دانشگاه گنبد کاووس
نشریه "پژوهش‌های ماهی شناسی کاربردی"
دوره ششم، شماره اول، بهار ۹۷
http://jair.gonbad.ac.ir

مقایسه تأثیر هیپوکلریت سدیم و روش‌های متداول در رفع چسبندگی تخم لقاح یافته ماهی ازون برون *Acipenser stellatus* Pallas, 1771

بهرام فلاحتکار[1*]، عبدالعلی راهداری[2]، حسین محمدی پرشکوه[3]، صمد درویشی[3]
[1]استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، گیلان، ایران
[2]دانشجوی دکتری شیلات، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، گیلان، ایران
[3]کارشناس ارشد مجتمع تکثیر و حفاظت از ذخایر ژنتیکی ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی، رشت، گیلان، ایران

تاریخ ارسال: ۹۵/۱۲/۲۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۸

چکیده

در تکثیر مصنوعی ماهیان خاویاری، چسبندگی تخم یک مشکل اساسی است که تکنیک‌های مختلفی برای رفع آن گسترش پیدا کرده است. در مطالعه حاضر، از هیپوکلریت سدیم با غلظت ۰/۰۳ درصد به‌مدت ۴۰ ثانیه به‌عنوان تکنیکی جدید برای رفع چسبندگی تخم لقاح یافته ماهی ازون برون (*A. stellatus*) استفاده و کارایی آن با برخی مواد متداول (کائولین، تانیک اسید و گل رس) مقایسه گردید. کمترین درصد تخم‌های مرده و قارچ‌زده (۳/۸ ± ۳۱/۹۴ درصد) و بیشترین درصد تبدیل تخم به لارو (۵/۵ ± ۶۸/۰۶ درصد) در تخم‌های رفع چسبندگی شده با هیپوکلریت سدیم مشاهده شد. نتایج این مطالعه نشان داد استفاده از هیپوکلریت سدیم روشی آسان، ارزان و سریع برای رفع چسبندگی تخم ازون برون می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *A. stellatus*، **تکثیر مصنوعی، رفع چسبندگی تخم، هیپوکلریت سدیم**

مقدمه

*نویسنده مسئول: falahatkar@guilan.ac.ir

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-22]

اهمیت آبزی‌پروری ماهیان خاویاری به‌خاطر تولید خاویار و گوشت آنها می‌باشد. باتوجه به محدود شدن و از بین رفتن تولید مثل طبیعی این ماهیان در بسیاری از مکان‌های تخم‌ریزی، تولید آنها وابسته به تکثیر مصنوعی می‌باشد. تکثیر مصنوعی وابسته به صید مولد از محیط‌های طبیعی می‌باشد. متأسفانه در سال‌های اخیر میزان صید مولدین از دریای خزر کاهش چشمگیری داشته است. لذا باتوجه به کاهش یافتن تعداد مولدینی که مراکز تکثیر تاسماهیان می‌توانند با استفاده از آنها تکثیر مصنوعی را انجام داده و بچه‌ماهی مورد نیاز را تأمین کنند، لازم است با استفاده از تکنیک‌های جدید و مطلوب، راهکارهایی اتخاذ شود تا با کمترین هزینه و وقت، کارایی تولید به حداکثر ممکن برسد. برای کسب نتایج مطلوب در تکثیر مصنوعی، باید چسبندگی طبیعی تخم‌ها بدون وارد شدن آسیب، خفگی و یا ابتلا به عفونت‌های قارچی و باکتریایی از بین برود (Siddique *et al*., 2014). روش‌های قدیمی و متداول فعلی علاوه بر داشتن برخی از مشکلات فوق، زمان‌بر بوده و نیاز به نیروی انسانی زیاد دارند. به‌همین دلایل همواره نیاز به تحقیق و بررسی روش‌های جایگزین با کارایی بالاتر می‌باشد.

تخم‌های بسیاری از ماهی‌های آب شیرین وقتی فعال می‌شوند و در معرض آب قرار می‌گیرند، حالت چسبندگی پیدا می‌کنند. در تاسماهیان بعد از تماس تخمک با آب، ترشح چهارمین لایه تخم (jelly coat) موجب بروز چسبندگی می‌گردد (Cherr and Clark, 1982) که باید برطرف گردد. استفاده از یک روش مؤثر برای رفع چسبندگی، موجب افزایش بقای جنین و تخم‌گشایی بیشتر می‌شود (Linhart *et al*., 2000; Gela *et al*., 2003). روش‌های رفع چسبندگی اولاً نباید باعث سخت‌شدن دیواره تخمک شود چون میزان تخم‌گشایی کاهش می‌یابد و ثانیاً موجب ضد عفونی تخم هم بشود (Pšeničkа, 2016). فاکتورهای متعددی مانند زمان مورد نیاز برای رفع چسبندگی، کمیت لارو به‌دست آمده و هزینه اجرای روش در مقیاس وسیع، مناسب بودن یک ماده برای رفع چسبندگی را تعیین می‌کنند (Al Hazzaa and Hussein, 2003). هر ماده‌ای که بتواند زمان شستشو را به‌علت تأثیر منفی بر جنین و لقاح کاهش دهد مناسب‌تر است. همچنین کمیت لارو تولید شده با استفاده از تکنیک مورد استفاده در رفع چسبندگی که با استفاده از آن رشد و نمو جنین طبیعی باشد از فاکتورهای اصلی انتخاب ماده رفع کننده چسبندگی است. به‌عنوان مثال، سولفیت سدیم با اینکه طی مدت ۸ تا ۱۰ دقیقه چسبندگی تخم ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) را از بین می‌برد ولی نمو طبیعی جنینی در تعداد بسیار کمی از تخم‌ها مشاهده می‌شود (Kowtal *et al*., 1986). تاکنون از روش‌های متعددی مانند گل رس، تانیک اسید، کائولین و ... برای رفع چسبندگی تخم ماهیان استفاده شده است.

استفاده از گل رس یکی از قدیمی‌ترین روش‌های رفع چسبندگی است. امروزه این روش در مراکز تکثیر ماهیان خاویاری ایران استفاده می‌شود. روش کار بهم‌زدن تخم‌ها در سوسپانسیون گل رس ۱۰ درصد به‌مدت نسبتاً طولانی (تا ۴۵ دقیقه) می‌باشد که علاوه بر وقت‌گیر بودن، دستکاری شدید و

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-22]

طولانی مدت تخم‌ها را موجب می‌شود (Monaco and Doroshov, 1983) و درصد تفریخ کمتری می‌تواند ایجاد نماید (Kowtal *et al*., 1986; Linhart *et al*., 2000 and 2003).

اسید تانیک یک ماده طبیعی است که از شیره گیاهی به‌دست می‌آید (Haslam, 1966). از این ماده برای رفع چسبندگی تخم‌های ماهیان مختلف از قبیل ماهی سوف (*Sander vitreus*) (Waltemyer, 1976)، باربوس حمری (*Barbus lutes*) (Al Hazzaa and Hussein, 2003)، سوف سفید (*Sander lucioperca*) (Demska-Zakes *et al.*, 2005) و ماهی بنی (*Barbus sharpeyi*) (Kalbassi *et al*., 2013) استفاده شده است. غلظت زیاد اسید تانیک منجر به تلفات زیاد در مرحله آخر انکوباسیون می‌گردد، همچنین امکان دارد موجب سخت شدن کوریون تخم شود و احتمالاً فعالیت آنزیم کوریوناز را کاهش دهد (Demska-Zakes *et al*., 2005)، بنابراین باید در استفاده از آن دقت زیادی نمود. در مطالعات اخیر، از هیپوکلریت سدیم برای رفع چسبندگی تخم ماهی استرلیاد با غلظت ۰/۰۳ درصد به‌مدت ۴۰ ثانیه استفاده شده است بدون اینکه روی نمو جنینی یا میزان تخم‌گشایی در مقایسه با سایر روش‌ها (رس، نمک طعام، اوره و اسید تانیک) اثر منفی داشته باشد (Pšenička, 2016).

با توجه به اهمیت استفاده از تکنیک‌های جدید که دارای کارایی بالا بوده، هزینه کمتری داشته باشد و وقت کمتری را برای شستشوی تخم‌ها بگیرد، می‌بایست از مواد جدید برای رفع چسبندگی استفاده نمود. نظر به سنتی بودن روش رفع چسبندگی تخم در لقاح تاسماهیان در شرایط کارگاهی کشور و نیاز به ارتقای آن در بهبود عملکرد تولید مثلی، این مطالعه با هدف مقایسه کارایی هیپوکلریت سدیم با برخی از مواد متداول (گل رس، تانیک اسید و کائولین) برای رفع چسبندگی تخم ماهی ازون‌برون (*A. stellatus*) صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

مولدین وحشی ماهی ازون برون (*A. stellatus*) پس از صید از یکی از صیدگاه‌های استان گیلان به مجتمع تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی منتقل و در استخرهای مخصوص نگهداری شدند. پس از رفع استرس حمل و نقل مولدین توسط کارشناسان بازدید شدند. علاوه بر بررسی ظاهری مولدین ماده و نر، با نمونه‌برداری از تخمک‌های مولدین ماده و بررسی میزان مهاجرت هسته تخمک به طرف قطب جانوری و نیز کیفیت اسپرم ماهی نر، مناسب بودن مولدین تزریق هورمون مشخص شد. پس از تزریق هورمون LHRHa2 به میزان ۲ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن ماهی به مولدین نر و ماده، تخم‌های استحصال شده از یک ماهی ماده با اسپرم چند ماهی نر به روش نیمه مرطوب لقاح داده شدند. به این ترتیب که تخمک‌ها و اسپرم‌ها به صورت جداگانه در ظروف خشک گرفته شدند. سپس اسپرم با آب مخلوط و به تخمک‌ها اضافه شد تا باروری مصنوعی انجام شود. پس از

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-22]

لقاح، تخم‌ها به چهار تیمار (هر تیمار دارای دو تکرار ۲۵ گرمی تخمک، با تعداد ۸۲ عدد در هر گرم) تقسیم و مطابق غلظت‌ها و زمان‌های ذکر شده در جدول ۱ شستشو و به جعبه‌های انکوباتور یوشچنکو منتقل شدند. ۴۸ ساعت پس از شروع انکوباسیون درصد لقاح به میزان ۴/۵ ± ۷۳/۲ درصد برآورد گردید. در طول دوره انکوباسیون، تخم‌های قارچ زده و مرده به‌صورت روزانه به روش فیزیکی از جعبه‌ها جدا و شمارش گردید. پس از تخم‌گشایی، تعداد لاروهای هر جعبه به تفکیک شمارش گردید. در طول دوره پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب شامل دما، pH و اکسیژن محلول اندازه‌گیری گردید که دمای متوسط آب در طول انکوباسیون ۰/۵±۱۸/۶۰ درجه سانتی‌گراد، pH ۰/۲±۷/۸ و اکسیژن محلول ۰/۱±۷/۸۰ میلی‌گرم در لیتر بود. مشخصات تیمارهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- مشخصات تیمارهای مورد استفاده در تحقیق حاضر برای رفع چسبندگی تخم ازون برون (*A. stellatus*)

ماده رفع چسبندگی	غلظت	مدت شستشوی تخم‌ها
هیپوکلریت سدیم	٪۰/۰۳	۴۰ ثانیه
کائولین	۱۰ g/lit	۴۰ دقیقه
تانیک اسید	٪۰/۰۴	۱۰-۲۰-۳۰ ثانیه*
گل رس	٪۱۰	۴۵ دقیقه

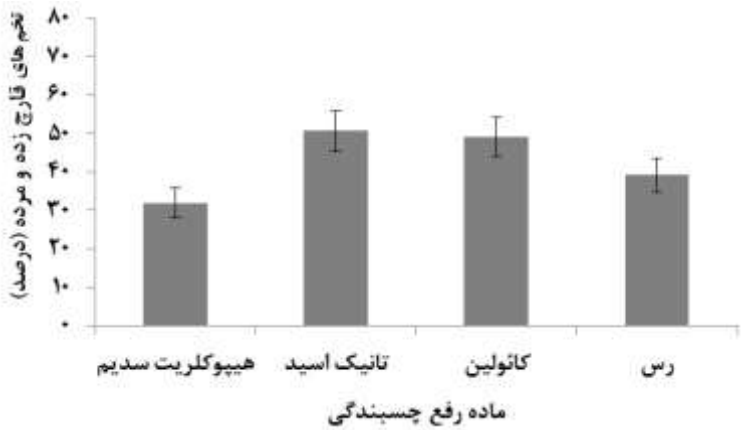
*تخم‌ها در سه مرحله ۱۰، ۲۰، ۳۰ ثانیه‌ای با تانیک اسید شستشو داده شده، ولی پس از هر مرحله با آب معمولی شستشو می‌شوند.

داده‌های به‌دست آمده از آزمایش حاضر با استفاده از نرم‌افزار SPSS-16 (Chicago, IL, USA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. آنالیز داده‌ها با واریانس یک طرفه و سپس با آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ انجام شد.

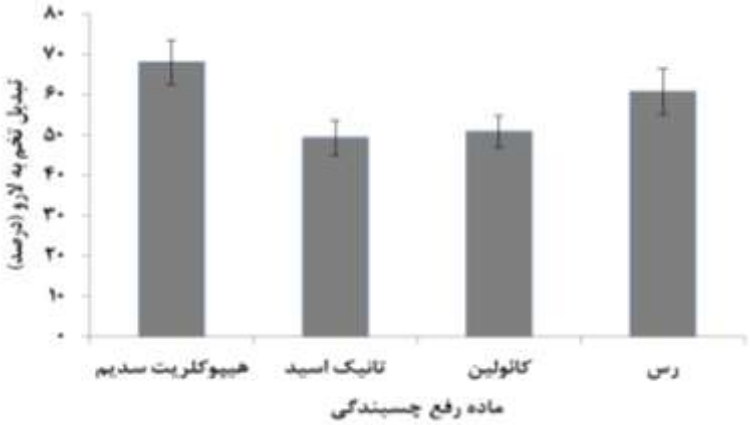
نتایج

درصد تلفات تخم‌ها در تیمار رفع چسبندگی شده با هیپوکلریت سدیم (۳/۸ ± ۳۱/۹۴ درصد؛ $p>0/05$) کمتر از سایر تیمارها بود (شکل ۱)، همچنین، درصد تفریخ در این تیمار (۵/۵ ± ۶۸/۰۶ درصد؛ $p>0/05$) بیشتر از تیمارهای دیگر بود (شکل ۲). بین مدت زمان تخم گشایی تیمارهای مختلف تفاوتی وجود نداشت.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-22]



شکل ۱- درصد تلفات تخم‌ها در تیمارهای رفع چسبندگی شده تخم ازون برون (*A. stellatus*) با مواد مختلف (میانگین ± انحراف معیار)



شکل ۲- درصد تفریخ در تیمارهای رفع چسبندگی شده تخم ازون برون (*A. stellatus*) با مواد مختلف (میانگین ± انحراف معیار)

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه، کارایی رفع چسبندگی تخم ماهی ازون برون توسط هیپوکلریت سدیم با سه ماده تانیک اسید، کائولین و گل رس مقایسه شد. نتایج به‌دست آمده حاکی از کمتر بودن درصد تلفات (تخم‌های قارچ‌زده و مرده) و بالاتر بودن درصد تفریخ در تخم‌های رفع چسبندگی شده با هیپوکلریت سدیم در مقایسه با سه ماده دیگر بود. این نتایج با صرف زمان بسیار کوتاه (۴۰ ثانیه) و با ماده‌ای ارزان قیمت (هیپوکلریت سدیم) به‌دست آمد. درحال حاضر روش‌های مختلف زیادی برای رفع چسبندگی

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-22]

تخم ماهیان مختلف استفاده می‌شود که بر اساس روش عمل به روش‌های مکانیکی (استفاده از سوسپانسیون رس، شیر و تالک)، آنزیمی (استفاده از آنزیم‌های آلکالاز، هیالورونیداز و تریپسین) و شیمیایی (استفاده از اوره، نمک طعام و تانیک اسید) طبقه‌بندی می‌شوند (Woynarovich and Woynarovich, 1980; Monaco and Doroshov, 1983; Linhart *et al*., 2000). این روش‌ها با اعمال یکسری تغییرات برای رفع چسبندگی تخم ماهیان خاویاری نیز بکار رفته‌اند اما در کاهش مدت زمان رفع چسبندگی چندان مؤثر نبوده و یا تأثیرات سو بر میزان بقا و تخم‌گشایی داشته‌اند. به‌عنوان مثال زمان لازم برای رفع چسبندگی با سوسپانسیون ۱۰ درصد گل رس حدود ۴۵ دقیقه می‌باشد و امکان آسیب دیدن تخم‌ها نیز در این روش زیاد می‌باشد. بنابراین، یافتن ماده‌ای مؤثر برای رفع چسبندگی تخم‌ها که ضمن نداشتن معایب مذکور، ارزان و در دسترس باشد همواره مورد تحقیق و بررسی بوده است.

در بیشتر ماهیان خاویاری علت چسبندگی تخم وجود یک غشا بیرونی ژله مانند است که منشأ آن اپی‌تلیوم فولیکولی است (Dettlaff *et al*., 1993; Vorob'eva and Markov, 1999). لایه چسبنده تخم در تماس با آب آن را جذب می‌کند و طی مدت ۵ دقیقه چسبندگی ایجاد می‌شود (Siddique *et al*., 2014). در این لایه دو ترکیب گلیکوپروتئین و اسید سیالیک وجود دارند که تمایل به اکسیداسیون دارند (Reuter *et al*., 1989). از طرفی، هیپوکلریت سدیم یک اکسید کننده قوی است که موجب تغییر چسبندگی سطح تخم می‌شود. مکانیسم اثر این ماده برای تغییر میزان چسبندگی به این صورت است که اکسیداسیون پروتئین‌ها موجب تغییر در زنجیره آمینواسیدهای جانبی به آمینواسیل کربونیل‌های پایدار می‌شود (Levine *et al*., 1990) که پس از تماس تخم با هیپوکلریت سدیم به‌صورت لایه نازکی روی تخم قرار می‌گیرند. چسبندگی این لایه نازک به قدری کم است که تخم‌ها به هم نمی‌چسبند. همچنین، این اکسیداسیون بر لایه‌های داخلی سیتوپلاسم تخم تأثیر سو ندارد، بنابراین تغییری در مسیر رشد و نمو تخم در مراحل بعدی ایجاد نمی‌شود.

مسئله دیگری که در رفع چسبندگی با هیپوکلریت سدیم مطرح می‌گردد این است که سمی بودن این ماده تأثیر منفی بر تخم ماهی می‌گذارد یا خیر. کوریون ماهیان خاویاری بسیار محکم است. به‌عنوان مثال تخم تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) چهار لایه دارد. در تاسماهی سفید (*Acipenser transmontanus*) ضخامت چهار لایه ۵۰ میکرون می‌باشد. این کوریون سخت باعث می‌شود که تخم در مدت بسیار کوتاهی (۴۰ ثانیه) که در معرض هیپوکلریت سدیم به‌عنوان یک ماده سمی قرار می‌گیرد محافظت شود. در واقع وجود این کوریون سخت و مدت زمان تماس بسیار کوتاه تخم و هیپوکلریت سدیم امکان ورود این ماده به درون تخم را صلب می‌کند. نبودن چنین کوریون محکم و سختی در دیگر ماهی‌ها از جمله کپورماهیان باعث شده که رفع چسبندگی تخم با

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-22]

هیپوکلریت سدیم موجب افزایش درصد تلفات جنین گردد (اطلاعات منتشر نشده) که احتمالاً به علت کوریون نازک در تخم این ماهی‌ها می‌باشد که محافظت کمتری از محتوای درونی تخم به عمل می‌آورند (Pšeničkа, 2016).

رفع چسبندگی تخم ماهی با برخی آنزیم‌ها نیز زمان مورد نیاز برای این کار را کم نموده است. به‌عنوان مثال، رفع چسبندگی تخم لای‌ماهی (*Tinca tinca*) با آنزیم آلکالاز ظرف مدت تنها ۲ دقیقه با موفقیت بالا انجام شده است (Linhart *et al*., 2000). این آنزیم به‌طور بسیار جزئی دیواره تخم را هضم می‌کند و باعث می‌شود تخم گشایی به آسانی و در مدت کوتاهی صورت گیرد. ولی بر اساس آزمایشات، کاربرد این آنزیم‌ها در مورد ماهیان خاویاری موفقیتی نداشته است (Siddique *et al*., 2014)، که دلیل این امر می‌تواند دمای پایین انکوباسیون و همچنین ضخامت بالای تخم ماهیان خاویاری باشد. زیرا فعالیت مؤثر آنزیم‌ها در دمای بالا صورت می‌گیرد. نتایج مطالعه حاضر مؤید این است که هیپوکلریت سدیم ماده‌ای ارزان قیمت و در دسترس برای رفع چسبندگی تخم تاسماهیان می‌باشد که این کار را در زمان بسیار کوتاهی انجام می‌دهد.

منابع

Al Hazzaa R., Hussein A. 2003. Stickiness elimination of Himri Barbel (*Barbus lutes*, Heckel) Eggs. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 3: 47-50.

Cherr G.N., Clark W.H. 1982. Fine structure of the envelope and micropyles in the eggs of the white sturgeon, *Acipenser transmontanus* Richardson. Development, Growth & Differentiation, 24: 341-352.

Demska-Zakes K., Zakes Z., Roszuk J. 2005. The use of tannic acid to remove adhesiveness from pikeperch, *Sander lucioperca*, eggs. Aquaculture Research, 36: 1458-1464.

Dettlaff T.A., Ginsburg A.S., Schmalhausen O.I. 1993. Sturgeon Fishes Developmental Biology and Aquaculture, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg and New York, NY. 300P.

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

Haslam E. 1966. Chemistry of Vegetable Tannins. Academic Press, London, UK. 179 P.

Kalbassi, M.R., Lorestani, R., Ghafle Maramazi, J. 2013. Analysis of saline activator solution effects on sperm quality indices of *Barbus sharpeyi* by image J software. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 12: 357-377.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-22]

Kowtal G.V., Clark W.H., Cherr G.N. 1986. Elimination of adhesiveness in eggs from the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*: chemical treatment of fertilized eggs. Aquaculture, 65:139-143.

Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.-G., Ahn B.W., Shaltiel S., Stadtman E.R. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods in Enzymology, 186: 464-478.

Linhart O., Gela D., Flajšhans M., Duda P., Rodina M., Novák V. 2000. Alcalase enzyme treatment for elimination of egg stickiness in tench, *Tinca tinca* L. Aquaculture, 191: 303-308.

Linhart O., Rodina M., Gela D., Kocour M., Rodriguez M. 2003. Improvement of common carp artificial reproduction using enzyme for elimination of egg stickiness. Aquatic Living Resources, 16: 450-456.

Monaco G., Doroshov S.I. 1983. Mechanical de-adhesion and incubation of white sturgeon eggs (*Acipenser transmontanus* Richardson) in jar incubators. Aquaculture, 36: 117-123.

Pšenička M. 2016. A novel method for rapid elimination of sturgeon egg stickiness using sodium hypochlorite. Aquaculture, 453: 73-76.

Reuter G., Schauer R., Szeiki C., Kamerling J.P., Vliegenthart J.F. 1989. A detailed study of the periodate oxidation of sialic acids in glycoproteins. Glycoconjugate Journal, 6: 35-44.

Siddique M.A.M., Pšenička M., Cosson J., Dzyuba B., Rodina M., Golpour A., Linhart O. 2014. Egg stickiness in artificial reproduction of sturgeon: an overview. Reviews in Aquaculture, 6: 1-12.

Vorob'eva E.I., Markov K.P. 1999. Specific ultra-structural features of eggs of Acipenseridae in relation to reproductive biology and phylogeny. Journal of Ichthyology, 39: 157-169.

Waltemyer D.L. 1976. Tannin as an agent to eliminate adhesiveness of walleye eggs during artificial propagation. Transactions of the American Fisheries Society, 105: 731-736.

Woynarovich E., Woynarovich A. 1980. Modified technology for elimination of stickiness of common carp *Cyprinus carpio* eggs. Aquacultura Hungarica, 2: 19-21.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-22]