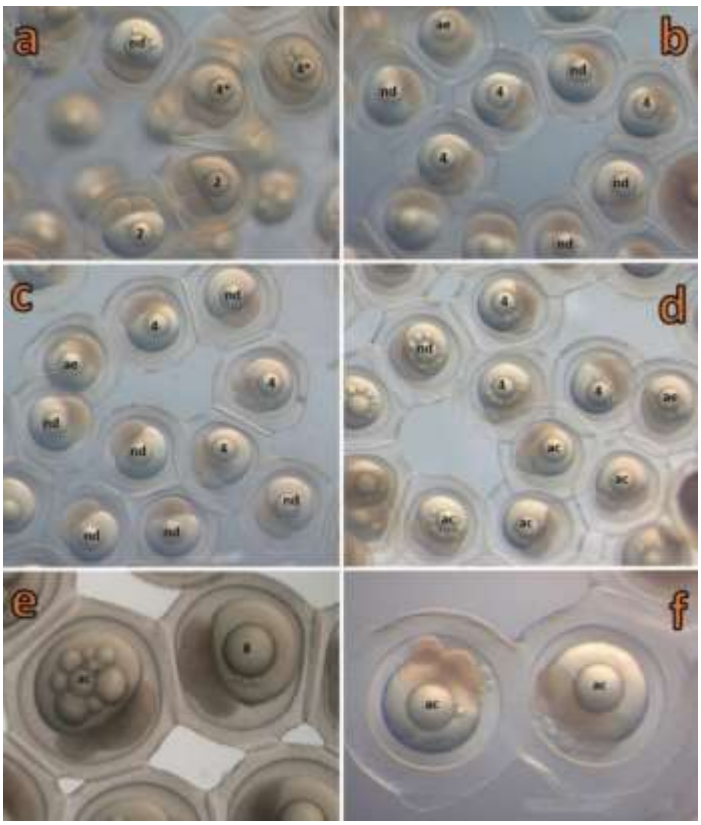
توصیه عملی:

بررسی ریخت‌شناسی بلاستومر باید حداکثر تا مرحله ۱۶ سلولی انجام گیرد (بعد از ۴ تقسیم).

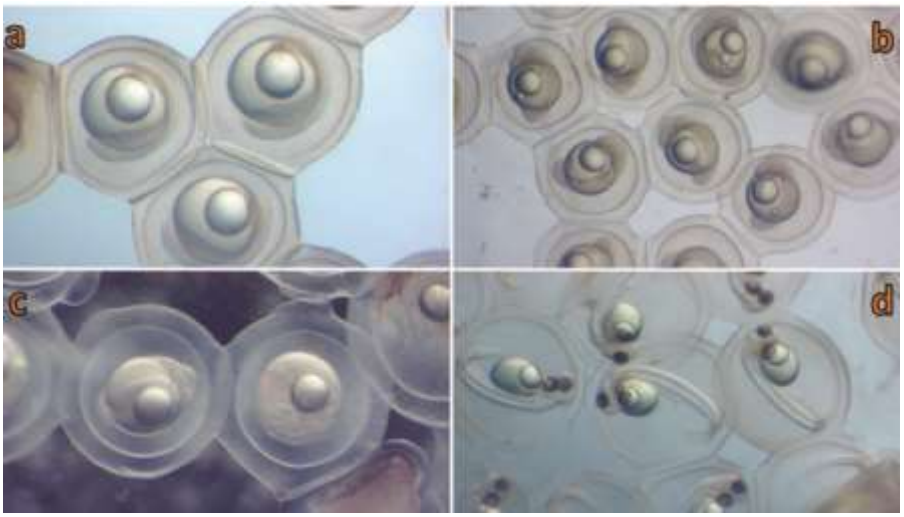
میزان بقای جنین

از نقطه نظر علمی علاوه بر اهمیت انتخاب دسته تخمک‌ها برای لقاح و انکوباسیون، بررسی تمامی مراحل تولیدمثل نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. برای دستیابی به این هدف به‌طور معمول نمونه‌برداری برای بررسی میزان لقاح در آخرین مراحل توسعه جنینی (که مطمئن‌ترین شاخص کیفیت تخم می‌باشد) که امکان‌پذیر باشد انجام می‌گیرد. قابل اطمینان‌ترین مرحله برای بررسی کیفیت تخم مرحله چشم‌زدگی است، هنگامی‌که تمامی تخم‌های توسعه‌نیافته معمولاً

غیرشفاف دیده می‌شوند. البته در مواردی لازم است میزان لقاح زودتر برآورد گردد، اما در چنین مواردی باید توجه ویژه‌ای برای متمایز نمودن جنین‌های زنده از مرده صورت گیرد، زیرا تمامی تخم‌ها می‌توانند تا آخرین مراحل توسعه خود شفاف باقی بمانند (شکل ۸-۵).



شکل ۸-۴. نمونه‌هایی از الگوهای مختلف تقسیم. (a): یک دسته تخم که جنین‌ها الگوهای تقسیم غیرهمزمان را نشان می‌دهند، (b و c): دسته‌ای از تخم که تمامی جنین‌ها مرحله پس از تقسیم دوم را نشان می‌دهند (تقسیم ۴ سلولی) و همچنین تخم‌های توسعه‌نیافته و تغییریافته قابل مشاهده می‌باشند، (d): یک دسته تخم که در آن غالباً تقسیم‌های غیرطبیعی قابل مشاهده است، (e): دسته تخم در مرحله ۸ سلولی (تخم دارای قطرات چربی قطعه‌قطعه و بلاستومر غیرطبیعی است)، (f): تخم‌هایی با مراحل تقسیم غیرطبیعی از دسته تخمی که باید مرحله ۱۶ سلولی را به‌نمایش بگذارند. اعداد نشان‌دهنده تعداد بلاستومرها در هر مرحله خاص می‌باشد (ستاره نشان‌دهنده شروع هر مرحله خاص می‌باشد)، nd: تخم‌های توسعه‌نیافته، ae: تخم‌های تغییریافته (تغییرات ریخت شناختی)، ac: بلاستومر غیرطبیعی (عکس از D. Żarski)



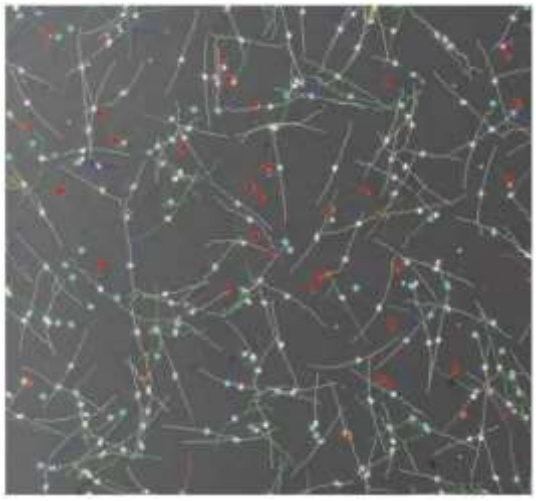
شکل ۸-۵. نمونه‌هایی از تخم‌های سوف حاج طرخان در مراحل جنینی مختلف. (a): ۲ تا ۳ روز پس از انکوباسیون، (b): ۳ تا ۴ روز پس از انکوباسیون، (c): ۳ تا ۴ روز پس از انکوباسیون که جنین‌های توسعه‌یافته (چپ) و توسعه‌نیافته (راست) قابل مشاهده می‌باشند، (d): جنین‌ها در مرحله چشم‌زدگی (عکس از D. Żarski)

سنجش کیفیت اسپرم از طریق ارزیابی تحرک

طی این فرایند، کیفیت اسپرم‌های استحصال‌شده با استفاده از سیستم CASA موردسنجش قرار می‌گیرد (شکل ۸-۶ و ۸-۷). پارامترهای مختلف حرکتی با استفاده از این روش قابل ضبط و ذخیره می‌باشند. همچنین با استفاده از میکروسکوپ نوری می‌توان حرکت سلول‌ها را با تخمین چشمی برآورد نمود. ضروری است تا نمونه‌ها بر اساس درصد سلول‌های متحرک و غیرمتحرک دسته‌بندی شوند، بنابراین با استفاده از این روش می‌توان موفقیت لقاح در نمونه اسپرم‌های تازه و همچنین انجمادزدایی شده را بهبود بخشید. در نمونه‌های اسپرم انجمادزدایی شده سوف حاج طرخان به‌طور میانگین تخمین کاهش تحرک بین ۳۰ تا ۵۰ درصد قابل پیش‌بینی است. اسپرم سوف حاج طرخان بسیار غلیظ است (شکل ۹-۱ مشاهده شود)، بنابراین باید قبل از انجام آزمایش‌ها در محلول جلوگیری از تحرک مخصوص این ماهی رقیق شود. آغاز تحرک اسپرماتوزوآ نیز به‌وسیله محلول فعال‌سازی ویژه سوف حاج طرخان انجام می‌گیرد (Lahnsteiner 2011;

Bernáth et al. 2015b). پس از انجمادزدایی، برای انجام آزمایش نیازی به رقیق‌سازی نمونه‌ها نیست، زیرا نمونه‌ها قبل از انجماد رقیق می‌شوند.

شکل ۸-۶. تجزیه‌وتحلیل اسپرم با استفاده از سیستم CASA. میکروسکوپ به رایانه‌ای متصل شده است که از نرم‌افزار ویژه سیستم CASA استفاده می‌کند (عکس از G. Bernath)



شکل ۸-۷. اسپرم‌های متحرک (Motile) (سلول‌های دارای مسیر)، دارای تحرک درجا (locally motile) (نقطه‌های آبی) و بدون تحرک (immotile) (نقطه‌های قرمز) (عکس از G. Bernath)

مهم

توصیه می‌شود اسپرم‌های تازه استحصال‌شده را در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ذخیره‌سازی نمایید تا از کاهش کیفیت احتمالی آن‌ها جلوگیری شود. پیشنهاد می‌شود محلول‌های جلوگیری از تحرک و فعال‌سازی قبل از انجام آزمایش آماده شوند، هرچند محلول‌های آماده‌شده در فریزر نیز قابل نگهداری هستند. بسیار مهم است که از حرکت سلول‌ها[1] طی آزمایش CASA جلوگیری شود، زیرا در این حالت به‌علت ثبت تحرک اشتباه، پاسخ آزمایش صحیح نخواهد بود. اسپرم سوف حاج طرخان بسیار غلیظ می‌باشد و لازم است در هنگام نمونه‌برداری از آن‌ها از سرسمپلرهایی که نوک آن‌ها بریده‌شده استفاده شود. پس از نمونه‌برداری از هر اسپرم باید سرسمپلر مورد استفاده تعویض گردد. تعداد سلول مناسب برای مشاهده در میدان دید مورد بررسی ۲۰۰ تا ۵۰۰ عدد است. توصیه می‌شود تمامی نمونه‌ها در ۲ یا ۳ تکرار ارزیابی شوند. پس از ارزیابی یا فعال‌سازی هر نمونه، محفظه قرارگیری نمونه‌ها[2] و اسلایدهای پوشاننده محفظه باید با دستمال مخصوص[3] تمیز شوند (برای جلوگیری از خراش سطح محفظه یا اسلاید). سلول اسپرم پس از فعال‌سازی به‌طور میانگین می‌تواند ۳۰ ثانیه به تحرک خود ادامه دهد (Bernáth et al. 2015a).

موارد لازم:

- لوله‌های اپندورف برای محلول‌ها
- نشانه‌گذار (برای علامت‌گذاری لوله‌ها)
- سمپلر و سرسمپلر (۱۰-۱ و ۱۰۰-۱۰ میکرولیتر)
- محلول جلوگیری از تحرک اصلاح‌شده Lahnsteiner (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO4 × 7H2O, 1 mM CaCl2 × 2H2O, 20 mM Tris, pH 8 Lahnsteiner) (2011; Bernáth et al. 2015a
- محلول فعال‌سازی اصلاح‌شده Lahnsteiner (75 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgSO4 × 7H2O, 1 mM CaCl2 × 2H2O, 20 mM Tris, pH 8 Lahnsteiner) (2011; Bernáth et al. 2015a) مخلوط شده با ۰/۰۱ گرم در میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin)

1. Drifting of cells
2. Chamber
3. Precision wipes

- سیستم CASA یا میکروسکوپ نوری
- محفظه شمارش (برای CASA) یا لام معمولی (برای میکروسکوپ نوری)
- محفظه Styrofoam به همراه یخ خردشده (ذخیره اسپرم)
- دستمال مخصوص
- قیچی (در صورت نیاز برای برش نوک سرسمپلر)

روش انجام آزمایش:

۱. اسپرم تازه یا انجمادزدایی شده را روی یخ قرار دهید.
۲. سیستم CASA یا میکروسکوپ نوری را روشن نمایید.
۳. محفظه شمارش یا لام‌های مورد استفاده دیگر را در محل مورد نظر میکروسکوپ قرار دهید.
۴. برای اسپرم تازه: ۲ میکرولیتر اسپرم را در ۱۰۰ میکرولیتر محلول جلوگیری از تحرک رقیق نمایید (در برخی موارد سرسمپلر با نوک بریده شده مورد نیاز می‌باشد).
۵. ۲۰ میکرولیتر از محلول فعال‌سازی را روی محفظه مورد نظر اضافه نمایید.
۶. ۱ میکرولیتر از اسپرم تازه رقیق‌سازی شده یا انجمادزدایی شده را به محلول فعال‌سازی اضافه نمایید و به‌خوبی مخلوط نمایید.
۷. نمونه آماده‌سازی‌شده را با استفاده از سیستم CASA یا میکروسکوپ نوری معمولی طی مدت ۱۰ ثانیه بررسی نمایید.

منابع

Abdulfatah A, Fontaine P, Kestemont P, Gardeur J-N, Marie M (2011) Effects of photothermal kinetics and amplitude of photoperiod decrease on the induction of the reproduction cycle in female Eurasian perch *Perca fluviatilis*. Aquaculture 322–323:169–176. doi:10.1016/j. aquaculture.2011.09.002

Alix M, Schaerlinger B, Ledoré Y, Chardard D, Fontaine P (2013) Developmental staging and deformities characterization of the Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. Commun Agric Appl Biol Sci 78:12–14

Barton BA (2002) Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. Integr Comp Biol 42:517–525. doi:10.1093/icb/42.3.517

Bernáth G, Bokor Z, Kása E, Várkonyi L, Hegyi Á, Kollár T, Urbányi B, Żarski D, Radóczi Ifj J, Horváth Á (2015a) Comparison of two different methods in the cryopreservation of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) sperm. Cryobiology 70:76–78. doi:10.1016/j.cryobiol.2014.12.003

Bernáth G, Żarski D, Krejszeff S, Palińska-Żarska K, Bokor Z, Król J, Kollár T, Kucharczyk D, Urbányi B, Horváth Á (2015b) Optimization of conditions for the cryopreservation of Eurasian perch (*Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758) sperm. J Appl Ichthyol 31:94–98. doi:10.1111/ jai.12740

Bobe J, Labbé C (2010) Egg and sperm quality in fish. Gen Comp Endocrinol 165:535–548. doi:10.1016/j.ygcen.2009.02.011

Castets M-DD, Schaerlinger B, Silvestre F, Gardeur J-NN, Dieu M, Corbier C, Kestemont P, Fontaine P (2012) Combined analysis of *Perca fluviatilis* reproductive performance and oocyte proteomic profile. Theriogenology 78(432–442):442–413. doi:10.1016/j. theriogenology.2012.02.023

Cejko BI, Kowalski RK, Żarski D, Dryl K, Targońska K, Chwaluczyk R, Kucharczyk D, Glogowski J (2012) The influence of the length of time after hormonal treatment with [(d-Ala6, Pro9 NEt)- mGnRH+metoclopramide] i.e. Ovopel on barbel *Barbus barbus* (L.) milt quality and quantity indicators. J Appl Ichthyol 28:249–253. doi:10.1111/j.1439-0426.2011.01923.x

Dabrowski K, Ciereszko A, Ramseyer L, Culver D, Kestemont P (1994) Effects of hormonal treatment on induced spermiation and ovulation in the yellow perch (*Perca flavescens*). Aquaculture 120:171–180. doi:10.1016/0044-8486(94)90231-3

Fauvel C, Suquet M, Cosson J (2010) Evaluation of fish sperm quality. J Appl Ichthyol 26:636–643. doi:10.1111/j.1439-0426.2010.01529.x

Fontaine P, Pereira C, Wang N, Marie M (2006) Influence of pre-inductive photoperiod variations on Eurasian perch *Perca fluviatilis* broodstock response to an inductive photothermal program. Aquaculture 255:410–416. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.12.025

Henrotte E, Kaspar V, Rodina M, Psenicka M, Linhart O, Kestemont P (2010a) Dietary n-3/n-6 ratio affects the biochemical composition of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) semen but not indicators of sperm quality. Aquac Res 41:e31–e38. doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02452.x

Henrotte E, Mandiki RSNM, Prudencio AT, Vandecan M, Mélard C, Kestemont P (2010b) Egg and larval quality, and egg fatty acid composition of Eurasian perch breeders (*Perca fluviatilis*) fed different dietary DHA/EPA/AA ratios. Aquac Res 41:e53–e61. doi:10.1111/ j.1365-2109.2009.02455.x

Kouril J, Linhart O, Relot P (1997) Induced spawning of perch by means of a GnRH analogue. Aquac Int 5:375–377

Kucharczyk D, Kujawa R, Mamcarz A, Skrzypczak A, Wyszomirska E (1996) Induced spawning in perch, *Perca fluviatilis* L. using carp pituitary extract and HCG. Aquac Res 27:847–852. doi:10.1046/j.1365-2109.1996.t01-1-00802.x

Kucharczyk D, Kujawa R, Mamcarz A, Skrzypczak A, Wyszomirska E (1998) Induced spawning in perch, *Perca fluviatilis* L., using FSH + LH with pimozide or metoclopramide. Aquac Res 29:131–136. doi:10.1046/j.1365-2109.1998.00949.x

Lahnsteiner F (2000) Morphological, physiological and biochemical parameters characterizing the over-ripening of rainbow trout eggs. Fish Physiol Biochem 23:107–118. doi:10.1023/ A:1007839023540

Lahnsteiner F (2011) Spermatozoa of the teleost fish *Perca fluviatilis* (perch) have the ability to swim for more than two hours in saline solutions. Aquaculture 314:221–224. doi:10.1016/j. aquaculture.2011.02.024

Migaud H, Fontaine P, Kestemont P, Wang N, Brun-Bellut J (2004) Influence of photoperiod on the onset of gonadogenesis in Eurasian perch *Perca fluviatilis*. Aquaculture 241:561–574. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.07.031

Milla S, Douxfils J, Mandiki SNM, Saroglia M (2015) Corticosteroids and the stress response in percid fish. In: Kestemont P, Dąbrowski K, Summerfelt RC (eds) Biology and culture of percid fishes, principles and practices. Springer, Dordrecht, p 891

Samarin AM, Ahmadi MR, Azuma T, Rafiee GR, Amiri BM, Naghavi MR (2008) Influence of the time to egg stripping on eyeing and hatching rates in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* under cold temperatures. Aquaculture 278:195–198. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.03.034

Samarin AM, Amiri BM, Soltani M, Nazari RM, Kamali A, Naghavi MR (2011) Effects of post-ovulatory oocyte ageing and temperature on egg quality in kutum *rutilus frisii kutum*. World Appl Sci J 15:14–18

Schaerlinger B, Żarski D (2015) Evaluation and improvements of egg and larval quality in percid fishes. In: Kestemont P, Dabrowski K, Summerfelt RC (eds) Biology and culture of percid fishes. Springer, Dordrecht, pp 193–223

Schreck CB, Contreras-Sanchez W, Fitzpatrick MS (2001) Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. Aquaculture 197:3–24

Shields RJ, Brown NP, Bromage NR (1997) Blastomere morphology as a predictive measure of fish egg viability. Aquaculture 155:1–12. doi:10.1016/S0044-8486(97)00105-1

Targońska K, Szczerbowski A, Żarski D, Łuczyński MJ, Szkudlarek M, Gomułka P, Kucharczyk D (2014) Comparison of different spawning agents in artificial out-of-season spawning of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L. Aquac Res 45:765–767. doi:10.1111/are.12010

Vallin L, Nissling A (1998) Cell morphology as an indicator of viability of cod eggs – results from an experimental study. Fish Res 38:247–255. doi:10.1016/S0165-7836(98)00157-X

Żarski D, Palińska K, Targońska K, Bokor Z, Kotrik L, Krejszeff S, Kupren K, Horváth Á, Urbányi B, Kucharczyk D (2011) Oocyte quality indicators in Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L., during reproduction under controlled conditions. Aquaculture 313:84–91. doi:10.1016/j. aquaculture.2011.01.032

Żarski D, Krejszeff S, Palińska K, Targońska K, Kupren K, Fontaine P, Kestemont P, Kucharczyk D (2012) Cortical reaction as an egg quality indicator in artificial reproduction of pikeperch, *Sander lucioperca*. Reprod Fertil Dev 24:843. doi:10.1071/RD11264

۹ لقاح آزمایشگاهی

پیشینهٔ علمی

لقاح آزمایشگاهی تکنیکی است که طی آن گامت‌های بالغ در معرض محیطی قرار می‌گیرند که سبب فعال شدن اسپرم و تخمک می‌شود (Żarski et al. 2014). در مطالعات به این محیط محلول فعال‌سازی (AS) گفته می‌شود (Krise et al. 1995). در این مرحله از تولیدمثل کنترل‌شده، مداخله انسانی در موفقیت فرآیند نقش کلیدی دارد. با تعدیل نسبت مناسب اسپرم به تخمک، انتخاب محلول فعال‌کننده صحیح و همچنین از طریق در کنار هم قراردادن گامت‌ها با روش مناسب، تمامی تخمک‌هایی که صلاحیت توسعه را داشته باشند با بالاترین احتمال بارور خواهند شد. سال‌های طولانی است که روش لقاح آزمایشگاهی در ماهیان استخوانی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Radziwoński 1852; Billard et al. 1974; Woynarovich and Woynarovich 1980). با این‌حال، خصوصیات زیستی گامت‌ها در بین گونه‌های مختلف متفاوت است. بنابراین، برای اطمینان از دستیابی به بالاترین کارایی، توسعه روش لقاح باید برای هر گونه به‌صورت جداگانه انجام گیرد (Żarski et al. 2012a; 2014; 2015). این امر به‌ویژه در مورد گونه‌های جدیدی که در آبزی‌پروری مورد استفاده قرار می‌گیرند و همچنین گونه‌هایی که دارای گامت‌هایی با خصوصیات خاص هستند بسیار بااهمیت است. هر دو حالت بیان‌شده در سوف حاج طرخان قابل مشاهده می‌باشد، به‌طوری‌که هم استفاده از آن به‌عنوان یک گونه مناسب برای آبزی‌پروری در حال افزایش است و هم دارای تخمک‌هایی با ساختاری منحصربه‌فرد است (برای مشاهده جزئیات بیشتر به فصل ۶ مراجعه کنید).

روش فنی لقاح آزمایشگاهی

در عملیات آبزی‌پروری، روش لقاح آزمایشگاهی، شامل مخلوط‌کردن گامت‌ها باهم به‌روش خشک و سپس فعال‌کردن گامت‌ها به‌وسیله اضافه کردن محلول فعال‌سازی است (Żarski et al. 2015). با این‌حال، در سوف حاج طرخان مشخص شده است که در چنین روشی (استفاده از آب کارگاه به‌عنوان محلول فعال‌سازی) در مقایسه با حالتی که تخمک‌ها ابتدا با محلول فعال‌سازی فعال می‌شوند و بارورسازی ۱۵ ثانیه پس از فعال شدن تخمک‌ها انجام می‌گیرد درصد لقاح

پایین‌تری مشاهده می‌شود (Żarski et al. 2012a). این حالت احتمالاً از این واقعیت ناشی می‌شود که تخمک‌های سوف حاج طرخان درون ساختار استوانه‌ای ژلاتین مانندی[1] قرار دارند. علاوه بر این، تخمک‌ها معمولاً یکدیگر را می‌پوشانند که این عوامل سبب می‌شود مخلوط کردن آن‌ها با اسپرم بسیار دشوار باشد. در این حالت پس از اضافه کردن محلول فعال‌سازی، تخمک‌ها هنوز هم‌پوشانی دارند و تا دستیابی به زمانی که تخمک‌ها کاملاً در محلول فعال‌سازی پراکنده شوند و کل روبان تخمک‌ها حالتی پیدا کرده باشد که امکان در معرض قرارگیری همه تخمک‌ها با محلول فعال‌سازی فراهم شود، تحرک اسپرم‌ها به‌میزان قابل‌توجهی کاهش می‌یابد. بنابراین، در عملیات لقاح سوف حاج طرخان اسپرم باید با تأخیر ۱۵ تا ۳۰ ثانیه‌ای پس از فعال‌سازی تخمک‌ها اضافه شود.

فعال‌سازی گامت‌ها

تخمک‌های ماهیان استخوانی در مدت زمان مشخصی پس از قرارگیری در معرض آب قابلیت لقاح خود را از دست می‌دهند (Coward et al. 2002; Minin and Ozerova 2008). مدت زمانی که تخمک‌ها قابلیت لقاح خود را حفظ می‌کنند در گونه‌های مختلف متفاوت است. به‌عنوان مثال، پس از استفاده از آب کارگاه برای فعال‌سازی، تخمک‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان حدود ۳۰ ثانیه قابلیت لقاح دارند (Liley et al. 2002)، تخمک‌های کپور معمولی در این حالت تقریباً ۱ دقیقه قابلیت لقاح داشته (Żarski et al. 2015) و تخمک‌های سوف حاج طرخان حتی تا ۲ دقیقه و ۳۰ ثانیه قابلیت لقاح خود را حفظ می‌کنند (Żarski et al. 2012a). این تفاوت‌ها در مدت زمان حفظ قابلیت لقاح نشان می‌دهد که نیاز به اصلاحات جزئی اما بسیار مهم در عملیات لقاح هر گونه به‌صورت اختصاصی وجود دارد و این امر در سوف ماهیان نیز صدق می‌کند. جالب توجه است که طبق اطلاعات حاضر، مدت زمان حفظ قابلیت لقاح در تخمک‌های سوف حاج طرخان بالاترین میزان در ماهیان آب شیرین می‌باشد.

اسپرم ماهیان (به استثنای گونه‌های زنده‌زا) پس از تماس با محیط آبی فعال می‌شوند. تاکنون ۳ روش فعال‌سازی در اسپرم ماهیان شناسایی شده است. اسپرماتوزوآ در اکثر ماهیان آب شیرین با کاهش میزان اسمولالیته فعال می‌شوند، در گونه‌های دریایی فعال‌سازی با افزایش اسمولالیته صورت می‌گیرد و در آزادماهیان و ماهیان خاویاری فعال‌سازی با کاهش غلظت یون پتاسیم در فضای خارج سلولی انجام می‌پذیرد (Morisawa 2008). تمامی این پدیده‌ها زنجیره‌ای پیچیده از وقایع را ایجاد می‌کنند که در نهایت به تولید پروتئینی به نام Dynein در تاژک اسپرماتوزوآ منجر

1. Ribbon

می‌شود و نقش آن به‌طور مستقیم ایجاد حرکت در تاژک است. اسپرماتوزوآ در سوف حاج طرخان با کاهش اسمولالیته فعال می‌شود، بنابراین برای لقاح از مدل اصلی فعال‌سازی در ماهیان آب شیرین پیروی نمایید. مدت زمان حرکت فعال به غلظت (و همچنین اسمولالیته) محلول فعال‌سازی بستگی دارد که این دوره در آب معمولی کمتر از ۹۰ ثانیه و در محلول دارای اسمولالیته ۲۱۰ میلی‌اسمول در کیلوگرم تا بیش از ۱۲۰ دقیقه است (Lahnsteiner 2011).

مهم

مکانیزم فعال‌سازی تخمک ماهیان استخوانی آب شیرین هنوز مورد بحث می‌باشد و نظریه‌های مختلفی در این زمینه گزارش شده است (برای مشاهده جزئیات بیشتر به مطالعه Coward و همکاران (۲۰۰۲) مراجعه نمایید). بنابراین، مکانیزم فعال‌سازی در این کتابچه مورد بحث قرار نمی-گیرد، به‌جز این واقعیت که تخمک‌ها پس از تماس با آب توانایی لقاح خود را از دست می‌دهند. با این‌حال، پس از تماس تخمک‌های سوف حاج طرخان با آب، واکنش قشری[1] رخ می‌دهد (Żarski et al. 2012b) که با فعال شدن تخمک‌ها هم‌زمان می‌باشد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که تخمک‌های سوف حاج طرخان پس از تماس با آب فعال می‌شوند، اگرچه مکانیزم این فرآیند هنوز نامشخص است.

محلول‌های فعال‌سازی

طی سال‌های متمادی در عملیات تکثیر هنگام لقاح آزمایشگاهی از آب کارگاه به‌عنوان محلول فعال‌کننده استفاده می‌شد. با این‌حال، مشخص شد که مدت زمان فعالیت اسپرم و تخمک‌ها (هنگامی‌که تخمک‌ها قابلیت لقاح و اسپرم‌ها قابلیت تحرک داشته باشند) کاملاً به ترکیب محلول فعال‌کننده بستگی دارد (Krise et al. 1995; Żarski et al. 2012a; Cejko et al. 2013)، به‌طوری‌که اسمولالیته عامل اصلی تعیین‌کننده مدت زمان فعال بودن گامت‌ها است (Boryshpolets et al. 2009; Żarski et al. 2015).

با توجه به این واقعیت که اسمولالیته در دامنه صفر تا ۳۰۰ میلی‌اسمول در کیلوگرم، مدت زمان فعالیت اسپرم و تخمک همبستگی مثبتی با اسمولالیته دارد، غیرمنطقی است که برای لقاح از آب کارگاه که معمولاً اسمولالیته کمتر از ۵۰ میلی‌اسمول در کیلوگرم دارد استفاده شود. مشکل

1. Cortical reaction

دیگر استفاده از آب کارگاه به‌عنوان محلول فعال‌کننده این است که ترکیب آن در مراکز تکثیر مختلف متفاوت می‌باشد و معمولاً حتی در یک مرکز تکثیر نیز ترکیب آن ثابت نیست که باعث می شود مقایسه موفقیت لقاح در مراکز تکثیر مختلف و همچنین در سال‌های مختلف غیرممکن شود. بنابراین، توصیه می‌شود از محلول‌های فعال‌کننده استاندارد استفاده شود که این امر می‌تواند به‌طور قابل‌توجهی موفقیت لقاح را بهبود بخشد. محلول‌های فعال‌کننده مختلفی در سوف حاج طرخان مورد آزمایش قرارگرفته و استفاده از آن‌ها نتایج متفاوتی در پی داشته است (Żarski et al. 2012a; Sarosiek et al. unpublished). ترکیبات برخی از محلول‌های فعال‌کننده مؤثر در ادامه ارائه شده است (Sarosiek et al. unpublished):

۱. محلول واینارووِیچ (0.3 % urea, 0.4 % NaCl)
۲. 20 mM Tris, 40 mM NaHCO3, pH 8.5
۳. 10 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 8.0
۴. 80 mM NaCl, 20 mM KCl, 10 mM Tris, pH 8.0

همان‌طور که مشاهده می‌شود ترکیب اکثر محلول‌های فعال‌کننده آزمایش شده به‌نوعی پیچیده است و به‌عنوان‌مثال در مواردی مانند خنثی کردن[1] به دقت خاصی برای آماده‌سازی نیاز دارد. این امر باعث می‌شود تا به‌کارگیری محلول‌های فعال‌سازی در شرایط معمول کارگاهی بسیار دشوار شود. با این‌حال، با توجه به موفقیت لقاح آزمایشگاهی فواید استفاده از محلول فعال‌سازی استاندارد به‌میزان قابل‌توجهی زیاد است. بنابراین، توصیه می‌شود برای عملیات تکثیر از ساده‌ترین محلول فعال‌کننده که محلول واینارووِیچ است استفاده شود. این محلول فعال‌کننده، ترکیبی ساده از اوره[2] و کلرید سدیم (NaCl) است که به‌راحتی بدون نیاز به ترکیبات شیمیایی خاص قابل آماده‌سازی است. مهم‌تر از همه، ثابت شده است که استفاده از این محلول فعال‌سازی در تکثیر کنترل‌شده سوف حاج طرخان بسیار مؤثر می‌باشد (Żarski et al. 2012a).

1. Buffering
2. Karbamid

مهم

۱. برای آماده‌سازی محلول واینارووِیچ باید از آب مقطر استفاده شود. به‌جای آب مقطر امکان استفاده از آب دیونیزه شده[1] و یا آب حاصل از فرآیند اسمز معکوس[2] نیز وجود دارد. استفاده از آب کارگاه می‌تواند سبب افزایش اسمولالیته محلول فعال‌کننده شود و از فعال‌شدن مؤثر گامت‌ها جلوگیری نماید.
۲. برای فعال‌سازی مناسب اسپرم و تخمک، اسمولالیته بیش از ۳۰۰ میلی‌اسمول در کیلوگرم بسیار بیشتر از مقدار مورد نیاز است. بنابراین استفاده از محلول‌های فعال‌کننده با اسمولالیته بالا[3] می‌تواند موفقیت لقاح را کاهش دهد و یا از لقاح کامل جلوگیری نماید.

نسبت اسپرم به تخمک

در بسیاری از گونه‌های ماهیان ثابت شده است که یکی از مهم‌ترین پارامترهای تأثیرگذار بر موفقیت لقاح، نسبت اسپرم به تخمک است (Rinchard et al. 2005; Butts et al. 2009). متأسفانه اغلب این جنبه در عملیات تکثیر نادیده گرفته می‌شود و میزان استفاده از اسپرم به‌صورت چشمی برآورد می‌شود (به‌صورت تخمینی). با این‌حال، در هر دو حالت استفاده از اسپرم زیاد یا کم، ممکن است موفقیت کل عملیات تولیدمثل کنترل‌شده کاهش یابد. استفاده از اسپرم بیش‌ازحد زیاد معمولاً لزوم استحصال اسپرم بیشتر را ایجاب می‌کند که به‌نوبه خود باعث بهره‌برداری بیش‌ازحد از ذخیره مولدین نر می‌شود که به‌طور مستقیم بر وضعیت آن‌ها اثر می‌گذارد و درنتیجه می‌تواند موجب افزایش مرگ‌ومیر ماهی‌ها شود. این امر می‌تواند با استفاده از تعداد نرهای بیشتر طی دوره تکثیر برطرف شود. با این‌حال، موجب افزایش هزینه‌های تحریک تخم‌ریزی مولدین می‌شود. از طرفی، علت مشاهده درصد لقاح پایین طی فرآیند تکثیر معمولاً استفاده از حجم خیلی کم اسپرم است (Rinchard et al. 2005; Linhart et al. 2006; Litvak et al. 2008) و این امر بر تعداد لاروهای تولیدی تأثیر منفی می‌گذارد. بنابراین، در تدوین پروتکل‌های استاندارد تکثیر باید استفاده از مقدار مناسب اسپرم مدنظر قرار گیرد و توجه ویژه به این موضوع امری ضروری است.

مشخص شده است که اگر میزان تحرک اسپرم بیش از ۸۰ درصد باشد نسبت مطلوب اسپرم به تخمک در سوف حاج طرخان ۲۵۰ هزار اسپرماتوزوآ به ازای هر تخمک می‌باشد (Bernáth et al.

1. Deionized
2. Reverse osmosis water
3. Hyperosmotic

unpublished). غلظت اسپرماتوزوآ در سوف حاج طرخان در دامنه ۳/۳ تا ۶۶/۵ میلیارد در هر میلی‌لیتر است (جدول ۹-۱). بر همین اساس، توصیه مشخص و ثابت برای مقدار اسپرم ضروری مورد استفاده در فعالیت‌های تکثیر دشوار است. با در نظر گرفتن این موضوع و همچنین این واقعیت که تعداد تخمک سوف حاج طرخان طبق اندازه مولد ماده در هر گرم بین ۳۵۰ تا ۷۰۰ عدد است (Bernáth et al. unpublished, Żarski et al. unpublished)، توصیه می‌شود ابتدا غلظت اسپرم و همچنین تعداد تخمک در گرم (در روبان تخمک خشک) را بررسی کنید و سپس از توصیه های مندرج در جدول ۹-۲ پیروی نمایید.

جدول ۹-۱. غلظت‌های اسپرم (به‌صورت محدوده یا میانگین) سوف حاج طرخان بر اساس مطالعات نویسندگان مختلف

مولد	غلظت اسپرم (10^9 × در هر میلی‌لیتر)			منبع
	حداقل	حداکثر	میانگین ± انحراف معیار	
اهلی‌شده[a]	۲۷/۹	۴۲/۰	–	Rougeot et al. (2004)
اهلی‌شده	۲۹/۸	۳۹/۱	–	Rougeot et al. (2004)
وحشی	۲۱/۷	۳۲/۶	–	Król et al. (2006)
وحشی	۱۳	۱۹	–	Lahnsteiner et al. (1995)
پرورش‌یافته در استخر	۳/۳	۴۳/۹	–	Alavi et al. (2007)
پرورش‌یافته در استخر	۳۶/۰	۶۶/۵	–	Alavi et al. (2010)
وحشی[b]	–	–	۴۵/۳ ± ۵/۴	Rodina et al. (2008)
وحشی	–	–	۳۷/۸ ± ۶/۳	Rodina et al. (2008)
پرورش‌یافته در استخر	۲۹/۶	۳۷/۸	–	Żarski et al. (منتشرنشده)
وحشی	۲۳/۴	۴۵/۲	–	Bernáth et al. (منتشرنشده)

[a] به‌منظور تجزیه‌وتحلیل از اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته (neomales) به‌روش هورمونی استفاده‌شده است

[b] از اسپرم به‌دست‌آمده از بیضه‌های مولدین نر تغییر جنسیت یافته (neomales) به‌روش هورمونی استفاده‌شده است

مهم

مقادیر جدول ۹-۲ به‌صورت منتقدانه ارائه شده‌اند، حجم‌های کمتر (مقادیر آستانه) اسپرم که موفقیت لقاح را تضمین می‌کنند برای اهداف علمی مناسب‌تر می‌باشند. پیشنهاد می‌شود برای اهداف تجاری از ۱ میلی‌لیتر اسپرم تازه استحصال‌شده به ازای هر ۱۰۰ گرم تخمک خشک استفاده شود که در این حالت می‌توان اطمینان داشت که درصد لقاح بالا خواهد بود. با این‌حال، در این حالت غلظت خیلی کم اسپرم باید به‌عنوان عامل محدودکننده احتمالی هر گونه عدم موفقیت در لقاح در نظر گرفته شود.

جدول ۹-۲. حجم اسپرم (میلی‌لیتر اسپرم به ازای هر ۱۰۰ گرم تخمک خشک) توصیه‌شده برای استفاده در عملیات لقاح آزمایشگاهی تخمک‌های سوف حاج طرخان و رابطه آن با غلظت اسپرم ($۱۰^{۹}$× اسپرماتوزوآ در هر میلی‌لیتر) و تعداد در گرم تخمک خشک

تعداد تخمک در گرم	غلظت اسپرم ($۱۰^{۹}$ × اسپرماتوزوآ در هر میلی‌لیتر)												
	۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵	۴۰	۴۵	۵۰	۵۵	۶۰	۶۵
۳۵۰	۱/۷۵	۰/۸۸	۰/۵۸	۰/۴۴	۰/۳۵	۰/۲۹	۰/۲۵	۰/۲۲	۰/۱۹	۰/۱۸	۰/۱۶	۰/۱۵	۰/۱۳
۴۰۰	۲/۰۰	۱/۰۰	۰/۶۷	۰/۵۰	۰/۴۰	۰/۳۳	۰/۲۹	۰/۲۵	۰/۲۲	۰/۲۰	۰/۱۸	۰/۱۷	۰/۱۵
۴۵۰	۲/۲۵	۱/۱۳	۰/۷۵	۰/۵۶	۰/۴۵	۰/۳۸	۰/۳۲	۰/۲۸	۰/۲۵	۰/۲۳	۰/۲۰	۰/۱۹	۰/۱۷
۵۰۰	۲/۵۰	۱/۲۵	۰/۸۳	۰/۶۳	۰/۵۰	۰/۴۲	۰/۳۶	۰/۳۱	۰/۲۸	۰/۲۵	۰/۲۳	۰/۲۱	۰/۱۹
۵۵۰	۲/۷۵	۱/۳۸	۰/۹۲	۰/۶۹	۰/۵۵	۰/۴۶	۰/۳۹	۰/۳۴	۰/۳۱	۰/۲۸	۰/۲۵	۰/۲۳	۰/۲۱
۶۰۰	۳/۰۰	۱/۵۰	۱/۰۰	۰/۷۵	۰/۶۰	۰/۵۰	۰/۴۳	۰/۳۸	۰/۳۳	۰/۳۰	۰/۲۷	۰/۲۵	۰/۲۳
۶۵۰	۳/۲۵	۱/۶۳	۱/۰۸	۰/۸۱	۰/۶۵	۰/۵۴	۰/۴۶	۰/۴۱	۰/۳۶	۰/۳۳	۰/۳۰	۰/۲۷	۰/۲۵
۷۰۰	۳/۵۰	۱/۷۵	۱/۱۷	۰/۸۸	۰/۷۰	۰/۵۸	۰/۵۰	۰/۴۴	۰/۳۹	۰/۳۵	۰/۳۲	۰/۲۹	۰/۲۷

جنبه‌های عملی لقاح آزمایشگاهی

موارد لازم:

- تخمک‌های خشک جمع‌آوری شده
- اسپرم استحصال‌شده (حداقل از ۳ مولد نر)
- ترازوی دقیق (حداقل با دقت ۱± گرم)
- ظرف پلاستیکی برای لقاح
- میزکار

- محلول فعال‌سازی (توصیه می‌شود از محلول واینارورویچ استفاده شود: ۰/۴ گرم کلرید سدیم به همراه ۰/۳ گرم اوره به ازای ۱ لیتر آب مقطر) با دمای نزدیک به آب واحد انکوباسیون (۲± درجه سانتی‌گراد)
- آب کارگاه (از واحد انکوباسیون)
- انکوباتورها و واحد انکوباسیون (به فصل ۱۰ مراجعه نمایید)

روش لقاح:

۱. تخمک‌ها را از ظرف یا ظروف نگهداری (مکان ذخیره‌سازی تخمک‌ها) به ظرف خشک بزرگ‌تر منتقل نمایید. اندازه ظرف به تعداد روبان‌های تخمکی که باید بارور شوند بستگی دارد. با این‌وجود، اندازه ظرف باید به‌صورتی باشد که به‌راحتی بتوان با استفاده از دست درون ظرف تخمک‌ها را مخلوط نمود.
۲. محلول فعال‌کننده را به تخمک‌ها اضافه نمایید، به‌طوری‌که تخمک‌ها آزادانه در کل حجم محلول پراکنده شوند. به‌آرامی تخمک‌ها را به‌مدت ۱۵ ثانیه هم بزنید و اجازه دهید در کل حجم ظرف پراکنده شوند.
۳. ۱۵ تا ۳۰ ثانیه پس از فعال‌سازی تخمک‌ها (هرچه روبان تخمک بزرگ‌تر باشد و یا تعداد روبان‌ها برای بارورسازی بیشتر باشد اسپرم باید دیرتر اضافه شود) اسپرم را به ظرف اضافه نمایید و به‌مدت ۲ دقیقه تخمک‌ها را به‌آرامی هم بزنید.
۴. محلول فعال‌سازی را از ظرف خارج نموده (تخمک‌ها را خارج نکنید) و ظرف را با آب تازه پر نمایید (با آب واحد انکوباسیون).
۵. برای جذب آب، تخم‌ها را به مدت ۳۰ دقیقه درون ظرف بگذارید و توجه کنید که دمای آب باید طی این مدت ثابت باشد (دما نباید بیش از ۲ درجه سانتی‌گراد افزایش یابد)، در صورت نیاز، آب ظرف را تعویض نمایید.
۶. پس از ۳۰ دقیقه (که باعث می‌شود تخم‌ها با جذب آب سفت شوند و مقاومت لازم برای دستکاری را به‌دست آورند) تخم‌ها را به‌آرامی به انکوباتورها منتقل نمایید.

توصیه عملی:

توصیه می‌شود همیشه قبل از عملیات بررسی آمادگی مولدین ماده برای تخم‌کشی، تقریباً ۲ میلی‌لیتر اسپرم استحصال نمایید (با رقیق‌کننده یا بدون آن). بدین‌صورت، طی دستکاری‌ها هنگامی‌که ماهی به‌صورت خودبه‌خودی تخمک‌ها را رهاسازی می‌کند می‌توان تخمک‌ها را سریعاً به ظرف انتقال داده و به‌وسیله اسپرمی که از قبل استحصال‌شده بارور نمود. توجه به این دو موضوع بسیار مهم است که می‌توان اسپرم را برای مدت زمان نسبتاً طولانی ذخیره‌سازی نمود (با استفاده از رقیق‌کننده‌ها و یا بدون آن‌ها؛ به فصل ۷ مراجعه نمایید)، درحالی‌که تخمک‌ها تقریباً تا ۲ دقیقه و ۳۰ ثانیه پس از تماس با آب کارگاه قابلیت لقاح خواهند داشت. درنتیجه، در نظر گرفتن این موضوع یک امکان عملی برای بارورسازی مؤثر تخمک‌های رهاسازی شده طی دستکاری‌ها ایجاد می‌کند.

منابع

Alavi SMH, Rodina M, Policar T, Kozak P, Psenicka M, Linhart O (2007) Semen of *Perca fluviatilis* L.: sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility. Theriogenology 68:276–283. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.05.045

Alavi SMH, Rodina M, Hatef A, Stejskal V, Policar T, Hamáčková J, Linhart O (2010) Sperm motility and monthly variations of semen characteristics in *Perca fluviatilis* (Teleostei: Percidae). Czech J Anim Sci 55:174–182

Billard R, Petit J, Jalabert B, Szollosi D (1974) Artifical insemination in trout using a sperm diluant. In: Blaxter JHS (ed) The early life history of fish. Springer, Berlin/Heidelberg, pp 715–723 j.1749-7345.1995.tb00833.x

Król J, Glogowski J, Demska-Zakes K, Hliwa P (2006) Quality of semen and histological analysis of testes in Eurasian perch *Perca fluviatilis* L. during a spawning period. Czech J Anim Sci 51:220–226

Lahnsteiner F (2011) Spermatozoa of the teleost fish *Perca fluviatilis* (perch) have the ability to swim for more than two hours in saline solutions. Aquaculture 314:221–224. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.02.024

Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T, Patzner RA (1995) Fine structure and motility of spermatozoa and composition of the seminal plasma in the perch. J Fish Biol 47:492–508. doi:http://dx.doi.org/10.1006/jfbi.1995.0154

Liley NR, Tamkee P, Tsai R, Hoysak DJ (2002) Fertilization dynamics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effect of male age, social experience, and sperm concentration and motility on in vitro fertilization. Can J Fish Aquat Sci 152:144–152. doi:10.1139/f01-202

Linhart O, Rodina M, Kocour M, Gela D (2006) Insemination, fertilization and gamete management in tench, *Tinca tinca* (L.). Aquac Int 14:61–73. doi:10.1007/s10499-005-9014-1

Litvak MK, Butts IAE, Rideout RM (2008) Cryopreservation of sperm from Winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. In: Methods in reproductive aquaculture. CRC Press, Boca Raton, pp 459–462

Minin AA, Ozerova SG (2008) Spontaneous activation of fish eggs is abolished by protease inhibitors. Russ J Dev Biol 39:293–296. doi:10.1134/S1062360408050056

Morisawa M (2008) Adaptation and strategy for fertilization in the sperm of teleost fish. J Appl Ichthyol 24:362–370. doi:10.1111/j.1439-0426.2008.01126.x

Radziwoński J (1852) O sztucznem zapładnianiu ikry rybiej w zastosowaniu do chowu pstrągów: rzecz czytana na posiedzeniu Towarzystwa nauk

Rinchard J, Dabrowski K, Van Tassell JJ, Stein RA (2005) Optimization of fertilization success in *Sander vitreus* is influenced by the sperm: egg ratio and ova storage. J Fish Biol 67:1157–1161. doi:10.1111/j.0022-1112.2005.00800.x

Rodina M, Policar T, Linhart O, Rougeot C (2008) Sperm motility and fertilizing ability of frozen spermatozoa of males (XY) and neomales (XX) of perch (*Perca fluviatilis*). J Appl Ichthyol 24:438–442. doi:10.1111/j.1439-0426.2008.01137.x

Rougeot C, Nicayenzi F, Mandiki SNM, Rurangwa E, Kestemont P, Mélard C (2004) Comparative study of the reproductive characteristics of XY male and hormonally sex-reversed XX male Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. Theriogenology 62:790–800. doi:10.1016/j.theriogenology.2003.12.002

Woynarovich E, Woynarovich A (1980) Modified technology for elimination of stickiness of common carp *Cyprinus carpio* eggs. Aquac Hung 2:19–21

Żarski D, Horváth Á, Kotrik L, Targońska K, Palińska K, Krejszeff S, Bokor Z, Urbányi B, Kucharczyk D (2012a) Effect of different activating solutions on the fertilization ability of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L., eggs. J Appl Ichthyol 28:967–972. doi:10.1111/jai.12098

Żarski D, Krejszeff S, Palińska K, Targońska K, Kupren K, Fontaine P, Kestemont P, Kucharczyk D (2012b) Cortical reaction as an egg quality indicator in artificial reproduction of pikeperch, *Sander lucioperca*. Reprod Fertil Dev 24:843. doi:10.1071/RD11264

Żarski D, Horváth Á, Bernáth G, Palińska-Zarska K, Krejszeff S, Müller T, Kucharczyk D (2014) Application of different activating solutions to in vitro fertilization of crucian carp, *Carassius carassius* (L.), eggs. Aquac Int 22:173–184. doi:10.1007/s10499-013-9692-z

Żarski D, Cejko BI, Krejszeff S, Palińska-Żarska K, Horvath A, Sarosiek B, Judycka S, Kowalski RK, Łączyńska B, Kucharczyk D (2015) The effect of osmolality on egg fertilization in common carp, *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758. J Appl Ichthyol 31:159–163. doi:10.1111/jai.12739

Żarski D, Bernath G, Król J, Cejko BI, Bokor Z, Palińska-Żarska K, Milla S, Fontaine P, Krejszeff S. Hormonal manipulation improves spermiation in Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L., a freshwater teleostei fish. unpublished

۱۰ انکوباسیون و تخم‌گشایی

پیشینهٔ علمی

انکوباسیون جنین‌های درحال توسعه و کنترل فرآیند تخم‌گشایی آخرین مرحله تولیدمثل کنترل‌شده و اولین مرحله از کنترل چرخه زیستی ماهی است (Schaerlinger and Żarski 2015). فرآیند انکوباسیون، تمام اقداماتی که شرایط مناسب توسعه جنین‌ها تا رسیدن به مرحله تخم گشایی را فراهم می‌کند شامل می‌شود. در سایر ماهیان آب شیرین مانند سوف سفید، قبل از فرآیند انکوباسیون باید با استفاده از روش‌های خاصی چسبندگی تخم‌ها را از بین برد که معمولاً این امر برای انکوباسیون موفقیت‌آمیز بسیار با اهمیت است (Zakęś and Demska-Zakęś 2009; Żarski et al. 2015b). با این‌حال، با توجه به ویژگی‌های خاص تخم سوف حاج طرخان (ساختار روبان مانند در زمان تخم‌ریزی) هیچ‌گونه تیماری بعد از لقاح مورد نیاز نیست. به‌طورکلی، نگرانی اصلی طی انکوباسیون تخم‌های روبان مانند سوف حاج طرخان فراهم کردن چرخه آب به‌خوبی اکسیژن‌دهی شده در اطراف تخم‌ها می‌باشد. برای دستیابی به این هدف از انواع مختلفی از انکوباتورها استفاده می‌شود (Kucharczyk et al. 1996; Żarski et al. 2011).

به مجموعه روش‌هایی که به دستیابی به لاروهای تخم‌گشایی شده و آماده انتقال به واحد پرورش منجر می‌شود فرآیند تخم‌گشایی می‌گویند. در طی فرآیند تخم‌گشایی باید به جداسازی و حذف ساختار روبان مانند تخم‌ها (ساختارهای ژله مانند) با استفاده از مؤثرترین روش توجه ویژه نمود. درواقع این امر بسیار مهم است زیرا ساختار روبان مانند تخم‌ها درست قبل از آماده شدن لاروها برای خروج از تخم، نرم و سست شده (Formicki et al. 2009) و در این هنگام به یک توده ژله‌ای فاقد شکل تبدیل می‌شود که جداسازی آن‌ها بسیار دشوار است. بنابراین، اکیداً توصیه می شود که بر روند تخم‌گشایی نظارت بسیار دقیقی صورت گیرد. به‌خصوص به‌این‌علت که فرآیند تخم‌گشایی در سوف حاج طرخان معمولاً به‌صورت ناهم‌زمان رخ می‌دهد، به‌طوری‌که طول دوره انکوباسیون حتی در یک دسته تخم مشابه بین ۳ روز در دمای ۱۹ درجه سانتی‌گراد تا ۵ روز در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد می‌تواند متغیر باشد (Żarski et al. 2011, 2015a).

توسعه جنینی

در دمای ۱۲ تا ۱۳ درجه سانتی‌گراد اولین تقسیم سلولی ۳ ساعت پس از لقاح قابل مشاهده است. ۲۴ ساعت پس از لقاح جنین‌ها باید به مرحله بلاستولا[1] برسند که این مرحله در ادامه اولین مرحله اپی‌بولی[2] رخ می‌دهد و نشانگر آغاز مرحله گاسترولاسیون[3] است. این مرحله باید ۲ روز پس از آغاز انکوباسیون هنگامی‌که بلاستودرم[4] به‌طور کامل زرده را می‌پوشاند تکمیل شود (اپی‌بولی ۱۰۰ درصد). مراحل بعدی اندام‌زایی[5] و تقسیم‌بندی دم[6] هستند و تا زمانی که چشم‌ها رنگ-دانه‌دار[7] شوند به‌طول می‌انجامند. در سوف حاج طرخان لحظه خاصی که رنگ‌دانه چشم‌ها به‌وضوح در جنین قابل مشاهده می‌شود، درست قبل از تخم‌گشایی اتفاق می‌افتد. در این زمان توسعه مقدماتی خصوصیات ریخت‌شناختی[8] بسیاری از اندام‌ها تقریباً تکمیل شده و به‌طور قابل‌توجهی کند می‌شود (شکل ۱۰-۱).

تأیید موفقیت لقاح

طی ۳ روز اول انکوباسیون ممکن است تلفات جنینی قابل‌توجهی مشاهده شود (Alix et al. 2013). بنابراین، موفقیت لقاح نباید زودتر از ۷۲ ساعت پس از لقاح که جنین‌ها به اواخر مرحله نورولا[9] می‌رسند بررسی شود (هنگامی‌که قابلیت مشاهده بدن جنین در قسمت قطب حیوانی وجود دارد، همان‌طور که توسط Iwamatsu (۲۰۰۱) توضیح داده شده است). با این‌حال، باید به این موضوع توجه نمود که در این مرحله بسیاری از ناهنجاری‌های رایج دوره توسعه جنینی هنوز قابل تشخیص نیست. با توجه به این موضوع که معمولاً درصد تخم‌گشایی پایین‌تر از میزان لقاحی است که در مراحل توسعه اولیه برآورد می‌شود (Żarski et al. 2011; Alix et al. 2013; Schaerlinger and Żarski 2015)، موفقیت لقاح (نتیجه کلی کیفیت گامت که از روش‌های اعمال‌شده در تولیدمثل کنترل‌شده نشأت می‌گیرد و همچنین اثربخشی لقاح) باید در زمان تخم‌گشایی تأیید گردد. با این‌حال، لازم به تأکید است که حتی لاروهایی که قادر به تخم‌گشایی هستند می‌توانند از

1. Blastula
2. Epiboly
3. Gastrulation
4. Blastoderm
5. Organogenesis
6. Tail segmentation
7. Pigmentation
8. Morphogenesis
9. Neurula

لحاظ کیفیت متفاوت باشند، زیرا گزارش شده است که لاروهای ناقص نیز به‌صورت خودبه‌خود قادر به تخم‌گشایی می‌باشند (Żarski et al. 2011; Alix et al. 2013; Schaerlinger and Żarski 2015). در مطالعه‌ای، Castets و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که مقاومت لاروها در برابر گرسنگی و همچنین بازماندگی آن‌ها ۷ روز پس از تخم‌گشایی شاخص‌هایی هستند که کیفیت بالای تخم‌ها را توصیف می‌کنند. این امر بیانگر آن است که عملکرد دوره لاروی می‌تواند شاخصی قابل‌اطمینان‌تری از میزان لقاح و یا تخم‌گشایی باشد. در همین راستا، مطالعه‌ای که اخیراً منتشرشده گزارش نموده است که تعیین تعداد لاروها با کیسه شنای پر شده (لاروهایی که کیسه شنای خود را از هوا پر کرده‌اند) مطمئن‌ترین روش برای اثبات موفقیت تولیدمثل در سوف حاج طرخان است (Żarski et al. 2015c). این روش برآورد نتیجه تخم‌ریزی، لاروهای با کیفیت زیستی پایین را با دقت بسیار زیادی از کل توده لاروهای تولیدی جدا می‌نماید. این موضوع از این واقعیت ناشی می‌شود که لاروهایی که از کیفیت پایین‌تری برخوردارند در اغلب موارد قادر نیستند کیسه شنای خود را با هوا پر کنند و این یک رویداد حساس در چرخه زندگی ماهی است (Woolley and Qin 2010; Palińska-Żarska et al. 2014). بنابراین، توصیه می‌شود برای بررسی بهره‌وری تخم ریزی (در بررسی‌های علمی و تولیدات تجاری) از شاخص کارایی تخم‌ریزی[1] استفاده شود. این شاخص از طریق رابطه تعداد لاروهای دارای کیسه شنای پر شده با وزن بدن مولدین ماده تخم ریزی نموده محاسبه می‌شود و از کیفیت نهایی لاروها که از اثربخشی کل فرآیند تولیدمثل کنترل‌شده نشات می‌گیرد یک دید کلی ارائه می‌نماید.

شاخص کارایی تخم‌ریزی (SEI)

شاخص کارایی تخم‌ریزی در سوف حاج طرخان (Żarski et al. 2015c) رابطه بین تعداد لاروهای دارای کیسه شنای پر شده با ۱ کیلوگرم وزن بدن مولدین ماده تخم‌ریزی نموده را مشخص می‌نماید.

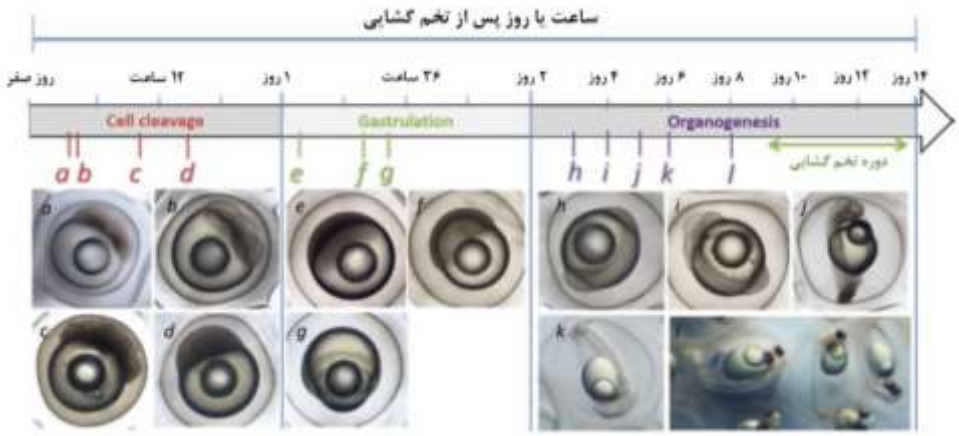
$$SEI = N / BWF$$

در این رابطه، N تعداد لارو دارای کیسه شنای پر شده و BWF وزن بدن مولدین ماده تخم‌ریزی نموده (به کیلوگرم) است.

1. Spawning efficiency index

توصیه عملی:

تخم‌های توسعه‌نیافته باید در سریع‌ترین زمان ممکن پس از تشخیص پایین بودن کیفیت تخم-ها جداسازی شوند. اگر امکان تشخیص در مراحل ابتدایی‌تر وجود نداشته باشد، در بررسی‌های ماکروسکوپی پس از مشاهده تخم‌های سفید (غیرشفاف)، روبان‌های مرده (یا بخش‌های مرده روبان ها) باید سریعاً جداسازی شوند. این عمل سبب می‌شود واحد پرورش در شرایط بهداشتی مناسبی نگهداری شود.



شکل ۱۰-۱. مراحل توسعه جنینی سوف حاج طرخان (*P. fluviatilis*). ویژگی‌های کلی به‌وسیله مشاهدات انجام‌شده در جنین‌های زنده طی انکوباسیون در دمای ۱۳ درجه سانتی‌گراد توصیف شده است (برای مشاهده جزئیات بیشتر به مطالعه Alix و همکاران (۲۰۱۵) مراجعه نمایید). تشریح مراحل توسعه: (a): ۲ سلولی (۳ ساعت و ۳۰ دقیقه پس از لقاح)، (b): ۴ سلولی (۴ ساعت پس از لقاح)، (c): ۱۲۸ سلولی (۲۰ ساعت پس از لقاح)، (d): بلاستولای پیشرفته (۱۵ ساعت پس از لقاح)، (e): اپی‌بولی ۳۰ درصد (۲۶ ساعت پس از لقاح)، (f): اپی‌بولی ۵۰ درصد (۳۱ ساعت پس از لقاح)، (g): اپی‌بولی ۹۰ درصد (۴۱ ساعت پس از لقاح)، (h): کپسول چشمی (۶۶ ساعت پس از لقاح)، (i): وزیکول شنوایی (Otic vesicle) (۹۶ ساعت پس از لقاح)، (g): کشیدگی دم (۵ روز پس از لقاح)، (k): آغاز تجمع رنگ‌دانه‌ها در چشم (۶ روز پس از لقاح)، (l): مرحله چشم‌زدگی (۸ روز پس از لقاح) (عکس‌ها: a، k و l از Palińska-Żarska K.؛ b تا j از Alix M.)

دستگاه‌های انکوباسیون

در حقیقت هیچ انکوباتور استانداردی به‌صورت تخصصی برای سوف حاج طرخان طراحی نشده است. برای انکوباسیون تخم‌های این ماهی دستگاه‌های مختلفی ساخته و آزمایش شده‌اند و در اغلب موارد بسیار مؤثر بوده‌اند. با این‌حال، از دیدگاه تجاری مناسب‌ترین انکوباتورها آن‌هایی هستند که روبان‌های تخم را در ستون آب معلق نگه می‌دارند و در بسیاری از موارد مرسوم است که انکوباتور به‌عنوان مکان پرورش اولیه لاروها مورد استفاده قرار گیرد (شکل ۱۰-۲). برای این منظور پیشنهاد می‌شود از قفس‌های شناور مختلف یا سینی‌های خاص (شناور یا ثابت درست در قسمت بالایی سطح آب) که قسمت پایینی آن با تور (یا قسمت پایینی سوراخ‌دار مانند سبد) تعویض شده استفاده شود (شکل ۱۰-۳). در این انکوباتورها تخم‌ها از تمامی سمت‌ها شست‌وشو می‌شوند و امکان تبادل کافی آب در اطراف همه تخم‌های موجود در روبان‌ها وجود دارد. لذا مهم است که اندازه چشمه تور (یا اندازه سوراخ‌های کف) به مقدار کافی بزرگ باشد (تقریباً ۳ میلی‌متر) تا پس از انتقال سبدهای نگهداری تخم‌ها به واحد پرورش، امکان سقوط لاروهای تخم‌گشایی شده به کف مخزن وجود داشته باشد. به همین دلیل، اندازه چشمه تور نباید زیاد بزرگ باشد زیرا ممکن است روبان‌های تخم‌های باقی‌مانده نیز خارج شوند. اندازه چشمه تور باید به‌صورتی باشد که فقط با بیرون آوردن قفس‌ها (سبدها) از درون مخزن (واحد انکوباسیون)، لاروها به‌راحتی خارج شوند و روبان تخم‌ها باقی بماند.

شکل ۱۰-۲. روبان‌های تخم استحصال‌شده از مولدین ماده مختلف در قفس‌های (سبدهای) جداگانه در سیستم مداربسته آزمایشی با مقیاس کوچک شناور می‌باشند و لاروها پس از تخم‌گشایی درون سیستم پرورش می‌یابند (عکس از D. Żarski)

توصیه عملی:

به‌منظور تسهیل کار با تخم‌ها، توصیه می‌شود از یک انکوباتور واحد برای تمامی تخم‌ها استفاده شود و درست قبل از تخم‌گشایی، تخم‌ها به واحد پرورش منتقل گردند. در این حالت، دمای واحد پرورشی می‌تواند ۲ تا ۳ درجه سانتی‌گراد بیشتر باشد. این امر سبب هم‌زمانی فرآیند تخم‌گشایی دسته تخم‌های در نظر گرفته‌شده برای یک واحد پرورشی می‌شود و میزان تخم‌های باقی‌مانده احتمالی را به‌حداقل رسانده و یا از ظهور عوامل بیماری‌زا توسط تخم‌هایی که کیفیت پایینی دارند جلوگیری می‌نماید.

شکل ۱۰-۳. نمونه‌ای از انکوباتور مخصوص برای تخم‌های سوف حاج طرخان که روبان‌های تخم در کف آن قابل‌مشاهده می‌باشند و بخشی از دیواره انکوباتور با توری مناسب جایگزین شده است (عکس از D. Żarski)

شرایط انکوباسیون

طی فرایند انکوباسیون علاوه بر اکسیژن محلول آب، تأمین دما و pH مناسب بسیار با اهمیت است. با توجه به این موضوع که دما به‌صورت مستقیم بر سرعت توسعه جنینی اثر می‌گذارد، دمای خیلی پایین یا خیلی بالا ممکن است باعث تحریک توسعه جنینی نامناسب شده و درنتیجه به ناهنجاری‌ها و یا مرگ‌ومیر جنینی منجر شود (Kamler 2002). مشخص شده است که pH بیش‌ازحد کم (کمتر از ۵) می‌تواند باعث افزایش طول دوره انکوباسیون و مرگ‌ومیر جنینی شود (Rask 1983). به‌طورکلی، در سوف حاج طرخان تخم‌ها در دامنه دمایی ۸ تا ۱۸ درجه سانتی‌گراد با موفقیت انکوبه می‌شوند و عنوان شده است که دمای ۱۲/۵ درجه سانتی‌گراد دمای بهینه انکوباسیون این ماهی می‌باشد (Teletchea et al. 2009; Żarski et al. 2015a) که طی آن دوره انکوباسیون حدوداً ۱۶۵ درجه-روز به‌طول می‌انجامد (تقریباً ۱۳ روز). با این‌حال، عموماً دامنه دمایی ۱۲ تا ۱۶ درجه سانتی‌گراد برای انکوباسیون سوف حاج طرخان اعمال می‌گردد (Żarski et al. 2015a) و توصیه می‌شود از این محدوده دمایی برای عملیات کارگاهی (دوره انکوباسیون) این ماهی استفاده شود.

به‌طورکلی، به‌جز دما، pH و اکسیژن محلول در آب، نیازمندی خاص دیگری برای انکوباسیون سوف حاج طرخان وجود ندارد. بنابراین، پارامترهای آب واحد انکوباسیون باید معیارهای معمول مورد نیاز ماهیان آب شیرین را دارا باشند. در ایده‌آل‌ترین حالت، آب مورد استفاده باید معیارهای کلی مورد نیاز برای آب آشامیدنی مورد مصرف انسان را داشته باشد. با این‌حال، اگر تأمین چنین آب با کیفیتی امکان‌پذیر نباشد، باید به‌طور ویژه توجه شود تا از آب دارای معیارهای لازم برای استفاده در مراکز تکثیر ماهیان استفاده شود. در همین راستا، تأمین نیازمندی‌های ارائه‌شده توسط Hart و همکاران (۲۰۰۶) برای سوف زرد (*Perca flavescens*) که یک گونه نزدیک به سوف حاج طرخان است می‌تواند مدنظر قرار گیرد (جدول ۱۰-۱). به‌طورکلی، منبع آب مورد استفاده باید از هرگونه مواد معلق (باید شفاف باشد)، بو و همچنین مواد سمی محلول (شامل ترکیبات نیتروژن و فسفر که اغلب در سیستم مداربسته انباشته می‌شوند) عاری باشد. در صورت استفاده از آب‌های آزاد برای تأمین آب واحد انکوباسیون ضروری است تا تصفیه آب (برای حذف تمامی ذرات معلق مانند گل، مواد آلی و غیره) به‌وسیله فیلترهای مکانیکی (به‌عنوان مثال فیلترهای بشکه‌ای[1]) انجام گیرد و آب قبل از استفاده در سیستم انکوباسیون به‌طور مؤثر استریل شود. همچنین باید به‌طور ویژه به منابع آبی محیط اطراف (دریاچه یا رودخانه) توجه داشت تا مشاهده شود که آلودگی شدید

1. Drum filters

کشاورزی، صنعتی یا حتی آلوده‌کننده‌های خانگی موجب نفوذ مواد مضر به منبع آب مورد استفاده نمی‌شوند. در صورت استفاده از آب چاه، باید به تصفیه و پاک‌سازی آب به‌صورت ویژه توجه شود. بر اساس کیفیت ممکن است ضروری باشد تا ترکیبات آهن و یا منگنز حذف شوند، کلسیم‌زدایی انجام شود و یا سایر ترکیبات که مقدار آن‌ها بیش‌ازحد مورد نیاز می‌باشند قبل از استفاده از آب حذف گردند. در صورت استفاده از آب لوله‌کشی، بسیار مهم است تا اطمینان حاصل نمایید که آب قبل از هر گونه استفاده در کل واحدهای مرکز تکثیر کلرزدایی شده باشد.

جدول ۱۰-۱. کیفیت آب مورد نیاز برای استفاده در مرکز تکثیر

اکسیژن محلول (DO)	>۳/۵ ppm
دی اکسید کربن (CO2)	<۰/۵ ppm
pH	۶/۵۰-۹/۰۰
کلسیم	۱۰-۱۶۰ ppm
فسفر	۰/۰۱-۳/۰۰ mg/l
سختی کل	۵۰-۴۰۰ ppm
سولفید هیدروژن	۰
نیتریت (NO2)	<۰/۱ mg/l
آمونیاک (NH3)	<۰/۰۱۲۵ mg/l

مهم

تخم‌ها طی فرآیند انکوباسیون نباید در کف مخزن روی هم قرار گیرند و باید در حالت حداکثری گسترده و پخش شوند. این موضوع از این واقعیت ناشی می‌شود که در تخم‌های چشم‌زده، جنین‌ها قبل از تخم‌گشایی ممکن است به‌علت افزایش نیاز اکسیژنی شروع به تلف شدن کنند، زیرا ساختار ژله مانند نرم و سست روبان تخم‌ها تبادل اکسیژنی را دشوارتر می‌کند.

تخم‌گشایی

قبل از تخم‌گشایی، سلول‌های غده تخم‌گشایی که مسئول تولید آنزیم تخم‌گشایی کوریوناز[1] می‌باشد در لارو رشد و توسعه می‌یابد (Luczynski et al. 1987; Rechulicz 2001). این آنزیم به آرامی باعث هضم شدن ساختار داخلی لایه کوریون[2] اطراف جنین درحال توسعه می‌شود و درنتیجه کوریون استحکام خود را از دست می‌دهد. این عمل به‌همراه پدیده شل و سست‌شدن ساختار ژله مانند لایه زونا رادیاتای خارجی درست قبل از تخم‌گشایی (Formicki et al. 2009)، امکان خروج آسان لارو را فراهم می‌نماید. خروج لارو از تخم با حرکات بسیار فعال لارو در داخل تخم که به او برای ترک پوشش تخم کمک مضاعفی می‌کند ارتباط دارد. با توجه به اهمیت موضوع، لازم به تأکید است که تعداد و اندازه سلول‌های غده تخم‌گشایی به دمای آب بستگی دارد و به‌نظر می‌رسد که بیشترین ظرفیت تولید آنزیم کوریوناز معمولاً در دمای بهینه انکوباسیون وجود دارد (Rechulicz 2001). در ارتباط با این موضوع نیاز است در آینده تحقیقات بیشتری در سوف حاج طرخان انجام گیرد، با این‌وجود، این امر اهمیت حفظ دامنه دمایی بهینه در طول دوره انکوباسیون را نمایان می‌سازد. با توجه به این موضوع که فرآیند تخم‌گشایی به فعالیت آنزیمی وابسته است، توصیه می‌شود با افزایش دمای آب فرآیند تخم‌گشایی را مدیریت نمایید (کمک به فرآیند تخم‌گشایی)، زیرا افزایش دما درواقع باعث افزایش فعالیت آنزیم کوریوناز خواهد شد. در دوره انکوباسیون پس از مشاهده نخستین تخم‌گشایی لاروها می‌توان دمای آب را چند درجه سانتی‌گراد (حداکثر ۵ درجه سانتی‌گراد) افزایش داد. این عمل می‌تواند موجب کاهش طول دوره تخم‌گشایی شود و امکان تخم‌گشایی لاروها را در زمان باز شدن دهان و یا اندکی قبل‌تر از آن فراهم نماید (Alix et al. 2015) (شکل ۱۰-۴).

1. Chorionase
2. Chorion

شکل ۱۰-۴. سوف حاج طرخان لحظاتی پس از تخم‌گشایی (طول کل ۵/۷۱ میلی‌متر، انکوبه‌شده در دمای ۱۴ درجه سانتی‌گراد) (عکس از K. Palińska-Żarska)

توصیه عملی:

۱. توصیه می‌شود طی دوره انکوباسیون دمای آب ۱۲ تا ۱۳ درجه سانتی‌گراد باشد و هنگام فرآیند تخم‌گشایی دما حداکثر تا ۱۵ درجه سانتی‌گراد افزایش یابد.
۲. هنگام انکوباسیون، درصورتی‌که تخم‌ها در زمان‌های مختلف استحصال و بارور شده‌اند و در یک واحد تخم‌گشایی مشابه نگهداری می‌شوند نباید از تیمار دمایی استفاده کرد.

پرورش اولیه لاروها (توصیه‌های کلی)

پس از تخم‌گشایی توصیه می‌شود لاروها در ۱۴ روز اول در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند (Palińska-Żarska et al. unpublished). در طی این مدت شرایط نوری باید طوری اعمال شود که لاروها در تمام قسمت‌های مخزن پراکنده باشند و یا در قسمت میانی مخزن درست زیر سطح آب جمع شوند. باید از فراهم آوردن شرایط نوری که طی آن لاروها نزدیک دیواره و یا در گوشه‌های مخزن جمع می‌شوند اجتناب شود، زیرا این حالت می‌تواند بر فرآیند پر کردن کیسه شنا از هوا تأثیر بگذارد (Palińska-Żarska et al. 2013). در چنین دمایی (۱۵ درجه سانتی‌گراد) اولین جیره غذایی لاروها باید ۵ تا ۷ روز پس از تخم‌گشایی عرضه شود. ناپلی تازه تخم‌گشایی شده آرتمیا (*Artemia* sp.) باید به‌عنوان اولین منبع غذایی در اختیار لارو قرار گیرد.

منابع

Alix M, Schaerlinger B, Ledoré Y, Chardard D, Fontaine P (2013) Developmental staging and deformities characterization of the Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. Commun Agric Appl Biol Sci 78:12–14

Alix M, Chardard D, Ledoré Y, Fontaine P, Schaerlinger B (2015) An alternative developmental table to describe non-model fish species embryogenesis: application to the description of the Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L. 1758) development. Evodevo 6:39. doi:10.1186/ s13227-015-0033-3

Castets M-DD, Schaerlinger B, Silvestre F, Gardeur J-NN, Dieu M, Corbier C, Kestemont P, Fontaine P (2012) Combined analysis of *Perca fluviatilis* reproductive performance and oocyte proteomic profile. Theriogenology 78(432–42):442–13. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.02.023

Formicki K, Smaruj I, Szulc J, Winnicki A (2009) Microtubular network of the gelatinous egg envelope within the egg ribbon of European Perch, *Perca fluviatilis* L. Acta Ichthyol Piscat 39:147–151. doi:10.3750/AIP2009.39.2.10

Hart SD, Garling DL, Malison JA (2006) Yellow perch (*Perca flavescens*) culture guide. North Central Regional Aquaculture Center, Iowa State University, Ames

Iwamatsu T (2004) Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. Mech Dev 121:605–618. doi:10.1016/j.mod.2004.03.012

Kamler E (2002) Ontogeny of yolk-feeding fish: an ecological perspective. Rev Fish Biol Fish 12:79–103. doi:10.1023/A:1022603204337

Kucharczyk D, Kujawa R, Mamcarz A (1996) New experimental incubation unit for eggs of the Perch *Perca fluviatilis*. Progress Fish Cult 58:281–283. doi:10.1577/1548-8640(1996)058<0281:NEIUFE>2.3.CO;2

Luczynski M, Strzczek J, Brzuzan P, Łuczyński M, Strzeżek J, Brzuzan P (1987) Secretion of hatching enzyme and its proteolytic activity in coregoninae (*Coregonus albula* L. and *Coregonus lavaretus* L.) embryos. Fish Physiol Biochem 4:57–62. doi:10.1007/bf02044314

Palińska-Żarska K, Krejszeff S, Łopata M, Żarski D. Effect of temperature and tank wall colour on the effectiveness of swim bladder inflation in Eurasian Perch, *Perca fluviatilis* L., larvae reared under controlled conditions (unpublished)

Palińska-Żarska K, Żarski D, Krejszeff S, Nowosad J, Biłas M, Kucharczyk D (2013) Tank wall color affects swimbladder inflation in Eurasian perch, *Perca fluviatilis* l., under controlled conditions. Commun Agric Appl Biol Sci 78:338–341

Palińska-Żarska K, Żarski D, Krejszeff S, Nowosad J, Biłas M, Trejchel K, Kucharczyk D (2014) Dynamics of yolk sac and oil droplet utilization and behavioural

aspects of swim bladder inflation in burbot, *Lota lota* L., larvae during the first days of life, under laboratory conditions. Aquac Int 22:13–27. doi:10.1007/s10499-013-9663-4

Rask M (1983) The effect of low pH on perch, *Perca fluviatilis* L. I. Effects of low pH on the development of eggs of perch. Ann Zool Fenn 20:73–76

Rechulicz J (2001) Incubation temperature effects on the development of hatching gland cells in ide, *Leuciscus idus* (L.). Electron J Pol Agric Univ 4:#03

Schaerlinger B, Żarski D (2015) Evaluation and improvements of egg and larval quality in percid fishes. In: Kestemont P, Dabrowski K, Summerfelt RC (eds) Biology and culture of percid fishes. Springer, Dordrecht, pp 193–223

Teletchea F, Fostier A, Kamler E, Gardeur J-N, Le Bail P-Y, Jalabert B, Fontaine P (2009) Comparative analysis of reproductive traits in 65 freshwater fish species: application to the domestication of new fish species. Rev Fish Biol Fish 19:403–430. doi: 10.1007/ s11160-008-9102-1

Woolley LD, Qin JG (2010) Swimbladder inflation and its implication to the culture of marine finfish larvae. Rev Aquac 2:181–190. doi:10.1111/j.1753-5131.2010.01035.x

Zakęś Z, Demska-Zakęś K (2009) Controlled reproduction of pikeperch *Sander lucioperca* (L.): a review. Arch Pol Fish 17:153–170. doi:10.2478/v10086-009-0014-z

Żarski D, Palińska K, Targońska K, Bokor Z, Kotrik L, Krejszeff S, Kupren K, Horváth Á, Urbányi B, Kucharczyk D (2011) Oocyte quality indicators in Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L., during reproduction under controlled conditions. Aquaculture 313:84–91. doi:10.1016/j. aquaculture.2011.01.032

Żarski D, Horváth A, Held JA, Kucharczyk D (2015a) Artificial reproduction of percid fishes. In: Kestemont P, Dąbrowski K, Summerfelt RC (eds) Biology and culture of percid fishes, 1st edn. Springer, Dordrecht, pp 123–161

Żarski D, Krejszeff S, Kucharczyk D, Palińska-Żarska K, Targońska K, Kupren K, Fontaine P, Kestemont P (2015b) The application of tannic acid to the elimination of egg stickiness at varied moments of the egg swelling process in pikeperch, *Sander lucioperca* (L.). Aquac Res 46:324–334. doi:10.1111/are.12183

Żarski D, Krejszeff S, Palińska-Żarska K, Bernath G, Urbanyi B, Bokor Z (2015c) The spawning efficiency index as a tool in aquaculture research and production. In: Poleksic V, Markovic Z (eds) 7th international conference “WATER & FISH.” University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Belgrade, pp 23–28

۱۱ تکثیر پیش از موعد (تکثیر خارج از فصل)

پیشینهٔ علمی

اقتصادی بودن آبزی‌پروری تجاری سوف حاج طرخان به توانایی تأمین بازار با استفاده از محصول با کیفیت بالا در تمام طول سال بستگی دارد و این امر با رعایت ضوابط مربوط به اندازه استاندارد مورد تقاضا ارتباط دارد. با این‌حال، سوف حاج طرخان فقط یک‌بار در سال در فصل بهار که فصل تولیدمثل طبیعی آن می‌باشد تخم‌ریزی می‌نماید (Treasurer 1981; Treasurer and Holliday 1981; Długosz 1986; Sulistyo et al. 1998). بنابراین، برای پایدار بودن تداوم تولید در تمام طول سال ضروری است که ماهی‌ها در خارج از فصل تکثیر تخم‌ریزی نمایند (Migaud et al. 2002).

در مولدین اهلیِ نگهداری شده در محیط کاملاً کنترل‌شده (شامل رژیم نوری-دمایی، پارامترهای کیفی آب، تغذیه و غیره)، از لحاظ تئوری اگر تحریک کافی برای توسعه گنادی و تخم‌ریزی فراهم شود می‌توان در هر زمانی از سال ماهی‌ها را جهت تخم‌ریزی القا نمود (Fontaine et al. 2006; Abdulfatah et al. 2011, 2013; Fontaine et al. 2015). به‌منظور شبیه‌سازی چرخه طبیعی سالیانه طول روز و دما در تولیدمثل سوف حاج طرخان خارج از فصل طبیعی تخم‌ریزی، ماهی‌ها تحت شرایط هدایت‌شده چرخه نوری-دمایی که از قبل تعیین‌شده قرار می‌گیرند. در این حالت، مولدین اهلی‌شده معمولاً به‌دنبال مواجهه با نیازمندی‌های نوری-دمایی طبیعی خود که برای این گروه خاص از ماهی‌ها تداعی‌کننده فصل تولیدمثل می‌باشد تخم‌ریزی می‌کنند. با این‌حال، پس از تخم‌گشایی اولین نسل از ماهی‌هایی که در اسارت نگهداری می‌شوند (ماهی‌هایی که اجداد آن‌ها طی فصل تخم‌ریزی از حیات‌وحش صیدشده باشند) معمولاً استفاده از روش کوتاه نمودن یا طولانی نمودن اولین فرآیند توسعه گنادی به‌منظور تحریک بیش از یک‌بار تخم‌ریزی در سال ارجحیت دارد. با این‌وجود، حتی در این شرایط ماهی‌ها معمولاً از ابتدایی‌ترین مراحل در شرایط محیطی کاملاً کنترل‌شده پرورش می‌یابند، در همین راستا، از نظر ما به‌کارگیری اصطلاح "فصل تخم‌ریزی" برای این جمعیت از ماهی‌ها واژه دقیقی نیست.

معمولاً کنش‌های تخم‌ریزی این ماهی‌ها توسط رژیم‌های نوری-دمایی که از چرخه طبیعی سالیانه تقلید شده‌اند کنترل می‌شوند و درنتیجه استفاده از اصطلاح "تخم‌ریزی خارج از فصل" نیز برای این ماهی‌ها نسبتاً بحث‌برانگیز است. به‌خصوص به‌دلیل اینکه در مطالعات روی ماهی‌های

وحشی که چندین ماه قبل از فصل تکثیر تخم‌ریزی می‌کنند نیز اصطلاح "تخم‌ریزی خارج از فصل" بکار می‌رود که درواقع به "خارج از فصل تخم‌ریزی" اشاره دارد. با این‌حال، تکثیر ماهی‌های پرورشی در تمامی طول سال صرف‌نظر از زمان دقیق فصل تخم‌ریزی آن‌ها امکان‌پذیر است و درنتیجه، نه‌فقط چند ماه قبل از فصل تخم‌ریزی، بلکه در هر زمان خارج از فصل تخم‌ریزی امکان تولید لارو فراهم می‌باشد. بنابراین، برای جلوگیری از ابهامات در ارتباط با اصطلاحات عنوان‌شده در این کتابچه، تصمیم گرفته شد تا اصطلاحاتی که در ادامه بیان می‌شوند تشریح گردند. اصطلاح "تخم‌ریزی خارج از فصل" همیشه به تکثیر ماهی‌های اهلی‌شده (پرورش‌یافته در سیستم مداربسته) اطلاق می‌شود، درحالی‌که ما برای ماهی‌های وحشی اصطلاح "تخم‌ریزی پیش از موعد" را ارائه نموده‌ایم. البته از لحاظ تئوری تکثیر ماهی‌های وحشی را می‌توان به بعد از فصل تخم‌ریزی موکول نمود که این موضوع با طولانی‌تر کردن دوره زمستان‌گذرانی و ایجاد تخم‌ریزی تأخیری امکان‌پذیر می‌باشد. با این‌حال، این جنبه از تکثیر به‌علت کمبود اطلاعات در مورد پروتکل احتمالی و کارایی آن در کتابچه حاضر نادیده گرفته شده است. بعلاوه، با توجه به هدف کتابچه حاضر جنبه "تخم‌ریزی خارج از فصل" ماهی‌های پرورش‌یافته در سیستم مداربسته نیز در این کتاب در نظر گرفته نشده است. در صورت علاقه‌مندی می‌توانید اطلاعات ضروری در مورد پروتکل‌ها و عوامل تأثیرگذار بر موفقیت تکثیر ذخیره‌های اهلی‌شده را در مطالعه Fontaine و همکاران (۲۰۱۵) مشاهده نمایید.

پرورش‌دهندگان برای اجرای تخم‌ریزی پیش از موعد باید ضرورت تکمیل صحیح فرآیند توسعه گنادی بین دو عمل تخم‌ریزی را در نظر داشته باشند، زیرا این فرآیند در ماهی‌های وحشی حدود ۱ سال به‌طول می‌انجامد و نوسانات نوری-دمایی که چرخه هورمونی را تنظیم می‌کند را شامل می‌شود (Sulistyo et al. 1998). این امر به‌نوبه خود باعث تنظیم مناسب هر مرحله خاص از توسعه گنادی می‌شود و ازجمله شرایط ضروری است که تولید گامت‌های با کیفیت بالا را امکان‌پذیر می‌نماید (Fontaine et al. 2015). همچنین، با استفاده از رژیم‌های نوری-دمایی کاملاً کنترل‌شده، امکان کوتاه نمودن فاصله بین دو تخم‌ریزی (در شرایط طبیعی حدود ۱ سال به طول می‌انجامد) به میزان چند ماه وجود دارد. در ادامه مراحل نیز اغلب از تیمارهای هورمونی که از عناصر ضروری موفقیت "تخم‌ریزی پیش از موعد" می‌باشد استفاده می‌شود (Szczerbowski et al. 2009; Targońska et al. 2014).

آخرین پیشرفت‌های علمی در زمینه «تخم‌ریزی پیش از موعد» سوف حاج طرخان

در ماهی‌های وحشی و پرورشی (پرورش‌یافته در استخر) سوف حاج طرخان، "تخم‌ریزی پیش از موعد" موفقیت‌آمیز ۴ ماه زودتر از فصل تخم‌ریزی امکان‌پذیر می‌باشد (Szczerbowski et al. 2009; Targońska et al. 2014). در این مورد نیاز است ماهی‌ها طی فصل پاییز (اواخر مهر تا اوایل آذر) صیدشده و به مرکز تکثیر منتقل شوند و به مدت ۲ تا ۳ ماه در شرایط دمای سرد (دوره زمستان‌گذرانی) کمتر از ۱۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند (Migaud et al. 2004; Szczerbowski et al. 2009). پس از دوره زمستان‌گذرانی، معمولاً دمای آب تا رسیدن به ۱۴-۱۲ درجه سانتی‌گراد افزایش می‌یابد و سپس تحریک هورمونی اعمال می‌شود (Szczerbowski et al. 2009; Żarski et al. 2011; Targońska et al. 2014). طی دوره سرما، ماهی‌ها معمولاً در شرایط نوری کوتاه شده (۴ ساعت روشنایی:۲۰ ساعت تاریکی؛ Szczerbowski et al. 2009) یا کم نوری مداوم نگهداری می‌شوند (Żarski et al. 2011). پس از دوره زمستان‌گذرانی معمولاً دمای آب به میزان کمتر از ۱ درجه سانتی‌گراد در روز افزایش می‌یابد (Żarski et al. 2011).

پروتکل "تکثیر پیش از موعد" سوف حاج طرخان در مطالعه Żarski و همکاران (۲۰۱۲) و Żarski (۲۰۱۲) توصیف‌شده است، بدین‌صورت که ماهی‌ها در آغاز سال میلادی (۲ تا ۳ ماه قبل از فصل تخم‌ریزی) در زیر یخ به‌وسیله عملیات تورکشی[1] صید می‌شوند. درواقع ماهی‌ها پس از طی یک دوره طبیعی سرما صید می‌شوند. پس از انتقال ماهی‌ها به مرکز تکثیر، فقط اعمال تحریک دمایی از دمای ۴ تا ۱۲-۱۰ درجه سانتی‌گراد ضروری است. مزیت این روش "تکثیر پیش از موعد" این است که ماهی‌ها بدون عوامل استرس‌زای ناشی از زمستان‌گذرانی کنترل‌شده در مرکز تکثیر تا لحظات آخر در شرایط طبیعی باقی می‌مانند. موفقیت تخم‌ریزی ماهی‌های به‌دست‌آمده از این روش معمولاً بسیار بالاست که احتمالاً به‌علت محدود بودن استرس و همچنین، دستکاری‌ها و انتقال ماهیان در دماهای بسیار پایین است. با این‌حال، از نقطه‌نظر تجاری، تولید متکی بر ماهی‌های به‌دست‌آمده در دوره زمستان دارای محدودیت‌های اساسی است، زیرا صید موفق به شرایط آب و هوایی و وضعیت کلی اکوسیستمی که صید در آن انجام می‌گیرد بستگی دارد. علاوه بر این، با توجه به مشاهدات، اهمیت آبزی‌پروری تجاری در آب‌های داخلی در دهه‌های گذشته رو به کاهش بوده است که این موضوع امکان برداشت ماهی (همان‌طور که در جملات بالا توضیح داده شده است) را به‌جز در مواردی خاص محدود می‌کند.

1. Drag netting

در تحریکات هورمونی نوع و دوز هورمون‌های مورد استفاده برای القای بلوغ نهایی اووسیت‌ها و رهاسازی تخمک‌ها طی "تکثیر پیش از موعد" معمولاً مشابه موارد اعمال‌شده در "فصل تخم‌ریزی" است (برای جزئیات بیشتر به مطالعه Żarski و همکاران (۲۰۱۵) و فصل ۵ مراجعه نمایید). همچنین، هورمون مورد استفاده معمولاً در یک مرحله به ماهی‌ها تزریق می‌شود. تنها تفاوت این است که معمولاً مدت زمان پاسخ‌دهی مولدین طولانی‌تر (حداقل ۶ روز در دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد- با توجه به مرحله اولیه بلوغ ماهی در هنگام تزریق) و تخم‌ریزی هم‌زمان‌تر می‌باشد. تخم‌ریزی هماهنگ‌تر به این علت است که معمولاً ماهی‌ها طی "تخم‌ریزی خارج از فصل" در مرحله رسیدگی کم‌وبیش مشابهی قرار دارند (قبل از مرحله رسیدگی نهایی) و واگرایی در مراحل رسیدگی آن‌ها احتمالاً دیرتر رخ می‌دهد (هنگامی‌که مهاجرت هسته آغاز می‌شود- به فصل ۴ مراجعه نمایید).

مولدین سوف حاج طرخان در شرایط کارگاهی معمولاً گرسنه نگه‌داشته می‌شوند (در طول نگهداری در دمای سرد و عملیات تولیدمثل کنترل‌شده). این امر بدین دلیل است که ماهی‌های وحشی یا پرورشی (پرورش‌یافته در استخر) فقط غذای زنده[1] یا بعضی از غذاهای منجمد شده (مثل کرم خونی منجمد) را می‌پذیرند. سازگاری ماهی‌ها با پلت‌های غذایی تجاری فرآیندی زمان‌بر و طولانی است. گذشته از این، نگهداری ماهی‌ها بدون غذادهی مقرون به‌صرفه‌تر می‌باشد و به حفظ شرایط بهداشتی مناسب مخازن و کل سیستم پرورشی کمک می‌نماید (هیچ مدفوع و غذای باقی‌مانده‌ای وجود نخواهد داشت)، همچنین هیچ‌گونه اطلاعاتی در ارتباط با بهبود عملکرد تولیدمثل پس از تغذیه مولدین در طی دوره زمستان وجود ندارد. با این‌وجود، از نقطه‌نظر اخلاقی باید در نظر گرفته شود که به مولدین مقداری غذای منجمد شده یا fodder fish ارائه گردد. در چنین حالتی باید توجه داشت که عملکرد فیلتراسیون بیولوژیک آب در دماهای پایین به مقداری زیادی کاهش می‌یابد (Wortman and Wheaton 1991; Sudarno et al. 2011). بنابراین، در این حالت باید سیستم پرورشی با ظرفیت بالا، تعویض آب مداوم و یا حجم بالای تصفیه زیستی آب فراهم شود.

1. Small fodder fish

مهم

پارامترهای کیفی آب به‌ویژه سطوح آمونیاک باید به‌طور مداوم در طی دوره سرما (زمستان‌گذرانی) بررسی گردند، زیرا حتی ماهی‌های گرسنه نیز مقادیر زیادی آمونیاک دفع می‌کنند.

توصیه‌های عملی:

اطلاعات عملی ارائه‌شده در ادامه بر اساس نتایج به‌دست آمده در پروژه PERCAHATCH که طی آن چندین آزمایش در یک پروتکل واحد گردآوری‌شده ارائه شده است. این آزمایش‌ها امکان تعیین شرایط اساسی برای تخم‌ریزی خارج از فصل موفق را فراهم نموده و تأیید کیفیت لارو تولیدی برای مراحل بعدی پرورش تا تبدیل‌شدن به بچه‌ماهیان جوان سازگار شده با غذای مصنوعی را شامل می‌شود. اگرچه این پروتکل به‌صورت منتقدانه مورد ارزیابی قرارگرفته است (با استفاده از ماهی‌های پرورش‌یافته در استخر به‌عنوان مدل) و می‌توان آن‌را برای استفاده در عملیات تکثیر خارج از فصل ماهی سوف حاج طرخان وحشی توصیه نمود، با این‌حال، پیشنهاد می‌شود قبل از هر گونه برنامه‌ریزی برای تولید تجاری، ابتدا پروتکل را با شرایط کارگاهی مکان مورد نظر و جمعیت در نظر گرفته‌شده برای تولیدمثل بازبینی نمایید.

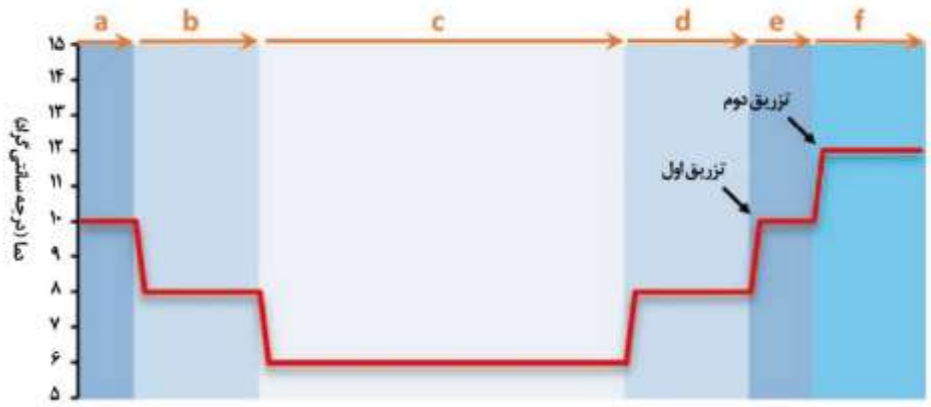
مدیریت مولدین

ماهی‌ها هنگامی‌که میانگین دمای روزانه آب به ۱۰ درجه سانتی‌گراد می‌رسد (حداقل دمای ۸ درجه سانتی‌گراد) باید از دریاچه یا استخر خاکی جمع‌آوری شوند. پس از صید، ماهی‌ها باید به مرکز تکثیر منتقل شوند تا دوره سرما (زمستان‌گذرانی) برای آن‌ها اعمال شود. هر ماهی قبل از ذخیره‌سازی در مخازن باید از لحاظ وضعیت سلامت عمومی (انگل‌های خارجی، انگل‌های احتمالی آبشش‌ها یا عفونت‌های قارچی، شکاف‌های پوستی، شرایط باله‌ها، سایر آسیب‌های بدنی و غیره) مورد ارزیابی قرار گیرد و قبل از انتقال به مخزن نگهداری، ماهی‌ها باید با دقت به یک حمام نمکی منتقل شوند (برای مشاهده جزئیات بیشتر به فصل ۲ و ۳ مراجعه نمایید). این عمل معمولاً از انتقال و سرایت بیش‌ازحد عوامل بیماری‌زا جلوگیری می‌نماید. در مرحله بعد، ماهی‌ها باید به‌مدت ۷ روز با محیط جدید سازگاری پیدا کنند و طی این مدت مرگ‌ومیرهای احتمالی باید به‌دقت بررسی شود.

تمامی ماهی‌های تلف‌شده باید سریعاً از مخزن نگهداری خارج شوند و عامل احتمالی تلفات باید تعیین شود تا عوامل بیماری‌زای مسبب مرگ‌ومیر مشخص و در صورت نیاز تیمار درمانی فوراً اعمال شود. پس از سپری شدن دوره ۷ روزه سازش‌پذیری با محیط، به‌منظور کنترل وضعیت بهداشتی مجدد باید یک نماینده از هر گروه ماهی‌ها به‌طور تصادفی انتخاب شده و بیهوش شود (همان‌طور که در فصل ۳ توضیح داده شد). درصورتی‌که ماهی‌ها برای دوره زمستان‌گذرانی مناسب تشخیص داده شدند (با داشتن شرایط مناسب)، مرحله بعدی که دستکاری نوری-دمایی است باید دنبال شود.

مهم

طی دوره زمستان‌گذرانی، هر دو جنس نر و ماده باید در کنار هم نگهداری شوند تا امکان تحریک فرومونی احتمالی بین آن‌ها وجود داشته باشد.



شکل ۱۱-۱. رژیم دمایی (خط قرمز) اعمال‌شده قبل و طی دوره زمستان‌گذرانی (a تا e) و در دوره تخم ریزی (f). مدت زمان هر مرحله خاص از رژیم دمایی اعمال‌شده: (a): ۷ روز، (b): ۱۴ روز، (c): ۴۰ روز، (d): ۱۴ روز، (e): ۷ روز، (f): تا زمانی که تخم‌ریزی رخ دهد. فلش‌ها زمان تزریق مولدین ماده را نشان می‌دهند (به جدول ۱۱-۱ نیز توجه کنید).

دستکاری نوری-دمایی

پس از دوره سازش‌پذیری، دوره زمستان‌گذرانی باید آغاز گردد. توصیه می‌شود رژیم‌های دمایی ارائه‌شده در شکل ۱۱-۱ دنبال شود. هر تغییر دمایی باید به آهستگی انجام شود، با این‌حال نباید بیش از ۲۴ ساعت طول بکشد (برای مثال تغییر دما از ۸ به ۶ درجه سانتی‌گراد باید طی ۲۴ ساعت انجام گیرد). در کل دوره سرمای اعمال‌شده، ماهی‌ها باید در شرایط کم نوری ثابت (بدون تغییر نوری روزانه) نگهداری شوند. این امر شرایط نوری آب زیر یخ دریاچه و یا استخر طی دوره زمستان‌گذرانی را برای ماهی‌ها شبیه‌سازی می‌کند و علاوه بر این، با کاهش تعداد محرک‌های بصری احتمالی استرس را محدود می‌نماید.

تحریک رهاسازی تخمک و اسپرم

پس از دوره زمستان‌گذرانی، در روز اعمال تیمار هورمونی باید یک مرحله گزینش دیگر انجام شود. برای این منظور، ماهی‌ها باید از نظر وضعیت سلامت (همان‌طور که در قسمت‌های قبل توضیح داده شد) و تشخیص جنسیت مورد ارزیابی قرار گیرند. برای تشخیص جنسیت باید از پروتکل ارائه‌شده در فصل ۳ استفاده شود. پس از شناسایی هر دو جنس، مولدین نر و ماده باید جداگانه نگهداری شوند. تحریک هورمونی مولدین نر و ماده باید طبق پروتکل ارائه‌شده در جدول ۱-۱۱ انجام گیرد. فاصله پاسخ‌دهی بین تزریق دوم و رهاسازی تخمک‌ها باید در بازه ۳۲ تا ۱۰۸ ساعت باشد. با این‌حال، زمان پاسخ‌دهی برای هر جمعیت باید به‌طور جداگانه بازبینی شود (برای مشاهده جزئیات بیشتر به فصل ۴ و ۵ مراجعه نمایید).

جدول ۱۱-۱. پروتکل تحریک هورمونی مولدین سوف حاج طرخان طی دوره "تخم‌ریزی پیش از موعد"

	تزریق اول		تزریق دوم	
	دوز هورمون (میکروگرم $sGnRH_a$ به ازای کیلوگرم وزن بدن)	دما پس از تزریق (سانتی‌گراد)	دوز هورمون (میکروگرم $sGnRH_a$ به ازای کیلوگرم وزن بدن)	دما پس از تزریق (سانتی‌گراد)
مولدین ماده	۱۰	۱۰	۲۵	۱۲
مولدین نر	۵۰	۱۰	-	۱۲

فاصله بین تزریق‌ها ۷ روز می‌باشد (برای مشاهده جزئیات بیشتر به شکل ۱۱-۱ و شکل پ-۲-۲ مراجعه کنید)

مهم

توصیه می‌شود در هنگام استفاده از hCG (به‌جای انواع GnRH) برای القای رهاسازی تخمک و اسپرم فقط از یک مرحله تزریق استفاده شود. در این حالت ماهی‌ها (مولدین نر و ماده) باید در زمان تزریق دوم پروتکل ارائه‌شده در قسمت‌های قبل به ازای هر کیلوگرم وزن بدن با دوز ۵۰۰ واحد بین‌المللی hCG تزریق شوند (هنگامی‌که دمای آب روی ۱۲ درجه سانتی‌گراد تنظیم شده است).

منابع

Abdulfatah A, Fontaine P, Kestemont P, Gardeur J-N, Marie M (2011) Effects of photothermal kinetics and amplitude of photoperiod decrease on the induction of the reproduction cycle in female Eurasian perch *Perca fluviatilis*. Aquaculture 322–323:169–176. doi:10.1016/j. aquaculture.2011.09.002

Abdulfatah A, Fontaine P, Kestemont P, Milla S, Marie M (2013) Effects of the thermal threshold and the timing of temperature reduction on the initiation and course of oocyte development in cultured female of Eurasian perch *Perca fluviatilis*. Aquaculture 376–379:90–96. doi:10.1016/j. aquaculture.2012.11.010

Długosz M (1986) Oogeneza i cykl rocznego rozwoju gonad wybranych gatunków ryb w zbiornikach o odmiennych warunkach termicznych. Acta Acad Agric Techn Olst, Prot Aquarum Piscat 14:1–68

Fontaine P, Pereira C, Wang N, Marie M (2006) Influence of pre-inductive photoperiod variations on Eurasian perch *Perca fluviatilis* broodstock response to an inductive photothermal program. Aquaculture 255:410–416. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.12.025

Fontaine P, Wang N, Hermelink B (2015) Broodstock management and control of reproductive cycle. In: Kestemont P, Dąbrowski K, Summerfelt RC (eds) Biology and culture of percid fishes, Principles and practices. Springer, Dordrecht, p 958

Migaud H, Fontaine P, Sulistyo I, Kestemont P, Gardeur JN (2002) Induction of out-of-season spawning in Eurasian perch *Perca fluviatilis*: effects of rates of cooling and cooling durations on female gametogenesis and spawning. Aquaculture 205:253–267. doi:10.1016/ S0044-8486(01)00675-5

Migaud H, Gardeur JN, Kestemont P, Fontaine P (2004) Off-season spawning of Eurasian perch *Perca fluviatilis*. Aquac Int 12:87–102. doi:10.1023/B:AQUI.0000017190.15074.6c

Sudarno U, Winter J, Gallert C (2011) Effect of varying salinity, temperature, ammonia and nitrous acid concentrations on nitrification of saline wastewater in fixed-bed reactors. Bioresour Technol 102:5665–5673. doi:10.1016/j.biortech.2011.02.078

Sulistyo I, Fontaine P, Rinchard J, Gardeur JN, Migaud H, Capdeville B, Kestemont P (1998) Reproductive cycle and plasma levels of steroids in male Eurasian perch *Perca fluviatilis*. Aquat Living Resour 11:101–110. doi:10.1016/S0990-7440(00)00146-7

Szczerbowski A, Kucharczyk D, Mamcarz A, Łuczyński MJ, Targońska K, Kujawa R (2009) Artificial off-season spawning of Eurasian perch *Perca fluviatilis* L. Arch Pol Fish 17:95–98

Targońska K, Szczerbowski A, Żarski D, Łuczyński MJ, Szkudlarek M, Gomułka P, Kucharczyk D (2014) Comparison of different spawning agents in artificial out-of-season spawning of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L. Aquac Res 45:765–767. doi:10.1111/are.12010

Treasurer JW (1981) Some aspects of the reproductive biology of perch *Perca fluviatilis* L. Fecundity, maturation and spawning behavior. J Fish Biol 18:729–740

Treasurer JW, Holliday FGT (1981) Some aspects of the reproductive biology of perch *Perca fluviatilis* L. A histological description of the reproductive cycle. J Fish Biol 18:359–376. doi:10.1111/j.1095-8649.1981.tb03778.x

Wortman B, Wheaton F (1991) Temperature effects on biodrum nitrification. Aquac Eng 10:183–205. doi:10.1016/0144-8609(91)90023-D

Żarski D (2012) First evidence of pheromonal stimulation of maturation in Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L., females. Turk J Fish Aquat Sci 12:771–776

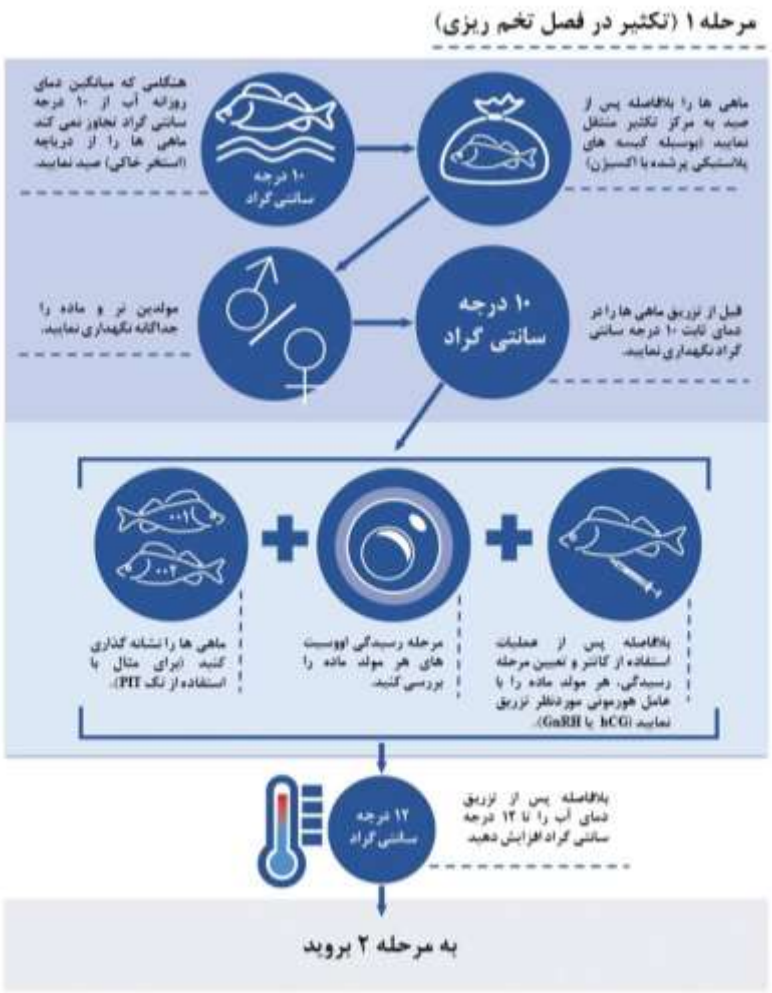
Żarski D, Bokor Z, Kotrik L, Urbanyi B, Horváth A, Targońska K, Krejszeff S, Palińska K, Kucharczyk D (2011) A new classification of a preovulatory oocyte maturation stage suitable for the synchronization of ovulation in controlled reproduction of Eurasian perch *Perca fluviatilis* L. Reprod Biol 11:194–209. doi:10.1016/S1642-431X(12)60066-7

Żarski D, Krejszeff S, Horváth Á, Bokor Z, Palińska K, Szentes K, Łuczyńska J, Targońska K, Kupren K, Urbányi B, Kucharczyk D (2012) Dynamics of composition and morphology in oocytes of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L., during induced spawning. Aquaculture 364– 365:103–110. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.07.030

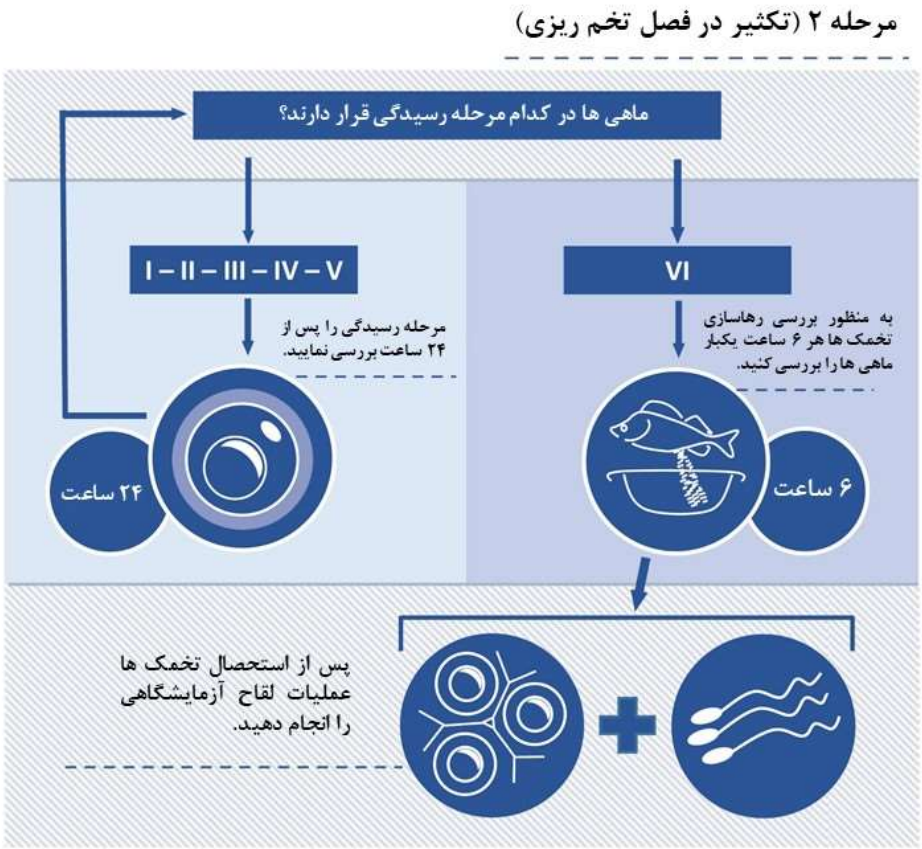
Żarski D, Horváth A, Held JA, Kucharczyk D (2015) Artificial reproduction of percid fishes. In: Kestemont P, Dąbrowski K, Summerfelt RC (eds) Biology and culture of percid fishes, 1st edn. Springer, Dordrecht, pp 123–161

پیوست‌ها

پیوست ۱

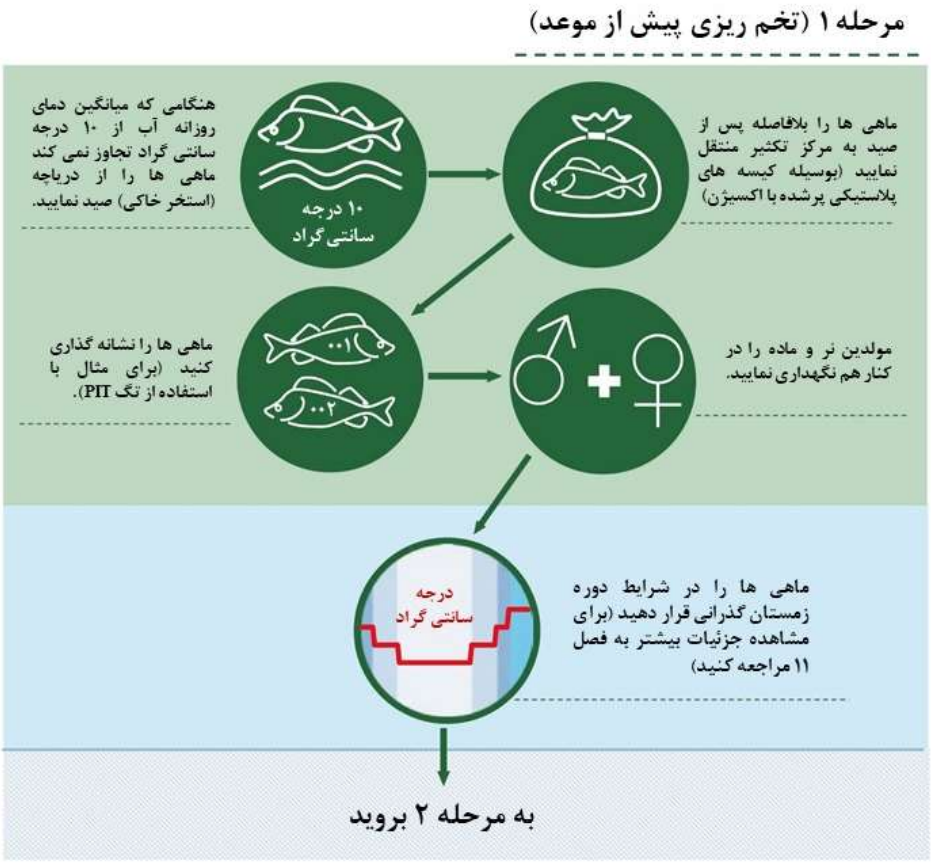


شکل پ-۱-۱. خلاصه شماتیک اولین مرحله پروتکل تکثیر سوف حاج طرخان طی فصل تخم‌ریزی

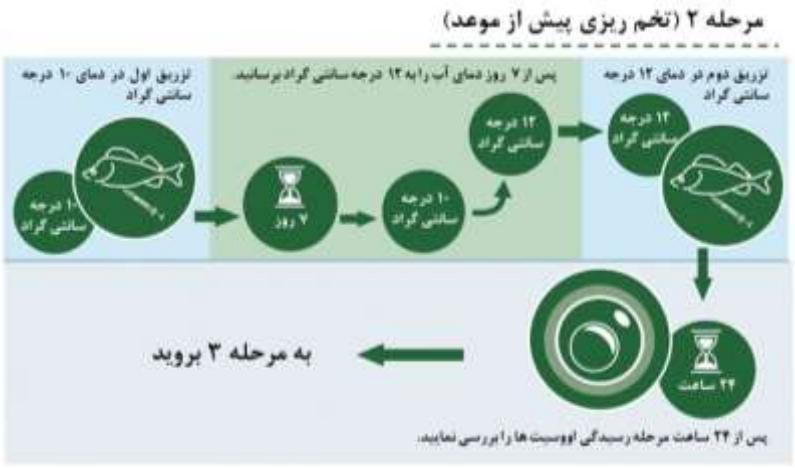


شکل پ-۱-۲. خلاصه شماتیک دومین (آخرین) مرحله پروتکل تکثیر سوف حاج طرخان طی فصل تخم‌ریزی

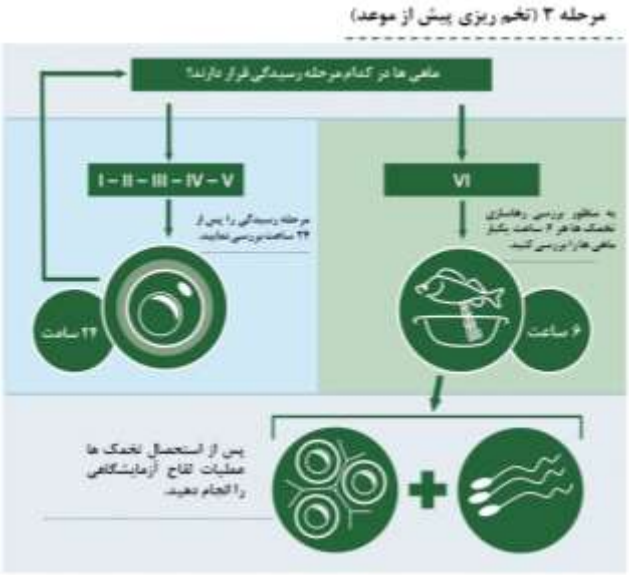
پیوست ۲



شکل پ-۲-۱. خلاصه شماتیک اولین مرحله پروتکل تکثیر سوف حاج طرخان طی "تخم‌ریزی پیش از موعد"



شکل پ-۲-۲. خلاصه شماتیک دومین مرحله پروتکل تکثیر سوف حاج طرخان طی "تخم‌ریزی پیش از موعد"



شکل پ-۲-۳. خلاصه شماتیک سومین (آخرین) مرحله پروتکل تکثیر سوف حاج طرخان طی "تخم‌ریزی پیش از موعد"

University of Guilan Press

Controlled Reproduction of Wild Eurasian Perch

A hatchery manual

Edited by

Żarski, Daniel...[et al.]

Translated by

Bahram Falahatkar, Ph.D

Erfan Akbari Nargesi, M.Sc