

بررسی امکان تکثیر مصنوعی مولدین پرورشی ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*)

سید امین میرهاشمی رستمی^(۱)؛ کوروش امینی^(۲)؛ مریم جرجانی^(۳)؛

حالت قلی قزل^(۴) و عبدالقیوم شافعی^(۵)

Rostamy_a@yahoo.com

۲،۲،۱ و ۵- مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آبهای داخلی، گرگان صندوق پستی: ۱۳۹

۴- کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی، صندوق پستی: ۱۱۵-۴۹۳۱۵

تاریخ ورود: آذر ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۸۴

چکیده

در این پژوهش، امکان تکثیر مصنوعی مولدین پرورشی نه ساله کفال خاکستری بررسی گردید. هشت سری آزمایش تکثیر مصنوعی در طول ۳ ماه (آبان ماه الی اسفند ماه ۱۳۸۲) انجام شد. برای مولدین آزمایشهای ۱ تا ۵ روش دو تزریقی به فاصله زمانی ۲۴ ساعت بکار برده شد. تزریق مقدماتی توسط CPH و تزریق نهایی توسط هورمونهای LHRH-A₂ همراه دمپریدون (Domperidone) یا CPH با HCG صورت پذیرفت. مولدین ماده آزمایشات ۶ تا ۸، ابتدا از طریق روش تزریق تدریجی روزانه به مدت ۵ روز به میزان ۵۰۰ واحد بین‌المللی به ازای هر کیلوگرم وزن بدن HCG دریافت کردند و به مولدین نر علاوه بر HCG هورمون ۱۷- آلفا-MT به میزان ۵ تا ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تزریق شد و سپس با روش دو تزریقی هورمون‌ها این مولدین تحریک گردیدند. نتایج نشان دادند که مولدین نر واقع در مرحله ۲+ و ۳+ هر دو گروه تزریق (دو تزریقی - چند تزریقی) که به آنها هورمون HCG تزریق شد نسبت به مولدینی که هورمون ۱۷- آلفا-MT دریافت کردند، از راندمان بهتری برخوردار بودند بطوریکه از یک مولد گاهی در آزمایشات تکثیر مصنوعی ۲ تا ۶ بار استفاده گردید. در هشت سری آزمایش تحریک مصنوعی مولدین ماده، ۲۷ عدد مولد بکار گرفته شد که ۲۲ عدد اقدام به تخم‌ریزی نمودند (یک میلیون تا ۲/۶ میلیون تخم). تخم هشت مولد لقاح یافته بود و درصد لقاح ۱۰ تا ۹۵ و درصد تخمه‌گشایی ۰/۰۰۸ تا ۸۸/۹ درصد برآورد گردید. همچنین از این تعداد پولد، شش سری لارو از ۱۱۷ تا ۲ میلیون عدد تولید شد. بهترین زمان جهت تکثیر مصنوعی این ماهی آذر ماه برآورد گردید، میانگین قطر تخمکها در این ماه ≥ 60 میکرون اندازه‌گیری شد. در بررسی‌های آماری بین دو گروه مولدین دو تزریقی و چند تزریقی از لحاظ میانگین قطر تخمکهای مولدین قبل از تزریق اولیه، درصد تخمه‌گشایی و تعداد لاروهای تولید شده اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۹۵٪ ($\text{One-Way-T-student } p < 0.05$) مشاهده گردید که حاکی از بهتر بودن وضعیت مولدین چند تزریقی از نظر بازده تکثیر مصنوعی می‌باشد.

کلمات کلیدی: کفال خاکستری، *Mugil cephalus*، تکثیر مصنوعی، ایران

مقدمه

کفال خاکستری یکی از ماهیان استخوانی با ارزش تجاری بسیار مهم می‌باشد که پراکنش آن در آبهای ساحلی بین عرض‌های جغرافیایی ۴۰ درجه شمالی و جنوبی گزارش شده است (Tamaru et al., 1993). به دلیل شرایط مناسب جهت پرورش، مقاومت زیاد در برابر دامنه وسیعی از درجه حرارت و شوری، ضریب رشد خوب، ضریب تبدیل غذایی مناسب و بازارپسندی عالی بعنوان یکی از بهترین گونه‌های پرورشی ماهیان دریایی در سراسر جهان به شمار می‌آید.

از طرف دیگر، وجود منابع آب شور و لب شور فراوان در نواحی ساحلی شمال و جنوب و نیز استانهای مرکزی و همچنین زمین‌های نامرغوب و کم‌بازده از نظر کشاورزی که برای پرورش این گونه مناسب تشخیص داده شده است، کشورمان را از نظر وجود منابع طبیعی جهت پرورش این گونه ماهی ممتاز جلوه می‌دهد.

با توجه به تلاشهای فراوانی که در کشورهای مختلف جهت دستیابی به فن‌آوری مطمئن جهت تکثیر مصنوعی این ماهی در دو دهه قبل صورت گرفته است، با این وجود پرورش این گونه در اکثر نقاط دنیا تاکنون وابسته به جمع‌آوری بچه ماهیان از آبهای ساحلی می‌باشد (مانند هنگ‌کنگ، تایوان، فلسطین و مصر). اگر چه فن‌آوری مناسبی برای تحریک هورمونی مولدین نر و ماده این ماهی وجود داشته، ولی جهت دستیابی به فن‌آوری زیستی دقیق تکثیر مصنوعی این گونه در شرایط کشورمان، پژوهش بیشتر ضروری به نظر می‌رسد (Tamaru et al., 1993).

فصل تولید مثل این گونه در ماههای سرد سال (آذر ماه تا اسفند ماه) می‌باشد (Tamaru et al., 1993).

در اکثر کشورها، جهت دستیابی به مولدین نر و ماده این ماهی، مولدین بالغ را اغلب به هنگام مهاجرت تولید مثلی از مصب به قسمت‌های باز دریا صید کرده و سپس آنها را وارد چرخه تکثیر مصنوعی می‌نمایند، ولی در این پژوهش از مولدین پرورشی حاصل شده از ۲۰ هزار بچه ماهی وارد شده از هنگ‌کنگ استفاده گردید (قانعی تهرانی، ۱۳۸۰). با اینکه این گونه در شرایط پرورش در استخرها، می‌تواند به بلوغ کامل برسد (مولدین نر و ماده) ولی گزارشی مبنی بر تخم‌ریزی و اسپرم‌ریزی در این شرایط مشاهده نشده است (Tamaru et al., 1993).

استفاده از انواع هورمون‌ها برای کنترل فعالیت تولید مثلی ماهیان استخوانی هم اکنون یکی از اعمال پذیرفته شده در آبرزی پروری می‌باشد (Lam, 1982 ; Donaldson & Hunter, 1983). در این راستا عوامل متعددی همانند ترکیب و فرمولاسیون هورمونی، میزان حداقل و مؤثر هورمون، نحوه استفاده آن، چگونگی رسیدگی مولدین، مدت زمان بکارگیری هورمون و شرایط محیطی به هنگام استفاده از هورمون دخالت دارند. بطور خلاصه، در شرایط محیطی مساعد (از نظر تنظیم شوری، درجه حرارت و کیفیت آب پرورشی) به هنگام مدیریت مولدسازی، به همراه یکسری عوامل محرک محیطی و تغییرات

فیزیولوژیک که در اندامهای درونی مولدین انجام می‌گیرد، سبب افزایش سطوح هورمون‌های مؤثر در رشد و نمو گندهای جنسی می‌شود. در شرایط پرورشی، مرحله رسیدگی نهایی و اوولاسیون صورت نگرفته و علت آن هم می‌تواند کمبود هورمونهای گنادوتروپین در این شرایط باشد. یک روش مرسوم و مؤثر جهت تشدید و افزایش سطوح هورمونی، که بطور طبیعی در مولدین اتفاق می‌افتد، تزریق عضلانی یا صفاقی است. به همین جهت پژوهش حاضر با این فرضیه انجام گرفت که آیا می‌توان با بکارگیری هورمونهای مرسوم که در آبی‌پروری استفاده می‌شوند، اقدام به تحریک رسیدگی نهایی مولدین و اوولاسیون و اسپرم‌ریزی آنان کرد و سپس بتوان به فن‌آوری زیستی استفاده از هورمون‌ها جهت تکثیر مصنوعی ماهی کفال خاکستری و تولید لارو در شرایط کشورمان دست یافت؟

مواد و روش کار

مولدین پرورشی نه ساله کفال خاکستری در مرکز میگوی گمیشان واقع در شمال شهرستان گمیشان جهت این پژوهش انتخاب گردیدند. در اواخر خرداد از ذخیره مولد موجود، ۳۰۰ عدد مولد نر و ماده انتخاب شده و به دو استخر خاکی ۰/۵ هکتاری با تراکم ۱۵۰ عدد در هر استخر با نسبت جنسی ۲:۱ ماده به نر منتقل شدند. مولدین مورد نظر تا نیمه آبان ماه با غذای دستی تغذیه شدند. تعویض آب و هوادهی استخرها برحسب نیاز رعایت گردید. سپس قبل از اینکه دمای آب استخر به زیر بیست درجه سانتیگراد کاهش یابد، تعداد ۷۶ عدد مولد ماده و ۴۹ عدد مولد نر انتخاب و به یک استخر گلخانه‌ای ۵۰۰ مترمربعی که شرایط دمایی و دوره نوری و هوادهی آن کاملاً کنترل می‌شد، منتقل شدند. جهت محاسبات مقدار هورمون و نمونه‌گیری از گندها، مولدین ابتدا توسط تور پره صید شدند سپس از لحاظ ریخت‌شناسی و سلامت ظاهری مورد بررسی قرار گرفتند. جهت اندازه‌گیری عوامل زیستی موردنظر، طول با متر پارچه‌ای با دقت سانتیمتر و وزن با ترازوی دیجیتال AND با دقت یک گرم استفاده گردید. مولدین مناسب و سالم در ظرف یونولیتی ۴۰ لیتری حاوی بیهوش‌کننده ۲ - فنوکسی اتانول با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیهوش شدند و پس از اندازه‌گیری طول و وزن و نمونه‌برداری از گندها به تانکهای بهبودی ۳۰۰ لیتری با هوادهی مداوم منتقل گشتند. برای مولدین نر، میزان رسیدگی بیضه‌ها به وسیله میزان ترشح اسپرم با مالش ملایم محفظه شکمی به سمت منفذ تناسلی تعیین گردید. کمیت اسپرم خارج شده از گنادوپور توسط علامت مثبت مشخص شد. بدین ترتیب که اگر در اثر مالش اسپرمی خارج نمی‌شد ماهی نر با علامت منفی (-) و در غیر اینصورت با توجه به میزان اسپرم خارج شده (جزئی یا فراوان) بین طبقه ۱+ تا ۳+ طبقه‌بندی می‌شدند. سعی گردید در چرخه تکثیر مصنوعی از مولدین نر ۲+ و ۳+ استفاده گردد (Liu & Kelley, 1994). رسیدگی جنسی مولدین ماده با اندازه‌گیری و بررسی تخمکهای استحصالی که توسط سوند پلاستیکی (بطول ۳۰ سانتیمتر و قطر داخلی ۱ میلی‌متر با دو سوراخ در سر آن) نمونه‌برداری شدند. میانگین قطر تخمکهای تثبیت شده در فرمالین ۱۰ درصد از اندازه‌گیری یکصد عدد توسط لوپ روسی (MBC)

مجهز به عدسی مدرج چشمی با دقت ± 10 میکرون تعیین گردید. مولدینی که میانگین قطر تخمک آنها ۶۰۰ میکرون یا بیش از آن بود، بعنوان مولدین کاملاً رسیده انتخاب و وارد چرخه تکثیر مصنوعی شدند (Kuo *et al.*, 1973 ; Greeley *et al.*, 1987 ; Tamaru *et al.*, 1991).

مولدین ماده کاملاً رسیده، بعداز سازگاری کامل با شرایط تفریخگاه، پس از زیست سنجی و علامتگذاری در ظرف یونولیتی ۴۰ لیتری بیهوش شده و آماده تزریق شدند. در آزمایشهای ۱ تا ۵ تزریق از روش دو تزریقی (Lee *et al.*, 1987) انجام گرفت. فواصل بین دو تزریق اولیه و نهایی ۲۴ ساعت در نظر گرفته شد. زمان تزریق معمولاً ساعت ۹ تا ۱۰ صبح انتخاب گردید. از هورمونهای LHRH-A₂ (محصول کشور چین)، HCG، CPH (تهیه داخل کشور) و نیز دامپریدون بعنوان عامل ضد دوپامین و محلول کلسیم همراه با LHRH استفاده گردید. برحسب نیاز (در مورد مولدینی که در معرض استرس بودند)، به همراه هورمون از ویتامین‌های C و B- کمپلکس نیز استفاده گردید (جدول ۱). پس از آماده‌سازی هورمون‌ها، تزریق توسط سرنگ پزشکی با شماره سوزن ۲۳ بصورت عضلانی در دو سه ردیف فلس زیر اولین باله پشتی صورت گرفت. در آزمایشات ۶ تا ۸ به روش تزریق تدریجی روزانه به مدت ۵ روز توسط هورمون HCG به میزان ۵۰۰ واحد بین المللی به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تزریق گردید.

مولدین نر انتخاب شده نیز پس از سازگاری با شرایط تفریخگاه، زیست‌سنجی، علامتگذاری و بیهوش شدند و توسط سرنگ انسولین ۲ سی‌سی مانند مولدین ماده تزریق شدند. تزریق مولدین نر نیز همزمان با تزریق نهایی مولدین ماده صورت گرفت. هورمونهای مورد استفاده با توجه به شرایط رسیدگی جنسی مولدین نر غالباً HCG به میزان ۱۰۰۰ IU به ازای هر کیلوگرم وزن بدن برای مولدین مرحله ۳+ تا ۵۰۰۰ واحد بین الملل برای مولدین مرحله ۲+ و یا ۱۷ - آلفا-MT، ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن برای مولدین مرحله ۲+ و ۳+ و برحسب نیاز نیز LHRH-A₂ ۱۰۰ میلیگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن برای مولدین مرحله ۲+ و ۳+ بود. برای تزریق تدریجی مولدین نر، روزانه به مدت حداقل ۵ روز هورمون HCG (به میزان ۵۰۰ IU تا ۵۰۰۰ به ازای هر کیلوگرم وزن بدن با توجه به شرایط رسیدگی جنسی مولد نر) و ۱۷ - آلفا-MT به میزان ۵ تا ۱۰ میلیگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن استفاده گردید.

مولدین پس از تزریق، در تانکهای نگهداری مولدین ۳ تنی بتونی پوشیده شده با پلاستیک مشکی با هوادهی به مدت ۶ تا ۸ ساعت نگهداری شدند. سپس مولدین به تانکهای تخم‌ریزی مشابه تانکهای قبلی با هوادهی نسبتاً شدید با نسبت جنسی ۲:۱ ماده به نر منتقل شدند. دمای آب و شوری در سالن تفریخگاه بترتیب ۲۴ تا ۲۶ درجه سانتیگراد و ۳۲ در هزار ثابت نگهداشته شد.

پس از تخم‌ریزی تعداد یکصد عدد تخم در زیر میکروسکوپ جهت تعیین درصد لقاح بررسی شدند فرمول (۱). تخم‌های لقاح یافته (شکل ۳) در این زمان براحتی توسط اولین شکاف جنینی قابل تشخیص بودند. همچنین قطر تخمهای لقاح یافته نیز اندازه‌گیری گردید.

فرمول (۱):

$$۱۰۰ \times \text{تعداد تخم های لقاح یافته} = \text{درصد لقاح}$$

تعداد تخم های بررسی شده

سیس تخم‌ها با آهستگی توسط تور دستی جمع‌آوری شده و با تراکم حدود ۵۰۰ عدد تخم در هر لیتر (Tamaru et al., 1993) در تانکهای انکوباسیون ۳۰۰ تا ۳۰۰۰ لیتری ذخیره‌سازی شدند. شوری آب ۳۲ قسمت در هزار، دمای آن ۲۴ تا ۲۶ درجه سانتیگراد و هوادهی نیز بطور مداوم در تانکها صورت گرفت. جهت تعیین درصد تخمه‌گشایی، از فرمول (۲) پس از کامل شدن تخمه‌گشایی تخم‌ها در تانک انکوباسیون استفاده گردید.

فرمول (۲):

$$۱۰۰ \times \text{تعداد کل لاروهای تخمه‌گشایی شده} = \text{درصد تخمه‌گشایی}$$

تعداد تخم‌های لقاح یافته ذخیره شده

تعداد تخم‌ها و همچنین لاروها نیز از روش حجمی (Tamaru et al., 1993) اندازه‌گیری گردید. تجزیه و تحلیل آماری بین میانگین قطر تخمکها، درصد تخمه‌گشایی و تعداد لارو تولیدی گروه دو تزریقی و چند تزریقی از روش آماری (One-Way T-student) استفاده گردید.

نتایج

نمودارهای ۱ تا ۴ توزیع فراوانی وزنی و طولی مولدین ماده و نر را در دوره تکثیر مصنوعی نشان می‌دهد. در توزیع فراوانی مولدین نر مطابق نمودار ۱، بیشترین درصد فراوانی وزنی در طبقه ۱۵۰۰ تا ۱۸۰۰ گرم به میزان ۴۲/۵ درصد و بیشترین درصد فراوانی طولی در طبقه ۵۶ تا ۵۸ سانتیمتر به میزان ۴۷/۵ درصد می‌باشد. همچنین براساس نمودار ۱، بیشترین درصد فراوانی وزنی مولدین ماده در طبقه ۲۴۰۰ تا ۲۷۰۰ گرم به میزان ۲۹/۵ درصد و بیشترین درصد فراوانی طولی در طبقه ۵۸ تا ۶۱ سانتیمتر به میزان ۲۹/۶ درصد بود.

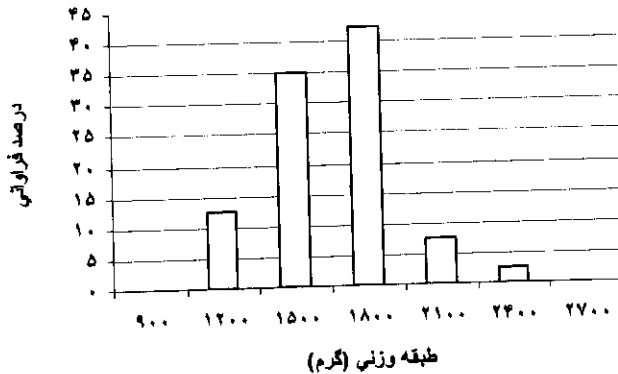
نمودار ۵، تغییرات قطر تخمکها را در طول شش ماه نشان می‌دهد. مطابق این نمودار، همانطور که مشاهده می‌شود، میزان قطر تخمکها در آذرماه ≥ 600 میکرون می‌باشد، لذا از آنها می‌توان جهت تکثیر مصنوعی استفاده نمود (شکل ۱). همچنین نتایج مشاهدات و بررسی‌ها نشان می‌دهند که در منطقه گمیشان قبل از رسیدن قطر تخمکها به اندازه ≥ 600 میکرون، دمای آب زیر ۲۰ درجه سانتیگراد تنزل پیدا می‌کند که این کاهش درجه حرارت به همراه کاهش دوره نوری باعث بازجذب زود هنگام تخمکها و همچنین کاهش یا توقف اسپرم‌دهی مولدین نر می‌شود. لذا با انتقال تعدادی از مولدین به استخر گلخانه‌ای که در حرارت ۲۱ تا ۲۴ درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱۰ تا ۱۲ ساعت در شبانه‌روز در آن تحت کنترل قرار گرفت، نه تنها از بازجذب گامتهای جنسی ممانعت بعمل آمد، بلکه گلخانه توانست مدت زمان نگهداری گامتهای جنسی توسط مولدین را در شرایط بهینه به ۳ ماه به درازا بکشد. در حالیکه در این مدت در اثر استرس‌های محیطی وارده به مولدین موجود در فضای باز استخر همانند

سالهای قبل (قانعی و همکاران، ۱۳۸۰) تخمکها و اسپرماتوزوئیدها کیفیت خود را به مقدار زیادی از دست داده بودند (شکل ۲).

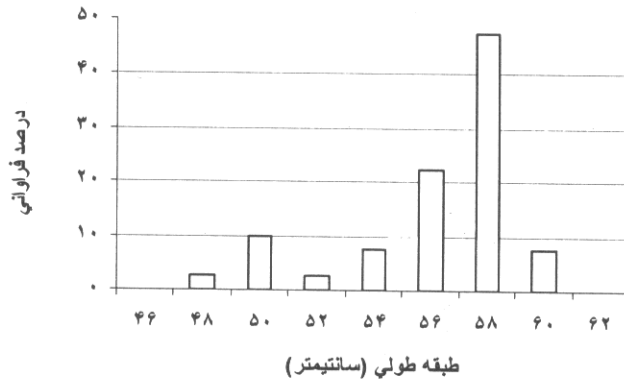
جدول ۱ اطلاعات مربوط به فعالیت تکثیر مصنوعی مولدین ماده کفال خاکستری را در سال ۱۳۸۲ نشان می‌دهد. در تزریق مقدماتی مولدین هر دو گروه (دو تزریقی - چند تزریقی) منحصراً از هورمون CPH به میزان ۲۵ تا ۴۰ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن استفاده شد. نتایج نشان داد که این هورمون می‌تواند در تحریک اولیه جهت شروع رسیدگی نهایی (شروع جذب آب تخمکها و اوولاسیون) نقش مؤثر خود را ایفا نماید. هرچند بسیاری از مولدین پس از دریافت هورمون در مرحله تزریق نهایی اقدام به تخم‌ریزی نمودند، ولی همان طور که ملاحظه می‌شود نتایج حاصل از مولدینی که پس از ۲۴ ساعت پس از تزریق نهایی، مجدداً در تزریق نهایی ثانویه، هورمون (اکثرأ LHRH-A₂ به میزان ۵ تا ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) دریافت کردند، از نظر معیارهای تکثیر شرایط بهتری را نشان دادند.

در بررسی مولدین نر ۲+ و ۳+ در هر دو روش تزریق، نتایج نشان داد هورمون HCG عملکرد بهتری نسبت به هورمون ۱۷-آلفا MT- در رسیدگی مولدین نر دارا می‌باشد، بطوریکه مولدین تزریق شده توسط هورمون HCG گاهی ۲ تا ۶ بار در آزمایش تکثیر مصنوعی مورد استفاده قرار گرفتند (یک مولد شش بار، ۶ مولد دو بار و ۵ مولد چهار بار).

در بررسی‌های آماری بین دو گروه مولدین دو تزریقی و چند تزریقی از لحاظ میانگین قطر تخمکهای مولدین قبل از تزریق اولیه، درصد تخمه‌گشایی و تعداد لاروهای تولید شده اختلاف معنی‌داری در سطح اعتماد ۹۵ درصد ($p < 0.05$ One-Way T-student) مشاهده گردید.



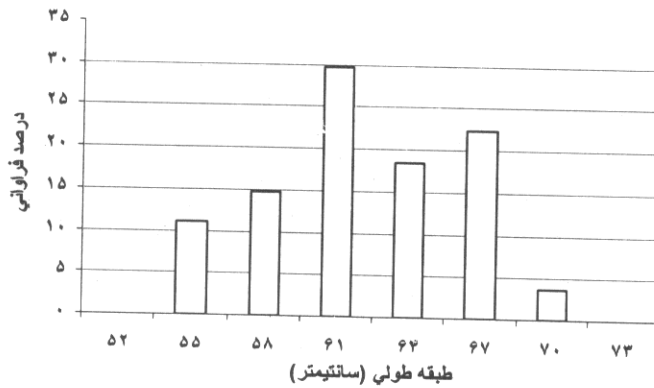
نمودار ۱: توزیع فراوانی وزنی مولدین نر کفال خاکستری (*Mugil cephalus*)



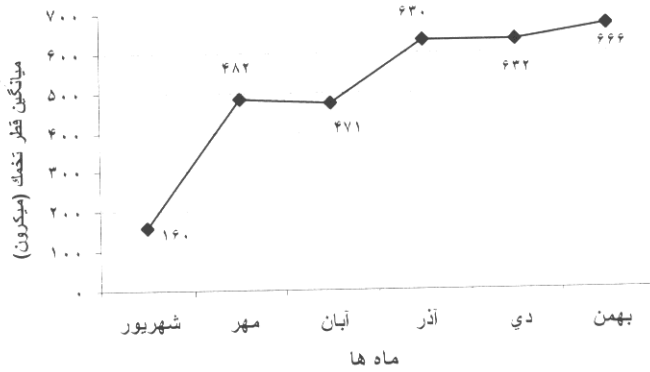
نمودار ۲: توزیع فراوانی طولی مولدین نر کفال خاکستری (*Mugil cephalus*)



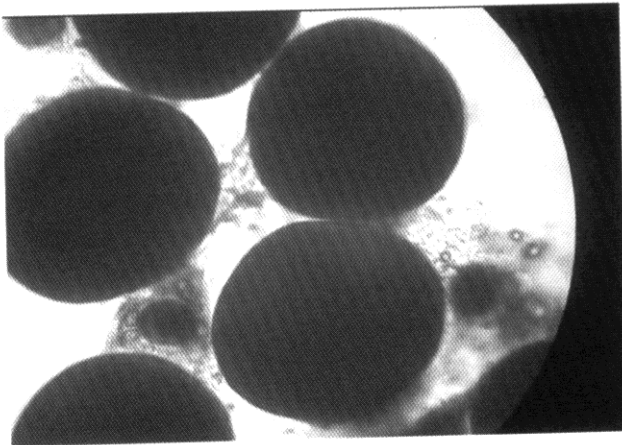
نمودار ۳: توزیع فراوانی وزنی مولدین ماده کفال خاکستری (*Mugil cephalus*)



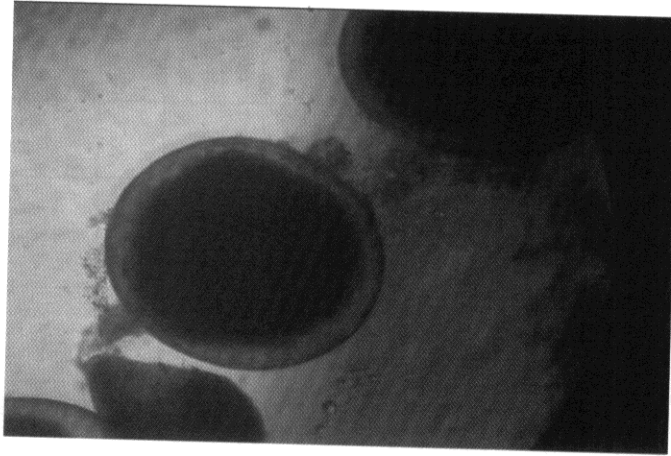
نمودار ۴: توزیع فراوانی طولی مولدین ماده کفال خاکستری (*Mugil cephalus*)



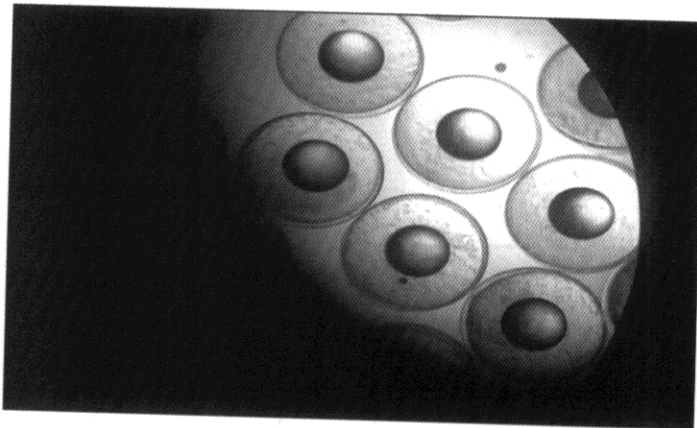
نمودار ۵: تغییرات قطر تخمک مولدین کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) در طول ماههای شهریور تا بهمن ۱۳۸۲ در منطقه گمیشان



شکل ۱: تخمک کفال خاکستری در زیر میکروسکوپ قبل از تزریق مقدماتی (۴۰×)



شکل ۲: تخمک کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) در حال تحلیل (۴۰×)



شکل ۳: تخمک تازه لقاح یافته کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) با یک قطره چربی (۴۰×)

جدول ۱: اطلاعات مربوط به تصویریک هورمونی (رژیم دو تزریقی) و برخی پارامترهای تکثیر مصنوعی مولدین ماده کتال خاکستری *Mugil cephalus*

شماره آزمایش	تعداد مولد (عدد)	مشخصات مولد		مقدار تزریق اولیه	تزریق ثانویه ^۱ (بند از ۲۴ ساعت)	تزریق اولویه ^۲ (بند از ۲۴ ساعت)	LP (ساعت)	DI (بیکروژن)	D2/D3 (بیکروژن)	وضعیت تخمیزی	وضعیت لانه (دوره)	تعداد تخم	تعداد لارو	درصد تکثیر لارو
		وزن کل (گرم)	طول کل (سانتیمتر)											
۱	۲	۶۲	۲۶۰۰	CPH = ۱۰۵mg	LHRH-A2=300µg DOMP=25mg	LHRH-A2=150µg DOMP=25mg	۲۱/۳	۷۰۱	۴۰۵۸۵۶	کامل	بدون لانه	بدون تخم	۱۰۰۰۰۰	۰
۲	۳	۵۹	۲۵۰۰	CPH = ۶۰mg	HCO=50000 IU CPH=60mg	LHRH-A2=250µg DOMP=20mg	۶۹/۳	۶۹۹	۲۳۷۸۵۷	کامل	بدون لانه	تلفات	۱۲۰۰۰۰	۰
۳	۱	۵۴	۲۱۰۰	CPH = ۸۰mg	LHRH-A2=250µg DOMP=20mg	LHRH-A2=400µg DOMP=20mg	۷۰/۳	۶۹۷	۱۰۰۰۰۰	بسته‌بندی	بدون لانه	تلفات	۱۰۰۰۰۰	۰
۴	۲	۶۲	۲۱۰۰	CPH = ۸۰mg	LHRH-A2=250µg DOMP=20mg	LHRH-A2=400µg DOMP=20mg	۷۰/۳	۶۹۷	۱۰۰۰۰۰	تلفات	بدون لانه	تلفات	۱۰۰۰۰۰	۰
۵	۲	۵۸	۱۷۰۰	CPH = ۵mg	HCG=65000 IU LHRH-A2=300µg DOMP=17mg	LHRH-A2=500µg DOMP=25mg	۲۰/۳	۶۲۲	۳۸۸۸۹۴	تجربا کامل	بدون لانه	تلفات	۱۱۷	۰/۰۰۸
۶	۲	۶۲	۲۶۰۰	CPH = ۷۵mg	LHRH-A2=350µg DOMP=25mg	LHRH-A2=250µg DOMP=20mg	۸	۶۰۴	۳۳۷۸۵۰	کامل	بدون لانه	تلفات	۲۰۰۰۰۰	۰
۷	۲	۶۲	۲۶۰۰	CPH = ۷۵mg	LHRH-A2=350µg DOMP=25mg	LHRH-A2=250µg DOMP=20mg	۸	۶۰۴	۳۳۷۸۵۰	کامل	بدون لانه	تلفات	۲۰۰۰۰۰	۰

LP = تخمیزی

DI = تزریق اولویه

D2 = تزریق ثانویه

D3 = تخم‌بندی

ادامه جدول ۱:

درصد تخم‌گذاری لارو	تعداد لارو	تعداد تخم	وضعیت لاج (دوره)	وضعیت تخم‌ریزی	D2/D3 (میکرون)	D1 (میکرون)	LP (ساعت)	مقدار تزریق هورمون و مواد افزودنی (دام / مولد)		مقدار تزریق اولیه	طول کل (ساعتین)	تعداد مولد (عدد)	شماره آزمایش
								تزریق نگرید ۲ (بعد از ۲۲ ساعت)	تزریق نگرید ۱ (بعد از ۲۲ ساعت)				
—	—	—	بدون لاج	تخم‌ریزی	۳۸۷۸۵۱	۶۸۰	۱۶	تزریق نگرید	CPH=۶۰mg HCG=۵۰۰۰ IU	CPH=۶۰mg	۶۱	۶	۶
۵۰۰۰۰۰	۲۰۰۰۰۰	۲۰۰۰۰۰	۶۳	کامل	۲۰۵۹۷۸	۶۶۲	۱۵	تزریق نگرید	LHRH-A2=250µg DOMP=20mg	CPH=۷۵mg	۶۷۵	۶	۶
۵۰۰۰۰۰	۲۱۰۰۰۰	۲۱۰۰۰۰	۵۰	کامل	تلاورگیری نگرید	۶۷۵	۱۹	تزریق نگرید	CPH=۱۰mg HCG=۴۰۰۰ IU	CPH=۵۰ mg	۵۷۵	۶	۶
—	—	۲۰۰۰۰۰	۵۵	کامل	۲۸۷۹۱۶	۶۶۳	۱۷/۳	تزریق نگرید	CPH=15mg HCG=55000 IU	CPH=۷۵mg	۶۰	۶	۶
—	—	۱۹۵۰۰۰	۵۰	کامل	تلاورگیری نگرید	۶۶۱	۱۶/۳	تزریق نگرید	LHRH-A2=150µg DOMP=25mg	CPH=۱۰ mg	۵۵	۶	۶
—	—	—	بدون لاج	سپار ناچیز	تلاورگیری نگرید	۶۶۸	۲۰	تزریق نگرید	CPH=50mg HCG=50000 IU	CPH=۶۰ mg	۵۶	۶	۶
—	—	—	سوراخ	سوراخ	تلاورگیری نگرید	۷۸۱	—	تزریق نگرید	LHRH-A2=250µg DOMP=20mg	CPH=۶۰mg	۶۶	۶	۶
—	—	—	تلاقی	تلاقی	تلاورگیری نگرید	۷۰۷	—	تزریق نگرید	CPH=75mg HCG=75000 IU	CPH=۶۰ mg	۶۷۵	۵	۷
۱۵	۴۰۰۰	۲۰۰۰۰۰	۱۰	کامل	TAVAT	۶۸۲	۲۱	تزریق نگرید	CPH=45mg HCG=35000 IU	CPH=۷۵mg	۵۸	۵	۷
—	—	۱۵۰۰۰۰	بدون لاج	کامل	تلاورگیری نگرید	۶۵۸	۲۱	تزریق نگرید	تزریق نگرید	CPH=۷۰ mg	۵۷	۵	۷
—	—	۱۲۰۰۰۰	بدون لاج	تخم‌ریزی	تلاورگیری نگرید	۶۷۲	۱۷/۳	تزریق نگرید	LHRH-A2=150µg DOMP=20mg	CPH=۸۰ mg	۶۱	۵	۷
—	—	۱۰۰۰۰۰	بدون لاج	تقریباً کامل	تلاورگیری نگرید	۶۶۹	۱۹/۵	تزریق نگرید	LHRH-A2=300µg DOMP=20mg	CPH=۱۰۰ mg	۵۹	۵	۷
۸۵/۵	۲۰۰۰۰۰	۱۶۰۰۰۰	۹۰	کامل	۲۶۷۸۳	۶۱۹	۱۵/۳	تزریق نگرید	CPH=55mg HCG=15000 IU	CPH=۱۰۰ mg	۶۵/۶	۵	۸
—	—	—	بدون لاج	تخم‌ریزی	تلاورگیری نگرید	۶۱۲	۲۰	تزریق نگرید	CPH=75mg HCG=60000 IU	CPH=۹۰ mg	۵۹	۵	۸
—	—	—	بدون لاج	تخم‌ریزی	تلاورگیری نگرید	۶۲۶	۱۷/۵	تزریق نگرید	LHRH-A2=500µg DOMP=20mg	CPH=۱۰۰ mg	۶۲	۵	۸
۸۸/۱	—	۲۵۰۰۰۰	۹۰	کامل	۲۸۹۱۸	۶۵۹	۱۲	تزریق نگرید	LHRH-A2=150µg DOMP=20mg	CPH=۱۱۰ mg	۶۲	۵	۸

مدت زمان آخرین تزریق هورمون یا تخم‌ریزی = LP
 میانگین قطر تخم‌ها قبل از تزریق اولیه = D1
 میانگین قطر تخم‌ها بعد از تخم‌ریزی = D2
 میانگین قطر تخم‌ها بعد از تخم‌ریزی = D3

بحث

در شرایط طبیعی، کاهش دوره نوری و درجه حرارت، مولدین کفال خاکستری را تحریک به شروع مرحله زرده سازی تخمک می نماید (Lee et al., 1992). این مرحله معمولاً ۲ تا ۲/۵ ماه بطول می انجامد که در پایان آن اندازه تخمک ≥ 600 میکرون می باشد پس از آن فرایند بلوغ و رسیدگی نهایی گنادها در شرایط پرورش متوقف می گردد (Tamaru et al., 1993).

از بررسی مستمر تغییرات رشد و نمو تخمکها در شرایط گمیشتان مشخص گردید مولدین قبل از رسیدن به شرایط رسیدگی کامل تخمک (≥ 600 میکرون اندازه میانگین قطر تخمکها) با بروود آب محیط پرورش مواجه می شوند. این شوک حرارتی می تواند باعث کاهش کیفیت گامت های جنسی شده و مانع از حفظ شرایط بلوغ گردد و همچنین می تواند دوره زمانی فصل تولید مثل مولدین را کاهش دهد (Kuo, 1993).

نتایج این پژوهش نشان داد که از طریق فراهم کردن شرایط محیطی مناسب مخصوصاً از نظر درجه حرارت و دوره نوری می توان فصل تولید مثل این ماهی را به مدت ۳ ماه به درازا کشاند و از کاهش کیفیت گنادهای جنسی مولدین نر و ماده جلوگیری نمود. به طوری که مشاهده شده است مولدین موجود در استخر های فضای باز که با سرمای زیاد مواجه بودند در مدت کمتر از دو ماه کاملاً کیفیت گناد های خود را از دست می دهند (قانعی تهرانی، ۱۳۸۰).

ماهیان مولد کفال خاکستری می توانند در شرایط پرورش در استخر به بلوغ کامل برسند، ولی تاکنون گزارشی مبنی بر تخم ریزی و اسپرم ریزی این ماهیان در شرایط پرورشی ارائه نشده است (Tamaru et al., 1993).

مولدین ماده بالغ که دارای تخمکهای بزرگتر از ۶۰۰ میکرون از لحاظ قطر تخمک می باشند، جهت تخم ریزی موفقیت آمیز نیاز به تحریک هورمونی دارند (Shehadeh et al., 1979). نتیجه اینکه، مولدین نر و ماده مورد آزمایش با وجود بلوغ کامل، هرگز بطور خود بخودی اقدام به تخم ریزی و اسپرم ریزی ننموده، بلکه ثابت شده است که جهت تخم ریزی و اسپرم ریزی آنها نیاز به تحریک هورمونی دارند.

تاکنون مؤثرترین روش برای تحریک هورمونی مولدین کفال خاکستری جهت تخم ریزی بکارگیری روش دو تزریقی شامل یک تزریق اولیه گنادوتروپین (HCG, CPH) و پس از ۲۴ ساعت انجام تزریق نهایی توسط LHRH-A₂ گزارش شده است (Tamaru et al., 1993). جدول ۱ نشان می دهد که استفاده از هورمون CPH در مرحله تزریق مقدماتی توانسته است نقش خود را جهت شروع رسیدگی نهایی تخمکها ایفا نماید.

Lee و همکاران در سال ۱۹۸۷ گزارش نمودند که مولدین بالغ کفال با میانگین قطر تخمک بیش از ۶۰۰ میکرون با بیش از ۲۰ میلیگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن CPH تزریق شده و همچنین LHRH-A جهت تزریق نهایی با بیش از ۲۰۰ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، تخم ریزی موفقیت آمیزی را در مدت زمان ۱۱/۵ تا ۲۰ ساعت (با دو تزریق) و ۳۴ تا ۵۰ ساعت (با ۳ تزریق) بعد

از تزریق نهایی داشتند. به همین ترتیب بررسی نتایج آزمایشهای تکثیر مصنوعی حاضر نشان می‌دهد که استفاده از هورمون $LHRH-A_2$ به همراه دامپریدون و یا ترکیب هورمونی HCG و CPH و تزریق نهایی توانسته نقش مؤثری را ارائه دهد بطوریکه از ۲۷ مولد بکارگرفته شده، ۲۲ عدد پس از دریافت مقدار نهایی اولیه و ثانویه اقدام به جذب آب و به تبع آن اوولاسیون نموده و در نهایت تخم‌ریزی موفقیت‌آمیزی داشته باشند.

Tamaru و همکاران در سال ۱۹۹۳، اظهار نمودند که اگر چه معمولاً CPH بعنوان گنادوتروپین در تحریک اولیه مولدین مورد استفاده واقع می‌شود ولی بکار بردن هورمون HCG بعلت استاندارد بودن توان زیستی آن به واحدهای بین‌المللی، از توجه بالاتری برخوردار می‌باشد. همچنین تیمار CPH/LHRH-A مطمئن‌ترین و مقرون به صرفه‌ترین تیمار در تحریک هورمونی این ماهی می‌باشد و هورمون HCG می‌تواند در این روش جایگزین CPH گردد ولی این جایگزینی هزینه بیشتری را در برمی‌گیرد (Lee et al., 1988).

Zaki و همکاران در سال ۱۹۹۸ طی تحقیق در کشور مصر گزارش نمودند که مولدین ماده کفال خاکستری که طی ۱۰ تزریق به فاصله زمانی ۵ روز میزان ۵۰۰ واحد بین‌المللی به ازای هر کیلوگرم وزن ماهی هورمون HCG دریافت کردند، رشد اووسیت و مرحله زرده‌سازی آنان کاملاً تحریک شده بود. نتایج پژوهش این محققین نشان می‌دهد که مکانیسم عمل HCG از طریق افزایش فعالیت ترشح سلولهای اپیتلیال فولیکولی و افزایش سنتز هورمونهای جنسی استروئیدی می‌باشد که به تبع آن موجب افزایش رشد اووسیت‌ها در مولدین ماده کفال می‌گردد. نتایج آزمایشات اخیر صورت گرفته در مرکز گمیشان مؤید این نکته می‌باشد، مولدین (نروماده) که روزانه به مدت هفت روز هورمون HCG دریافت نمودند نسبت به سایر مولدین نتایج بهتری را ارائه دادند.

از مطالب ارائه شده چنین استنباط می‌گردد که هرچه زمان دریافت هورمون‌ها توسط مولدین طولانی‌تر و میزان جذب آنها تدریجی‌تر باشد، تأثیر فیزیولوژیک آنها بر محور هیپوتالاموس، هیپوفیز، گنادها مؤثرتر واقع شده و در نتیجه شاهد راندمان بهتری از نظر عوامل زیستی تکثیر مصنوعی این گونه خواهیم بود.

تشکر و قدردانی

از ریاست وقت مؤسسه تحقیقات شیلات جناب آقای دکتر رضوانی و نیز جناب آقای دکتر متین‌فر ریاست محترم بخش آبی‌پروری مؤسسه به دلیل توجه ویژه و همچنین حمایت‌های بی‌دریغ و همه جانبه‌شان نهایت سپاسگزاری می‌شود.

همچنین از کلیه همکاران محترم آقایان محمد بینایی، محمد صلواتیان، یوسف ایری، حسین پیری، جمشید الیاسی، احمد طبری، رضا عسگری و بهروز منصوری تشکر و قدردانی می‌گردد.

از جناب آقای دکتر ستهی از کشور هندوستان و پروفیسور تامارو از کشور آمریکا که تلاش و همکاری آنان فراموش نشدنی است، نهایت تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

- قانع تهرانی، م.، ۱۳۸۰. مولدسازی و تکثیر مصنوعی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*). وزارت جهاد کشاورزی. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران. ۱۰۴ صفحه.
- Donaldson, E.M. and Hunter, G.A. , 1983. Induced final maturation, ovulation, and spermiation in culture fish. In: W.S. Hoar and D.J. Randall (ed.), Fish Physiology, Vol. 98. Academic Press, New York, USA. pp.351-403.
- Greeley, M.S. Jr. ; Calder, D.R. and Wallace, R.A. , 1987. Occyte growth and development in the striped mullet, *Mugil cephalus*, during seasonal ovarian recrudescence: relationship of fecundity and size at maturity. Fishery Bul. Vol. 85, No. 2, pp.187-200.
- Kuo, C.M. ; Nash, C.E. and Shehadeh, Z.H. , 1973. Induced spawning of captive grey mullet (*Mugil cephalus*) females by injection of human chorionic gonadotrophin. Aquaculture, Vol. 1, pp.429-432.
- Kuo, C.M. , 1993. Manipulation of ovarian maturation and spawning in grey mullet *Mugil cephalus* Linnaeus. The Third Indian Fisheries Forwn proceedings. Pantnagar, pp.81-88.
- Lam, T.J. , 1982. Application of endocrinology to fish culture. Can. J. Fish. Aquat. Sci., Vol. 39, pp.111-137.
- Lee, C.S. ; Kelley, C.D. and Tamaru, C.S. , 1988. The cost and effectiveness of CPH, HCG and LHRH-A on the induced spawning of grey mullet, *Mugilcephalus*. Aquaculture, Vol. 73, pp.341-347.
- Lee, C.S. ; Tamaru, C.S. ; Kelly, C.D. ; Moriwakeandnd, A. and Miyamoto, G.T. , 1992. The effect of salinities on the induction of spawning and fertilization in the striped mullet, *Mugil cephalus*. Aquaculture, Vol. 102, pp.289-296.
- Lee, C.S. ; Tamaru, C.S. ; Miyamoto, G.T. and Kelley, C.D. , 1987. Induced spawning of grey mullet (*Mugli cephalus*) by LHRH-a. Aqaculture, Vol. 62, pp.327-336.
- Liu, K.M. and Kelley, C.D. , 1994. The oceanic institute hatchery manual series striped mullet (*Mugil cephalus*). The Oceanic institute, Honolulu, Hawaii. 96825P.

- Shehadeh, Z.H. ; Kuo, C.M. and Milisen, K.K. , 1979. Induced Spawning of grey mullet, *Mugil cephalus* L., with fractionated salmonpituitary extract. Journal of Fish Biol., Vol. 5, pp.471-478.
- Tamaru, C.S. ; Fitz Gerald, W. and Sato, V. , 1993. Hatchery manual for the artificial propagation of striped mullet (*Mugil cephalus* L). Guam aquaculture development and training center technical report. 177P.
- Tamaru, C.S. ; Kelly, C.D. ; Lee, C.S. ; Aida, K. ; Hanyu, I. and Goetz, F. , 1991. Steroid profiles during maturation and induced spawning of the striped mullet (*Mugil cephalus*). Aquaculture, Vol. 95, pp.149-168.
- Zaki, M.I. ; Mousa, M. ; Kamel, S. and Banhawy, E.L. , 1998. Effects of exogenous hormone injection on growth and maturation of *Mugil cephalus* oocytes in captivity. National Institute of Oceanography and Fisheries. Ein Shams University, Faculty of Science, Egypt. Vol. 12, pp.149-161.

An investigation on artificial reproduction of *Mugil cephalus*

Mirhashem Rostamy S.A.⁽¹⁾ ; Amini K.⁽²⁾ ; Joorjany M.⁽³⁾ ;
Ghazel H.Gh.⁽⁴⁾ and Shafae A.⁽⁵⁾

Rostamy_a@yahoo.com

1,2,3,5- Inland Waters Aquatics Stocks Research Center, P.O.Box: 139
Goorgan, Iran

4- Shahid Marjani Sturgeon Rearing Center,

Received: November 2004

Accepted: June 2005

Keywords: *Mugil cephalus*, Artificial breeding, Iran

Abstract

Cultured nine years old breeder *M. cephalus* specimens were subjected to eight artificial breeding treatments from December till February 2003. In treatments 1-5, breeders received two injections of CPH and LHRH-A₂ coupled with Domperidone or a mixture of CPH and HCG in an interval of 24 hours. Female breeders in treatments 6-8 received a gradual daily injection of 500 IU HCG per kilogram of body weight for 5 days. Male breeders in treatments 6-8 were given 5-10mg of MT- α -17 in addition to HCG and then subjected to two injections similar to that of treatments 1-5.

Results showed that male breeders in stages +2 and +3 of all treatments that had received HCG produced more milt than those injected with MT- α -17, such that each male was used 2-6 times for milting purposes. Of 27 female breeders, 22 spawned 1-2.6 million eggs among which eight females' eggs were fertilized 10-95%. Hatching rate was between 0.008 to 88.9% and a maximum of 2 million larvae were produced.

The best time for artificial breeding is December when mean egg width is ≥ 600 microns. Statistical analysis of egg width, hatching rate and larvae production showed a significant difference between treatments 1-5 and 6-8 ($p < 0.05$). This proved the supremacy of multiple injections including HCG for artificial breeding of *Mugil cephalus*.