



## مروری بر روش های نوین در رفع چسبندگی تخم های لقاح یافته ماهیان

بی تا کلوانی نیتلی<sup>۱\*</sup>، محمدرضا کلباسی<sup>۱</sup>، باقر مجازی امیری<sup>۲</sup>، احمد نوری<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup>گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی و منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس

<sup>۲</sup>گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران

<sup>۳</sup>گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی و جوی، دانشگاه هرمزگان

### چکیده

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۲/۰۲/۰۴

اصلاح: ۹۲/۰۵/۰۸

پذیرش: ۹۲/۰۵/۲۰

تخم های بسیاری از ماهیان آب شیرین بعد از فعال سازی و تماس با آب حالت چسبنده پیدا می کنند که علت آن وجود مولکول های گلیکوپروتئینی در بخش خارجی آنهاست. در تاسماهیان چهارمین لایه تخم (jelly coat) بعد تماس با آب ترشح شده و موجب بروز چسبندگی می شود. در ماهیان استخوانی این امر توسط لایه زونارادیاتای خارجی صورت می گیرد. چسبندگی تخم ها در تخم ریزی طبیعی یا شرایط کنترل شده بر بسترهای مخصوص دارای اهمیت است، چرا که به مولدین فرصت استقرار تخم ها در مکان هایی با مناسب ترین شرایط محیطی را داده و از جابجایی تخم ها توسط آب جلوگیری می کند. همچنین تخم ها می توانند توسط والدین محافظت شوند که حاصل آن افزایش بقای تخم هاست. اما چسبندگی تخم ها تحت شرایط تفریخگاهی مطلوب نبوده و انباشتگی تخم های متصل بهم منجر به تلفات در اثر آنوکسی و رشد قارچ ها می شود. بنابراین یکی از مراحل تکثیر مصنوعی این قبیل ماهیان رفع چسبندگی تخم ها پیش از انکوباسیون می باشد. روش های رفع چسبندگی را می توان به ۳ دسته فیزیکی، شیمیایی و آنزیمی تفکیک نمود. روش های فیزیکی شامل سایش تخم ها با موادی نظیر رس، پودر تالک و نشاسته می باشد. کاهش نرخ تفریخ و طولانی بودن پروسه از نکات منفی روش های فیزیکی می باشد. معمول ترین روش های شیمیایی استفاده از کاربامید، اسیدتانیک، پودر شیر و سولفیت سدیم می باشد. با توجه به ماهیت گلیکوپروتئینی لایه چسبنده، کاربرد آنزیم های پروتئاز برای رفع چسبندگی موثر بوده و منجر به نتایج بهتری از دیدگاه نرخ تفریخ و مدت زمان انجام کار می شود. برای انتخاب روش مناسب می بایست به میزان تفریخ یا نمو طبیعی جنینی، مدت زمان انجام کار و هزینه توجه داشت.

کلمات کلیدی:

چسبندگی تخم

رفع چسبندگی

پوشش ژلاتینی

گلیکوپروتئین

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: [bkalvani@gmail.com](mailto:bkalvani@gmail.com)

## مقدمه

تعدادی از ماهیان استخوانی و غضروفی- استخوانی تخم ها را در یک بستر مستقر می کنند. تعدادی از گونه های پرورشی از این دست ماهیان می باشند. این عمل به ماهیان والد فرصت می دهد تا تخم ها را در بهترین مکان ممکن با مناسب ترین شرایط محیطی مستقر کنند. به علاوه این امر از جابجایی تخم ها توسط جریان آب یا امواج جلوگیری می کند. مزیت دیگر اتصال تخم ها، استقرار آنها در کلونی های لانه مانند است. با جایگیری در مکان های نسبتاً محافظت شده، تخم ها می توانند توسط والدین محافظت شوند که این امر امکان بقای آنها را به شدت افزایش می دهد (Riehl and Patzner, 1998). از نظر اکولوژیک شروع سریع چسبندگی تخم ها یک مکانیسم مهم برای جلوگیری از دور شدن تخم ها از بستر مناسب برای تخم ریزی، قبل از اتصال آنها به این بسترها می باشد (Mansour et al., 2009).

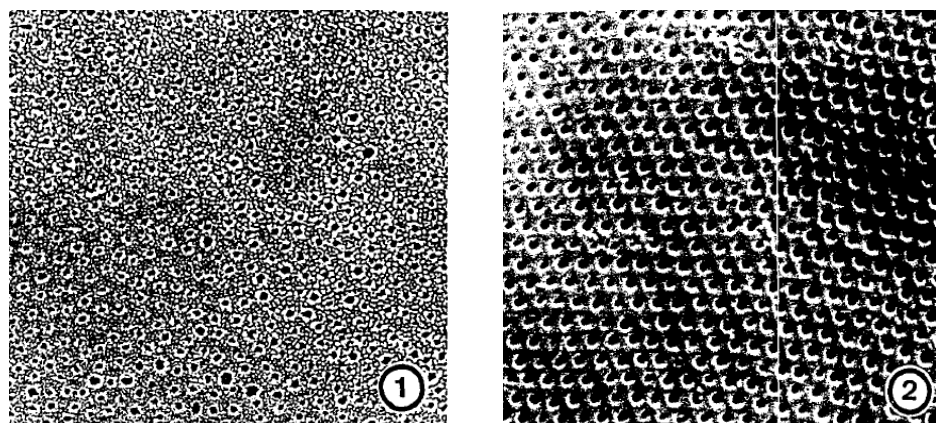
در برخی ماهیان همانند کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، گربه ماهی اروپایی (*Silurus glanis*) و یا سوف سفید (*Sander lucioperca*) کیفیت تکثیر مصنوعی با تعداد لارو به دست آمده سنجش می شود. این امر به ویژه به روشی که برای رفع چسبندگی تخم ها به کار رفته است بستگی دارد (Demska-Zake et al., 2005). کوریون چسبنده ای که در تخمهای این ماهیان ایجاد می شود امکان اتصال تخم ها به بسترهای مختلف را فراهم می آورد (Riehl and Patzner, 1998). چسبندگی تخم ها در تخم ریزی طبیعی ماهیان یا در شرایط کنترل شده بر بسترهای مخصوص (آشپانه ها) دارای اهمیت است. با این وجود، چسبندگی در شرایطی که تخم ها در ابزارهای انکوباسیون انکوبه می شوند مطلوب نیست به این دلیل که تخم ها به هم متصل شده و تولید توده ای جامد می کنند که تبادل گازی را با مشکل مواجه کرده و سبب رشد عوامل بیماریزا می شوند (Demska-Zake et al., 2005). روش های زیادی برای رفع چسبندگی تخم های ماهیان در آبی پروری به کار می رود: جداسازی مکانیکی تخم ها، سایش آنها با آب تمیز یا با مواد ساینده (رس، نشاسته، زغال چوب یا بتونیت) یا تیمار آنها با مواد شیمیایی، محلول کاربامید و نمک، اسیدتانیک و آنزیم. مؤثرترین این روش ها برای تخم های گونه های کپور ماهیان به ویژه کپور معمولی وجود دارد و علت این است که تکثیر مصنوعی این گونه از سال ۱۹۵۰ در حال انجام است. برای دیگر گونه ها خصوصاً آنهایی که بیوتکنیک تکثیر مصنوعی آنها طی چند سال اخیر ایجاد شده است، روش بهینه رفع چسبندگی هنوز در حال مطالعه می باشد (Demska-Zake et al., 2005).

این مقاله به طور جداگانه به تشریح ساختار دیواره تخم‌ها در ماهیان استخوانی و ماهیان خاویاری و علل چسبندگی تخم‌ها در هر گروه پرداخته سپس مروری بر متداول‌ترین روش‌های رفع چسبندگی به کار رفته در ماهیان به ویژه جدیدترین روش که کاربرد آنزیم می‌باشد خواهد داشت.

### حالت‌های مختلف اتصال تخم‌ها به بستر در محیط طبیعی

#### وجود لایه چسبنده

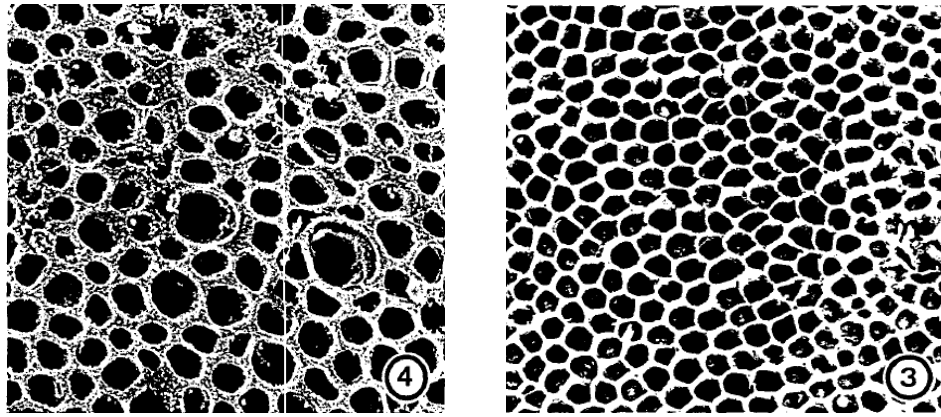
معمول‌ترین مکانیسم اتصال تخم‌های ماهیان استخوانی به بستر توسط لایه‌ای صورت می‌گیرد که عاری از رشته‌ها و کرک‌های چسبنده می‌باشد. این لایه صاف و هموار در تخم‌های ماهیانی چون اردک ماهی *Esox lucius*, *E. masquinongy* باربوت *Lota lota* (شکل ۱)، تعدادی از کپورماهیان (شکل ۲) و ماهی قنات *Phoxinus phoxinus* یافت شده است.



شکل ۱ و ۲. لایه چسبنده در تخم‌های ماهی باربوت (۱) و کپورماهیان (۲) (Riehl and Patzner, 1998).

#### سطوح کندویی

تخم‌های ماهی *Zingel streber* (شکل ۳)، ماهی *Zingel zingel*، سوف رومانیایی *Romanichthys valsanicola* (شکل ۴) و سوف سربرگ *Gymnocephalus cernua* دارای چنین حالتی می‌باشند. سطح تخم‌های این ماهیان دارای ساختار شبیه کندوی عسل است که در کل سطح تخم مشاهده می‌شود. قطر دندانه‌ها در این ساختار بسته به گونه متغیر است. این ساختار حالت چسبنده نیز دارد که موجب اتصال به بستر می‌شود.

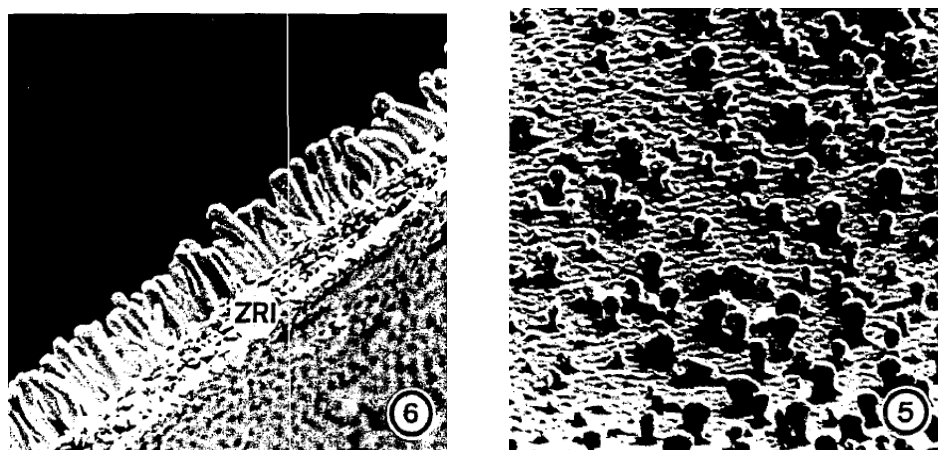


شکل ۳ و ۴. سطوح کندویی در تخم های ماهی *Zingel streber* (۳) و *Romanichthys valsanicola* (۴)

(Riehl and Patzner, 1998)

### زوائد کرکی

یکی از سازگاری های ایجاد شده در زونارادیاتای خارجی کرک ها یا زوائد اتصال هستند که حالت چسبندگی نیز دارند. این زوائد در کل سطح خارجی تخم گسترش دارند. این ساختار در بعضی از گونه های کپورماهیان دیده شده است که البته از نظر طول و تراکم متغیر می باشند. تخم های ماهی قنات سرمخروطی *Leuciscus leuciscus* حاوی تعداد کمی کرک کوتاه هستند. حدود ۵ میکرون طول و ۶ میکرون از هم فاصله دارند. این کرک ها در لای ماهی *Tinca tinca* ۴ میکرون (شکل ۵) و در کولمه *Rutilus rutilus* ۱۱/۵ میکرون و نزدیک به هم می باشند. این ساختار همچنین در ماهی خیاطه و *Alburnoides bipunctatus* (شکل ۶) و کپور کفزی *Gobio gobio* مشاهده شده اند.

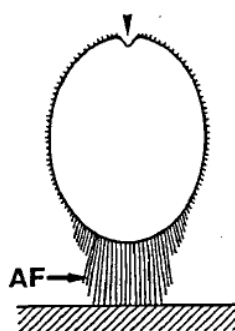


شکل ۵ و ۶. برآمدگی های کرکی دور تخم ها در لای ماهی (۵) و خیاطه (۶) (Riehl and Patzner, 1998)

## رشته های اتصال

ساختار دیگر زونارادیاتای خارجی، رشته های اتصال هستند که در گونه های زیادی از خانواده های متعدد یافت شده اند (Cichlidae, Gobiidae, Clariidae, Blenniidae...). رشته های اتصال بلندتر از کرک ها و تنها در قطب حیوانی یا نباتی

تخم ها مستقر می باشند (شکل ۷).



شکل ۷. رشته های اتصال (Riehl and Patzner, 1998).

## چسبندگی توسط لایه ژلاتینی

ماهیانی وجود دارند که از زونارادیاتای خارجی برای اتصال تخم ها استفاده نمی کنند. یکی از این ماهیان، ماهی سوف *Perca fluviatilis* می باشد. اطراف تخم های این ماهیان وجود لایه ژلاتینی مشهود است. تخم های این ماهیان به صورت رشته ای و به دنبال هم به گیاهان آبی متصل می گردند.

## چسبندگی توسط اپی تلیوم موکو- فولیکولار

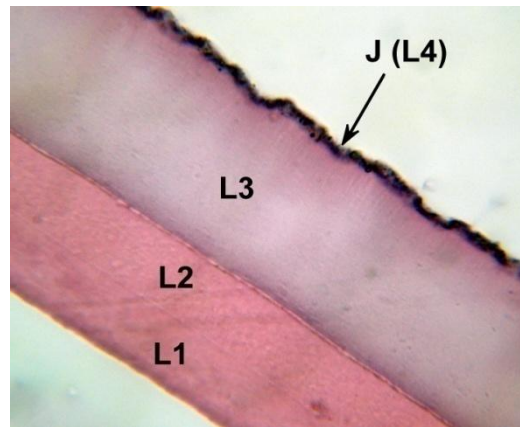
در گربه ماهی اروپایی طی اوژنز موکوس زیادی در اپی تلیوم ترشح می شود. بعد از تخم ریزی این موکوس آزاد شده و موجب چسبندگی تخم به بستر می گردد (Riehl and Patzner, 1998).

## لایه های اطراف تخم و علل چسبندگی

## ساختار لایه های اطراف تخم در ماهیان خاویاری

پژوهشگران با بررسی تخم های ماهیان خاویاری دریافته اند که پوشش تخم ماهی خاویاری سفید (*Acipenser transmontanus*) دارای ضخامتی ۵۰ میکرونی بوده و شامل ۴ لایه مجزا می باشد (شکل ۸). خارجی ترین لایه، لایه ژلاتینی است که اطراف تخم را در بر گرفته و تا منافذ لایه زیرین خود یعنی لایه سوم ( $L_3$ ) امتداد دارد. لایه سوم از طریق ساختارهای الیافی ماریپیچی غیرسلولی که از لایه دوم ( $L_2$ ) منشعب می شود متصل است. درونی ترین لایه ( $L_1$ ) بدون

واسطه غشای پلاسمای تخم را احاطه کرده است (Cherr and Clark, 1982). در منابع روسی تخم های تاسماهیان ۳ لایه قلمداد می شوند. به این علت که لایه چهارم پوشش چسبنده ایست که تا زمانی که تخم فعالیت خود را آغاز نکند ترشح نمی شود. بنابراین روس ها لایه ۴ را بخشی از پوشش تخم تلقی نمی کنند (Conte et al., 1988).



شکل ۸. ساختار لایه های اطراف تخم در ماهی قره برون *Acipenser persicus* (کلوانی و همکاران، ۱۳۹۲)

### چسبندگی تخم در ماهیان خاویاری

لایه چهارم و خارجی ترین لایه از لایه های اطراف تخم ماهیان خاویاری، یک لایه ژلاتینی غیرمحلول در آب بوده که از نظر ریخت شناسی یک پوشش کرکی شکل و به طور متراکم دارای بار الکتریکی است. عملکردهای متفاوتی از قبیل آغاز فعالیت های اکروزومی و نیز چسبندگی تخم ها به این لایه ژلاتینی نسبت داده می شود. قبل از تماس با آب پوشش ژلاتینی به طور متراکم دارای بار الکتریکی است و درون مجراهای لایه سوم وجود دارد. بعد از مواجهه با آب شیرین، مجراهای لایه سوم منبسط شده و ژلاتین آزاد و هیدراته می شود. این عمل حالت چسبندگی در دیواره تخم ایجاد می کند که موجب اتصال تخم ها به بستر می شود. هم زمان با آزاد شدن ژلاتین، کاهش تراکم الکترون در لایه سوم مشاهده می شود. آنالیز پوشش ژلاتینی تخم ماهی خاویاری سفید نشان می دهد که این لایه حاوی ۸۸/۱٪ پروتئین و ۱۱/۹٪ کربوهیدرات بوده که ترکیبات کربوهیدراته آن شامل ۹۶٪ هگروز و ۴٪ سیالیک اسید می باشد. در آزمایشات الکتروفورز این لایه با هدف شناسایی پروتئین یک باند در بخش وزن مولکولی ۱۱۰ کیلودالتون تشکیل شد. هنگامی که این عمل با هدف شناسایی کربوهیدرات صورت گرفت مجدداً در بخش ۱۱۰ کیلودالتون همان باند مشاهده گشت. این امر نشان می دهد که در لایه ژلاتینی، کربوهیدرات و پروتئین به هم پیوسته بوده و به صورت گلیکوپروتئین می باشند. به نظر می رسد یک پروتئاز مشابه تریپسین مسئول

آزادسازی پوشش ژلاتینی است و همین پوشش است که عامل چسبندگی تخم ماهیان خاویاری می باشد (Cherr and Clark, 1984).

### ساختار لایه های اطراف تخم در ماهیان استخوانی

در قسمت خارجی، تخم ماهیان استخوانی به غشایی بسیار نازک به نام اوولما و پوششی با قطر متغیر محدود می شود. این پوشش (زونارادیاتای) در ماهیان استخوانی معمولاً ۲ لایه است: زونارادیاتای داخلی (*Zona radiata Interna*) و زونارادیاتای خارجی (*Zona radiata Externa*). ترکیب شیمیایی زونارادیاتای داخلی عمدتاً پروتئینی است. موکوپلی ساکاریدهای خنثی و اسیدی ترکیبات عمده زونارادیاتای خارجی می باشند. زونارادیاتای دارای عملکردهای متفاوت است. عملکرد اصلی آن حفاظت از جنین است که توسط زونارادیاتای داخلی صورت می گیرد. عملکرد مهم دیگر اتصال تخم ها به یک بستر است که عمدتاً توسط زونارادیاتای خارجی و به واسطه چسبندگی ایجاد شده انجام می شود (Riehl and Patzner, 1998).

### چسبندگی تخم در ماهیان استخوانی

چسبندگی تخم ها چند ثانیه بعد از تماس با آب ایجاد می شود. مطالعات بر روی تخم های کپور معمولی، لای ماهی، سرمخروطی و شاه کولی نشان داده است که پروتئین های خاصی در مایع تخمدانی کنترل کننده (بازدارنده) ایجاد چسبندگی تخم ها می باشند. بنابراین چسبندگی تا هنگامی که تخم ها در مایع تخمدانی نگه داری شوند رخ نمی دهد. هنگامی که پروتئین های مایع تخمدانی به هر طریقی (مثلاً در اثر حرارت) از مایع جدا شوند در عرض چند ثانیه تخم ها چسبیده خواهند شد، درست همان حالتی که هنگام تماس تخم ها با آب رخ می دهد. این پروتئین ها اختصاصی می باشند، زیرا مایع تخمدانی آزاد ماهیان در غلظت مشابه پروتئین، مانع از بروز چسبندگی تخم ها نمی شود (Mansour *et al.*, 2009).

از نظر بیوشیمیایی، زونارادیاتای خارجی متشکل از ۹ نوع پروتئین است که ۴ نوع آنها گلیکوپروتئین می باشد. پروتئین های یکسانی که در تخم های چسبیده و غیرچسبیده شناسایی شدند نشان می دهد که پروتئین ها طی شروع چسبندگی تغییری نمی کنند. در کنار پروتئین ها، زونارادیاتای خارجی حاوی انواع مختلفی از کربوهیدرات ها مانند گلوکز، فروکتوز، گالاکتوز و یورنیک اسید می باشد. تیمار غشای تخم با آمیلوگلوکزیداز اثری بر چسبندگی تخم ها ندارد در صورتی که تیمار تخم ها با پروتئاز کاملاً چسبندگی را کاهش می دهد. از این نتایج می توان دریافت که نه کربوهیدرات های آزاد، بلکه گلیکوپروتئین ها مولکول های عامل چسبندگی تخم می باشند (Mansour *et al.*, 2009).

همچنین مشخص شده است که چسبندگی تخم ارتباطی با pH آب (در محدوده ۹-۶)، دمای آب (در محدوده ۳۰-۴ درجه سانتی گراد)، یون های دو ظرفیتی در غلظت کمتر از  $20 \text{ mmol.l}^{-1}$  و کلرید سدیم در غلظت کمتر از  $50 \text{ mmol.l}^{-1}$  ندارد. این امر نشان می دهد که احتمالاً شروع چسبندگی تخم ها مستقل از عوامل غیرزنده زیست محیطی است. از میان عوامل غیرآلی تست شده، تنها کلرید سدیم در اسمولالیتیه بالا (بیش از  $300 \text{ mmol.l}^{-1}$  برابر با  $300 \text{ mosmol.kg}^{-1}$ ) قادر است به طور کامل از پروسه چسبندگی تخم ها جلوگیری کند. از آنجا که اسمولالیتیه مایع تخمدانی کپورماهیان در حدود  $100-150 \text{ mosmol/kg}$  و غلظت یون سدیم در حدود  $100-120 \text{ mmol/l}$  می باشد، مکانیسم چسبندگی نمی تواند فقط تحت تأثیر اسمولالیتیه در شرایط *In vivo* باشد و عوامل دیگری باید در جلوگیری از چسبندگی تخم ها دخیل باشند. در این میان یون های کلسیم و منیزیم نیز بی تأثیرند، هرچند کلسیم در فعال سازی تخم خصوصاً در آزادسازی وزیکول های کورتیکال و استحکام زونارادیاتا نقش مؤثری دارند. چسبندگی تخم یک پروسه بیولوژیکی مولکولی می باشد که ترکیبات زونارادیاتا مسئول آن هستند (Mansour *et al.*, 2009).

ساختار لایه پوششی تخم از لحاظ ریخت شناسی بین گونه ها متفاوت است (Riehl *et al.*, 1993). تخم های شاه کولی به واسطه یک لایه صاف چسبندگی دارد در حالیکه در ماهی سرمخروطی و سیاه کولی سطح تخم ها به طور سراسری با میکروپرزهایی پوشیده شده است که مسئول چسبندگی می باشند (Riehl and Patzner, 1998). تفاوت های ساختاری می تواند به تخم ها این امکان را بدهد که به بسترهای خاص متصل شوند (Mansour *et al.*, 2009).

### انواع روش های رفع چسبندگی

تخم های بسیاری از ماهیان پرورشی مانند کپور معمولی، گربه ماهی اروپایی، ماهی سفید، ماهیان خاویاری و ... بعد تماس با آب حالت چسبندگی پیدا می کنند که این حالت در شرایط طبیعی به دلایل ذکر شده از جمله استقرار تخم ها در بستر مفید می باشد. اما چنین امری تحت شرایط تفریخگاهی مطلوب نبوده و انباشتگی تخم های متصل به هم منجر به مرگ و میر و تلفات زیادی در اثر آنوکسی و نیز رشد قارچ ها می شود (Kowtal *et al.*, 1986). بنابراین یکی از مراحل تکثیر مصنوعی این قبیل ماهیان رفع چسبندگی تخم ها پیش از ورود به انکوباسیون می باشد. رفع چسبندگی تخم ها برای تکثیر مصنوعی کنترل شده گونه های فیتوفیلیک در آبی پروری در آب شیرین یک عمل بحرانیست (Linhart *et al.*, 2000).

انواع روش های به کار رفته در مورد رفع چسبندگی را می توان به طور عمده به ۳ دسته تقسیم نمود:

۱- فیزیکی (شامل استفاده از ذرات رس، پودر تالک، نشاسته و ...)

۲- شیمیایی (شامل استفاده از محلول‌ها مانند اسیدتانیک، کاربامید، شیر، سولفیت سدیم و ...)

۳- آنزیمی (کاربرد آنزیم‌های پروتئاز نظیر تریپسین،  $\alpha$ -کیموتریپسین، آلکالاز و ...)

## روش‌های فیزیکی

### ذرات رس

استفاده از سوسپانسیون رس (گل شویی) از قدیمی‌ترین روش‌های رفع چسبندگی می‌باشد. Sakowics در سال ۱۹۲۸ از آن برای رفع چسبندگی تخم‌های ماهی سوف *Sander vitreus* استفاده نمود. امروزه نیز این روش خصوصاً در مورد ماهیان خاویاری (به دو صورت دستی و مکانیکی) انجام می‌شود (کیوان ۱۳۸۲). Monaco و Doroshov در سال ۱۹۸۳ اثرات گل‌شویی تخم‌های تاسماهی سفید با دو روش گل‌شویی دستی و گل‌شویی مکانیکی را از نظر رشد و نمو و بقای جنین با هم مقایسه کردند و مشاهده شد که لقاح همراه با گل‌شویی مکانیکی منجر به کاهش چشمگیری در بقای جنین در مقایسه با گل‌شویی دستی شد (Monaco and Doroshov, 1983). استفاده از ذرات رس برای رفع چسبندگی برای تخم‌های لقاح یافته ماهیان خاویاری سفید *Acipenser transmontanus* (Doroshov et al., 1983) و استرلیاد *A. ruthenus* (Williot et al., 2005) و همچنین قره‌برون *Acipenser persicus* (Amini et al., 2012) انجام شده است، ضمن اینکه در تفریخگاه‌های ماهیان خاویاری در ایران نیز اکثراً همین روش به کار می‌رود. روش کار معمولاً شامل به هم زدن تخم‌های لقاح یافته به مدت نسبتاً طولانی در مخلوط آب و ذرات رس می‌باشد.

استفاده از مخلوط رس برای رفع چسبندگی تخم‌ها خالی از اشکال نبوده و طبق گزارش Monaco و Doroshov در سال ۱۹۸۳ این عمل به صورت دستی و طی چندین دقیقه صورت می‌گیرد که در نتیجه مستلزم دستکاری شدید و طولانی مدت تخم‌ها می‌باشد. همچنین در بسیاری از مطالعاتی که با هدف مقایسه روش گل‌شویی با سایر روش‌های رفع چسبندگی صورت گرفت، نتایج حاصل از شستشوی تخم‌ها با گل رس از نظر درصد تفریخ، زمان لازم برای انجام کار و غیره نسبتاً ضعیف‌تر از روش‌های دیگر ظاهر شدند (Kowtal et al., 1986; Linhart et al., 2000; Linhart et al., 2003). اثرگذاری کم و سختی کار برای این روش، منجر به آزمودن مواد شیمیایی مختلف برای رفع چسبندگی تخم‌های لقاح یافته شده است (Demska-Zakes et al., 2005).

### پودر تالک

استفاده از پودر تالک به اندازه ذرات رس گسترده نبوده است. از موارد استفاده از این ماده برای رفع چسبندگی تخم های لقاح یافته می توان به کاربرد آن برای رفع چسبندگی تخم های سوف سفید *Sander lucioperca* اشاره کرد. شستشوی تخم ها در محلول نمک و پودر تالک (۲۵ گرم نمک و ۱۰۰ گرم تالک در ۱۰ لیتر آب) در مدت ۴۵-۵۵ دقیقه چسبندگی تخم ها را رفع نمود. در سنجش تعداد لاروهای حاصل شده به منظور دریافت تأثیر این فرایند، مشخص شد که این رقم حدود ۶۰٪ بوده است (Schlumpberger and Schmidt, 1980).

### روش های شیمیایی

#### اسید تانیک

اسید تانیک یک ماده طبیعی است که از شیر گیاهی به دست می آید (Haslam, 1966). این ماده قادر است چسبندگی تخم های ماهیان را برطرف کند. Waltemyer در سال ۱۹۷۶ اسید تانیک را برای رفع چسبندگی تخم های ماهی سوف *Sander vitreus* به کار برد. همچنین این ماده برای رفع چسبندگی تخم های باریوس حمیری *Barbus lutes* مورد استفاده قرار گرفت. به این صورت که بعد از لقاح، محلول ۰/۳٪ نمک به نسبت ۱۰۰ ml محلول نمک به ازای ۱ کیلوگرم تخم به آنها افزوده شد. بعد از ۲ دقیقه به هم زدن، تخم ها آبکشی شده و به مدت ۱۵ ثانیه وارد محلول اسید تانیک با غلظت  $1 \text{ g.l}^{-1}$  می شوند. این عمل چسبندگی تخم ها را برطرف می کند. بعد از این مدت تخم ها را با آب تفریخگاه شسته و وارد انکوباتور می کنند (Al Hazzaa and Hussein, 2003). Demska-Zakes و همکاران در سال ۲۰۰۵ سه غلظت مختلف اسید تانیک را در سه زمان متفاوت به منظور اطلاع از غلظت و زمان بهینه برای رفع چسبندگی تخم های ماهی سوف سفید *Sander lucioperca* مورد آزمایش قرار دادند. تخم های لقاح یافته سوف سفید بعد شستشو با آب، به مدت ۰/۵، ۲ و ۵ دقیقه در معرض اسید تانیک با غلظت های  $500 \text{ mg.l}^{-1}$ ،  $1000$  و  $1500$  قرار گرفتند و مشاهده شد که بهترین نتیجه در غلظت  $500 \text{ mg.l}^{-1}$  در زمان ۵ دقیقه و  $1000 \text{ mg.l}^{-1}$  در زمان ۲ و نیز ۵ دقیقه حاصل شد. آبکشی تخم های ماهی بنی (*Barbus sharpeyi*) با محلول ۵ درصد اسید تانیک به مدت ۲۰ ثانیه، بعد از شستشوی نیم ساعته آنها با آب کارگاه موجب رفع چسبندگی تخم های لقاح یافته گونه مذکور می شود (Kalbassi et al., 2013).

در استفاده از اسید تانیک برای رفع چسبندگی تخم ها باید محتاط بود. دیده شده است که استفاده از غلظت بسیار زیاد اسید تانیک به منظور رفع چسبندگی منجر به تلفات زیادی در مرحله آخر انکوباسیون می شود. همچنین بسیار محتمل است که اسید تانیکی که در داروهای مورد استفاده انسان به شکل پوشش مخاطی به کار رفته و مواد سمی را به هم متصل می کند

سبب سخت شدن کوریون شده و احتمالاً فعالیت کوریوناز را کاهش دهد (Demska-Zakes et al., 2005). مطالعه انجام شده توسط Krise و همکاران در سال ۱۹۸۶ نیز نشان داد که اسید تانیک می‌تواند اثر زیان بخشی بر روند تفریح لاروها داشته باشد. هم چنین لازم به ذکر است که غلظت های بالاتر از  $25 \text{ mg.l}^{-1}$  اسید تانیک می‌تواند مانع تحرک اسپرماتوزوآ شود. چنان که Waltemyer در سال ۱۹۷۵ در مطالعاتی بر روی *Sander vitreus* به دست آورد (Demska-Zakes et al., 2005).

### محلول کاربامید

کاربامید از جمله مواد شیمیایی است که قادر است چسبندگی را رفع کند. Woynarovich در سال ۱۹۶۲ پروسه لقاح مصنوعی و انکوباسیون تخم های کپور معمولی را انجام داد. این پروسه شامل تیمار تخم های لقاح یافته در محلول های مختلف از جمله محلول اوره و نمک بود. به هم زدن تخم ها به مدت  $1/5$  ساعت در محلول حاوی ۴ گرم نمک و ۳ گرم اوره در ۱ لیتر آب چسبندگی تخم ها را به طور کامل برطرف نمود (Woynarovich, 1962). این تکنیک بعدها ارتقاء یافت، با استفاده از محلول دوم شامل ۴ گرم نمک و ۲۰ گرم اوره در ۱ لیتر آب مدت زمان لازم برای رفع چسبندگی کاهش پیدا کرد (Woynarovich and Woynarovich 1980). محلول اوره و نمک در فرایند تکثیر ماهیان خاویاری نیز به کار رفته است. در ماهی خاویاری سفید *Acipenser transmontanus* تخم های لقاح یافته ۲ بار با آب شیرین آبکشی شده و بعد در محلول اوره و نمک قرار گرفتند (۳٪ نمک و ۴٪ اوره) و ظرف ۱۰ - ۵ دقیقه چسبندگی تخم ها برطرف شد. به دنبال این عمل، شستشوی تخم ها با محلول ۱٪ اسید تانیک به مدت ۱ دقیقه مورد نیاز است. در صورت عدم استفاده از اسید تانیک تخم ها بعد از ۲۰ - ۱۵ دقیقه مجدداً چسبنده شده و نیاز به تیمار دیگری خواهند داشت. روش استفاده از محلول اوره و نمک به صورت یاد شده این پتانسیل را داراست که در تکثیر مصنوعی ماهیان خاویاری جایگزین گل شویی شود. این روش نسبت به روش گل شویی نیازمند کار دستی کمتری بوده و منجر به افزایش درصد تفریح می‌شود (Kowtal et al., 1986). در تکثیر ماهی باربوس حمری *Barbus lutes* برای رفع چسبندگی تخم های لقاح یافته می‌توان از محلول اوره و نمک (۴ گرم نمک و ۳ گرم اوره در ۱ لیتر آب) استفاده کرد و به درصد تفریحی مشابه با روش های دیگر (اسید تانیک، شیر و ...) دست یافت. استفاده از تانیک اسید در رفع چسبندگی تخم های باربوس حمری منجر به کسب بهترین نتیجه از لحاظ زمان لازم برای انجام کار و همچنین هزینه مواد می‌شود (Al Hazzaa and Hussein, 2003).

پودر شیر

در دهه های گذشته از پودر شیر برای رفع چسبندگی تخم های لقاح یافته برخی ماهیان استفاده شده است. Soim در سال ۱۹۷۶ شیر را به منظور رفع چسبندگی تخم کپور معمولی به کار برد. Khan و همکاران در سال ۱۹۸۶ گزارش کردند  $1 \text{ gr.l}^{-1}$  ۲۵-۲۰ پودر شیر پرچرب در حذف چسبندگی تخم ها بسیار موثر بوده و بهترین نتیجه را برحسب درصد لقاح و تفریح در مقایسه با روشهای Woynarovich ارائه می دهد. تفریخگاه های اصلی در اروپای مرکزی در حال حاضر برای تولید ۱۰۰-۲۰۰ میلیون نوزاد کیسه زرده دار این روش را به کار می برند. ۲-۳ دقیقه بعد از لقاح، تخم ها در انکوباتورهای زوج به همراه شیر ریخته شده و محتویات از طریق تزریق حباب های هوا به مدت ۶۰ دقیقه مخلوط می شوند. سپس با برقراری جریان ورودی طی مدت زمان ۱۰ دقیقه شیر از سیستم خارج می شود (Billard et al., 1995). مزارع تکثیر کپور در جمهوری چک از پودر شیر حاوی ۲۷/۲٪ چربی، ۲۶/۶ گرم آلبومین، ۳۷/۲ گرم قند شیر، ۵/۸ گرم یون ها، ۰/۲ گرم لسیتین و ۳ گرم آب در هر ۱۰۰ گرم پودر شیر، در ۱ لیتر آب شهری کلرزدایی شده یا آب تمیز تفریخگاه برای رفع چسبندگی تخم های لقاح یافته استفاده می کنند. محلول شیر به آرامی همراه با به هم زدن مداوم به میزان ۱ لیتر به ازای ۱ کیلوگرم تخم اضافه می شود. اغلب ۱۵ دقیقه بعد از فعالسازی زمانی که تخم ها متورم شده اند مابقی شیر به آرامی افزوده می شود. در صورتی که میزان محلول شیر افزوده شده زیاد باشد عمل رفع چسبندگی موفقیت آمیز نخواهد بود. فرایند جذب آب ۶۰ دقیقه به طول می انجامد و سپس در مدت زمان ۱۰ دقیقه آب تفریخگاه تدریجا جایگزین شیر شده و سپس تخم ها به انکوباتور منتقل می شود (Linhart et al., 2003).

تلفیقی از کاربرد پودر شیر و رس، یک روش سنتی برای رفع چسبندگی تخم های لقاح یافته لای ماهی *Tinca tinca* می باشد. تخم های لقاح یافته ابتدا ۴۰ - ۳۰ دقیقه در محلول شیر به هم زده می شوند. سپس سوسپانسیون رس به تخم ها اضافه شده و بعد از ۱۰ دقیقه به هم خوردن تخم ها در این مخلوط، آنها را با آب تفریخگاه شستشو داده و به انکوباتور ها منتقل می کنند. رفع چسبندگی ۲ مرحله ای با محلول شیر و گل رس منجر به نتایج متناقض در مدت زمان لازم برای انکوباسیون و زمان تفریح می شود. این امر می تواند به دلیل اختلاف شرایط تکثیر و استفاده از رس باشد. سوسپانسیون رس معمولا با به هم زدن ذرات خاک رس در آب تفریخگاه و سپس صاف کردن آن و ته نشین شدن آماده می شود. بنابراین هم سبب ذرات و هم غلظت سوسپانسیون در دفعات و مناطق مختلف می تواند متفاوت باشد. اگر سوسپانسیون خیلی غلیظ باشد، سایش ذرات رس به دیواره تخم شدیدتر رخ می دهد که منجر به کاهش درصد تفریح می شود (Linhart and Billard, 1995).

به منظور استفاده از شیر در تکثیر باربوس حمیری ابتدا تخم‌های لقاح یافته با محلول نمک  $6 \text{ gr.l}^{-1}$ ، به مدت ۲ دقیقه شستشو داده شده و سپس ترکیبی از ۱۰ گرم پودر شیر پرچرب و ۱٫۲ گرم نمک در ۱ لیتر آب برای رفع چسبندگی تخم‌ها به کار رفت. تخم‌ها ۴۰ دقیقه در این محلول به هم زده شدند و طی این مدت هر گاه کدورت زیادی در محلول دیده شد آن را تعویض نمودند. در پایان تخم‌های غیرچسبنده را با آب شستشو داده و وارد انکوباتور کردند (Al Hazzaa and Hussein, 2003).

### سولفیت سدیم

این ترکیب شیمیایی ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) قادر است چسبندگی تخم‌ها را برطرف نماید. Kowtal و همکاران از این ماده برای رفع چسبندگی تخم‌های ماهی‌های خاویاری سفید استفاده کردند. تخم‌های این ماهی بعد از لقاح و شستشو با آب در معرض محلول ۱٫۵٪ سولفیت سدیم قرار گرفته و ظرف مدت ۱۰ - ۵ دقیقه چسبندگی تخم‌ها برطرف شد. متعاقباً شستشو با محلول ۰٫۱٪ اسید تانیک صورت گرفت تا مانع از بازگشت چسبندگی شود. این روش به طور موفقیت آمیزی در حذف چسبندگی تخم‌های ماهی‌های خاویاری سفید مؤثر بوده اما نسبت به روش‌های دیگر درصد کمتری از تکامل طبیعی تخم‌ها را به دنبال دارد. سولفیت سدیم در غلظت‌های بالاتر به طور موفقیت آمیزی برای رفع چسبندگی تخم‌های باربوس به کار رفته است. تخم‌های این ماهی بعد از لقاح و آبکشی با محلول ۰٫۴٪ نمک، به مدت ۵ دقیقه در معرض محلول ۱۵ گرم در لیتر سولفیت سدیم قرار گرفتند. بعد از این عمل شستشو با محلول اسید تانیک صورت گرفت (Al Hazzaa and Hussein, 2003).

### روش‌های آنزیمی

استفاده از آنزیم برای رفع چسبندگی تخم‌های ماهیان با هدف افزایش درصد تفریخ و به خصوص کاهش قابل توجه مدت زمان لازم برای رفع چسبندگی نسبت به روش‌های سنتی و شیمیایی صورت گرفت. با توجه به ماهیت گلیکوپروتئینی لایه چسبنده، آنزیم‌های پروتئاز (تریپسین، کیموتریپسین، آکالاز...) برای رفع چسبندگی تخم‌ها به کار گرفته شد. در سال ۱۹۸۴ محققان دریافتند که ترشح و هیدراته شدن لایه گلیکوپروتئینی تخمک ماهی خاویاری سفید - که مسئول ایجاد چسبندگی است - به نوعی پروتئاز شبه تریپسین وابسته بوده و در عین حال تحت تأثیر کیموتریپسین نمی‌باشد (Cherr and Clark, 1984). در تکثیر کپور معمولی نیز تلاش‌هایی برای رفع چسبندگی تخم‌ها با آنزیم‌های پروتئاز صورت گرفت. Linhart و همکاران در سال ۲۰۰۳ گزارش کردند که استفاده از آنزیم  $\alpha$ -کیموتریپسین در رفع چسبندگی تخم‌ها مؤثر بوده اما پاسخ موفقیت آمیز این آنزیم بسته به تفاوت شرایط محیطی، کیفیت آب و نژاد ماهی کپور متفاوت است.

این در حالیست که تیمار ۶۰ - ۴۵ ثانیه ای تخم های کپور با آنزیم آلکالاز حدود ۲۰ دقیقه بعد از فعال سازی تخم ها موفق عمل نموده و علاوه بر رفع کامل چسبندگی منجر به نرخ تفریخ ۸۷٪ - ۸۰٪ می شود. بنابراین آنزیم آلکالاز قادر است چسبندگی تخم های کپور معمولی را رفع نماید. نسبت اپتیمم تخم ها و محلول آنزیم به ترتیب ۲/۵: ۱ (۱ گرم تخم به ۲/۵ میلی لیتر محلول آنزیم) است که محلول آنزیم نیز با غلظت ۲ میلی لیتر آنزیم در ۱ لیتر آب به مدت ۲۰ دقیقه به کار می رود. در ادامه محلول ذکر شده را با محلول آنزیمی غلیظ تری (۲۵ میلی لیتر در لیتر) جایگزین می کنند و بعد از ۱ دقیقه تخم ها با آب شسته شده و وارد انکوباتور می گردند. نتایج نرخ تفریخ حاصل از رفع چسبندگی تخم ها با این روش مشابه روش شستشو با شیر می باشد اما با کاربرد آنزیم به جای روش های سنتی رفع چسبندگی (شیر و کاربامید) می توان مدت زمان لازم برای رفع چسبندگی را از ۷۰ دقیقه به ۲۱ دقیقه کاهش داد (Linhart et al., 2003).

آنزیم آلکالاز در تکثیر گربه ماهی اروپایی *Silurus glanis* به کار رفته است. ۳ دقیقه بعد از لقاح محلول آنزیمی به تخم ها اضافه می شود. از نظر حجمی، محلول و تخم ها به نسبت ۱:۱ با هم مخلوط شده و حدود ۳ دقیقه به هم زده می شوند. آماده سازی محلول آنزیمی نیز بدین صورت است که  $20 \text{ cm}^3$  آنزیم در  $980 \text{ ml}$  آب تفریخگاه رقیق شده و استفاده می شود. در گربه ماهی اروپایی استفاده از آنزیم برای رفع چسبندگی تخم ها منجر به نرخ تفریخ مشابه با روش های سنتی می شود اما مزیت کاربرد آنزیم، کاهش زمان دستکاری تخم ها می باشد که از ۳۰ دقیقه به ۳ دقیقه کاهش می یابد (Linhart et al., 2002, 2003).

در حال حاضر آنزیم آلکالاز به طور متداول در تفریخگاه های فرانسه و جمهوری چک استفاده می شود. استفاده از آنزیم برای گربه ماهی اروپایی و نیز لای ماهی موفقیت در تفریخ و نیز کاهش زمان دستکاری تخم ها را (از یک ساعت در روش شستشو با شیر و رس در لای ماهی و نیز رس تنها در گربه ماهی به چند دقیقه) به دنبال دارد (Linhart et al., 2003). در مورد لای ماهی غلظت و زمان مناسب کاربرد آنزیم آلکالاز  $10 \text{ ml.l}^{-1}$  در مدت ۲ دقیقه می باشد که دیده شده در این صورت نرخ تفریخ به ۸۸,۱٪ رسید. این در حالیست که در همین شرایط کاربرد روش سنتی شیر و گل رس به نرخ تفریخ ۳۰٪ انجامید، ضمن اینکه مدت زمان لازم برای رفع چسبندگی در روش سنتی حدود ۶۰ دقیقه و در روش آنزیمی ۲ دقیقه بوده است (Linhart et al., 2000).

از کارهای انجام شده در مورد کاربرد آنزیم در رفع چسبندگی می توان به بررسی اثر آنزیم تریپسین بر رفع چسبندگی تخم های قره برون اشاره کرد. در این تحقیق پس از تکثیر و لقاح مصنوعی تخم ها با متد Kowtal، تخم ها در معرض ۴ دوز

مختلف آنزیم (IU/ml) ۱، ۳، ۶، ۱۲) قرار داده شده و زمان رفع شدن چسبندگی و میزان بازماندگی جنینی بعد از ۶۰ ساعت انکوباسیون سنجش شد. در پایان این تحقیق مشخص شد که آنزیم تریپسین قادر به انحلال لایه ژلاتینی دور تخم ماهی قره برون بوده و کمترین زمان لازم برای رفع چسبندگی تخم ها در دوز های یاد شده ۶ دقیقه و مربوط به دوز IU/ml ۱۲ بود. بازماندگی جنینی در این دوز  $75/0 \pm 7/0$  درصد و در بیشترین میزان بازماندگی جنینی نیز  $86/9 \pm 2/0$  درصد در غلظت IU/ml ۶ حاصل شد که به طور معنی دار از سایر تیمارها بالاتر بوده است (کلوانی و همکاران، ۱۳۹۲).

### جمع بندی و نتیجه گیری

با توجه به مقایسه نتایج به دست آمده در آزمایشات مختلف انجام شده در زمینه رفع چسبندگی می توان در مورد روش بهینه رفع چسبندگی تخم ها برای هر گونه اظهار نظر نمود. در اکثر آزمایشات انجام شده، برای قضاوت در مورد مناسب بودن و قابل اجرا بودن روش های مختلف رفع چسبندگی عمدتاً فاکتورهای زمان، کمیت لاروهای تفریخ شده یا تخم های دارای رشد جنینی طبیعی و نیز هزینه مواد در نظر گرفته شده اند.

در مورد فاکتور زمان می توان اظهار کرد که چنانچه روشی بتواند مدت زمان لازم برای رفع چسبندگی را کاهش دهد از این نظر مناسب تر است. در روش های سنتی رفع چسبندگی تخم مانند گل شویی و استفاده از پودر شیر، مدت زمان طولانی انجام فرایند از نکات منفی این روش ها تلقی می شود. مزیت عمده کاربرد روش های آنزیمی، کاهش قابل توجه مدت زمان دستکاری تخم ها می باشد (Linhart et al., 2000; 2002; 2003).

کمیت لاروهای تولید شده یا تخم های دارای رشد و نمو جنینی طبیعی از فاکتورهای اصلی انتخاب روش رفع چسبندگی می باشد. به عنوان مثال سولفیت سدیم قادر است ظرف ۱۰-۸ دقیقه چسبندگی تخم های ماهی استرلیاد را برطرف نماید اما نمو طبیعی جنینی در تعداد بسیار کمی از این تخم ها مشاهده شد (Kowtal et al., 1986). در نهایت برای اجرای هر یک از روش های رفع چسبندگی در مقیاس وسیع باید به هزینه انجام کار نیز توجه داشت (Al Hazzaa and Hussein, 2003).

مقایسه روش شیمیایی (استفاده از پودر شیر) و روش آنزیمی (کاربرد آنزیم آلکالاز و  $\alpha$ -کیموتریپسین) در ماهی کپور معمولی نشان داد که زمان لازم برای انجام رفع کامل چسبندگی تخم ها در کاربرد پودر شیر ۷۰ دقیقه و در مورد آلکالاز تنها ۲۱ دقیقه می باشد. میزان تفریخ در کاربرد آلکالاز ۸۷-۸۰٪ و مشابه با کاربرد پودر شیر بوده است، در نتیجه درصد تفریخ در دو روش ذکر شده اختلاف معناداری نداشتند. در نتیجه مزیت استفاده از آنزیم آلکالاز در کپور معمولی کاهش زمان لازم برای فرایند

رفع چسبندگی می باشد. نتایج حاصل از کاربرد  $\alpha$ -کیموتریپسین از نظر نرخ تفریخ ضعیف تر از گروه کنترل بوده است (Linhart et al., 2003).

کاربرد آنزیم آلکالاز در رفع چسبندگی تخم های لای ماهی در شرایط تفریخگاه موجب افزایش قابل توجه نرخ تفریخ از ۳۰٪ در روش سنتی شستشو با شیر و سوسپانسیون رس به ۸۸٫۱٪ شد. ضمن اینکه مدت زمان انجام فرایند رفع چسبندگی از حدود ۶۰ دقیقه به ۲ دقیقه کاهش یافت. در مورد گربه ماهی اروپایی نیز استفاده از آنزیم آلکالاز به جای سوسپانسیون رس اگرچه در نتایج مربوط به نرخ تفریخ تفاوت معناداری ایجاد نکرد اما موجب کاهش قابل توجه زمان به ۳ دقیقه شد. بنابراین نتایج، استفاده گسترده تفریخگاه های اروپایی از آنزیم آلکالاز در رفع چسبندگی تخم های لای ماهی و گربه ماهی منطقی به نظر می رسد (Linhart et al., 2000; 2003).

در مورد باربوس، نتایج حاصل از ۴ روش شیمیایی متفاوت برای رفع چسبندگی تخم ها (اسید تانیک، نمک و کاربامید، پودر شیر و سولفیت سدیم) از نظر نرخ تفریخ تفاوت معناداری ایجاد نمود. درصد تفریخ در کلیه تیمارها مشابه و حداکثر ۵۸٪ مشاهده شد. این در حالی بود که درصد لقاح تخم ها در تیمارهای مختلف ۹۷٫۸ تا ۹۸٫۶ بوده است. از نظر مدت زمان مورد نیاز، استفاده از اسید تانیک کمترین و استفاده از محلول نمک و کاربامید بیشترین زمان را به خود اختصاص دادند. با توجه به موارد ذکر شده و یکسان بودن نتایج نرخ تفریخ در تمامی روش ها، روش شستشوی تخم ها با اسید تانیک از نظر زمان کوتاه تر و هزینه کمتر نسبت به سایر روش های یاد شده ارجحیت دارد (Al Hazzaa and Hussein, 2003). ضمن اینکه پیشنهاد می شود به منظور کاهش اختلاف بین درصد تخم های لقاح یافته و درصد تخم های تفریخ شده استفاده از آنزیم های پروتئاز امتحان شود.

در تکثیر ماهی خاویاری عمدتاً از روش گل شویی استفاده می شود. رفع چسبندگی تخم های ماهی خاویاری با سولفیت سدیم از نظر درصد تفریخ حتی در مقایسه با گروه کنترل چندان موفق نبوده است. کاربرد محلول اوره و نمک در عرض ۱۰-۸ دقیقه چسبندگی تخم ها را برطرف می کند در صورتی که زمان لازم برای رفع چسبندگی تخم ها با ذرات رس حداقل ۳۰ دقیقه می باشد. همچنین ۵۷٫۷٪ از تخم های تیمار شده با محلول اوره و نمک با موفقیت تفریخ شدند. این در حالیست که این میزان در تخم های حاصل از گل شویی ۳۲٫۵٪ بود (Kowtal et al., 1986). در مورد ماهیان خاویاری نیز بررسی بیشتر در مورد استفاده از روش های آنزیمی برای رفع چسبندگی تخم ها پیشنهاد می شود.

## منابع

کلوانی نیتلی، ب.، مجازی امیری، ب.، کلباسی، م.، نوری، ا. ۱۳۹۲. مطالعه تطبیقی اثر آنزیم تریپسین و روش متداول گل شویی در حذف لایه چسبنده تخم لقاح یافته تاسماهی ایرانی. نشریه شیلات مجله منابع طبیعی ایران، در حال چاپ.

کنت، ف.، دوروشف، س.، لوتس، پ.، استرنج، ه. ۱۹۸۸. دستورالعمل تکثیر مصنوعی تاس ماهی سفید و کاربرد آن برای دیگر تاس ماهیان آمریکای شمالی. ترجمه مهدی امانی و سید محمدرضا فاطمی ۱۳۷۸. مرکز انتشارات علمی دانشگاه آزاد اسلامی. ص. ۲۲۳.

کیوان، ا. ۱۳۸۲. ماهیان خاویاری ایران. انتشارات نقش مهر. ص ۴۰۰.

- 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.
- Amini, K., Siraj, S.S., Mojazi Amiri, B., Mirhashemi Rostami, S.A., Sharr, A., Hossienzade, H. 2012. Evaluation of LHRH-a acute release implantation on final maturation and spawning in not-fully matured broodstocks of Persian sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1897). Iranian Journal of Fisheries Sciences. 11(3): 440-459.
- Billard, R., Cosson, J., Perchec, G., Linhart, O. 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. Aquaculture. 129: 95-112.
- 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 (1):145-149.
- Cherr, G.N., Clark, W.H., Jr. 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.
- Donaldson, E.M. 1996. Manipulation of reproduction farmed fish. Animal Reproduction Science. 42: 381-392.
- 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.
- Foresti F. 2000. Biotechnology and fish culture. Hydrobiology. 420:45-47.
- Haslam E. 1966. Chemistry of Vegetable Tannins. Academic Press, London, UK. pp.179.
- 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(2): 357-377.
- 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. Aquacultura Hung. (Szarvas).5: 47-54.
- 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.
- Krise, W.F., Bulkowski-Cummings, L., Shellman, D.A., Kraus, K.A., Gould, R.W. 1986. Increased walleye egg hatch and larval survival after protease treatment of eggs. The Progressive Fish-Culturist. 48: 95-100.

- Linhart, O., Billard, R. 1995. Survival of ovulated oocytes and ova in the European catfish (*Silurus glanis*) after in vivo and in vitro storage or exposure to various solutions. *Aquatic Living Resources* . 8: 317–322.
- 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., Štech, 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.
- 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.
- Mansour, N., Lahnsteiner, F., Patzner, R.A. 2009. Physiological and biochemical investigations on egg stickiness in common carp. *Animal Reproduction Science*. 114: 256–268.
- 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.
- Riehl R., Patzner R. A., Glechner R. 1993. The eggs of native fishes. 2. *Chalcalburnus chalcoides mento* (Agassiz, 1832). *Österr. Fisch.*, 46: 138-140 (in German).
- Riehl, R., Patzner, R. A. 1998. Minireview: The modes of egg attachment in teleost fishes. *Italian Journal of Zoology*. 65: 1, 415 - 420.
- Sakowicz, S. 1928. Pikeperch (*Lucioperca sandra* Cuv.) (Ed. By W. Reuning), *Przegląd Rybacki* 6: 175-188. (In Polish).
- Schlumpberger W., Schmidt, K. 1980. Vorläufiger Stand der Technologie zur Aufzucht von vorgestreckten Zander (*Stizostedion lucioperca*). *DDR Berlin Bd.* 27: 284-286.
- Soin, S.G. 1976. Two new methods for elimination of egg stickiness. *Rybnoe Chozjajstvo* 10, 18–21 (In Russian).
- Waltemyer, D.L. 1975. The effect of tannin on the motility of walleye (*Stizostedion vitreum*) spermatozoa. *Transactions of the American Fisheries Society*. 4: 808-810.
- 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.
- Williot, P., Brun, R., Rouault, T., Pelard, M., Mercier, D., Ludwig, A. 2005. Artificial spawning in cultured sterlet sturgeon, *Acipenser ruthenus* L., with special emphasis on hermaphrodites. *Aquaculture*. 246: 263– 273.
- Woynarovich, E. 1962. Hatching of carp eggs in Zuger-glasses and breeding of carp larva until and age of 10 days. *Badmidgeh*. 14: 38–46.
- Woynarovich, E., Woynarovich, A. 1980. Modified technology for elimination of stickiness of common carp *Cyprinus carpio* eggs. *Aquacultura Hung.* 2: 19–21.