

نشریه شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۶۷، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۸/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۹/۲

ص ۸۷-۹۴

استفاده از اتوسکوپ در تعیین جنسیت فیل ماهیان

پرورشی (*Huso huso*)

❖ بهرام فلاحتکار*: دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعهسرا، گیلان، ایران
❖ حسنعلی شاهواری: کارشناس مزرعه پرورش ماهیان خاویاری مروارید قروق، تالش، گیلان، ایران

چکیده

در مطالعه حاضر برای تعیین جنسیت فیل ماهیان سه ساله پرورشی در محدوده وزنی ۵/۵-۲/۵ کیلوگرم از اتوسکوپ استفاده شد. ۲۳۵۰ فیل ماهی برای این کار در نظر گرفته شدند به طوری که، با برش کوچک ۰/۸-۰/۶ سانتی متری، پروب دستگاه اتوسکوپ وارد ناحیه شکمی شد و گنادها برای تعیین جنسیت مشاهده و بررسی شدند. نتایج نشان داد ۹۹/۲ درصد ماهیان با استفاده از این روش از نظر جنسیت تفکیک پذیرند و نسبت جنسی ماهیان مورد مطالعه ۰/۹۸:۱ محاسبه شد. این مطالعه مشخص کرد که تعیین جنسیت در فیل ماهیان با حداقل سه سال سن از طریق اتوسکوپی به راحتی و با دقت بالایی انجام شدنی است.

واژگان کلیدی: اتوسکوپ، جنسیت، گناد، ماهی خاویاری، وزن.

۱. مقدمه

فیل ماهی از بزرگترین ماهیان آب شیرین است که در دریای خزر، سیاه و آزوف پراکنش طبیعی دارد. نسل این ماهی نیز همانند بسیاری از گونه‌های خاویاری به دلایلی چند از جمله صید بی‌رویه و قاچاق، تخریب مناطق تخم‌ریزی و آلودگی‌های زیست‌محیطی شدیداً کاهش یافته است. با این حال، تلاش‌هایی برای حفظ ذخایر آن در تفریخگاه‌ها در حال انجام است. نظر به نرخ رشد سریع، بازماندگی بالا، مقاومت در برابر عوامل نامساعد زیست‌محیطی و استرس‌زا و کیفیت بالای گوشت و خاویار بسیاری از کشورها به پرورش مصنوعی این گونه توجه ویژه‌ای کرده‌اند (Falahatkar et al., 2009). سن بلوغ این ماهی در محیط‌های طبیعی در نرها بین ۱۲-۱۴ سال و در ماده‌ها ۱۴-۱۶ سال است، اما در محیط پرورش به نظر می‌رسد با مدیریت نگهداری و تغذیه‌ای مناسب، این سن در نرها به ۸-۶ سال و در ماده‌ها به ۱۰-۸ سال کاهش یابد (Hochleithner and Gessner, 2001). با وجود این، اطلاعات در خصوص مدیریت مولدین، رشد و توسعه گنادی و بلوغ و رسیدگی در شرایط پرورشی بسیار محدود است.

با توجه به سن بلوغ بالا در ماهیان خاویاری و نبود مشخصه خارجی که با آن بتوان جنسیت نر و ماده را از هم تفکیک کرد، مدیریت جنسیت در این ماهیان از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است به طوری که، برخی از مزارع پرورشی ماهیان نر را پس از سه سال پرورش و رسیدن به وزن بازاری از چرخه تولید خارج و صرفاً به نگهداری ماهیان ماده برای تولید خاویار اقدام می‌کنند.

روش‌های غیر تهاجمی، نظیر سونوگرافی و

اندوسکوپی، در تعیین جنسیت ماهیان مختلفی به کار رفته است (Moccia et al., 1984; Ortenburger et al., 1996; Will et al., 2002; Evans et al., 2004; Bryan et al., 2005; Whiteman et al., 2005). امروزه از این روش‌ها در ماهیان بااهمیت و در معرض خطر، نظیر ماهیان خاویاری، نیز استفاده بسیاری می‌شود (Moghim et al., 2002; Kynard and Kieffer, 2002; Falahatkar et al., 2011).

در حالی که، روش‌های مختلف جراحی مبتنی بر برداشت نمونه بافت برای مطالعات میکروسکوپی یا ماکروسکوپی بسیار دقیق‌اند و خصوصاً در تعیین مرحله رسیدگی طی دوره پرورش حائز اهمیت‌اند، اما در مطالعات میدانی یا صرفاً تعیین جنسیت در مراحل ابتدایی پرورش ماهیان خاویاری از اهمیت یا دقت کمتری برخوردارند، چراکه فرصت و امکانات لازم برای انجام دادن برخی شیوه‌های خاص در این خصوص وجود ندارد. این در حالی است که تعیین جنسیت در تعداد بسیاری از ماهیان، که عمدتاً در کارهای صحرایی (نظیر مزارع پرورش ماهی) انجام می‌شود، می‌بایست مبتنی بر سرعت عمل و دقت بالا باشد و حتی بعضاً این فرصت برای بیهوش کردن ماهی نیز وجود نخواهد داشت (Kynard and Kieffer, 2002)، به طوری که، ممکن است تا بیش از ۴۰۰ ماهی در یک روز کاری تعیین جنسیت شوند (Hurvitz et al., 2007).

در این بین به نظر می‌رسد، روشی باید در تعیین جنسیت ماهیان خاویاری مد نظر قرار گیرد که بتواند مبتنی بر دقت عمل و کارایی بالا در شرایط مختلف باشد همچنین، افراد با سطح معلومات پایین‌تر هم بتوانند این روش را به کار گیرند. بنابراین، هدف از مطالعه حاضر بررسی عملکرد اتوسکوپ در تعیین

(شکل ۲). کل مدت این عمل کمتر از ۲ دقیقه بود سپس، برش ایجادشده به وسیله چسب Corega (Dungarvan Co., Waterford, Ireland) پر شد و ۱ ml اکسی‌تراسایکلین به ازای هر ماهی در قسمت ساقهٔ دم در زیر بالهٔ پشتی تزریق و نهایتاً ماهی به مخازن پرورش برگردانده شد.



شکل ۱. اتوسکوپ مورد استفاده در تحقیق حاضر برای تعیین جنسیت فیلماهیان پرورشی



شکل ۲. نمای شکمی فیلماهی تحت ارزیابی تعیین جنسیت و چگونگی به‌کارگیری اتوسکوپ

جنسیت فیلماهیان پرورشی سه‌ساله در اوزان مختلف و مقایسهٔ نسبت‌های جنسی در این مرحله به‌منزلهٔ روشی کم‌تهاجمی است.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. ماهی و شرایط پرورش

فیلماهیان مورد استفاده در این تحقیق حاصل تکثیر مصنوعی مولدین وحشی دریای خزرند که تا وزن ۱۰۰ گرمی در مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی نگهداری و پرورش یافته سپس، به مزرعهٔ پرورش ماهیان خاویاری قروق تالش انتقال یافته‌اند. این ماهیان در مخازن گرد بتونی و با استفاده از غذای فرموله‌شدهٔ شرکت فرادانه به مدت سه سال در شرایط مزرعه پرورش یافتند. در مجموع، تعداد ۲۳۵۰ فیلماهی با وزن متوسط $1 \pm 4/7$ کیلوگرم (میانگین \pm انحراف معیار) برای تعیین جنسیت در تحقیق حاضر استفاده شدند.

۲.۲. تعیین جنسیت

برای تعیین جنسیت ماهیان از اتوسکوپ (Heine, Herrsching, Germany) استفاده شد (شکل ۱). ماهیان پس از صید، توزین و انتقال از مخازن پرورش به روی میز کار، به وسیلهٔ بندهای پهن مخصوصی ثابت نگه داشته شدند و برش کوچکی در حد $0/6-0/8$ سانتی‌متر در قسمت شکمی و بین پلاک‌های ۲ و ۳ شکمی (از سمت دم به سر) به وسیلهٔ اسکالپل تیز ایجاد شد سپس، با استفاده از برش ایجادشده، پروب دستگاه اتوسکوپ وارد ناحیهٔ شکمی شد و با روشن کردن چراغ مخصوص اتوسکوپ اندام‌های داخلی و از جمله گنادها برای ارزیابی و تعیین جنسیت بررسی و مشاهده شدند

۳. ۲. آنالیز داده‌ها

ماهی‌ها در سه دسته وزنی مشخص تفکیک شدند و نسبت جنسی در هر دسته محاسبه شد. سپس، برای مشاهده اختلاف بین نسبت‌های جنسی از نسبت جنسی مورد انتظار ۱:۱ از آزمون مربع کای در سطح معنی دار ۰/۰۵ با نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۳؛ Chicago, IL) استفاده شد.

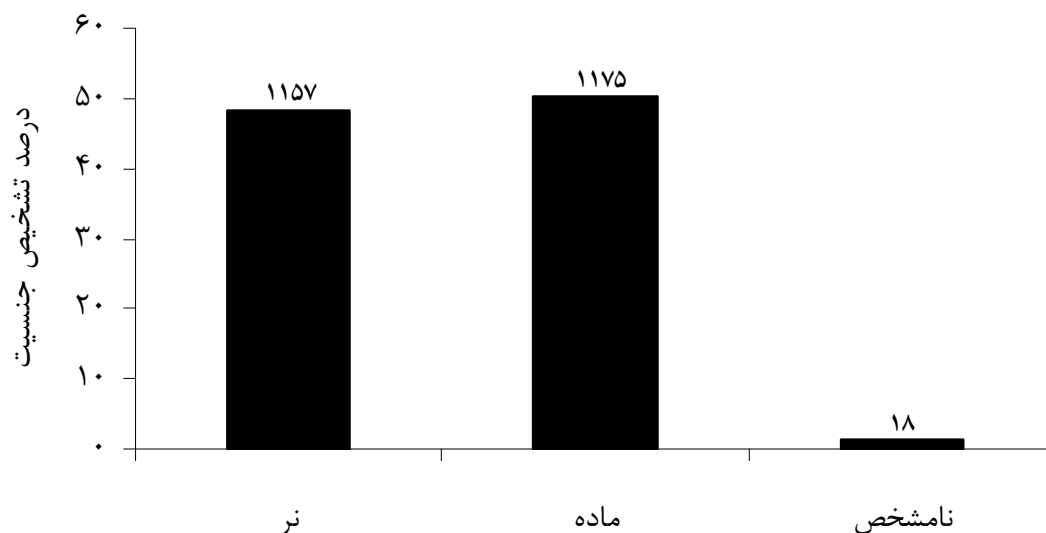
۳. نتایج

تعداد و درصد ماهیان تعیین جنسیت شده در محدوده‌های وزنی متفاوت در جدول ۱ نشان داده

شده است. اختلاف معنی‌داری در این نسبت‌ها در وزن‌های متفاوت وجود نداشت به طوری که، درصد نرها از ۴۸-۵۰/۵ و ماده‌ها از ۴۸/۹-۵۱/۸ درصد متغیر بود. در کل، نسبت جنسی ۱:۰/۹۸ در بین ماهیان سه‌ساله ملاحظه شد به طوری که، از ۲۳۵۰ عدد ماهی مورد ارزیابی، ۱۱۵۷ عدد (۴۹/۲ درصد) نر، ۱۱۷۵ عدد (۵۰ درصد) ماده و ۱۸ عدد (۰/۸ درصد) با جنسیت نامشخص شناسایی شدند (شکل ۳). هیچ‌کدام از ماهیان تحت آزمایش تلف نشدند یا علائمی از عفونت‌های ثانویه را پس از تعیین جنسیت نشان ندادند.

جدول ۱. درصد تشخیص جنسیت در فیل ماهیان سه‌ساله پرورشی در محدوده‌های وزنی متفاوت با استفاده از اتوسکوپ

محدوده وزنی (کیلوگرم)	تعداد	درصد ماهیان نر	درصد ماهیان ماده	درصد ماهیان غیر قابل تشخیص
۲/۵-۴	۵۵۰	۴۸	۵۱/۸	۰/۲
۴-۵	۸۰۰	۴۸/۵	۵۰/۱	۱/۴
۵-۶	۱۰۰۰	۵۰/۵	۴۸/۹	۰/۶



شکل ۳. درصد تشخیص جنسیت در فیل ماهیان سه‌ساله پرورشی (n=۲۳۵۰). اعداد روی ستون‌ها تعداد هر جنس از کل ماهیان مورد بررسی را نشان می‌دهد

۴. بحث و نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که با استفاده از اتوسکوپ در ماهیان سه ساله می توان جنسیت را در اکثر قریب به اتفاق آنها تعیین کرد. فقط ۰/۸ درصد از ماهیان در تحقیق حاضر شناسایی شدنی نبودند که در مقایسه با سایر روش های به کار گرفته شده قبلی رقم بسیار اندکی است. Falahatkar و همکاران (۲۰۱۱) با استفاده از اندوسکوپ موفق به تعیین جنسیت ۹۶ درصد از فیلماهیان در اوزان و سنین مختلف شدند. همین مقدار در تحقیقات Wildhaber و همکاران (۲۰۰۷ و ۲۰۰۵) و Hurvitz و همکاران (۲۰۰۷) نیز گزارش شده است. به نظر می رسد با افزایش سن، حجم و اندازه گنادها افزایش می یابد، اما ذخایر و محتویات چربی احشایی نیز زیاد می شود که یکی از دلایل خطا در شناسایی یا تعیین جنسیت ماهیان می تواند باشد.

مطالعات مختلفی در خصوص تعیین جنسیت ماهیان خاویاری با استفاده از روش های تهاجمی نظیر بیوپسی (Conte et al., 1988; Falahatkar, 2010)، کمتر تهاجمی نظیر خونگیری و سنجش استروئیدهای جنسی (Linares-Casenave et al., 2003; Nazeri et al., 2013) و اندوسکوپ (Wildhaber et al., 2005, 2007; Matsche et al., 2011) انجام شده است که هر کدام معایب و مزایای خاص خود را دارد. هزینه ها، دردسترس بودن، کارایی بالا، تجربه افراد در به کارگیری روش مورد

نظر و انجام پذیر بودن از اهم این موارد است (فلاحتکار و همکاران، ۱۳۸۸).

در این بین، کاربرد شیوه هایی که کاربر را قادر به مشاهده مستقیم بافت گنادی کند، کارایی بالایی خواهد داشت. اندوسکوپ یکی از این روش هاست که کارایی بالایی برای آن در نظر گرفته شده است، اما قیمت بالای دستگاه و آسیب احتمالی که سیستم اسکوپ لاپاراسکوپ می تواند به سبب بی دقتی کاربر به سایر اندام های داخلی ماهی وارد کند از معایب این شیوه محسوب می شود. به این ترتیب، استفاده از اتوسکوپ به علت قیمت پایین (۵ درصد قیمت لاپاراسکوپ) و امکان مشاهده مستقیم اندام های داخلی بدون ورود به محوطه شکمی می تواند آن را در زمره روش های مطلوب در تعیین جنسیت ماهیان خاویاری قرار دهد. ضمن اینکه در مطالعات صحرایی امکان حمل، جابه جایی، تأمین منبع انرژی و حساسیت دستگاه از محدودیت های استفاده از لاپاراسکوپ است در حالی که، در استفاده از اتوسکوپ صرفاً به کمی تجربه، سرعت عمل و آشنایی با آناتومی ماهی خاویاری نیاز است و معایب ذکر شده برای لاپاراسکوپ را ندارد. نداشتن تلفات و بهبود سریع زخم ماهی همچنین، سرعت عمل در انجام دادن کار بدون نیاز به بخیه زنی از دیگر مزایای این روش محسوب می شود.

نظیر مطالعه حاضر، Kynard and Keiffer (2002) با استفاده از borescope موفق به تعیین جنسیت و شکل مجرای تناسلی در تاسماهی پوزه کوتاه *Acipenser breirostrom* شدند که البته آنها از ۴۴۳ ماهی مورد آزمایش موفق به تعیین جنسیت ۲۷۳ عدد شدند. آنها استفاده از این دستگاه

سونوگرافی، توصیه شده است (Bryan *et al.*, 2007). بنابراین، به نظر می‌رسد با کارایی مطلوبی که استفاده از این دستگاه در تحقیق حاضر نشان داد برای جداسازی جنسیت‌ها در مراحل ابتدایی رشد (سه‌سالگی) مناسب است، اما مطالعات تکمیلی درباره گنادها با استفاده از سایر روش‌های ذکرشده امکان‌پذیر است، چراکه در شیوه اتوسکوپی امکان بیوپسی و برداشت بافت گنادی برای مطالعات هیستولوژیک و میکروسکوپی وجود ندارد. ضمن اینکه با افزایش ضخامت لایه پوست و عضله در ناحیه شکمی ماهی، استفاده از این شیوه محدودتر خواهد شد.

بنا بر نتایج این مطالعه، تعیین جنسیت در فیل ماهیان با سن حداقل سه سال با استفاده از دستگاه اتوسکوپ با دقت بالایی انجام‌پذیر است و می‌توان آن را به سبب قیمت و دقت مناسبی که دارد به پرورش‌دهندگان ماهیان خاویاری و محققان رشته‌های مختلف شیلاتی و بیولوژی توصیه کرد، البته درک محدودیت‌های این روش حائز اهمیت است و خطاهای احتمالی می‌بایست به حداقل برسد، ولی روش مناسبی خصوصاً در سنین ابتدایی پرورش برای تفکیک جنسیت در ماهیان خاویاری به علت سرعت عمل بالا و آسیب‌های حداقلی به ماهی خواهد بود.

تقدیر و تشکر

از همکاری مدیریت و کارکنان مزرعه پرورش ماهیان خاویاری قروق تالش که ما را در این تحقیق یاری دادند کمال تشکر و سپاسگزاری را داریم.

را به دلایلی نظیر نداشتن جراحی ماهی (به علت ورود از طریق منفذ تناسلی)، سرعت عمل بالا، کاربرد در شرایط مختلف آب و هوایی و شناسایی تخمک در مرحله قبل از تخم‌ریزی و تخمک‌های نابالغ، آموزش آسان به تکنیسین‌ها و قیمت مناسب آن توصیه کردند. این در حالی است که در روش پیشنهادی در تحقیق حاضر، بیش از ۹۹ درصد ماهیان بدون هیچ مشکلی تعیین جنسیت شدند که می‌تواند حائز اهمیت باشد.

استفاده از روش‌هایی که کمترین استرس را به ماهی وارد کند همیشه در اولویت است. با اینکه روش‌هایی نظیر استفاده از شاخص‌های مورفولوژی یا سونوگرافی می‌تواند استرس و تبعات ناشی از شکافتن بدن و جراحی ماهی را در پی نداشته باشد، اما مشاهده مستقیم بافت گنادی را امکان‌پذیر نمی‌کند بنابراین، ممکن است با نتایج ضد و نقیضی همراه باشد. همان طور که اشاره شد، مشاهده مستقیم بافت گنادی از اهمیت دوچندانی در تعیین جنسیت ماهی برخوردار است که البته این امر مستلزم جراحی و ایجاد شکاف در ناحیه شکمی است و به تبع می‌تواند سبب بروز استرس در ماهی شود (Falahatkar, 2010). به نظر می‌رسد در شیوه اتوسکوپی، به سبب ورود نکردن به ناحیه شکمی، شدت بروز استرس و آسیب‌های احتمالی به اندام‌های داخلی کمتر است که البته این امر باید مطالعه و بررسی شود. در برخی مطالعات، بررسی همه‌جانبه گنادها در ماهیان خاویاری از نقطه نظر تعیین مرحله رسیدگی جنسی و شاخص‌هایی نظیر GSI و قطر تخمک، از طریق استفاده از دو روش هم‌زمان اندوسکوپی و

References

- [1]. Bryan, J.L., Wildhaber, M.L., Noltie, D. B., 2005. Examining madtom reproductive biology using ultrasound and artificial photothermal cycles. *North American Journal of Aquaculture* 67, 211–230.
- [2]. Bryan, J.L., Wildhaber, M.L., Papoulias, D.M., DeLonay, A.J., Tillitt, D.E., Annis, M.L., 2007. Estimation of gonad volume, fecundity, and reproductive stage of shovelnose sturgeon using sonography and endoscopy with application to the endangered pallid sturgeon. *Journal of Applied Ichthyology* 23, 411–419.
- [3]. Colombo, R.E., Willis, P.S., Garvey, J.E., 2004. Use of ultrasound imaging to determine sex of shovelnose sturgeon. *North American Journal of Fisheries Management* 24, 322–326.
- [4]. Conte, F.S., Doroshov, S.I., Lutes, P.B., Strange, E.M., 1988. Hatchery manual for the white sturgeon (*Acipenser transmontanus* Richardson) with application to other north American Acipenseridae. University of California Cooperative Extension Service Publication 3322, Oakland, California.
- [5]. Evans, A.F., Fitzpatrick, M.S., Siddens, L.K., 2004. Use of ultrasound imaging and steroid concentrations to identify maturational status in adult steelhead. *North American Journal of Fisheries Management* 24, 967–978.
- [6]. Falahatkar, B., Poursaeid, S., Shakoorian, M., Barton, B., 2009. Responses to handling and confinement stressors in juvenile great sturgeon *Huso huso*. *Journal of Fish Biology* 75, 784–796.
- [7]. Falahatkar B., 2010. Primary and secondary stress responses of great sturgeon following gonad biopsy. *Aquaculture Europe* 2010, October 5–8, Porto, Portugal.
- [8]. Falahatkar, B., Tolouei, M.H., Falahatkar, S., Abbasalizadeh, A., 2011. Laparoscopy, a minimally-invasive technique for sex identification in cultured great sturgeon *Huso huso*. *Aquaculture* 321, 273–279.
- [9]. Hochleithner, M., Gessner, J., 2001. *The Sturgeon and Paddlefishes of the World -Biology and Aquaculture*. Aquatech publications, 106p.
- [10]. Hurvitz, A., Jackson, K., Degani, G., Levavi-Sivan, B., 2007. Use of endoscopy for gender and ovarian stage determinations in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) grown in aquaculture. *Aquaculture* 270, 158–166.
- [11]. Kynard, B., Kieffer, M., 2002. Use of a borescope to determine the sex and egg maturity stage of sturgeons and the effect of borescope use on reproductive structures. *Journal of Applied Ichthyology* 18, 505–508.
- [12]. Linares-Casenave, J., Kroll, K.J., Van Eenennaam, J.P., Doroshov, S.I., 2003. Effect of ovarian stage on plasma vitellogenin and calcium in cultured white sturgeon. *Aquaculture* 221, 645–656.
- [13]. Mal'sev, A.V., Merkulov, Y.G., 2006. A biometric method for determining the sex of Acipenserids, including the Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii* (Acipenseridae) of the Azov population. *Journal of Ichthyology* 46, 536–540.
- [14]. Matsche, M.A., Bakal, R.S., Rosemary, K.M., 2011. Use of laparoscopy to determine sex and reproductive status of shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*) and Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*). *Journal of Applied Ichthyology* 27, 627–636.
- [15]. Moccia, R.D., Wilkie, E.J., Munkittrick, K.R., Thompson, W.D., 1984. The use of fine needle fibre endoscopy in fish for in vivo examination of visceral organs, with special reference to ovarian evaluation. *Aquaculture* 40, 255–259.

- [16]. Moghim, M., Vajhi, A.R., Veshkini, A., Masoudifard, M., 2002. Determination of sex and maturity in *Acipenser stellatus* by using ultrasonography. *Journal of Applied Ichthyology* 18, 325–328.
- [17]. Nazeri, S., Mojazi Amiri, B., Nazeri, M.R., Mirvaghefi, A.R., 2013. Sexing of farmed immature beluga (*Huso huso*) using steroid hormone levels as indicators. *Comparative Clinical Pathology*. DOI 10.1007/s00580-012-1662-8
- [18]. Ortenburger, A.I., Jansen, M.E., Whyte, S.K., 1996. Nonsurgical videolaprosopy for determination of reproductive status of the Arctic charr. *Canadian Veterinary Journal* 37, 96–100.
- [19]. Whiteman, E.A., Jennings, C.A., Nemeth, R.S., 2005. Sex structure and potential female fecundity in a *Epinephelus guttatus* spawning aggregation: applying ultrasonic imaging. *Journal of Fish Biology* 66, 983–995.
- [20]. Wildhaber, M.L., Papoulias, D.M., DeLonay, A.J., Tillitt, D.E., Bryan, J.L., Annis, M.L., Allert, J.A., 2005. Gender identification of shovelnose sturgeon using ultrasonic and endoscopic imagery and the application of the method to the pallid sturgeon. *Journal of Fish Biology* 67, 114–132.
- [21]. Wildhaber, M.L., Papoulias, D.M., DeLonay, A.J., Tillitt, D.E., Bryan, J.L., Annis, M.L., 2007. Physical and hormonal examination of Missouri River shovelnose sturgeon reproductive stage: a reference guide. *Journal of Applied Ichthyology* 23, 382–401.
- [22]. Will, T.A., Reinert, T.R., Jennings, C.A., 2002. Maturation and fecundity of a stock enhanced population of striped bass in the Savannah River Estuary, U.S.A. *Journal of Fish Biology* 60, 532–544.