دانشکده شیلات و محیط زیست

عنوان پایان‌نامه

تاثیر محیط، درجه‌حرارت و مدت زمان نگهداری بر نگهداری کوتاه مدت تخمک ماهی‌قرمز *Carassius auratus gibelio*

پژوهش و نگارش

محمدمهدی طاعتی‌کلی

استاد راهنما

آقای دکتر علی شعبانی

استاد مشاور

آقای دکتر محمدرضا ایمانپور

فهرست

چکیده فارسی ٥
اهداف ٦
فرضیات ٦
١- مقدمه و کلیات ٧
سابقه تحقیق و مطالعات مروری ١٤
٢- مواد و روش ٢١
٢-١- مکان و زمان انجام آزمایش ٢٢
٢-٢- ماهیان مولد و طراحی آزمایش ٢٢
٢-٣- نحوه تیماربندی در گروه‌های آزمایشی ٢٣
٢-٣-١- گروه ١- نگهداری تخمک ماهی قرمز در مایع سلومیک ٢٣
٢-٣-١-١- استحصال مایع سلومیک ٢٣
٢-٣-١-٢- استحصال و جمع آوری گامت ٢٤
٢-٣-١-٣- نگهداری تخمک‌های اوول شده و لقاح ٢٤
٢-٣-٢- گروه ٢- نگهداری تخمک ماهی قرمز بدون رقیق کننده ٢٥
٢-٣-٢-١- استحصال و جمع آوری گامت ٢٥
٢-٣-٢-٢- نگهداری تخمک‌های اوول شده و لقاح ٢٦
٢-٣-٣- گروه ٣- نگهداری تخمک ماهی قرمز به همراه رقیق کننده دتلاف ٢٧
٢-٣-٣-١- استحصال و جمع آوری گامت ٢٧
٢-٣-٣-٢- نگهداری تخمک‌های اوول شده و لقاح ٢٨
٢-٣-٤- گروه ٤- نگهداری تخمک ماهی قرمز به همراه مایع سلومیک مصنوعی ٢٩

۲-۳-٤-۱- استحصال و جمع آوری گامت ۳۰
۲-۳-٤-۲- نگهداری تخمک‌های اوواله شده و لقاح ۳۱
۲-۳-۵- گروه ۵- نگهداری تخمک ماهی قرمز درون محوطه بدن ۳۲
۲-٤- محاسبه میزان بدشکلی لاروی ۳۳
۲-۵- آنالیز آماری ۳٤
۳- نتایج ۳۵
۳-۱- نتایج حاصل از نگهداری تخمک ماهی قرمز در رقیق کننده مایع سلومیک ۳٦
۳-۲- نتایج حاصل از نگهداری تخمک ماهی قرمز بدون رقیق کننده ۳۸
۳-۳- نتایج حاصل از نگهداری تخمک ماهی قرمز به همراه رقیق کننده دتلاف ٤۰
۳-٤- نتایج حاصل از نگهداری تخمک ماهی قرمز در مایع سلومیک مصنوعی ٤۳
۳-۵- نتایج حاصل از نگهداری تخمک ماهی قرمز درون محوطه تخمدان ٤٦
٤- بحث ٤۸
٤-۱- نگهداری کوتاه مدت تخمک ماهی قرمز در مایع سلومیک ۵۱
٤-۲- نگهداری کوتاه مدت تخمک ماهی قرمز بدون رقیق کننده ۵۵
٤-۳- نگهداری کوتاه مدت تخمک ماهی قرمز در رقیق کننده دتلاف ۵٦
٤-٤- نگهداری کوتاه مدت تخمک ماهی قرمز در مایع سلومیک مصنوعی ٦۰
٤-۵- نگهداری کوتاه مدت تخمک ماهی قرمز در محوطه تخمدانی و شرایط بدن ٦۲
۵- نتیجه‌گیری ٦٤
٦- پیشنهادات پژوهشی ٦۵
۷- پیشنهادات اجرایی ٦۵
منابع ٦٦
چکیده انگلیسی ۷۱

چکیده

هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر چند محیط نگهداری، درجه حرارت و مدت زمان بر نگهداری کوتاه مدت تخمک بارور نشده ماهی قرمز (*Carassius auratus gibelio* Bloch, 1782) بود. بر اساس محیط نگهداری، گروه‌های آزمایشی به ۵ گروه مقابل تقسیم شدند: نگهداری در مایع سلومیک طبیعی، نگهداری بدون رقیق کننده، نگهداری به همراه رقیق کننده دتلاف، نگهداری در مایع سلومیک مصنوعی و نگهداری در محوطه تخمدانی و شرایط بدن. تخمک‌های متعلق به هر گروه آزمایشی (به غیر از نگهداری در شرایط بدن) در دو تیمار دمایی یخچال و محیط و برای مدت زمان‌های ۲۰، ۳۰، ٦۰ و ۱۲۰ دقیقه نگهداری شده و با فرا رسیدن هر یک از زمان‌های مذکور با اسپرم تازه حاصل از چندین مولدین نر لقاح یافته و انکوباسیون شدند. تخمک‌های گروه کنترل هر گروه نیز در زمان صفر (بدون نگهداری) بارور گردیدند. هر گروه دارای ۹ تیمار و ۳ تکرار به ازای هر تیمار بود. در شرایط نگهداری در بدن، مولدین در درجه حرارت محیط نگهداری شده و پس از آغاز اوولاسیون، مولدین در زمان‌های آغاز مشاهده اوولاسیون، ۲۰، ۳۰، ٦۰ و ۱۲۰ دقیقه پس از اوولاسیون تخم‌کشی شده و تخمک‌ها بارور و انکوباسیون شدند. درصد جنین‌های چشم زده، تخمه‌گشایی و بدشکلی (دفرمه شدگی) لاروی به‌عنوان شاخص‌های باروری و کیفیت تکثیر ثبت گردیدند. نتایج حاصل نشان داد که در تمامی گروه-های آزمایشی (غیر از نگهداری تخمک‌ها در شرایط بدن)، با افزایش زمان نگهداری میزان چشم‌زدگی و تخمه‌گشایی به صورت معنی-داری کاهش پیدا کرد. در گروه آزمایشی نگهداری در مایع سلومیک طبیعی، پس از گذشت ۱۲۰ دقیقه، در شرایط دمایی محیط و یخچال درصد چشم‌زدگی و تخمه‌گشایی به صفر درصد رسید. در شرایط نگهداری بدون رقیق کننده، با گذشت ۲ ساعت از نگهداری تخمک‌ها، میزان چشم‌زدگی و تفریخ در دمای یخچال به ترتیب به ۱۵/۷۳ و ٦۲/۷۱ و در دمای محیط به ۹/٦ و ٥٤/٦ رسید. در محیط نگهداری دتلاف نیز پس از گذشت ۱۲۰ دقیقه نگهداری، در تیمار دمایی محیط میزان جنین‌های چشم‌زده و تفریخ به ۰ درصد و در شرایط دمایی یخچال به ۳/٦ و ۲۱/٤۹ درصد رسید. در گروه آزمایشی نگهداری تخمک‌ها در مایع سلومیک مصنوعی هم پس از ۱۲۰ دقیقه نگهداری میزان چشم‌زدگی و تفریخ در تیمار دمایی محیط به ۰ و در شرایط دمایی یخچال به ۹/۱۹ و ۳۳/٦۳ رسید. در گروه آزمایشی نگهداری تخمک ماهی قرمز در شرایط بدن، با گذشت دو ساعت از آغاز اوولاسیون کاهش معنی‌داری در درصد چشم‌زدگی و تخمه‌گشایی مشاهده نشد. از سوی دیگر، تخمک‌های نگهداری شده در تیمار دمایی یخچال دارای راندمان بالاتر و تعداد تخم‌های چشم‌زده و هچ شده بیشتری نسبت به تیمار دمایی محیط در کلیه گروه‌های آزمایشی بودند. همچنین نتایج ثبت شده از تعداد لاروهای بدشکل نشان داد که افزایش معنی‌داری در تعداد این لاروها با افزایش زمان نگهداری تخمک ماهی قرمز وجود نداشت. به‌طور کلی و با توجه به شرایط آزمایشی و یافته‌های حاصل از این آزمایش می‌توان بیان نمود که رقیق کننده‌های به کار رفته در این آزمایش برای نگهداری کوتاه مدت تخمک ماهی قرمز چندان مناسب نبودند. ولی با مقایسه گروه‌های آزمایشی این مطالعه می‌توان عنوان کرد که ضعیف‌ترین گروه آزمایشی مربوط به نگهداری تخمک ماهی قرمز در رقیق کننده دتلاف و بهترین گروه آزمایشی گروه نگهداری تخمک در شرایط بدن و محوطه تخمدانی بود.

کلمات کلیدی: نگهداری کوتاه مدت، محیط نگهداری، تخمک، ماهی قرمز

فصل اول:

مقدمه و کلیات

ماهی قرمز (*Carassius auratus gibelio* Bloch, 1782) از خانواده کپور ماهیان بوده و از نظر زیستی و تغذیه‌ای شرایطی مشابه با کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) دارد. ماهی قرمز در محیط طبیعی در آبهای ساکن و یا آب‌های تقریبا ساکن با سرعت ناچیز که پوشیده از گیاهان آبزی و دارای بستر نرم است زندگی کرده و غالبا به همراه ماهیان برکه‌ای دیده می‌شود (وثوق و مستجیر، ۱۳۷۳). تکثیر و پرورش این ماهی به منظور تامین ماهی کوچک مورد نیاز سفره هفت سین و نیز علاقه‌مندان نگهداری ماهی قرمز در آکواریوم چندین سال است که رونق یافته و نیاز آن هر ساله بیشتر احساس می‌شود (زادمجید و همکاران، ۱۳۸۷). به طور کلی در تکثیر مصنوعی ماهیان به منظور تولید لاروهای با کیفیت مناسب و بالا بردن راندمان لقاح نیاز به گامت با کیفیت بالا می‌باشد (تکین[1] و همکاران، ۲۰۰۳).

محدودیت عمده در بیولوژی گامت ماهیان، کاهش مداوم کیفیت آنها با گذشت زمان می باشد. قابلیت باروری تخمک‌های رسیده به تدریج کاهش پیدا کرده و سرانجام از بین می‌رود، از این رو افزایش قابلیت زنده‌مانی تخمک‌ها و دست‌یابی به روش‌هایی که بتوان گامت ماهیان را در شرایط خارج از بدن با حداقل افت کیفیت نگهداری کرد، یکی از فاکتورهای مهم در مدیریت آبزی پروری می‌باشد (اسپرینگیت[2] و همکاران، ۱۹۸٤؛ جورسویک[3] و همکاران، ۱۹۹۰؛ دتلاف[4] و همکاران، ۱۹۹۳؛ راتبرد[5] و همکاران، ۱۹۹٦؛ اسکافر[6] و همکاران، ۱۹۹۷). مطالعه حاضر نیز با هدف بررسی ظرفیت نگهداری تخمک ماهی قرمز در شرایط داخل و خارج از بدن و در دو درجه حرارت محیط و یخچال، برای مدت زمان‌های ۰، ۲۰، ۳۰، ٦۰ و ۱۲۰ دقیقه مورد ارزیابی قرار گرفت.

به طور کلی می‌توان عنوان کرد که علم نگهداری کوتاه و بلند مدت تخمک ماهیان، بحثی جدید بوده که اطلاعات زیادی از آن در دست نمی‌باشد و مطالعات انجام شده بر روی آن در سطح مقدماتی است. از این رو

1. Tekin
2. Springate
3. KJorsvik
4. Dettlaff
5. Rothbard
6. Escaffre

هنوز دستورالعمل قطعی برای نگهداری تخمک ماهیان (چه سردآبی و چه گرمابی) ارائه نشده است. بنابراین دست‌یابی به دانش فنی نگهداری تخمک یک گونه، در گرو انجام مطالعات بسیار گسترده می‌باشد.

هنگامی که تخمک از گناد آزاد می‌شود، مشکلات مربوط به قابلیت زنده‌مانی آن بیشتر می‌شود. تخمک‌های بالغ می‌توانند برای چندین هفته در مرحله متافاز II میوز دو باقی بمانند تا اینکه آزاد و فعال شوند. فعالیت تخمک‌ها باعث حرکت آنها از مرحله خواب می‌شود که به برخی از تغییرات فیزیولوژیکی مرتبط می‌باشد (لینهارت[1] و همکاران، ۱۹۹۵). زمانی که تخمک‌ها در حفره بدن ماهی ماده قرار دارند در مایع سلومیک نگهداری می‌شوند. تخمک‌ها تنها باید در یک محدوده زمانی مشخص پس از آزاد شدن از دیواره تخمدان بارور گردند تا جنین‌های با قابلیت بقا تولید شوند. این زمان از چند ساعت تا چند هفته در میان گونه‌ها متفاوت می‌باشد (هابی و پانکورست[2]، ۱۹۹۷). به عنوان مثال مرحله پس از آزاد شدن تخمک ماهی کپور در محوطه تخمدانی معمولاً بسیار کوتاه و در محدوده‌ای بین ٦-۱ ساعت و در ماهی قزل‌آلا ۱۰-۷ روز می‌باشد (مارسل[3]، ۱۹۸۱). تخمک-های آزاد شده در محوطه تخمدانی در اثر تغییرات تدریجی مورفولوژیکی و بیوشیمیایی وارد مرحله فوق رسیدگی شده که این حالت تاثیر منفی بر باروری و تکامل جنینی می‌گذارد (فورماسین[4] و همکاران، ۱۹۹۳). فرآیند فوق رسیدگی تخمک‌ها، رویدادی اجتناب ناپذیراست که در ماهیان مولد رخ می‌دهد. این پدیده برای بدست آوردن و باروی تخمک‌ها در زمان‌های پس از اوولاسیون حائز اهمیت است. بروز حالت فوق رسیدگی در کارگاه‌های تکثیر زمانی به وقوع می‌پیوندد که تخمک‌های آزاد شده در زمان مناسب تخم‌کشی نگردند. این حالت بیشتر در ماهیانی وجود دارد که تخمک‌های آنها تنها از طریق تخم‌کشی دستی و تلقیح مصنوعی بدست می‌آید (جورسویک و همکاران، ۱۹۹۰). عموماً، تخمک‌ها می‌توانند چندین روز در مایع سلومیک نگهداری شوند که این دوره در ارتباط با درجه حرارت نگهداری می‌باشد (جنسن و آلدردیس[5]، ۱۹۸٤) .

1. Linhart
2. Hobby and Ponkhurst
3. Marcel
4. Formacion
5. Jehsen and Alderdice

قابلیت بقای تخمک به مدت زمانی که تخمک‌های آزاد شده از مولد ماده رها شده تا زمانی که بارور شوند نیز بستگی دارد (لگندره[1] و همکاران، ۱۹۹٦). فاکتور محدود کننده برای نگهداری تخمک‌های ماهیان، توانایی عملکرد طبیعی آنها در لقاح و تکامل جنینی می‌باشد. تخمک‌های آزاد شده که در محوطه تخمدان و یا شرایط آزمایشگاهی نگهداری می‌شوند، به سرعت قابلیت خود را برای لقاح و تکامل جنینی از دست می‌دهند (لینهارت و همکاران، ۱۹۹۵). باروری گامت‌های ماهیان بر اثر لقاح خارجی، به ثانیه و دقایق کوتاهی در آب محدود می‌شود، زیرا تخمک‌ها فعال شده و دستخوش واکنش‌های غشایی می‌شوند که در اثر آن مجرای میکروپیل بسته می‌شود (هارت[2]، ۱۹۹۰). علت از دست رفتن بقای تخمک به خوبی شناخته نشده است.

براساس گفته‌های استوس[3] (۱۹۸۳)، نگهداری کوتاه مدت موفق تخمک در گونه‌هایی بدست می‌آید که فعالیت پس از اوولاسیون، بعد از رهایی تخمک در آب رخ دهد (مانند آزاد ماهیان). درسایر جنس‌ها مانند Carassius و Cyprinus، خودفعالی بعد از اوولاسیون و همچنین زمانی‌که تخمک‌ها در محلول رینگر نگهداری می‌شوند رخ می‌دهد. بنابراین جلوگیری از فعالیت مکانیکی تخمک، نقطه‌ای بحرانی برای نگهداری کوتاه مدت آن می‌باشد (لیونگ و جامیسون[4]، ۱۹۹۱).

طولانی کردن دوره نگهداری تخمک‌های اوولە شده بسیار مشکل بوده و در کپور ماهیان از چند ساعت تجاوز نمی‌کند. اگر چه نگهداری طولانی مدت اسپرم به صورت منجمد به طور گسترده‌ای بررسی شده و با تکنیک‌های نگهداری برای بسیاری از گونه‌ها از جمله کوی و کپور (کورکورا[5] و همکاران، ۱۹۸٤؛ لابزنس[6] و همکاران، ۲۰۰۵) بهینه شده است، ولی کاربرد روش‌های مشابه برای نگهداری تخمک ماهیان هنوز نتایج رضایت بخشی به دنبال نداشته است.

نگهداری تخمک و جنین ماهیان به صورت منجمد تاکنون موفق نبوده است. نگهداری موفق تخمک و جنین‌های موجودات آبزی، به تعداد کمی از گونه‌های بی‌مهرگان محدود شده است. بر خلاف تخمک‌ها و جنین‌های

1. Legendre
2. Hart
3. Stoss
4. Leung and Jamieson
5. Kurkura
6. Lubzens

نرم‌تنان و سخت پوستان آبزی، تخمک و جنین‌های ماهیان بزرگ بوده و محتوی مقدار زیادی زرده می‌باشد که با یک لایه ضخیم کوریونی پوشیده شده‌اند. به علت اندازه بزرگ تخمک، نسبت زیاد سطح به حجم، حجم زیادآب، توده بزرگ زرده، غشای احاطه کننده تخمک با ویژگی‌های نفوذ پذیری متفاوت، یکسانی نفوذ ترکیبات آلی کرایوپروتکتنت‌ها[1] (ترکیباتی که دارای نقطه انجماد پایینی می‌باشند)، دهیدراسیون ناکافی و سمیت کرایوپروتکتنت‌ها، میزان سردکنندگی ثابت در طول فرایند انجماد، انجماد در تخم‌های بزرگ و چگال علی‌رغم نگهداری اسپرماتوزوآ ناموفق بوده است (سکوئت[2] و همکاران، ۱۹۹۹؛ چائو و لیائو[3]، ۲۰۰۱؛ لابزنس و همکاران، ۲۰۰۵). از این‌رو، بیشتر مطالعات در زمینه نگهداری کوتاه مدت تخمک ماهیان متمرکز شده است.

به طور کلی، در بحث نگهداری کوتاه مدت تخمک، سه رکن اصلی زیر مورد مطالعه قرار می‌گیرند:

۱- نوع محیط نگهداری (اکستندر) مورد استفاده که می‌تواند به صورت طبیعی (مایع سلومیک) و یا سنتتیک (محلول رینگر، اکستندر دتلاف، محیط مصنوعی مایع سلومیک و . . .) باشد.

۲- مدت زمان نگهداری که بسته به نوع گونه و سردآبی یا گرمابی بودن متفاوت است.

۳- درجه حرارت

بیشتر پژوهش‌ها در زمینه نگهداری تخمک نیز روی تخمک ماهیان سرد آبی انجام شده است. نشان داده شده است که سرد کردن تخم‌های بارور آزاد ماهیان می‌تواند زنده‌مانی را افزایش داده و ازاین‌رو سرد کردن می‌تواند به‌عنوان ابزاری مفید در حمل و نقل تخم‌های این ماهیان مورد استفاده قرار گیرد. حمل و نقل تخم‌های بارور شده آزاد ماهیان در مرحله چشم‌زدگی به سراسر جهان، فرآیندی متداول است (نش و نوواتی[4]، ۱۹۹۵). این سیستم، قابلیت نگهداری ٤٨ ساعته را دارد، بنابراین نگهداری و حمل و نقل تخمک‌های بارور نشده پیشنهادی عملی بوده و امکان نگهداری طولانی مدت‌تر آن در دوره‌های حضور رقیق کننده وجود دارد.

دستورالعمل‌های نگهداری کوتاه مدت تخمک در درجه حرارت‌های معین نیز در ماهیان مختلفی چون آزاد ماهیان (بیلارد[5]، ۱۹۸۰)، گربه‌ماهیان (لگندره و همکاران، ۱۹۹٦) و کپور (لینهارت و همکاران، ۱۹۹۵) مورد

1. Cryoprotectants
2. Suquet
3. Chao and Liao
4. Nash and Novothy
5. Billard

بررسی قرار گرفته است. غالب تحقیقات انجام شده در این زمینه نیز روی آزاد ماهیان می‌باشد که نشان دهنده تاثیر درجه حرارت (بیلارد و جیلت[1]، ۱۹۸۱؛ سو و گوئتز[2]، ۱۹۹۳) و ترکیبات محیط نگهداری (بیلارد، ۱۹۸۰) روی ظرفیت نگهداری تخمک می‌باشد. تاثیر هر دو عامل در گربه ماهی اروپایی (*Siluris glanis*) (لینهارت و بیلارد، b ۱۹۹۵) و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (راتبرد و همکاران، ۱۹۹٦) نیز گزارش شده است. افزودن اکسیژن در محیط نگهداری، باروری تخم‌های تیلاپیا (*Sarotherodon mossambocus*) را پس از نگهداری افزایش داد (هاروی و کلی[3]، ۱۹۸٤). در ماهیان دریایی نیز میزان بالای تخمه‌گشایی تخم‌های هرینگ اقیانوس اطلس (*Clupea pallasii*) در دوره‌های نگهداری ۳٦ ساعته مشاهده شد (بلاکستر[4]، ۱۹۵۵).

تخمک‌های اوله شده تاس ماهی سیبری (*Acipenser baeri*) و استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) که در مایع سلومیک و در درجه حرارت ۱۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بودند، باروری خود را به ترتیب تا ٤ و ٤-۲ ساعت پس از اوولاسیون حفظ کردند (گیسبرت و وایلیوت[5]، ۲۰۰۲). تخمک‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) نیز در محیط نگهداری کورتلند، در درجه حرارت ۱۳-۱۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت ٤۸ ساعت نگهداری شدند (گوئتز و کافمن[6]، ۲۰۰۰).

به طور کلی می‌توان بیان کرد که هدف از نگهداری کوتاه مدت تخمک، افزایش طول عمر آن پس از رسیدگی می‌باشد و ابزارهای اجرائی نگهداری گامت‌های مولدین نر و ماده و جنین‌ها، راهکاری مفید در راستای اجرای برنامه‌های تکثیر در عملیات‌های مختلف کارگاه‌های تکثیر است که اوولاسیون در آنها توسط هورمون و یا عوامل محیطی کنترل و تحریک می‌شود (راتبرد و همکاران، ۱۹۹٦).

1. Gillet
2. Hsu and Goetz
3. Harvey8 kelley
4. Blaxter
5. Gisbert and williot
6. Goetz and Coffman

از جمله کاربردهای نگهداری کوتاه مدت تخمک می‌توان به موارد ذیل اشاره کرد:

۱- سهولت بخشیدن تولید ذخایر گامتی.

۲- حفظ تنوع ژنتیکی وحفظ ذخایر ژنتیکی گونه‌های در معرض انقراض (میس[1]، ۱۹۹٦).

۳- بهبود گزینش مولدین و هیبریدگیری.

٤- کاربرد در حمل ونقل گامت به مسافت‌های کوتاه (در گامت‌هایی به صورت هم‌زمان از نرها وماده‌ها در طول تکثیر مصنوعی جمع‌آوری شده‌اند).

۵- دستکاری‌های کروموزومی (استوس، ۱۹۸۳).

٦- بهبود مدیریت هچری از طریق کاهش مشکلات حاصل از تخم‌کشی و بلوغ مولدین غیرهمزمان[2] (برومأژ و رابرت[3] ، ۱۹۹۵).

۷- کاربرد در مواقعی که عدم هم‌زمانی رسیدگی جنسی در هر دو جنس (نر و ماده) در طول تکثیر مصنوعی وجود دارد (جورسویک و همکاران، ۱۹۹۰).

۸- میسر ساختن نگهداری تخمک‌ها در زمانی که اسپرم مولدین نر با یک مرحله اسپرم گیری کافی نبوده و زمانی لازم است تا برای اسپرم کشی مجدد به آنها داده شود (این زمان در ماهی قرمز ۱ – ۰/۵ ساعت می‌باشد).

۹- فراهم کردن شرایط اجرای فرآیندهایی چون تابش اشعه به گامت (برای ایجاد تنها یک جنس) که پس از آن تخمک باید همچنان زنده باشد (لینهارت و همکاران، ۲۰۰۱).

با افزودن یک محلول اکستندر و نگهداری در درجه حرارت‌های پایین می‌توان از کاهش قابلیت زنده‌مانی گامت کاست. اگر چه، مطالعات کمی در خصوص نگهداری تخمک‌ها در محلول‌های رقیق کننده و درجه حرارت‌های مختلف در پیش از لقاح وجود دارد. همچنین برخلاف ماهی آزاد و قزل‌آلا، تخمک‌های تعداد کمی از ماهیان گرمابی برای بررسی میزان بقا در ساعت‌های نگهداری در محوطه تخمدان مورد آزمایش قرار گرفته‌اند.

1. Maisse
2. Asynchronous
3. Bromage and Robbert

علل انتخاب ماهی قرمز به عنوان گونه‌ی مطالعاتی این آزمایش موارد زیر بودند:

۱- در ماهی قرمز عدم اسپرم دهی به میزان کافی و نیاز چند باره به اسپرم‌کشی وجود دارد که به کـرات در آن مشاهده می‌شود و در برخی مواقع به علت نگهداری زیاد تخمک در خارج و یا داخل بدن تا انجـام اسپرم گیری مجدد، تعداد زیادی از تخمک‌ها از بین رفته و درصد چشم‌زدگی و تفریخ به شدت کاهش می‌یابد، از این رو ارائه روشی برای نگهداری کوتاه مدت تخمک ماهی قرمز لازم است.

۲- بدست آوردن زمان زنده‌مانی تخمک این گونه در شرایط خارج از بدن، در جهت بررسـی وجـود و یـا عدم وجود امکان حمل و نقل گامت آن سودمند می‌باشد.

۳- ماهی قرمز نیز مانند گونه‌هایی چون زبرافیش (ماهی گورخری) و سیم‌دریایی گونه‌ای مدل می‌باشد که اطلاعات حاصل از پژوهش بر روی آن می‌تواند نکات و موارد سودمندی را در خصوص کپورماهیان به دست دهد که قابل اجرا یا تعمیم در گونه‌های دیگر نیز باشد.

از این رو، مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر محیط‌های نگهداری مختلف (مایع سلومیک، مایع سلومیک سنتتیک، اکستندر دتلاف، بدون اضافه کردن اکستندر و نگهداری در شرایط بدن)، درجه حرارت و مدت زمان نگهداری بر میزان چشم زدگی، تخمه گشایی و بد شکلی لاروی تخمک‌های ماهی قرمز انجام شد.

اهداف:

۱- تعیین تاثیر چند محیط نگهداری بر زنده‌مانی، قدرت باروری تخمک ماهی قرمز و میزان بدشکلی لاروی.

۲- تعیین تاثیر درجه حرارت یخچال و محیط بر مدت زمان نگهداری، میزان چشم‌زدگی، تخمه‌گشایی و بدشکلی لاروی تخمک ماهی قرمز.

۳- تعیین تاثیر مدت زمان نگهداری بر درصد چشم‌زدگی، تخمه‌گشایی و تعداد لاروهای بدشکل.

فرضیات:

۱- استفاده از مایع سلومیک طبیعی ماهی قرمز به عنوان محیط نگهداری تخمک همین گونه سبب افزایش ماندگاری و نگهداری مطلوب تخمک می‌شود.

۲- استفاده از اکستندرهای سنتتیک دتلاف و مایع سلومیک مصنوعی در افزایش زمان نگهداری تخمک ماهی قرمز موثر است.

۳- نگهداری تخمک ماهی قرمز تحت تیمار دمایی یخچال باعث افزایش طول دوره نگهداری و مشاهده راندمانی بالاتر نسبت به تیمار دمایی محیط می‌شود.

فصل دوم:

مروری بر مطالعات انجام شده

مطالعات بسیار کمی در زمینه نگهداری تخمک ماهیان گرمابی به‌صورت منجمد یا نگهداری کوتاه مدت انجام شده است. به‌طور کلی تلاش‌ها برای نگهداری تخمک ماهیان به صورت منجمد تاکنون ناموفق بوده است، که دارای دلایل مختلفی می‌باشد (رانا[1]، ۱۹۹۵). در نتیجه، روش‌های نگهداری کوتاه مدت با استفاده از مایع تخمدانی و محیط‌های نگهداری مصنوعی و استفاده از درجه حرارت‌هایی با کارایی بالاتر توسعه یافت. تخمک‌های برخی از ماهیان گرمابی که پس از اوولاسیون استحصال شدند، قابلیت باروری خود را پس از ٦-٤ ساعت در درجه حرارت ۲۰-۱۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط نگهداری در آزمایشگاه از دست دادند (کیسلف[2]، ۱۹۸۰؛ مارسل، ۱۹۸۱؛ زلابک[3] و لینهارت، ۱۹۸۷).

پس از رقیق کردن با آب شیرین و یا یک محلول نمکی، دوره لقاح تخمک بسیارکوتاه بوده و پس از دقایق کوتاهی به صفر درصد می‌رسد (رنارد[4] و همکاران، ۱۹۸۷). یاماموتو[5] (۱۹٦۱) همچنین اشاره کرد که این پدیده در سایر کپور ماهیان نیز وجود دارد. در ماهی کپور نقره‌ای *Hypophtalmictis molitrix* تخمک‌ها ظرفیت لقاحی خود را پس از ٤۰-۳۰ ثانیه در آب و پس از ۷۰-۵۰ ثانیه در محلول نمکی از دست می‌دهند (میکودینا و ماکیوا[6]، ۱۹۸۰)، اما آنها قابلیت لقاح را برای ۸ دقیقه هنگامی که در محلول دارای ٤۰ mmol Nacl، ۵ mmol kcl، ۲۰ mmol Tris و در pH= ۸ نگهداری شوند، حفظ کردند (سعد[7] و بیلارد، ۱۹۸۷). با اضافه کردن یک محلول رقیق‌کننده، قابلیت لقاح تخمک‌های کپور معمولی می‌تواند حفظ شده و چسبندگی تخمک‌ها به عنوان یک تک لایه از بین برود.

تخمک‌های آزاد ماهی کتا (*Oncorhynchus keta*)، در درجه حرارت ۹ تا ۱۵ درجه سانتی‌گراد زنده‌مانی بالاتری را نسبت به درجه حرارت‌های ۳ تا ٦ درجه سانتی‌گراد در محیط فاقد نگهدارنده از خود نشان دادند (جنسن و آلدردیس، ۱۹۸٤).

---

1. Rana
2. Kiselev
3. Zlabek
4. Renard
5. Yamamoto
6. Mikodina and makeyeva
7. Saad

تخمک‌های ماهی تیلاپیای (*Sarotherodon mossambicus*) نگهداری شده در مایع سلومیک در درجه حرارت ۲۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۹ ساعت، میزان لقاح ۳۵ درصد را به همراه داشت، در حالی‌که در درجه حرارت‌های پایین‌تر از ۱۸ درجه سانتی‌گراد، قابلیت لقاحی پس از ۱/۵ ساعت کاهش پیدا کرد (هاروی و کلی، ۱۹۸٤). این حالت درتخمک‌های کپور معمولی قرار داده شده درمحلول رینگر ایزوتونیک و هیپوتونیک نیز مشاهد شد (یاماموتو، ۱۹٦۱). همچنین این واکنش (افزایش ضخامت کوریون) پس از ٦-٤ ساعت نگهداری در مایع تخمدانی کاهش پیدا کرد (بیلارد و همکاران، ۱۹۸٦؛ رنارد و همکاران، ۱۹۸۷).

تخمک‌های استحصال و نگهداری شده کپور معمولی بدون استفاده از هیچ اکستندری، قابلیت لقاح خود را از دست داده و درصد لقاح در آنها بعد از ٦-٤ ساعت در درجه حرارت ۲۰-۱۵ درجه سانتی‌گراد به صفر رسید (رنارد و همکاران، ۱۹۸۷؛ لینهارت و همکاران، ۱۹۹۵). در نگهداری در درجه حرارت‌های بالاتر (۳۰ - ۲٤ درجه سانتی‌گراد)، لقاح پس از ۲-۱/۵ ساعت صفر درصد بود (جانیچن، ۱۹۷۸). تخمک‌های کپور معمولی نگهداری شده در شوری و فشارهای اسمزی مختلف به مدت ۹ ساعت، افزایش خود به‌خودی ضخامت کوریون و از بین رفتن لقاح را نشان دادند (رنارد و همکاران، ۱۹۸۷ و ۱۹۹۰). قابلیت باروری تخمک‌های لای ماهی (*Tinca tinca*) که در شرایط آزمایشگاهی برای ۱، ۵/۵ و ۸/۵ ساعت در ۱۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند، درصد تفریخ به طور معنی‌داری به ٤۵/٤، ۱۰/۱، ۰/٦ درصد به ترتیب کاهش پیدا کرد (لینهارت و بیلارد، a ۱۹۹۵).

تخمک‌های گربه ماهی اروپایی (*Silurus glanis*) که بدون استفاده از هیچ اکستندر و محلولی در درجه حرارت ۱۹ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳/۵ ساعت نگهداری شده بودند دارای درصدتفریخ (٥٤ درصد) بالاتری نسبت به گروه کنترل (۳۵ درصد) بودند که در زمان صفر نگهداری شده بودند. درحالی‌که تخمک‌هایی که در ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بودند تفریخ نشدند (لینهارت و بیلارد، b ۱۹۹۵).

راتبرد و همکاران (۱۹۹٦) نگهداری کوتاه مدت تخمک‌های ماهی کوی (Ornamental *Cyprinus carpio*) در مایع تخمدانی و در سه رژیم دمایی مختلف را مورد بررسی قرار دارند. در این آزمایش گروهی از تخمک‌ها در درجه حرارت پایین (۹-٦ درجه سانتی‌گراد) ، گروه دیگر در درجه حرارت بالا و متغیر (۳۱- ۱۲ درجه سانتی‌گراد) و گروه سوم در درجه حرارت معتدل و ثابت (۲٤/۵ - ۲۰ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شده و

بقای لاروهای در حال تکامل در روزهای اول و دوم پس از لقاح و میزان تفریخ نشدن لاروها در پایان آزمایش محاسبه شد. بالاترین میزان مرگ و میر، در درجه حرارت بالا و متغیر و پایین‌ترین میزان آن در درجه حرارت معتدل و ثابت مشاهده شد. نتایج این آزمایش نشان داد که تخمک‌های این ماهی در درجه حرارت معتدل و ثابت (۲٤/٥ – ۲۰درجه سانتی گراد) برای حداکثر ٦ ساعت می‌توانند نگهداری شوند (راتبرد و همکاران، ۱۹۹٦) و تخمک‌های کپور معمولی نگهداری شده در ۲۰ تا ۲٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت، درصد لقاح ۹٦ درصد را داشتند (کیسلف، ۱۹۸۰). تخمک‌های کپور معمولی که در درجه حرارت‌های صفر و ۲٤ درجه سانتی‌گراد و برای ٦۰ دقیقه بدون هیچ اکستندری نگهداری شدند، حساسیت وابسته به درجه حرارت و مدت زمان نگهداری را نشان دادند (اوربانی[1] و همکاران، ۱۹۹۸).

سکوئت و همکاران (۱۹۹۹) تاثیر درجه حرارت، تعداد تخمک‌ها در هر تکرار، اضافه کردن یک رقیق کننده، یک آنتی‌بیوتیک، اکسیژن و یک پروتئین ممانعت‌کننده را بر ظرفیت نگهداری کوتاه مدت تخمک ماهی توربت (*Psetta maxima*) برای یک دوره ٤٥ ساعته پس از استحصال تخمک (برای محاسبه میزان لقاح) و برای یک دوره ۹ ساعته پس از جمع آوری تخمک (برای محاسبه میزان تخم‌گشایی) مورد ارزیابی قرار دارند. افزایش حجم تخمک، افزودن آنتی‌بیوتیک و یا اکسیژن، تاثیر معنی‌داری بر قابلیت نگهداری تخمک‌ها نداشت. براساس میزان تخم‌گشایی، بالاترین ظرفیت نگهداری در درجه حرارت ۸ و ۱۳ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با ۳ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. کاربرد محیط مصنوعی مایع سلومیک به طور معنی‌داری قابلیت نگهداری تخمک را کاهش داد.

تخمک‌های بارور نشده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در دو محیط مایع سلومیک و کورتلند (بافر شده با Tris-Hcl و Hepes) به مدت ۲٤ و ٤۸ ساعت و در درجه حرارت ۱۳-۱۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و درصد چشم‌زدگی و تخمه‌گشایی به عنوان شاخص‌های لقاح ثبت شدند. در این آزمایش میزان لقاح در تخمک‌های نگهداری شده در محیط کورتلند با بافرهای Tris-Hcl و Hepes به صورت معنا داری بالاتر از درصد لقاح در تخمک‌های نگهداری شده در محیط مایع سلومیک بود (گوئتز و کافمن، ۲۰۰۰).

1. Urbanyi

اثر نگهداری کوتاه مدت تخمک بر میزان تخمه‌گشایی تخمک ماهی کپور و لای ماهی مورد بررسی قرار گرفت. تخمک‌های این ماهیان در ۹ محلول نمکی مختلف (مایع سلومیک مصنوعی ماهی کپور که اختصاصا برای همین گونه نیز مورد استفاده قرار گرفت، (Dettlaff [1] 1, Dettlaff [2] 2, Dettlaff [3] 3, Dettlaff [4] 4, Dettlaff [5] 5, Ringer [6] 1, Ringer [7] 2, Ringer [8] 3 یک گروه بدون رقیق کننده به عنوان گروه کنترل و درجه حرارت ۲۱ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و در زمان‌های ۳۰ و ٦۰ دقیقه برای کپور و در زمان‌های۱۰، ۲۰، ۳۰ و ٦۰ دقیقه نگهداری برای لای ماهی، لقاح داده شده و انکوباسیون شدند. در این آزمایش درصد تخم‌گشایی به عنوان شاخص لقاح و بدشکلی لاروی به عنوان شاخص کیفیت لارو در نظرگرفته شد. بهترین محلول برای نگهداری تخمک کپور به مدت ۳۰ دقیقه، محلول Dettlaff 1 و برای ٦۰ دقیقه، Dettlaff 2 و Dettlaff 3 و بهترین محلول برای نگهداری تخمک لای‌ماهی Dettlaff 5 عنوان شد. میزان تخمه‌گشایی در تخمک‌های لای ماهی پس از گذشت ٦۰ دقیقه در تمامی رقیق کننده‌ها به صفر درصد رسید. همچنین، در ماهی کپور تعداد لاروهای بد شکل در گروه‌های آزمایشی فاقد اختلاف معنی‌دار بود ولی، در لای ماهی میزان بد شکلی لاروی در گروه کنترل به ۵۰-۱۰ درصد رسید که به طور معنی‌داری بالاتر از سایر تیمارهای آزمایشی بود (لینهارت و همکاران، ۲۰۰۱).

تاثیر نگهداری کوتاه مدت (۰، ۲، ٤، ٦، ۹ و ۱۲ ساعت) تخمک‌های اوولە شده استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) و ماهی خاویاری سیبری (*Acipenser baeri*) در مایع سلومیک و در درجه حرارت ۱۵ درجه سانتی‌گراد مطالعه شد. نتایج این آزمایش نشان داد که قابلیت لقاحی تخمک‌های استرلیاد به ویژگی‌های ماهی مادر بستگی دارد. همچنین با افزایش زمان نگهداری میزان لقاح کاهش یافت. به طور کلی در این دو گونه،

1. 111·3 NaCl + 3·3 KCl + 2·1 CaCl2 + 23·8 NaHCO3 (دتلاف و همکاران، ۱۹۹۳)
2. Dettlaff 1+ 0·1 g.l_1 BSA
3. Dettlaff + 0·5 g.l_1 BSA
4. 115·6 NaCl + 3·3 KCl + 23·8 NaHCO
5. 103 NaCl + 1 KCl+1 CaCl2 + 1·1 NaHCO3 (لینهارت، ۱۹۹۱)
6. 111·3 NaCl + 3·3 KCl + 23·8 NaHCO
7. Ringer + 0·1 g.l_1 BSA
8. Ringer + 0·5 g.l_1 BSA

قابلیت لقاح و بقا با افزایش زمان از کاهش یافته و تخمک‌ها پس از ٤-٢ ساعت در ماهی استرلیاد و پس از ٦ ساعت در ماهی خاویاری سیبری فوق‌رسیده می‌شوند (گیسبرت و وایلوت، ٢٠٠٢).

در پژوهشی دیگر تاثیر اکستندرها و فشارهای اسمزی مختلف بر روی نگهداری تخمک‌های کپور معمولی زینتی در یک بازه‌ی دمایی بدون تغییر ٢٥- ٢٢ درجهٔ سانتی‌گراد و دمای یخچال بررسی شد. اکستندرها شامل محلول نمکی C-F HBSS[1]، نمک (Nacl)، مایع‌تخمدانی مصنوعی و محلول کورکورا (K_2)[2] بودند که تخمک‌ها در اکستندرهای با اسمولالیتهٔ ٤٥٠-١٣٠ میلی‌اسمول بر کیلوگرم نگهداری شده و بعد از ٢ ساعت بارور شدند. بهترین نتیجه‌ی این آزمایش در فشار ٢٥٠ میلی‌اسمول و در محلول مصنوعی مایع‌تخمدان و در دمای یخچال به دست آمد (دونالد[3] و همکاران، ٢٠٠٢).

تخمک‌های ماهی *Prochilodus marggravii* در دو شرایط محوطه تخمدانی (نگهداری در شرایط بدن) و خارج از تخمدان و در دو درجه حرارت ١٨ و ٢٦ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت نگهداری شده و میزان لقاح و درصد بدشکلی لاروی آنها محاسبه شد. نتایج نشان داد که یک ارتباط منفی میان لقاح و بدشکلی لاروی در طول نگهداری در شرایط بدن و در درجه حرارت ٢٦ درجه سانتی‌گراد وجود دارد. همچنین نگهداری تخمک‌ها در شرایط خارج از محوطه تخمدانی و در درجه حرارت ١٨ درجه سانتی‌گراد سبب کاهش میزان لقاح در مقایسه با نگهداری در ٢٦ درجه سانتی‌گراد شد (ریتزو[4] و همکاران، ٢٠٠٣).

سهراب‌نژاد و همکاران (٢٠٠٦) تاثیر نگهداری کوتاه مدت (٣، ٦ و ٩ ساعت) تخمک‌های یک ماده بالغ تاس‌ماهی ایرانی در خارج از بدن ماهی در محیط سلومیک و محیط سنتتیک مایع سلومیک (محیط PSACF5[5]) و در دماهای ٤ و ١٨ درجه‌ی سانتی‌گراد را بر درصد لقاح، تفریخ و بد شکلی لاروی مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که تاثیر زمان و محیط نگهداری بر درصد لقاح، تفریخ و بد شکلی لارو معنی دار بود ($P<٠/٠٥$).

1 . Calcium – free Hanks balanced salt solution
2 . Kurkura
3. Donald
4. Rizzo
5. Persian sturgeon artificial coelomic fluid (80 mM Nacl + 3.96 mM Kcl + 0.78 mM MgSO4.7H2O + 0.26mM CaCl2 + 2.42 mM Glucose + 20 mM NaHco3 + 20 mM Hepes + 1g BSA)

دمای نگهداری روی درصد لقاح اثر معنی‌داری داشت اما، اثر آن بر درصد تفریخ و بد شکلی لارو معنی دار نبود (P>۰/۰۵). به طور کلی درصد لقاح و تخمه‌گشایی با گذشت زمان نگهداری از ۳ ساعت به ۹ ساعت کاهش یافته و درصد بد شکلی افزایش می‌یابد. آثار متقابل دما، زمان و محیط نگهداری بر درصد لقاح، تفریخ و بد شکلی معنی‌دار بود (P>۰/۰۵).

نیک سیرت و همکاران (a ۲۰۰۷) تاثیر نگهداری تخمک قزل‌آلا در محیط مایع سلومیک و محیط نگهداری مصنوعی کورتلند در دمای ۳-۲ درجه‌ی سانتی‌گراد را بررسی نمودند. تخمک‌ها با نسبت ۰/۵ :۱ در مایع سلومیک و ۲:۱ در محیط کورتلند ذخیره و در روزهای ۲ و ۹ لقاح داده شده و درصد لقاح، چشم‌زدگی و تخمه‌گشایی بررسی گردید. نتایج نشان داد پس از ۲ روز نگهداری اختلاف معنی‌داری بین درصد لقاح، چشم‌زدگی و تخمه‌گشایی در مایع کورتلند مشاهده نشد. پس از ۹ روز نیز تخمک‌هایی که در مایع سلومیک ذخیره شده بودند تفاوت معنی‌داری را در درصد چشم‌زدگی و هچ در مقایسه با کنترل نشان ندادند در حالی‌که کاهش درصد چشم‌زدگی و هچ در محیط کورتلند مشاهده شد.

همچنین آنها در پژوهشی دیگر تاثیر نگهداری تخمک ماهی آزاد دریای خزر را در دو محیط مایع سلومیک و محلول کورتلند در دمای ۳- ۲ درجه‌ی سانتی‌گراد بررسی کردند. آنها تخمک آزاد ماهی را با نسبت ۰/۵ :۱ در مایع سلومیک و ۱:۲ در محلول کورتلند برای حداکثر ۱۲۰ ساعت نگهداری کرده و آنها را در زمان‌های ۰، ٤٨، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت لقاح داده و درصد چشم‌زدگی و تخمه‌گشایی را مطالعه نمودند. بر اساس نتایج این آزمایش، تاثیرات و کاهش معنی‌داری بر روی درصد چشم‌زدگی و تخمه‌گشایی با افزایش زمان نگهداری پس از ٤٨ ساعت مشاهده شد. البته اختلاف معنی‌داری میان محیط مایع سلومیک و محلول کورتلند با گذشت مدت زمان یکسان مشاهده نشد. با توجه با نتایج این آزمایش می‌توان تخمک آزاد ماهی دریای خزر را به مدت ٤٨ ساعت بدون ایجاد اختلاف معنی‌دار در درصد چشم‌زدگی و تخمه‌گشایی در محیط مایع سلومیک یا کورتلند نگهداری نمود (نیک سیرت و همکاران، b ۲۰۰۷).

تاثیر فاکتورهای مختلف موثر در نگهداری سرد تخمک‌های بارور نشدهٔ قزل‌آلای رنگین‌کمان توسط کومراکووا و هلتز[1] (۲۰۰۹) بررسی شد. فاکتورهای مورد مطالعه دورهٔ نگهداری، تعداد لایه‌های تخم و شرایط

1. Komrakova and Holtz