فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال دهم، شماره اول، بهار ۱۴۰۱

مقاله پژوهشی

تعیین رسیدگی تخمک فیل‌ماهی (*Huso huso*) در شرایط برون‌تنی

بهرام فلاحتکار[۱،۲]*، محمود علیزاده ثابت[۳]

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۴۰۰

چکیده

با توجه به اهمیت بالای مولدین فیل‌ماهی و تعیین زمان مناسب القای هورمونی، مطالعه حاضر با هدف انتخاب مولدین دارای تخمک با کیفیت بالا برای تکثیر مصنوعی انجام شد. دو گروه تخمک از ۷ مولد فیل‌ماهی ماده پرورشی در معرض ۵ میکروگرم هورمون پروژسترون در میلی‌لیتر و یا بدون هورمون در محیط کشت رینگر و در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شدند. قبل و پس از این مدت، مقدار شاخص قطبیت هسته در ۱۰ عدد از تخمک‌ها تعیین شد. نتایج نشان داد موقعیت قرارگیری هسته قبل از در معرض قرارگیری به طور کلی برابر ۳/۴±۱۳/۰ و پس از کشت در محیط برون‌تنی در گروه شاهد ۴/۱±۱۱/۷ و در گروه پروژسترون ۲/۲±۹/۶ بود که اختلاف معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵). طی این مدت، حرکت هسته به سمت قطب جانوری تحت تاثیر هورمون پروژسترون ۳۱/۲ درصد بود. این مطالعه پیشنهاد می‌کند نظر به ارزش اقتصادی بالای مولدین فیل‌ماهی، از روش مذکور می‌توان برای انتخاب ماهیان مناسب جهت القای تکثیر مصنوعی استفاده کرد.

واژگان کلیدی: *فیل‌ماهی، هورمون پروژسترون، GVBD، انتخاب مولد، تکثیر مصنوعی.*

۱- استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران.
۲- استاد گروه علوم دریایی، پژوهشکده حوزه آبی دریای خزر، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۳- کارشناس ارشد شیلات، مجتمع بازسازی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی، سنگر، ایران.
* نویسنده مسئول: falahatkar@guilan.ac.ir

مقدمه

فیل‌ماهی (*Huso huso*) یکی از گونه‌های مهم پرورشی ایران محسوب می‌شود که ذخایر طبیعی آن در آب‌های دریای خزر، سیاه و آزوف وجود دارد (فلاحتکار و عفت‌پناه، ۱۳۹۵). کاهش شدید ذخایر طبیعی این ماهی که بزرگ‌ترین و ارزشمندترین گونه ماهی در آب‌های شیرین به شمار می‌آید، به دلایلی از جمله صید بی‌رویه ماهیان زیر سن بلوغ، تخریب زیستگاه‌ها و مناطق تخم‌ریزی طبیعی در رودخانه‌ها و آلودگی‌های زیست محیطی است که سبب قرارگیری این ماهی در فهرست قرمز IUCN به عنوان گونه در معرض خطر انقراض شده است (IUCN, 2020). سرعت رشد بالای این ماهی، مقاومت نسبت به عوامل استرس‌زا، دستکاری‌ها و ارزش بالای گوشت و خاویار آن موجب شده است تا بسیاری از پرورش‌دهندگان ماهیان خاویاری به این گونه توجه ویژه‌ای داشته باشند (Falahatkar et al., 2009; Falahatkar and Poursaeid, 2013).

یکی از چالش‌های اساسی در موفقیت آبزی‌پروری، تکثیر مصنوعی و کنترل شده و تامین بچه ماهی مورد نیاز به مقدار کافی است. با توجه به گسترش پرورش ماهیان خاویاری بویژه گونه فیل‌ماهی در بیشتر نقاط کشور و نظر به محدودیت مراکز تکثیر و تامین بچه ماهی، تهیه مولدین مناسب و به تعداد کافی یکی از الزامات توسعه پایدار این صنعت است.

طی سال‌های گذشته تامین مولد و بچه ماهیان مورد نیاز توسط مراکز دولتی شیلات و عمدتا از طریق صید مولدین وحشی از دریای خزر صورت می‌گرفت. اما با کاهش صید ماهیان مولد و رسیدن بسیاری از ماهیان پرورشی به سن بلوغ در مراکز دولتی و خصوصی، دسترسی به این نوع ماهیان برای تکثیر مصنوعی نیز امکان‌پذیر شده است.

با در نظر گرفتن کمبود ماهیان مولد مناسب برای تکثیر، شناسایی ماهیان برای القای هورمونی در زمان مناسب نکته‌ای بسیار بحرانی است. چرا که با از دست رفتن زمان مناسب، تخمک این ماهیان به مرحله فوق رسیدگی و آترشیا (جذب تخمک) پیش رفته و اهمیت خود را برای هدف تکثیر و یا استحصال تخمک برای خاویار از دست می‌دهد. در این بین، ضررهای اقتصادی برای پرورش دهنده و یا اختلالات فیزیولوژیک در مولدین (فلاحتکار و همکاران، ۱۳۹۷) نیز رخ خواهد داد.

در ماهیان مولد، تعیین زمان اوولاسیون (تخمک‌گذاری) به دلیل متغیرهایی مانند

وضعیت توده تخمدانی، عوامل استرس‌زا، شرایط تغذیه‌ای و محیطی قابل پیش‌بینی نیست. همچنین در مولدین پرورشی امکان دستیابی طبیعی به تخمک وجود ندارد و به تزریق هورمونی برای القای تخم‌ریزی نیاز است. روش‌های مختلفی برای تعیین وضعیت رسیدگی گناد در ماهیان خاویاری انجام شده است که در حال حاضر کاربردی‌ترین آن‌ها تعیین شاخص موقعیت هسته (GV) در تخمک و همچنین تحت تاثیر قرارگیری هسته تخمک با استفاده از استروئیدهای جنسی و تعیین شکسته و ناپدید شدن هسته تخمک (GVBD) است (Dettlaff et al., 1993). مطالعات مختلف در این باره نشان دهنده کارایی مناسب استفاده از روش برون‌تنی (In vitro) با قرارگیری تخمک‌های نمونه‌برداری شده در معرض استروئید در گونه‌های مختلف خاویاری است (طعنه و همکاران، ۱۳۹۱؛ فلاحتکار، ۱۳۹۵؛ Lutes et al., 1987؛ Conte et al., 1988؛ Mojazi Amiri et al., 2001؛ Williot, 2018).

با توجه به اهمیت اقتصادی فیل‌ماهیان مولد ماده، استفاده از یک روش کاربردی و ساده که قادر به شناسایی ماهیان مناسب و زمان تقریبی تکثیر مصنوعی آنها باشد، بسیار حائز اهمیت است. بنابراین، مطالعه حاضر با هدف آشنایی پرورش دهندگان و ارائه یک روش کاربردی ارزیابی برون‌تنی تعیین رسیدگی تخمک با استفاده از هورمون پروژسترون انجام پذیرفت.

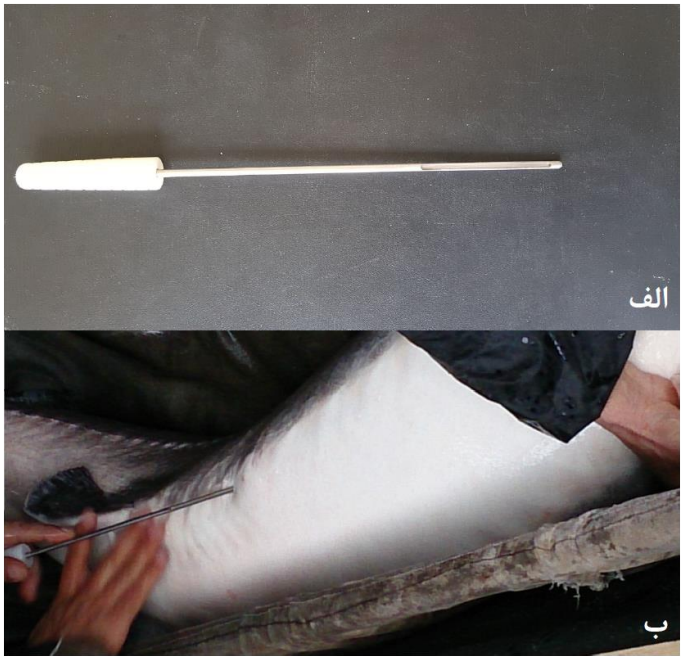
مواد و روش‌ها

ماهی و شرایط پرورش

فیل‌ماهیان (*Huso huso*) پرورشی مورد آزمایش در پژوهش حاضر حاصل تکثیر مولدین صید شده از دریای خزر و پرورش بچه ماهیان حاصل در مجتمع بازسازی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی (سنگر، گیلان) بودند که تحت شرایط کارگاه و در مخازن بتونی طی ۱۳ سال مورد پرورش قرار گرفتند. وزن این ماهیان ۴۴/۷±۵/۴ کیلوگرم بود. در این مدت ماهیان یاد شده با استفاده از غذاهای مختلف تجاری و در دسترس بر حسب نیاز و درجه حرارت آب مورد تغذیه قرار گرفتند. هر ماهی با استفاده از پلاک پلاستیکی متصل به باله علامت‌گذاری و دارای شناسنامه مشخص بود.

نمونه‌برداری و تیماربندی

پس از اطمینان از رسیدن ماهیان به سن بلوغ، از تخمدان ۷ ماهی در انتهای فصل پاییز نمونه‌برداری شد. در ابتدا، پس از خروج ماهیان از آب و قرار دادن آنها در برانکارد ثابت، ماهی یاد شده با استفاده از پلاک متصل به باله شناسایی و مقداری تخمک که در مرحله مهاجرت هسته به سمت قطب جانوری بود، نمونه‌برداری شد. به این ترتیب که ابتدا ناحیه شکمی ماهی با استفاده از الکل ضدعفونی شد و سپس پروب سوند نمونه‌برداری (شکل ۱- الف) بین پلاک‌های ۳ و ۴ شکمی از سمت ناحیه دم ماهی و با زاویه حدود ۳۰ درجه نسبت به بدن به میزان تقریبی ۱۵-۱۲ سانتی‌متر وارد تخمدان شد و با چرخش ۳۶۰ درجه سوند تعداد ۲۰-۱۵ عدد تخمک از تخمدان ماهی در شیار سوند جای گرفت و نهایتا از بدن خارج شد (شکل ۱- ب). محل سوند به وسیله بتادین ضدعفونی و ماهی سریعا به حوضچه پرورش بازگردانده شد (Falahatkar et al., 2013).



شکل ۱: الف) پروب سوند مورد استفاده برای نمونه‌برداری از تخمدان ماهیان خاویاری. ب) نحوه نمونه‌برداری و محل سوندزنی در فیل‌ماهی (*Huso huso*) مولد

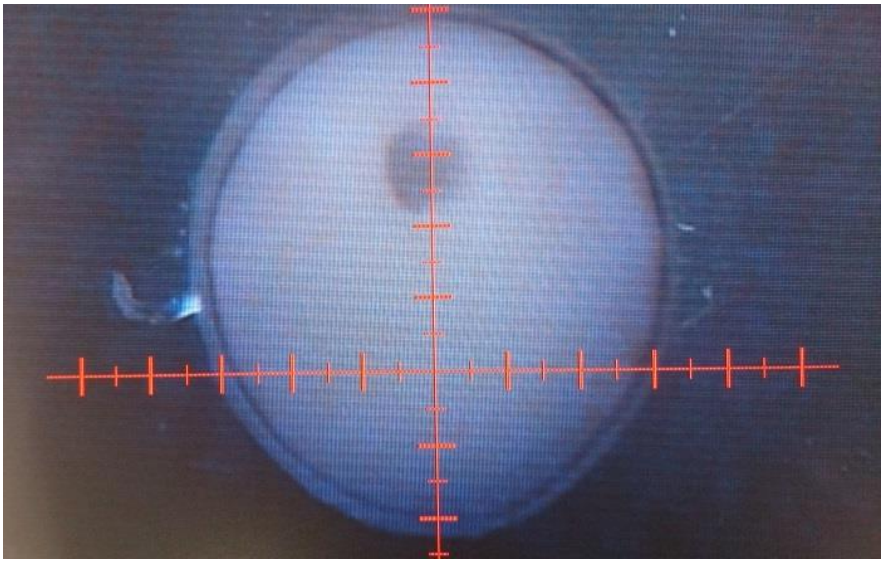
تخمک‌های نمونه‌برداری شده با دقت از شیار سوند خارج و پس از شستشو با سرم فیزیولوژی وارد ظرف نمونه‌برداری حاوی محیط کشت رینگر (حاوی ۱۴۷ میلی‌اکی‌والان در لیتر یون سدیم، ۱۵۵ میلی‌اکی‌والان در لیتر یون کلر، ۴ میلی‌اکی‌والان در لیتر یون پتاسیم و ۴ میلی‌اکی‌والان در لیتر یون کلسیم) شده و کدگذاری شدند. قبل از انکوباسیون، از ۸-۷ عدد تخمک هر کدام از ماهیان پس از جوشاندن ۱۰ دقیقه‌ای در بوته چینی و سرد کردن، به وسیله تیغ برشی طولی از قطب جانوری به قطب گیاهی تهیه و موقعیت هسته (GV) با استفاده از رابطه ۱ تعیین شد (شکل ۲) (Chapman and Van Eenennaam, 2007).

رابطه ۱:

$$GV = AP / ED$$

AP: فاصله بین بالای هسته تا قطب جانوری؛ ED: قطر تخمک.

برای تهیه محلول پروژسترون (داروسازی ابوریحان، ایران)، مقدار ۵ میکروگرم هورمون پروژسترون در میلی‌لیتر محلول رینگر حل و به عنوان محلول استوک هورمونی که باید به صورت تازه آماده می‌شد، در نظر گرفته شد.



شکل ۲: موقعیت هسته در تخمک و تعیین فواصل مربوطه

در مجموع، دو تیمار شاهد و هورمونی با ۷ تکرار برای این کار درنظر گرفته شد. نمونه‌های تخمک هر ماهی به دو بخش تقسیم و در چاهک‌های مخصوص پلیت‌های آزمایشگاهی حاوی محلول شاهد (رینگر) و یا محلول رینگر حاوی پروژسترون قرار داده شدند. سپس این پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت نگهداری شدند. با اتمام مدت زمان انکوباسیون، نمونه‌ها از محلول‌ها خارج و در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند. پس از ۴۸ ساعت، نمونه‌ها با روش یاد شده جوشانده و برش داده شدند تا میزان مهاجرت هسته مورد بررسی قرار گیرد (فلاحتکار، ۱۳۹۵؛ Conte et al., 1988؛ Chapman and Van Eenennaam, 2007).

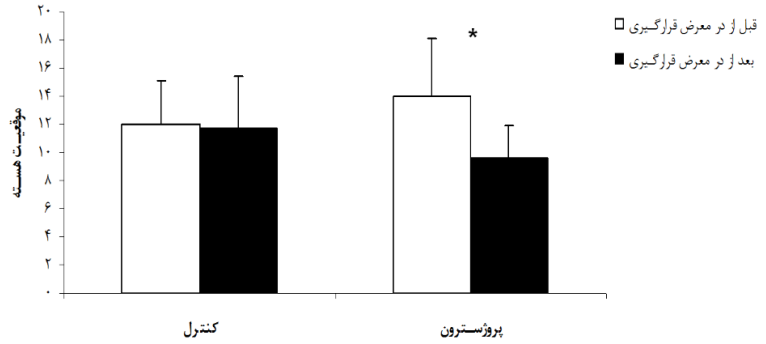
تجزیه و تحلیل آماری

با اطمینان از شروط همگنی واریانس‌ها به وسیله آزمون Levene و نرمال بودن داده‌ها از طریق آزمون Kolmogorov-Smirnov، داده‌های کسب شده مربوط به قبل و پس از قرارگیری تخمک ماهیان در معرض محلول‌های حاوی پروژسترون و یا بدون آن مورد مقایسه قرار گرفتند. برای این کار از آزمون T نمونه‌های مستقل (Independent Samples T-test) در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. برای تعیین رابطه خطی بین موقعیت هسته قبل و پس از قرارگیری در معرض محلول‌های یاد شده، از نرم‌افزار Microsoft Excel 2010 استفاده شد. نرم‌افزار مورد استفاده در تجزیه و تحلیل آماری، SPSS نسخه ۲۲ (IBM، آمریکا) بود و داده‌ها در متن به صورت میانگین ± انحراف معیار آورده شده است.

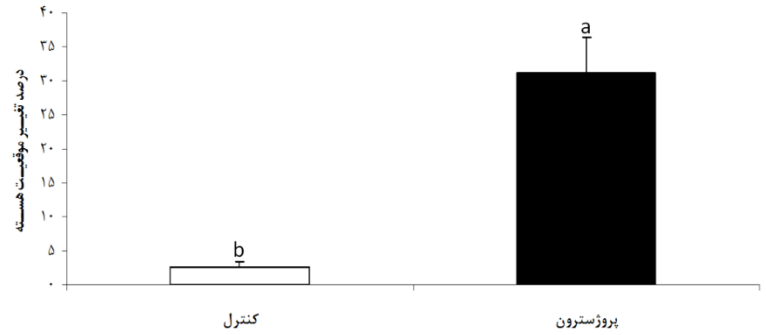
نتایج

اندازه‌گیری شاخص موقعیت هسته تخمک (GV) در قبل از قرارگیری در معرض تیمارها نشان داد که این مقدار به طور کلی در محدوده ۷/۱ تا ۱۸/۹ و به طور میانگین ۳/۴±۱۳/۰ بود. با مقایسه تیمارهای شاهد و پروژسترون در قبل و پس از در معرض قرارگیری، نتایج نشان داد که این مقدار در تیمار شاهد به ۴/۱±۱۱/۷ و در تیمار پروژسترون به ۲/۲±۹/۶ رسید (شکل ۳). تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها حاکی از کاهش معنی‌دار موقعیت GV در تخمک‌های قرار گرفته در معرض پروژسترون بود (P<۰/۰۰۱؛ F=۳/۱۱۷؛ df=۵۷)، اما این اختلاف در تیمار شاهد دیده نشد (P=۰/۰۶۷؛ F=۰/۳۱۵؛ df=۳۴).

با قرارگیری تخمک‌ها در معرض تیمار پروژسترون مشخص شد که میزان حرکت هسته در تخمک از ۱۴/۰±۳/۷ به ۹/۶±۲/۲ رسید که گویای ۳۱/۲ درصد حرکت هسته در طی این مدت است (شکل ۴). از این رو، اثرگذاری هورمون پروژسترون را به وضوح نشان می‌دهد (df=۲ ؛F=۵۶/۳۱۰ ؛P=۰/۰۱۷)، اما در هیچ نمونه‌ای سبب شکسته و ناپدید شدن هسته تخمک (GVBD) نشد.



شکل ۳: مقایسه میانگین موقعیت هسته تخمک فیل‌ماهی (*Huso huso*) در قبل و پس از قرارگیری در معرض محلول‌های شاهد و هورمون پروژسترون. علامت ستاره نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین موقعیت هسته، قبل و پس از قرارگیری در معرض هورمون پروژسترون است (P<۰/۰۵).

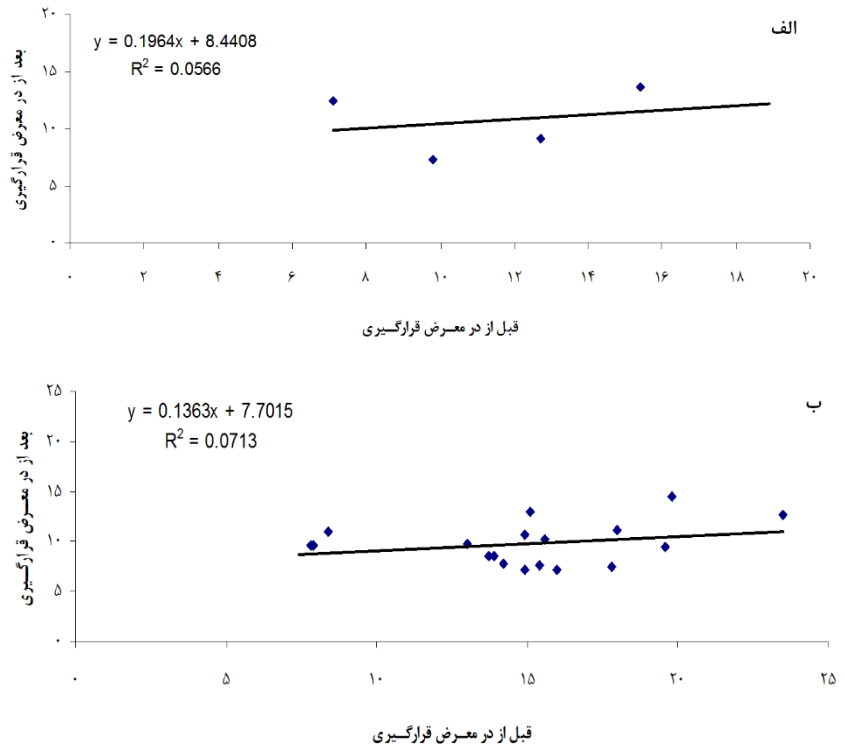


شکل ۴: مقایسه درصد تغییر موقعیت هسته تخمک فیل ماهی (*Huso huso*) در قبل و پس از قرارگیری در معرض محلول‌های شاهد و هورمون پروژسترون. حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین درصد تغییر موقعیت هسته پس از قرارگیری در معرض تیمارها است (P<۰/۰۵).

همچنین همبستگی معنی‌داری بین موقعیت هسته قبل و پس از قرارگیری در معرض محلول شاهد و یا پروژسترون دیده نشد (شکل ۵).

بحث

درک مناسب از وضعیت مولدین ماهیان خاویاری مستلزم مطالعات گسترده درباره چرخه تولیدمثلی و اثرگذاری هورمون‌های مختلف در محیط کشت برون‌تنی بر وضعیت تخمک و مرحله رسیدگی در هنگام نزدیکی به زمان تولیدمثل است. به این دلیل، معرفی روش‌ها و استفاده از ابزارهای کاربردی که بتوانند به شناسایی مولدین مناسب برای تکثیر مصنوعی و یا تولید خاویار بپردازند بسیار حائز اهمیت است.



شکل ۵: رابطه همبستگی موقعیت هسته تخمک فیل‌ماهی (*Huso huso*) در قبل و پس از قرارگیری در معرض محیط کنترل (الف) و با هورمون پروژسترون (ب)

مطالعه حاضر نشان داد هنگامی که تخمک فیل‌ماهیان پرورشی در معرض هورمون پروژسترون قرار می‌گیرد، می‌تواند باعث القای مهاجرت GV به سمت قطب جانوری شود، به طوری که این میزان حرکت ظرف ۱۸ ساعت معادل ۳۱/۲ درصد ثبت شد. با توجه به این که مقدار و نوع هورمون مورد استفاده نتوانست سبب ایجاد GVBD شود، به نظر می‌رسد عواملی مانند فصل نمونه‌برداری، موقعیت مرکزی هسته در تخمک، تاثیرپذیری کم تخمک نسبت به هورمون پروژسترون و مقدار مورد استفاده از عوامل تاثیرگذار بر روی این مسئله باشند. بنابراین، نمونه‌برداری در زمان‌های مختلف سال و آزمودن دیگر هورمون‌های القا کننده مرحله نهایی رسیدگی بویژه ۱۷- آلفا دی‌هیدروکسی پروژسترون (DHP) و یا مقادیر دیگر احتمالا بتواند نتایج متفاوتی را در پی داشته باشد. اصول این آزمون بر مبنای قرارگیری تخمک در معرض پروژسترون به عنوان یک پتانسیل هورمونی رسیدگی نهایی بود که سبب از سرگیری میوز پس از کامل شدن ویتلوژنز می‌شود (Dettlaff et al., 1993). با این حال، به نظر می‌رسد در بسیاری از گونه‌های خاویاری، هورمون DHP یکی از هورمون‌های مهم رسیدگی نهایی در مقایسه با پروژسترون محسوب می‌شود (Lutes et al., 1987).

باید به این نکته توجه داشت که قرارگیری هسته در موقعیت مرکزی تخمک سبب عدم پاسخ دهی به هورمون‌ها می‌شود. از این رو، این امر باید با شروع مهاجرت هسته به سمت قطب جانوری مورد سنجش قرار گیرد. به همین ترتیب، القای هورمونی چنین ماهیانی نیز سبب شکست در اوولاسیون و از دست دادن مولدین خواهد شد.

محیط‌های کشت مختلفی برای اهداف متفاوت توسط پژوهشگران مورد آزمایش قرار گرفته است. برخی از این محیط‌ها شامل یک محیط کشت با چند جزء پیچیده به نام Lebovitz (L-15) در ایالات متحده (Lutes, 1985; Lutes et al., 1987; Conte et al., 1988; Webb et al., 2000) و یک محیط کشت که بر پایه ترکیب یونی خون ماهیان خاویاری (SIS) در فرانسه استفاده شده است (Williot et al., 1991) می‌شود. طبق نتایج به دست آمده از این دو محیط کشت، درصد GVBD ناشی از پروژسترون در این گروه‌ها به طور قابل توجهی متفاوت بود و این ویژگی به عنوان ملاکی برای پیش‌بینی موفقیت تولیدمثل ماده‌ها ارائه شده است (Lutes et al., 1987;

Williot et al., 1991). با این وجود، در آزمایش‌هایی که بر روی ازون‌برون (*Acipenser stellatus*) انجام شد، مشخص شد که این ویژگی، به دلیل پاسخ حداکثری اووسیت‌ها به پروژسترون، نمی‌تواند برای تمایز بیشتر ماده‌ها مورد استفاده قرار گیرد. در برخی از مطالعات، عدم پاسخ فولیکول‌های تاس‌ماهی سیبری (*Acipenser baerii*) به عصاره هیپوفیز کپور (Williot, 1997) و یا بروز بسیار کم اوولاسیون تاس‌ماهی سفید (*Acipenser transmontanus*) در محیط برون‌تنی در حضور محلول گنادوتروپیک یا پروژسترون مشاهده شد (Lutes, 1985). در حالی که، در مطالعات دیگری بر روی فولیکول‌های ازون‌برون و تاس‌ماهی روسی (*Acipenser gueldenstaedtii*)، اوولاسیون نزدیک به ۱۰۰ درصد گزارش شد. همچنین اختلاف مشخصی در نتایج مقایسه فعالیت‌های گنادوتروپیک ماهیان خاویاری و محلول‌های عصاره هیپوفیز کپور و گنادوتروپین‌های خالص استفاده شده در سنجش رسیدگی اووسیت ماهیان خاویاری در محیط برون‌تنی مشاهده شده است (Doroshov and Lutes, 1984; Lutes, 1985; Goncharov et al., 2002).

با آزمایش هورمون‌های مختلف بر روی GVBD ماهی بستر (*Huso huso* × *Acipenser ruthenus*) مشخص شد مناسب‌ترین هورمون برای این امر DHP با غلظت ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر بود (Mojazi Amiri et al., 2001)، در حالی که به نظر می‌رسد در سایر گونه‌ها هورمون‌های دیگر و با غلظت‌های متفاوت باید در نظر گرفته شود (Lutes, 1985). این اختلافات می‌تواند ناشی از نوع گونه، تفاوت در وضعیت فیزیولوژیک، تفاوت در فعالیت محلول‌های گنادوتروپیک و همچنین شرایط انکوباسیون فولیکول (مانند ترکیبات محیط کشت) باشد.

نوع محیط کشت مورد استفاده تاثیر زیادی بر شناسایی مولدین دارد. به تازگی مشخص شده است که بهترین محلول برای این هدف SIS است که نسبت به محلول L-IS و بویژه رینگر دارای کارایی بالاتری است (Williot, 2018). حتما به pH محلول که باید بین ۹-۸ و اسمولالیته که بین ۳۰۰-۲۶۰ میلی‌اسمول در لیتر باشد نیز باید توجه داشت.

برخی مطالعات نشان داده‌اند همبستگی معنی‌داری بین میزان GV و شاخص GVBD وجود ندارد. در مطالعه حاضر بر روی فیل‌ماهی نیز همبستگی مشخصی بین موقعیت GV قبل

و پس از قرارگیری در معرض هورمون مشاهده نشد. Williot و همکاران (۱۹۹۱) با استفاده از هورمون DHP در تاس‌ماهی سیبری ملاحظه کردند که استفاده از GV به تنهایی کافی نیست و GVBD شاخص مناسب‌تری برای ارزیابی مولدین محسوب می‌شود. نتایج مطالعه Lutes و همکاران (۱۹۸۷) نشان دهنده رابطه معنی‌دار پاسخ مولدین به هورمون تراپی با میزان GV، قطر تخمک، پاسخ GVBD و مقدار هورمون DHP پلاسما است. همچنین طعنه و همکاران (۱۳۹۱) با مطالعه بر روی مولدین تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) اشاره داشتند که در برخی مولدین با GV بالای ۰/۰۷ رسیدگی به خوبی القاء شد و عملکرد تولید مثلی مناسبی در مولدین مشاهده شد. این در حالی بود که در برخی مولدین با GV پایین ۰/۰۷، رسیدگی، اوولاسیون و کارایی تولیدمثل پایین بود. آنها همبستگی بالایی را بین شاخص GVBD و درصد لقاح و بازماندگی انکوباسیونی گزارش کردند.

با وجود این که تعیین موقعیت GV یکی از شاخص‌های مهم در شناسایی مولدین مناسب محسوب می‌شود، اما عواملی مانند مرحله پایین رسیدگی جنسی (موقعیت میانی هسته تخمک) و یا استرس‌های ناشی از صید و نگهداری می‌توانند سبب شکست در اوولاسیون شوند. بر خلاف تعیین موقعیت GV، ارزیابی برون‌تنی رسیدگی تخمک شاخصی قابل اطمینان بویژه در تعیین ماهیان در مرحله میانی GV که مناسب تکثیر نیستند، است.

با توجه به نتایج یاد شده، به نظر می‌رسد استفاده از محلول‌هایی مانند L15 و یا رینگر نتایج واقعی‌تری را در هنگام استفاده از پروژسترون برای تعیین درجه رسیدگی تخمک ماهیان خاویاری از جمله فیل‌ماهی نشان دهد. بنابراین، پیشنهاد می‌شود در کنار بررسی‌های زمانی شاخص GV با استفاده از نمونه‌برداری‌ها، نسبت به تعیین درجه رسیدگی تخمک و شاخص GVBD برای مشخص کردن زمان تکثیر و عدم از دست دادن تخمک‌های مناسب تکثیر در مولدین فیل‌ماهی استفاده شود، چرا که روشی ساده با امکانات مورد نیاز محدود و کارایی بالا تلقی می‌شود و نسبت به تعیین صرفا GV دارای اولویت و قابلیت بیشتری است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مدیریت مجتمع بازسازی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی و همکاری کلیه عزیزانی که در طی

این پژوهش یاری‌رسان ما بودند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

طعنه ب.، ابطحی ب. و نظری ر.م. ۱۳۹۱. بررسی شاخص رسیدگی نهایی تخمک (GVBD) در تاس‌ماهی ایرانی در شرایط In vitro به عنوان معیار انتخاب مولد. زیست‌شناسی جانوری تجربی، ۱: ۴۳-۳۳.

فلاحتکار ب. ۱۳۹۵. دستور العمل مراکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری (ترجمه). انتشارات آموزش تحقیقات کشاورزی. ۳۲۸ص.

فلاحتکار ب. و عفت‌پناه ا. ۱۳۹۵. بیولوژی و فیزیولوژی ماهیان خاویاری دریای خزر. انتشارات دانشگاه گیلان. ۲۴۷ص.

فلاحتکار ب.، خدابخشی ل. و فرامرزپور س. ۱۳۹۷. روند تغییرات استروئیدهای جنسی و شاخص‌های بیوشیمیایی خون استرلیاد پرورشی (*Acipenser ruthenus*) طی مرحله جذب تخمک. مجله پژوهش‌های جانوری، ۳۱: ۱۰۵-۹۳.

Chapman F.A. and Van Eenennaam J.P. 2007. Sturgeon aquaculture-specialized techniques determining the stage of sexual maturity in female sturgeon for artificial spawning: The egg polarization index or PI. IFAS Extension, University of Florida. P: 1–4 (FA153).

Conte F.S., Doroshov S.I., Lutes P.B. and Strange E.M. 1988. Hatchery Manual for the White Sturgeon (*Acipenser transmontanus* Richardson): With Application to Other North American Acipenseridae. UCANR Publications, USA. 104P.

Dettlaff T.A., Ginsburg A.S. and Schmalhausen O.I. 1993. Sturgeon Fishes: Developmental Biology and Aquaculture. Springer, Germany. 300P.

Doroshov S.I. and Lutes P.B. 1984. Preliminary data on the induction of ovulation in the white sturgeon (*Acipenser transmontanus* Richardson). Aquaculture, 38: 221–227.

Falahatkar B. and Poursaeid S. 2013. Stress responses of great sturgeon *Huso huso* subjected to husbandry stressors. Aquaculture International, 21: 947–959.

Falahatkar B., Akhavan S.R., Abbasalizadeh A. and Tolouei M.H. 2013. Sex identification and sexual maturity stages in farmed great sturgeon, *Huso huso* L. through biopsy. Iranian Journal of Veterinary Research, 14: 133–139.

Falahatkar B., Poursaeid S., Shakoorian M. and Barton B. 2009. Responses to handling and confinement stressors in juvenile

great sturgeon *Huso huso*. Journal of Fish Biology, 75: 784–796.

Goncharov B.F. 2002. In vitro approach to studying the mechanisms of oocyte maturation in sturgeons: A review of fundamental and applied aspects. Journal of Applied Ichthyology, 18: 368–374.

IUCN. 2020. Red List of Threatened Species. Retrieved December 01, 2020, from www.iucnredlist.org.

Lutes P.B. 1985. Oocyte maturation in white sturgeon, *Acipenser transmontanus*: Some mechanisms and applications. P: 87–92. In: Binkowski F.P. and Doroshov S.I. (Eds.). North American Sturgeons: Biology and Aquaculture Potential. Springer, Netherlands.

Lutes P.B., Doroshov S.I., Chapman E., Harrah J., Fitzgerald R. and Fitzpatrick M. 1987. Morpho-physiological predictors of ovulatory success in white sturgeon, *Acipenser transmontanus* Richardson. Aquaculture, 66: 43–52.

Mojazi Amiri B., Maebayashi M., Omoto N., Adachi S. and Yamauchi K. 2001. In vitro oocyte maturation in a hybrid sturgeon, Bester: Changes in the germinal vesicle breakdown and 17,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one production. Journal of Agriculture Science and Technology, 3: 199–207.

Webb M.A.H., Van Eenennaam J.P. and Doroshov S.I. 2000. Effects of steroid hormones on in vitro oocyte maturation in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). Fish Physiology and Biochemistry, 23: 317–325.

Williot P. 1997. Effects of incubation media on maturation of isolated ovarian follicles of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt) induced by sturgeon gonadotropic preparation or 17a,20b-dihydroxyprogesterone. Comparative Biochemistry and Physiology (C), 118: 285–293.

Williot P. 2018. In vitro incubation of ovarian follicles of cultured Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* Brandt: A short practical implementation and its fundamentals. P: 519–528. In: Williot P., Nonnotte G., Vizziano-Cantonnet D. and Chebanov M. (Eds.). The Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869), Vol. 2: Farming. Springer, Switzerland.

Williot P., Brun R., Rouault T. and Rooryck O. 1991. Management of female spawners of Siberian sturgeon, *Acipenser baeri* Brandt: First results. P: 365–379. In: Williot P. (Ed.). Acipenser. Cemagref Publication, France.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 10, No. 1, Spring 2022

Research Paper

In vitro approach to determine oocyte maturation in beluga sturgeon (*Huso huso*)

Bahram Falahatkar[1,2]*, Mahmoud Alizadeh Sabet[3]

Received: May 2021 Accepted: June 2021

Abstract

Due to the high importance of beluga sturgeon breeders and to determine the appropriate time for hormonal induction, the present study was performed with the aim of selecting the breeders with high quality eggs for artificial reproduction. Two groups of eggs from 7 female beluga were incubated with 5 µg of progesterone per mL or hormone-free group in Ringer medium at 16°C for 18 hours. Pre- and post-exposure, the germinal vesicle migration (GVM) index was determined in 10 oocytes. The results showed that the GV position was 13.0±3.4 pre-treatment and changed after in vitro culture of oocytes in control and progesterone groups to 11.7±4.1 and 9.6±2.2, respectively, which showed a significant difference. During this period, the GVM exposed to progesterone was determined to be 31.2% closer to the animal pole. This study suggests that due to high economic value of beluga breeders, this method can be used to select suitable fish to induce artificial reproduction.

Key words: *Beluga Sturgeon, Progesterone, GVBD, Broodstock Selection, Artificial Propagation*.

1- Professor in Fisheries Department, Faculty of Natural Resource, University of Guilan, Sowmeh Sara, Iran.
2- Professor in Department of Marine Sciences, The Caspian Sea Basin Research Center, University of Guilan, Rasht, Iran.
3- M.Sc. in Fisheries, Shahid Dr. Beheshti Sturgeon Fishes Restoration and Genetic Conservation Complex, Sangar, Guilan, Iran.

*Corresponding Author: falahatkar@guilan.ac.ir