نشریه شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۶۷، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳
ص۱۰۹-۱۲۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۳/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۳/۳۰

مطالعهٔ تطبیقی اثر آنزیم تریپسین و روش متداول گل‌شویی در حذف لایه‌های چسبندهٔ تخم لقاح‌یافتهٔ تاسماهی ایرانی *(Acipenser persicus)*

❖ **بی‌تا کلوانی نیتلی:** دانشجوی کارشناسی ارشد گروه شیلات، دانشکدهٔ علوم دریایی و منابع طبیعی، دانشگاه تربیت‌مدرس، نور، ایران
❖ **باقر مجازی امیری*:** استادگروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
❖ **محمدرضا کلباسی:** دانشیار گروه شیلات، دانشکدهٔ علوم دریایی و منابع طبیعی، دانشگاه تربیت‌مدرس، نور، ایران
❖ **احمد نوری:** استادیار گروه شیلات، دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

چکیده

در این تحقیق به منظور رفع چسبندگی تخم‌های لقاح‌یافتهٔ تاسماهی ایرانی *(Acipenser persicus)* از آنزیم تریپسین استفاده شد؛ نتایج مربوط به مدت‌زمان لازم برای رفع چسبندگی و درصد بازماندگی جنینی با روش سنتی رفع چسبندگی (شست‌وشوی تخم‌ها با گل رس) مقایسه شد. همچنین، مطالعهٔ تطبیقی تأثیرات بافت‌شناسی آنزیم و ذرات رس در دیوارهٔ خارجی دور تخم انجام شد. بعد از لقاح و ۲ بار آبکشی، تخم‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در معرض ۴ غلظت متفاوت آنزیم تریپسین (۱،۳،۶ و۱۲ IU/ml) قرار گرفتند. بخشی از تخم‌ها طی همین مدت‌زمان به‌منزلهٔ شاهد با گل رس شست‌وشو شدند؛ تیمارهای آزمایش شامل ۴ تیمار با آنزیم‌هایی در غلظت‌های یادشده و ۱ تیمار مربوط به گل‌شویی (تیمار شاهد) بودند. هر تیمار در ۳ تکرار و برای هر تکرار ۱۵۰ تخم لقاح‌یافته در نظر گرفته شدند. ۱ بار در لحظهٔ شروع آزمایش سپس، هر ۱۰ دقیقه تا زمان پایان رفع چسبندگی از تخم‌ها نمونه‌برداری شد و این تخم‌ها به منظور بررسی‌های بافت‌شناسی در محلول بوئن تثبیت شدند. در هر یک از تیمارها زمان رفع‌شدن چسبندگی ثبت شد. ۶۰ ساعت بعد از لقاح درصد بازماندگی جنینی با سنجش میزان تخم‌های دارای جنین سالم و طبیعی در هر یک از تیمارها شمارش شد. بیشترین میزان بازماندگی جنینی ۲/۱۹±۸۶/۹ درصد در غلظت ۶ IU/ml حاصل شد که با استناد به نتایج آزمون ANOVA به طور معنی‌داری از تیمار شاهد بالاتر بود ($P<0/05$). میزان بازماندگی ۰/۸۸±۷۵/۲ درصد، ۲/۱±۷۷/۱ درصد، ۲/۲۶±۷۷/۳ درصد و ۲/۷۵±۷۷/۰ درصد به ترتیب در تیمارهای ۱ IU/ml، ۳ IU/ml، ۱۲ IU/ml و تیمار شاهد به دست آمد. کمترین زمان لازم برای رفع چسبندگی تخم‌ها ۶ دقیقه و مربوط به غلظت ۱۲ IU/ml بود. این زمان برای غلظت‌های ۱ IU/ml، ۳، ۶ و گروه شاهد به ترتیب ۱۹، ۱۵، ۱۱ و ۲۳ دقیقه بوده است. بررسی بافت‌شناسی لایهٔ چسبندهٔ دور تخم هیچ‌گونه آسیب فیزیکی را در تیمار شست‌وشو با گل رس نشان نداد. در این بررسی‌ها مشخص شد ضخامت لایهٔ چسبنده در تیمارهای آنزیمی با افزایش زمان نسبت معکوس دارد و در زمان یکسان این ضخامت با غلظت آنزیم ارتباط دارد. با توجه به نتایج این تحقیق، آنزیم تریپسین می‌تواند با موفقیت برای حذف واقعی لایهٔ چسبنده در تاسماهی ایرانی استفاده شود. دوز پیشنهادی برای رفع چسبندگی، ۶ IU/ml است که زمان انجام‌دادن عمل در دوز ذکرشده ۱۱ دقیقه است.

واژگان کلیدی: تاسماهی ایرانی، تریپسین، رفع چسبندگی تخم، لایهٔ چسبنده.

* نویسندهٔ مسئول تلفن: ۰۹۱۲۳۰۷۷۱۳۶
Email: hf498@uwindsor.ca

۱. مقدمه

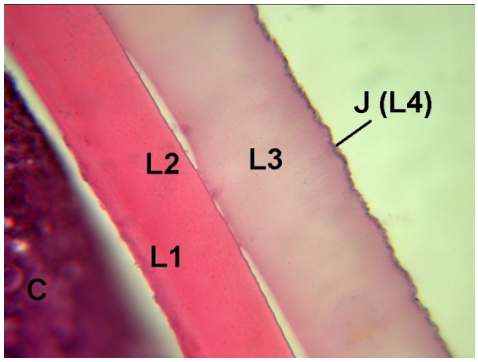
تخم‌های ماهیان خاویاری از جمله تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) لایه‌های متعددی دارند که خارجی‌ترین آنها لایهٔ ژلاتینی است (Cherr and Clark, 1985). لایهٔ مذکور پوششی ژلاتینی و نامحلول در آب است که از لحاظ ریخت‌شناسی کرکی‌شکل است و به طور متراکم دارای بار الکتریکی است. عملکردهای متفاوتی از جمله آغاز فعالیت‌های اکروزومی به این لایه نسبت داده می‌شود. آنالیز این لایه (که به Jelly coat نیز مشهور است) نشان داده است که ترکیب آن در ماهیان خاویاری متشکل از ۸۸/۱ درصد پروتئین و ۱۱/۹ درصد کربوهیدرات است که به‌هم‌پیوسته و به صورت مولکول‌های گلیکوپروتئینی‌اند (Cherr and Clark, 1984). پوشش ژلاتینی دور تخمک بعد از تماس با آب هیدراته می‌شود و حالت چسبنده پیدا می‌کند (Kowtal *et al.*, 1986). در نتیجه این امکان فراهم می‌شود که تخم‌ها در مکان تخم‌ریزی به بستر یا اجسام موجود در آب بچسبند (Riehl and Patzner, 1998)، اما چسبندگی تخم‌ها طی مرحلهٔ انکوباسیون مضر است و مشکلاتی را فراهم می‌کند. انباشتگی و اتصال تخم‌ها به یکدیگر در چنین شرایطی منجر به مرگ‌ومیر بالا به علت کمبود اکسیژن و رشد قارچ‌ها می‌شود (Monaco and Doroshov, 1983). برای اجتناب از این حالت، در مراکز تکثیر ماهیان خاویاری تخم‌ها بلافاصله بعد از لقاح با گل رس شست‌وشو می‌شوند. این عمل (که از آن تحت عنوان گل‌شویی یاد می‌شود) به صورت دستی و طی دقایق نسبتاً طولانی انجام می‌شود که در نتیجه مستلزم دستکاری شدید و درازمدت تخم‌هاست (ibid). برای رفع چسبندگی تخم ماهیان در آبزی‌پروری روش‌های متعددی به کار گرفته شده است (Demska-Zakes *et al.*, 2005)؛ از آن جمله می‌توان به رفع چسبندگی تخم‌ها با انواع محلول‌ها یا مواد شیمیایی مانند سولفیت سدیم (Kowtal *et al.*, 1986; Al Hazzaa and Hussein, 2003)، اسید تانیک (Al Hazzaa and Hussein, 2003; Demska-Zakes *et al.*, 2005)، کاربامید و نمک (Cherr and Clark, 1984; Kowtal 1986; Al Hazzaa and Hussein, 2003) و پودر شیر (Khan *et al.*, 1986; Billard 1995; Linhart *et al.*, 2003) اشاره کرد. همچنین، از محلول‌های حاوی آنزیم پروتئاز برای رفع چسبندگی تخم‌های ماهیان استفاده شده است (Linhart *et al.*, 2000, 2002, 2003; Mansour *et al.*, 2009). با توجه به ماهیت گلیکوپروتئینی پوشش ژلاتینی، برخی پروتئازها در رفع چسبندگی مؤثر شناخته شده‌اند. از مزایای استفاده از آنزیم کاهش چشمگیر مدت‌زمان رفع چسبندگی و افزایش درصد تفریخ نسبت به روش‌های سنتی (مانند گل‌شویی) است (Linhart *et al.*, 2003). در این تحقیق تأثیرات آنزیم تریپسین در رفع چسبندگی تخم تاسماهی ایرانی بررسی شد. هدف از این تحقیق مطالعهٔ تأثیر آنزیم تریپسین و تعیین دوز مناسب آن در رفع چسبندگی تخم‌های لقاح‌یافتهٔ تاسماهی ایرانی همچنین، مقایسهٔ نتایج آن با نتایج رفع چسبندگی تخم‌ها با روش سنتی شست‌وشو با گل رس بوده است.

۱. مواد و روش‌ها

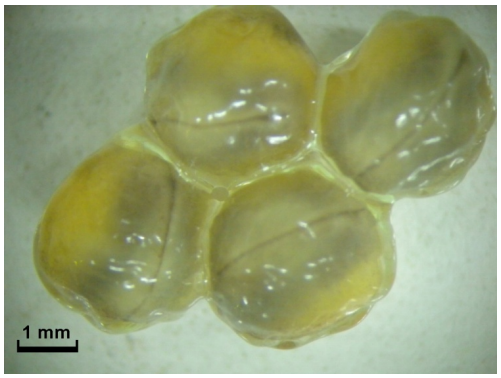
۱.۲. مراحل میدانی و آزمایشگاهی

مراحل میدانی این تحقیق در مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید بهشتی رشت- گیلان و در فروردین انجام شد. تخمک و اسپرم از ۵ جفت مولد نر و مادهٔ تاسماهی ایرانی برداشت شد. وزن مولدین ماده میانگین ۷۱/۲ کیلوگرم (حداقل ۶۵ و حداکثر ۷۶) و میانگین طول کل آنها ۱۷۷/۶ سانتی‌متر (حداقل ۱۷۱ و حداکثر ۱۸۳ سانتی‌متر) سنجش شد. بعد از رقیق‌سازی اسپرم با آب کارگاه به نسبت ۱:۲۰۰ (Kowtal *et al.*, 1986) لقاح به شیوهٔ نیمه‌خشک انجام شد. بعد از لقاح و ۲ بار آبکشی تخم‌ها عملیات رفع چسبندگی طی ۵ تیمار و هر تیمار با ۳ تکرار انجام شد. برای هر تکرار ۱۵۰ عدد تخم در نظر گرفته شد. یک تیمار شامل روش سنتی شست‌وشوی تخم‌ها با سوسپانسیون ۱۰ درصد گل رس (Sakowics, 1928) و ۴ تیمار شامل شست‌وشوی تخم‌ها با ۴ دوز مختلف آنزیم تریپسین (۱، ۳، ۶ و ۱۲ IU/ml) در نظر گرفته شد. دمای آب در زمان استفاده در مخلوط گل رس و محلول‌های حاوی آنزیم برابر با دمای آب کارگاه (۱۸ درجهٔ سانتی‌گراد) بود. تریپسین مورد استفاده به صورت قرص و هر قرص حاوی ۱۸۰ IU مادهٔ مؤثر بود (Sigma Chemical Company: TRYPSIN-1mg). برای تهیهٔ محلول‌های تریپسین با دوزهای مورد نظر، از محلول PBS (Phosphate-Buffered Saline) با pH ۷/۶ استفاده شد. نمونه‌برداری از تخم‌ها در دقایق صفر، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه بعد از شروع مراحل اجرایی رفع چسبندگی انجام شد. بعد از نمونه‌برداری، تخم‌ها در محلول تثبیت بوئن (۷۵ میلی‌لیتر محلول اسید پیکریک اشباع، ۲۵ میلی‌لیتر فرمالین و ۵ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال) تثبیت و بعد از ۳ روز وارد الکل اتانول ۹۶ درصد شدند و تا زمان بررسی در آزمایشگاه در آن نگهداری شدند. همچنین، به منظور بررسی مدت‌زمان لازم برای رفع چسبندگی، وضعیت تخم‌ها در محلول به طور مداوم بررسی شد و زمانی را که تخم‌ها آزادانه در محلول شست‌وشو حرکت کردند به‌منزلهٔ زمان رفع چسبندگی در نظر گرفته شد. بعد از طی ۳۰ دقیقه از شروع آزمایش، تخم‌ها مجدداً آبشویی و وارد انکوباتورهای یوشچنکو شدند. بعد از طی ۶۰ ساعت از شروع مرحلهٔ انکوباسیون، تخم‌ها از نظر درصد نمو جنینی سنجش شدند (Monaco and Doroshov, 1983). برای این منظور از هر تکرار ۵۰ تخم نمونه‌برداری شد و در محلول شفاف‌ساز (محلول Davidson، ۳ حجم اتانول ۹۵ درصد، ۲ حجم فرمالدهید، ۱حجم اسید استیک گلاسیال، ۳ حجم آب) قرار داده شد (Noori *et al.*, 2010). سپس، تخم‌ها در زیر لوپ Leica MZ6 از لحاظ وجود کمان عصبی (نوتوکورد) بررسی شدند و وجود کمان عصبی به‌منزلهٔ معیار بازماندگی جنین مد نظر قرار گرفت (شکل۱). در پایان، نمونه‌های تثبیت‌شده در محلول بوئن به آزمایشگاه منتقل شدند و بعد از انجام‌دادن مراحل بافت‌شناسی با روش کلاسیک (Busacker *et al.*, 1990) از مقاطع بافتی تهیه‌شده از تخم‌های لقاح‌یافته (با ضخامت ۵ میکرون) عکس‌های دیجیتالی تهیه شد. از هر تکرار ۷ تخمک و در مورد هر تخمک از ۱۰ بخش مختلف آن عکس تهیه شد. سپس، با کمک میکروسکوپ نوری Leica

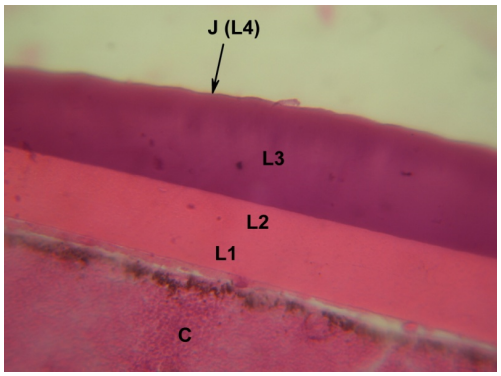
DMLS و نیز کاربرد نرم‌افزار Image Analyzer لایه‌های تخم بررسی شدند و ضخامت لایهٔ چسبنده، به‌منزلهٔ لایهٔ تأثیرپذیر از مراحل آزمایش، اندازه‌گیری شد (شکل‌های ۲ تا ۴).



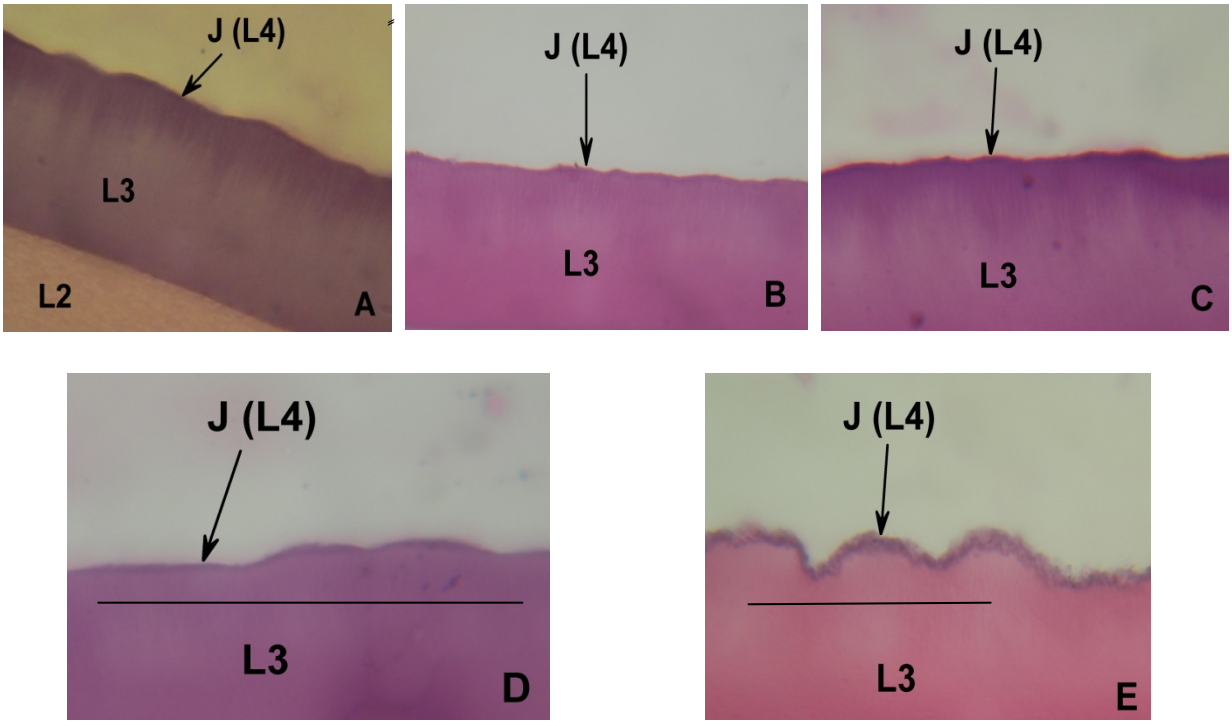
شکل ۲. مقطع بافت‌شناسی تخم تاسماهی ایرانی با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ بعد از شست‌وشوی تخم با سوسپانسیون رس. C: سیتوپلاسم داخل اووسیت، L1: لایهٔ زوناراديانا اول، L2: لایهٔ زوناراديانا دوم، L3: لایهٔ زوناراديانا سوم، J (L4): لایهٔ چسبنده یا لایهٔ زوناراديانا چهارم



شکل ۱. تشکیل طناب عصبی در تخم تاسماهی ایرانی ۶۰ ساعت بعد از لقاح



شکل ۳. مقطع بافت‌شناسی تخم تاسماهی ایرانی با بزرگنمایی ۱۰۰ بعد از لقاح و تماس با آب (دقیقه صفر)



شکل ۴. مقایسهٔ وضعیت لایهٔ چسبنده در گروه کنترل و گروه‌های تحت تأثیر آنزیم

A: گروه تیماری ۱IU/ml، B: گروه تیماری ۳IU/ml، C: گروه تیماری ۶IU/ml، D: گروه تیماری ۱۲IU/ml، E: گروه کنترل (گروه گل‌شویی)

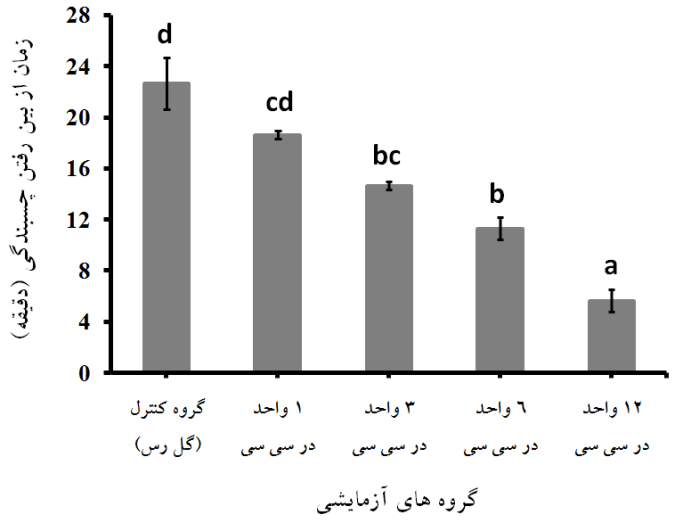
۲.۲. آنالیز آماری

نتایج بررسی‌ها با نرم‌افزار Excel و نرم‌افزار آماری SPSS پردازش شدند. داده‌ها ابتدا با روش کولموگروف- اسمیرنوف از لحاظ نرمال‌بودن بررسی شدند سپس، با استفاده از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) داده‌های گروه‌های آزمایشی با هم مقایسه شدند. شایان ذکر است که داده‌های به صورت درصد قبل از آزمون از طریق روش Arcsin تبدیل سپس، آزمون شدند. اختلافات معنی‌دار در بین گروه‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن ارزیابی شدند.

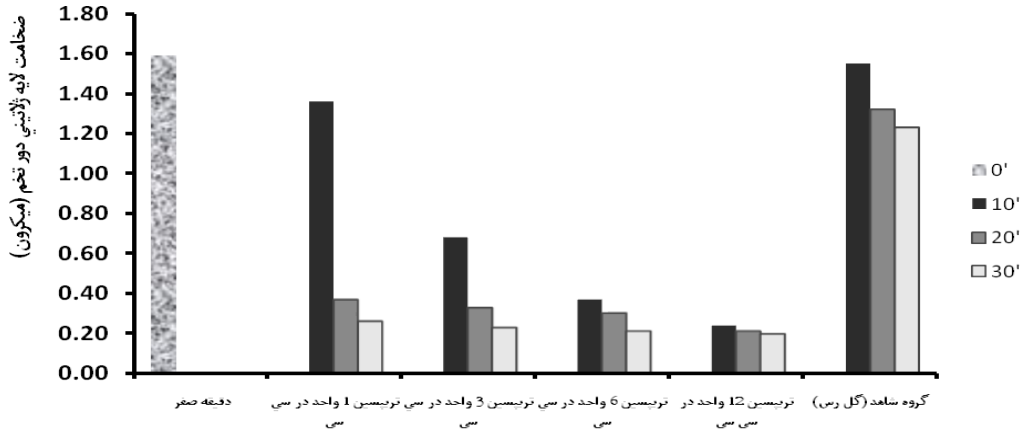
۳. نتایج

نتایج در مورد زمان رفع چسبندگی تخم‌ها در تیمارهای مختلف نشان داد که کمترین زمان لازم مربوط به تیمار IU/ml ۱۲ تریپسین و برابر با ۶ دقیقه بوده است. این اتفاق برای غلظت IU/ml ۶ در دقیقهٔ ۱۱، برای غلظت IU/ml ۳ در دقیقهٔ ۱۵ و برای غلظت IU/ml ۱ در دقیقهٔ ۱۹ رخ داد که نسبت به سایر تیمارها طولانی‌تر بود. ضمن اینکه چسبندگی تخم‌ها در گروه کنترل (گل رس) در دقیقهٔ ۲۳ برطرف شد (شکل ۵).

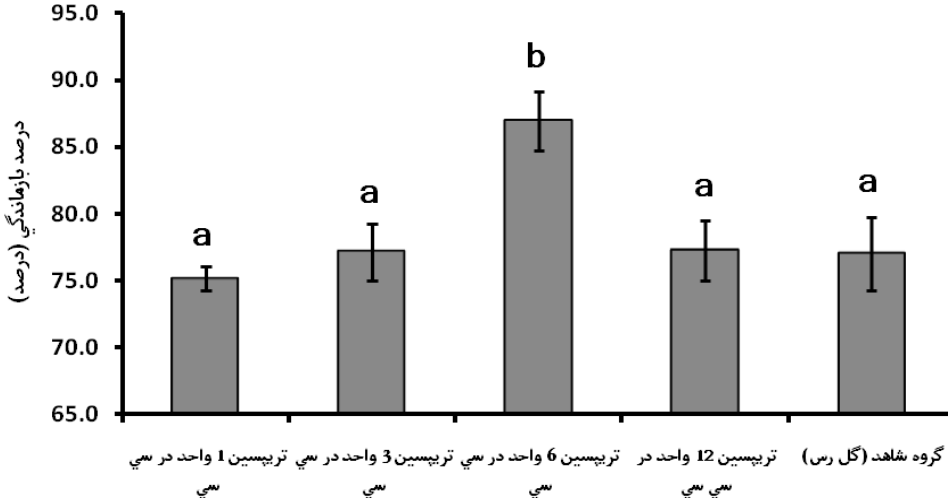
بنابراین، بررسی بافت‌شناسی لایهٔ ژلاتینی دور تخم‌ها نشان داد که ضخامت لایهٔ مذکور در ابتدای کار برابر با µm ۱/۵۹ بوده است. این میزان ۱۰ دقیقه بعد از شروع آزمایش به µm ۱/۳۶ در غلظت IU/ml۱، µm ۰/۶۸ در غلظت IU/ml ۳، µm ۰/۳۷ در غلظت IU/ml ۶، µm ۰/۲۴ در غلظت IU/ml ۱۲ آنزیم تریپسین و نیز برای گروه شاهد µm ۱/۵۵ رسید. در نمونه‌های تخم که ۲۰ دقیقه بعد از شروع آزمایش برداشت شدند ضخامت لایهٔ ژلاتینی در غلظت‌های ۱، ۳، ۶ و IU/ml ۱۲ به ترتیب ۰/۳۷، ۰/۳۳، ۰/۳۰ و µm ۰/۲۱ و در گروه شاهد µm ۱/۳۲ سنجش شد. نهایتا در دقیقهٔ ۳۰ ضخامت لایهٔ ژلاتینی در گروه‌های یادشده به ترتیب به مقادیر ۰/۲۶، ۰/۲۳، ۰/۲۱ و µm ۰/۲۰ و در گروه شاهد به µm ۱/۲۳ رسید (شکل ۶). در بررسی‌های آماری با مقایسهٔ قطر نهایی لایهٔ چسبنده در هر یک از تیمارها، اختلاف معنی‌دار بین گروه شاهد (گل رس) با سایر گروه‌ها مشخص شد.



شکل ۵. مدت‌زمان ازبین‌رفتن چسبندگی در تیمارهای مختلف آزمایشی



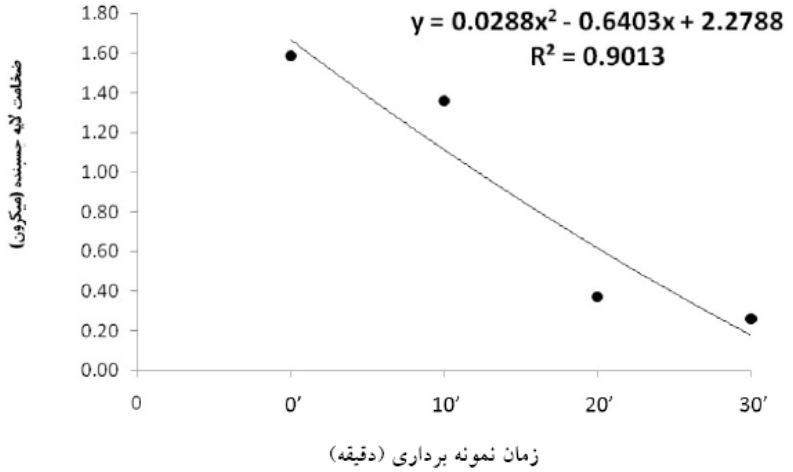
شکل ٦. ضخامت لایهٔ ژلاتینی دور تخم در گروه‌ها و زمان‌های مختلف



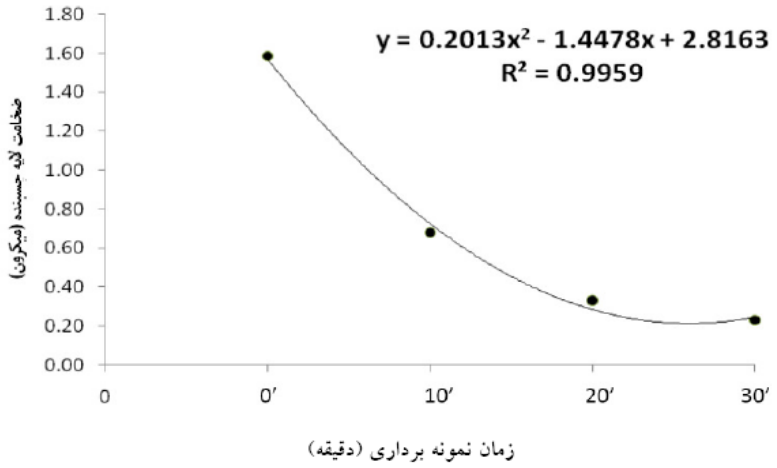
شکل ۷. میزان بازماندگی گروه‌های مختلف

نتایج بررسی درصد بازماندگی جنینی نشان داد که حداکثر این میزان در بین ۵ تیمار ذکرشده مربوط به تیمار تریپسین با غلظت IU/ml ۶ و برابر با ۸۶/۹±۲/۱۹ درصد بود که به طور معناداری با سایر گروه‌ها تفاوت داشت. درصد بازماندگی جنینی در تیمارهای ۱، ۳ و IU/ml ۱۲ به ترتیب ۷۵/۲±۰/۸۸ درصد، ۷۷/۱±۲/۱ درصد و ۷۷/۳±۲/۲۶ درصد بود که با یکدیگر و نیز با گروه شاهد (۷۷/۰±۲/۷۵ درصد) اختلاف معنی‌دار نداشتند (شکل ۷).

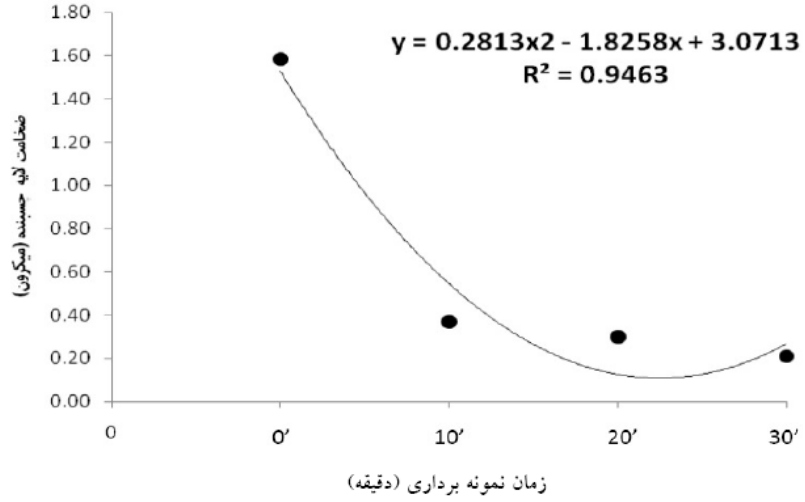
با رسم نمودارهای مربوط به ارتباط زمان و ضخامت لایهٔ چسبنده که در مورد هر تیمار به طور جداگانه رسم شد، مشخص شد که در غلظت‌های مختلف آنزیم بین مدت‌زمان و کاهش ضخامت لایهٔ چسبنده ارتباط وجود دارد؛ به طوری که، با افزایش غلظت آنزیم، روند کاهش ضخامت لایهٔ چسبنده سریع‌تر و با شیب بیشتر پیش می‌رود (اشکال ۸ تا ۱۲).



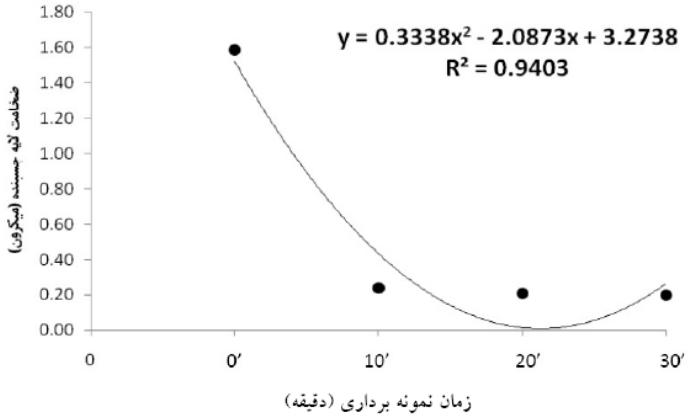
شکل ۸. ارتباط بین زمان نمونه‌برداری و ضخامت لایهٔ چسبنده در تیمار تریپسین با غلظت ۱ IU/ml



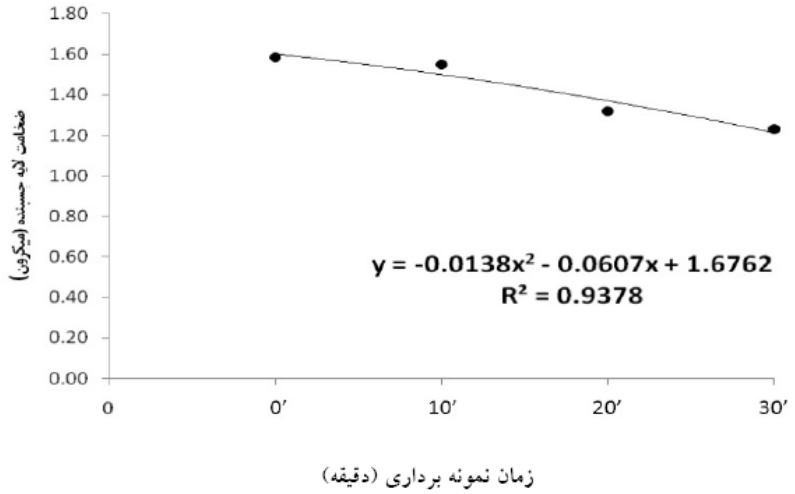
شکل ۹. ارتباط بین زمان نمونه‌برداری و ضخامت لایهٔ چسبنده در تیمار تریپسین با غلظت ۳ IU/ml



شکل ۱۰. ارتباط بین زمان نمونه‌برداری و ضخامت لایهٔ چسبنده در تیمار تریپسین با غلظت ٦ IU/ml



شکل ۱۱. ارتباط بین زمان نمونه‌برداری و ضخامت لایهٔ چسبنده در تیمار تریپسین با غلظت ۱۲ IU/ml



شکل ۱۲. ارتباط بین زمان نمونه‌برداری و ضخامت لایهٔ چسبنده در تیمار شاهد (گل رس)

نتایج آزمایش در مورد زمان رفع چسبندگی، ضخامت نهایی لایهٔ چسبنده و میزان بازماندگی جنینی مربوط به هر تیمار به طور خلاصه در جدول زیر قید شده است (جدول ۱).

جدول ۱. خلاصه‌ای از نتایج در هر یک از تیمارها

تیمارهای آزمایشی	پارامترهای اندازه گیری شده		
	درصد بازماندگی جنینی	قطر نهایی لایه چسبنده(µm)	زمان رفع چسبندگی(دقیقه)
تریپسین۱IU/ml	۷۵/۲ ±۰/۸۸	۰/۲۶ ±۰/۰۰۵	۱۹ ±۰/۳
تریپسین۳IU/ml	۷۷/۱ ±۲/۱۰	۰/۲۳ ±۰/۰۰۷	۱۵ ±۰/۳
تریپسین٦ IU/ml	۸٦/۹ ±۲/۱۹	۰/۲۱ ±۰/۰۰۵	۱۱ ±۰/۹
تریپسین۱۲ IU/ml	۷۷/۳ ±۲/۲٦	۰/۲۰ ±۰/۰۰۳	٦ ±۰/۹
گروه شاهد(گل رس)	۷۷/۰ ±۲/۷۵	۱/۲۳ ±۰/۰۱۰	۲۳ ±۲/۰

۴. بحث و نتیجه‌گیری

رفع چسبندگی تخم‌ها در تولیدمثل مصنوعی کنترل‌شده در ماهیان آب شیرین مرحله‌ای بحرانی است (Linhart *et al.*, 2000). در سال ۱۹۸۴، محققان دریافتند که ترشح و هیدراته‌شدن لایهٔ گلیکوپروتئینی تخمک ماهی خاویاری سفید -که مسئول ایجاد چسبندگی است- به نوعی به پروتئاز شبه‌تریپسین وابسته است و در عین حال تحت تأثیر کیموتریپسین نیست (Cherr and Clark, 1984).

در این آزمایش رفع چسبندگی تخم‌های لقاح‌یافتهٔ تاسماهی ایرانی با آنزیم تریپسین با موفقیت انجام شد. حداقل زمان لازم برای انجام‌دادن این عمل ۶ دقیقه بود که در غلظت IU/ml ۱۲ این آنزیم حاصل شد. از نظر درصد بازماندگی جنینی بهترین نتایج در غلظت IU/ml۶ به دست آمد که به طور معنی‌داری از نتایج سایر گروه‌ها بالاتر بود. از این دیدگاه می‌توان گفت غلظت IU/ml۶ برای رفع چسبندگی تخم‌های تاسماهی ایرانی مناسب است. این غلظت تریپسین قادر است طی مدت‌زمان ۱۱ دقیقه چسبندگی تخم‌ها را رفع کند.

بر اساس تحقیقات (Linhart *et al.*, 2003)، استفاده از آنزیم در رفع چسبندگی تخم‌های ماهیان چنانچه حتی از نظر درصد بازماندگی تفاوت نشان ندهد به علت کاهش محسوس مدت‌زمان انجام پروسهٔ رفع چسبندگی، نسبت به روش‌های سنتی، دارای مزیت است. استفاده از آنزیم (آلکالاز) در مورد ماهی کپور (*Cyprinus carpio*) زمان لازم برای فرایند رفع چسبندگی را از ۷۰ دقیقه در روش سنتی (شست‌وشو با پودر شیر) به ۲۱ دقیقه کاهش داد؛ در حالی که، از نظر میزان بازماندگی بین دو روش مذکور تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین، کاربرد آنزیم در رفع چسبندگی تخم‌های گربه‌ماهی اروپایی (*Silurus glanis*) نشان داد که زمان رفع چسبندگی این تخم‌ها نیز با کاربرد آنزیم از ۳۰ به ۳ دقیقه کاهش می‌یابد (Linhart *et al.*, 2002).

کاهش مدت‌زمان رفع چسبندگی در صورت به‌کارگیری آنزیم (۶ دقیقه در غلظت IU/ml ۱۲ و ۱۱ دقیقه در غلظت IU/ml ۶ در مقابل ۲۳ دقیقه در روش سنتی) در یافته‌های حاصل از این تحقیق نیز مشاهده شد. علت کاهش ضخامت لایهٔ ژلاتینی در تماس با آنزیم تریپسین ماهیت گلیکوپروتئینی این لایه است که آنزیم تریپسین، به‌منزلهٔ پروتئاز، در تماس با آن مانند حلال عمل می‌کند. این بخش از نتایج با یافته‌های Cherr و Clark (۱۹۸۴) هماهنگ بود، زیرا این محققان دریافته بودند که لایهٔ ژلاتینی در ماهیان خاویاری به نوعی پروتئاز شبه‌تریپسین عکس‌العمل نشان می‌دهد. طبق انتظار، هر چه غلظت آنزیم بیشتر باشد حل‌شدن لایهٔ ژلاتینی سریع‌تر انجام می‌شود.

استفاده از آنزیم در تکثیر گربه‌ماهی اروپایی و نیز لای‌ماهی علاوه بر کاهش زمان دستکاری تخم‌ها (از ۱ ساعت در روش شست‌وشو با شیر و رس در لای‌ماهی و نیز رس تنها در گربه‌ماهی به چند دقیقه) افزایش میزان بازماندگی را نیز به دنبال دارد (Linhart *et al.*, 2003). در مورد لای‌ماهی غلظت و زمان مناسب کاربرد آنزیم آلکالاز IU/ml۱۰ در مدت ۲ دقیقه است که در این صورت نرخ تفریخ به ۸۸/۱ درصد رسید. این در حالی است که در همین شرایط کاربرد روش سنتی شیر و گل رس به نرخ تفریخ ۳۰

درصد انجامید، ضمن اینکه مدت‌زمان لازم برای رفع چسبندگی در روش سنتی حدود ۶۰ دقیقه و در روش آنزیمی ۲ دقیقه بوده است (Linhart *et al.*, 2000). در این آزمایش در غلظت ۶IU/ml افزایش معنی‌دار میزان بازماندگی نسبت به روش سنتی مشاهده شد و میزان آن ۸۹/۱ درصد بوده است. بنابراین، استفاده از آنزیم تریپسین با غلظت ۶IU/ml در رفع چسبندگی تخم‌های تاسماهی ایرانی موجب افزایش درصد بازماندگی می‌شود.

بررسی‌های بافت‌شناسی، به منظور تعیین اثر آنزیم و ذرات رس بر لایهٔ ژلاتینی، نشان داد که ذرات رس موجب کاهش جزئی ضخامت لایهٔ ژلاتینی می‌شود. این کاهش ضخامت در گروه کنترل (ذرات رس) روندی آرام داشت و بعد از گذشت ۳۰ دقیقه از ۱/۵۹ میکرون به ۱/۲۳ میکرون رسید. این در صورتی بود که روند کاهش ضخامت لایهٔ ژلاتینی در تیمارهای آنزیم تریپسین نسبتاً تندتر بوده است. بعد از گذشت ۱۰ دقیقه از شروع آزمایش ضخامت لایهٔ مذکور در تیمار ۱IU/ml تریپسین به ۱/۳۶ رسید، در حالی که طی همین زمان کاهش ضخامت لایهٔ ژلاتینی در سایر تیمارهای تریپسین بسیار شدیدتر بوده است؛ به طوری که، ضخامت لایه بعد از ۱۰ دقیقه در تیمارهای ۳ IU/ml، ۶ و ۱۲ به ترتیب ۰/۶۸، ۰/۳۷ و ۰/۲۴ میکرون بوده است. روند کاهش ضخامت در تیمارهای تریپسین بعد از دقیقهٔ ۱۰ تا پایان آزمایش ادامه داشت و در نهایت ضخامت لایه برای تیمارهای ۱ IU/ml، ۳، ۶ و ۱۲ به ترتیب به ۰/۲۶، ۰/۲۳، ۰/۲۱ و ۰/۲۰ میکرون رسید. علت کاهش ضخامت لایهٔ ژلاتینی در تماس با آنزیم تریپسین ماهیت گلیکوپروتئینی این لایه است که آنزیم تریپسین، به‌منزلهٔ پروتئاز، در تماس با آن مانند حلال عمل می‌کند و طبق انتظار، هر چه غلظت آنزیم بیشتر باشد حل‌شدن لایهٔ ژلاتینی سریع‌تر انجام می‌شود.

بررسی نمودارهای مربوط به کاهش ضخامت لایهٔ چسبنده در ارتباط با میزان غلظت آنزیم طی زمان‌های نمونه‌برداری نشان می‌دهد که در همهٔ گروه‌های تیماری کاربرد آنزیم باعث کاهش ضخامت لایهٔ چسبنده می‌شود و این مقدار روندی نزولی را در ارتباط با زمان نشان می‌دهد. با بررسی نمودارهای مربوط می‌توان این گونه استنباط کرد که هر چه غلظت آنزیم بیشتر باشد، این روند با شیب بیشتری پیش می‌رود و در حقیقت تأثیر آنزیم در حذف لایهٔ چسبنده بیشتر می‌شود. همان طور که در نمودارهای ۹ تا ۱۳ مشاهده می‌شود، بیشترین روند کاهش لایهٔ چسبنده در غلظت‌های زیاد دیده می‌شود و با کاهش غلظت آنزیم از شدت این روند کاسته می‌شود.

در بررسی‌های بافت‌شناسی تطبیقی بین تیمار گل‌شویی با تیمارهای تریپسین در مورد لایه‌های دور تخم، به خصوص لایهٔ چسبنده، دیده شده است که آسیب فیزیکی به دیوارهٔ خارجی تخم‌ها که عامل آن شست‌وشو با ذرات رس بوده باشد در هیچ موردی از مقاطع بافتی وجود نداشته است که این امر ثابت می‌کند که شست‌وشو با ذرات رس اگر به طریق درست اعمال شود آسیبی به دیوارهٔ تخم وارد نمی‌آورد. یگانه تفاوت بین لایهٔ چسبنده در تیمار گل‌شویی و تیمارهای تریپسین به لحاظ بافت‌شناسی مربوط به ضخامت بیشتر آن در تیمار گل‌شویی بوده است.

همچنین، بررسی‌های بافت‌شناسی ثابت کرد که رفع چسبندگی تخم‌ها در اثر شست‌وشو با

سوسپانسیون رس به سبب حذف لایهٔ چسبنده در اثر سایش فیزیکی طولانی‌مدت یا خراش نیست. این ادعا با بررسی‌های میکروسکوپی مقاطع بافتی نمونه‌های مربوط به تیمار گل‌شویی و مشاهدهٔ لایهٔ چسبنده به طور نسبتاً کامل اثبات شد. طبق نتایج این آزمایش، تخم‌های مربوط به تیمار گل‌شویی بعد از ۳۰ دقیقه شست‌وشو با سوسپانسیون رس و رفع کامل چسبندگی، برخلاف تیمارهای آنزیمی، هنوز لایهٔ چسبنده را به طور نسبتاً کامل دارا بودند (شکل‌های ۲ و ۳). نتایج خروجی از نرم‌افزار Image Analyzer نیز تأیید کرد که ضخامت لایهٔ چسبنده بعد از انجام‌دادن پروسهٔ رفع چسبندگی به میزان کم کاهش یافت و بخش اعظم آن موجود بود (شکل ۶؛ جدول ۱). در مقاطع بافتی مربوط به نمونه‌های حاصل از تیمار گل‌شویی مشاهده شد که ذرات رس به طور انبوه جذب لایهٔ چسبنده شده‌اند (شکل ۲)، از آنجا که ذرات رس دارای بار الکتریکی منفی‌اند (Ardekani, 1388) و لایهٔ چسبندهٔ دور تخم نیز دارای بار الکتریکی است (Cherr and Clark, 1984)، به نظر می‌رسد در مکانیسم رفع چسبندگی تخم با روش شست‌وشو با ذرات رس، بار الکتریکی دخیل باشد به این صورت که، بار الکتریکی موجب جذب رس از طریق لایهٔ چسبنده و پوشش این لایه با ذرات رس می‌شود؛ به طوری که، رس از تماس مستقیم لایه با سطوح مختلف پیش‌گیری می‌کند و این امر موجب ازبین‌رفتن حالت چسبندهٔ تخم می‌شود. برای تأیید این فرضیه تحقیقات بیشتری مورد نیاز است.

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که به‌رغم این حقیقت که در ماهیان خاویاری ترکیبات گلیکوپروتئینی مسئول چسبندگی‌اند، اما بعد از رفع چسبندگی تخم‌ها هنوز بخشی از لایهٔ چسبنده دور تخمک مشاهده می‌شود، این امر به خصوص در مورد تیمار گل رس جالب توجه است به علت اینکه بخش اعظم لایهٔ چسبندهٔ اولیه بعد از ۳۰ دقیقه هنوز موجود است. همان گونه که ذکر شد، در بررسی‌های میکروسکوپی این تخم‌ها دیده شد که ذرات رس (احتمالاً به سبب وجود بار الکتریکی) جذب لایهٔ چسبنده شده و سطح آن را پوشانده است؛ بنابراین، احتمالاً مکانیسم رفع چسبندگی با گل رس به این صورت است که ذرات رس همانند عایق از تماس مستقیم لایه با سطوح اطراف جلوگیری می‌کنند و موجب رفع حالت چسبندگی تخم می‌شوند. در مورد تیمارهای آنزیمی، همان طور که ذکر شد، تریپسین لایهٔ چسبنده را حل می‌کند و به این علت ضخامت تیمارهای تریپسین کاهش می‌یابد. گرچه در هیچ‌یک از تیمارها ضخامت نهایی به صفر نرسید و لایهٔ چسبنده حتی بعد از رفع کامل چسبندگی ناپدید نشد، اما میزان آن به‌شدت کاهش یافت و به صورت بقایای لایهٔ چسبندهٔ اولیه در اطراف L3 دیده شد. چنین حالتی در یافته‌های حاصل از مطالعات مشابه در این زمینه نیز مشاهده شد که بعد از تیمار تخم‌های تاسماهی سفید، با محلول‌های مختلف بازدارنده، چسبندگی باقیماندهٔ آن در بخش خارجی تخم نمایان بوده است (Cherr and Clark, 1984).

بنابراین، می‌توان گفت رفع چسبندگی تخم‌های تاسماهی ایرانی با محلول آنزیم تریپسین موفقیت‌آمیز است و بهترین غلظت آنزیم برای این عمل ۶ IU/ml است. شست‌وشوی تخم‌ها با محلول ۶ IU/ml آنزیم تریپسین طی مدت زمان ۱۱ دقیقه به طور کامل

چسبندگی تخم‌ها را رفع می‌کند و منجر به بازماندگی جنینی برابر با ۸۹/۱ درصد می‌شود. این روشِ رفع چسبندگی از نظر بیولوژیک قابلیت جانشینی روش گل‌شویی را داراست.

تقدیر و تشکر

در پایان، از مسئولان مجتمع تکثیر ماهیان خاویاری شهید بهشتی و ادارهٔ کل شیلات استان گیلان، به ویژه آقای مهندس طلوعی، برای همکاری در اجرای این تحقیق و همچنین از دانشگاه تربیت‌مدرس برای برعهده‌گرفتن هزینه‌های این کار قدردانی و تشکر می‌کنیم.

References

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

[2]. Ardekani, M., 1388. Ecology. Tehran University Publication. 340 p.

[3]. Billard, R., Cosson, J., Perchec, G., Linhart, O., 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. Aquaculture 129, 95–112.

[4]. Busacker, G.P., Adelman, I.R., Goolish, E.M., 1990. Growth Institute: Schereck, C.B., Moyle, R.B. (Eds.), Methods for Fish Biology. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA, pp. 684.

[5]. Cherr, G.N., Clark, W.H., Jr., 1984. Jelly release in the eggs of the white sturgeon, Acipenser transmontanus. An enzymatically mediated event. Journal of Experimental Zoology 230, 145-149.

[6]. 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.

[7]. Doroshov, S.I., Clark, W.H., Jr., Lutes, P.B., Swallow, R.L., Beer, K.E., McGuire, A.B., Cochran, M.D., 1983. Artificial propagation of the white sturgeon, Acipenser transmontanus. Aquaculture 32, 93-104.

[8]. Khan, H.A., Gupta, S.D., Reddy, P.V.G., Sahoo, S.K., 1986. Use of milk, urea, sodium sulphite and human urine for degumming fertilized eggs of common carp, Cyprinus carpio L. Aquaculture Hungarica. (Szarvas) 5, 47–54.

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

[10]. 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.

[11]. Linhart, O., Štěch, L., Švarc, J., Rodina, M., Audebert, J.P., Grecu, J., Billard, R., 2002. The culture of the European catfish, Silurus glanis L. in Czech Republic and in France. Aquatic Living Resources. 15, 139–144.

[12]. 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.

[13]. Mansour, N. Lahnsteiner, F. Patzner, R.A., 2009. Physiological and biochemical investigations on egg stickiness in common carp. Animal Reproduction Science 114, 256–268.

[14]. 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.

[15]. Noori A., Mojazi Amiri, B., Mirvaghefi, A., Baker, D.W., 2010. LHRHa Induced-ovulation of the endangered Caspian brown trout (Salmo trutta caspius) and its effect on egg quality and two sex steroids: testosterone and 17α-hydroxyprogesterone. Aquaculture Research 41, 871-877.

[16]. Riehl, R., Patzner R.A., Glechner R., 1993a. The eggs of native fishes. 2. Chalcalburnus chalcoides mento (Agassiz, 1832).Österreich Fisheries. 46, 138-140.

[17]. Riehl, R., Patzner, R.A., 1998. Minireview: the modes of egg attachment in teleost fishes. Italian Journal of Zoology 65, 415- 420.

[18]. Sakowics, S., 1928. Pikeperch (Lucioperca sandra Cuv.). Przeglad Rybacki 6, 175-188. (in Polish).