وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور – مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آبهای داخلی

عنوان :

بررسی علل تلفات لارو ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus* L.) و دستیابی به بچه ماهیان انگشت قد

مجری:

سید امین میرهاشمی رستمی

شماره ثبت

٤٣٦٣٣

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آبهای داخلی

عنوان پروژه : بررسی علل تلفات لارو ماهی کفال خاکستری(*Mugil cephalus* L.) و دستیابی به بچه ماهیان انگشت قد

شماره مصوب پروژه : ۹۱۱۵۰-۱۲-۷۷-۲

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : سید امین میرهاشمی رستمی

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -

نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : سید امین میرهاشمی رستمی

نام و نام خانوادگی همکار(ان) : حسینعلی خوشباور رستمی ، عبدالحلیم آخوندی ، محمود سقرلی ، مریم جرجانی ، محمد بینایی ، محمد ایری ، عظیم بردی طریک ، قیوم شافعی

نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -

نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -

محل اجرا : استان گلستان

تاریخ شروع : ۹۱/۶/۱

مدت اجرا : ۱ سال و ۶ ماه

ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار : سال۱۳۹۳

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

پروژه : بررسی علل تلفات لارو ماهی کفال خاکستری(*Mugil cephalus* L.) و دستیابی به بچه ماهیان انگشت قد

کد مصوب : ۹۱۱۵۰-۱۲-۷۷-۲

شماره ثبت (فروست) : ٤٣٦٣٣ تاریخ : ۱۳۹۲/۷/۲۰

با مسئولیت اجرایی جناب آقای سید امین میرهاشمی رستمی‌دارای مدرک تحصیلی کارشناسی ارشد در رشته شیلات می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش اصلاح نژاد و تکثیر و پرورش آبزیـــان در تاریخ ۹۲/۶/۲۰ مورد ارزیابی و با رتبه خوب تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده □ مرکز■ ایستگاه□

با سمت کارشناس در مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آبهای داخلی مشغول بوده است.

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱- مقدمه ۲
۲- مواد و روشها ۴
۲-۱- عملیات اولیه جهت آماده سازی مولدین برای تکثیر مصنوعی ۴
۲-۲- تکثیر مصنوعی ۵
۲-۳- تزریق مولدین ماده ۶
۲-۴- تزریق مولدین نر ۷
۲-۵- تعیین درصد لقاح و جمع آوری تخمها و انکوباسیون و درصد تفریخ ۷
۲-۶- پرورش لارو ۹
۲-۷- تغذیه لارو ۱۲
۲-۸- آزمایش استرس جهت انتقال فرای به استخر ۱۶
۲-۹- زیست سنجی لاروها و بچه ماهیان ۱۷
۳- نتایج ۱۹
۳-۱- بررسی توزیع فراوانی وزنی و طولی مولدین نرو ماده ۱۹
۳-۲- بررسی تغییرات قطر تخمکها برای تعیین زمان تکثیر مصنوعی ۲۱
۳-۳- نتایج حاصل از تکثیر مصنوعی مولدین ماده کفال خاکستری ۲۲
۳-۴- نتایج حاصل از تکثیر مصنوعی مولدین نر کفال خاکستری ۲۵
۳-۵- بررسی نتایج حاصل از کشت جلبک *Nannochloropsis oculata* ۲۵
۳-۶- بررسی نتایج حاصل از کشت روتیفر *Brachionus plicatilis* ۲۵
۳-۷- زیست سنجی بچه ماهیان پس از تفریخ تخم ۲۵
۳-۸- زیست سنجی بچه ماهیان قبل از ورود به استخر گلخانه ۲۵
۳-۹- زیست سنجی ماهیان در هنگام انتقال به استخرخاکی ۲۶
۴- بحث و نتیجه گیری ۲۷
منابع ۳۱
چکیده انگلیسی ۳۲

چکیده

در این مطالعه مولدین پرورشی نه ساله کفال خاکستری *Mugil cephalus* از روش تحریک های هورمونی به طور مصنوعی تکثیر شدند . هشت سری آزمایش تکثیر مصنوعی درطول سه ماه (آبان تا اسفند ماه) انجام گردید . مولدین آزمایش های ۵-۱ از روش دو تزریقی به فاصله زمانی ۲۴ ساعت تزریق گردیدند . مولدین ماده آزمایش های ۸-۶ ابتدا از روش تزریق تدریجی ، روزانه به مدت ۵ روز به میزان ۵۰۰ واحد بین المللی به ازای هر کیلو وزن بدن HCG دریافت نمودند و به همین منوال ، مولدین نر علاوه بر HCG هورمون ۱۷-آلفا ـ متیل تستوسترون به میزان ۱۰-۵ میلی گرم به ازای هر کیلو وزن بدن تزریق شدند و سپس از طریق روش دو تزریقی توسط هورمون ها تحریک گردیدند . در مجموع در این هشت سری آزمایش های تحریک مصنوعی ۲۷ عدد مولد ماده به کار گرفته شدند که ۲۲ عدد از آنها اقدام به تخمریزی نمودند (یک میلیون تا ۶/ ۲ میلیون تخم تولید نمودند) . تخم هشت قطعه مولد لقاح یافته که درصد لقاح ۹۵-۱۰ درصد و درصد تخمه گشایی ۹/ ۸۸-۰۰۸ / ۰ درصد برآورد گردید .

همچنین از این تعداد مولد ، شش سری لارو از ۱۱۷ تا ۲ میلیون لارو تولید گردید . در طی عملیات تکثیر ، دمای آب ۲۳-۲۰ درجه سانتی گراد و شوری ۳۲ در هزار ثابت نگه داشته شدند .

در مورد پرورش لاروهای تولیدی دو تکرار صورت پذیرفت . تراکم نهایی کشت لاروها ۲۰ قطعه در هر لیتر ، درجه حرارت آب ۲۴-۲۲ سانتی گراد و شوری۳۳-۳۲ در هزار در نظر گرفته گردید . غدادهی لاروها از روز دوم و از جلبک *Nannochloropsis oculata* با تراکم ۵۰۰۰۰۰ سلول در هر میلی لیتر و روتیفر گونه *Brachionus plicatilis* با تراکم ۲۰ قطعه در هر میلی لیتر و نائوپلی آرتمیا با تراکم ۲۰۰-۳ قطعه در هر لیتر و همچنین غذای دستی ۵۰۰، ۳۰۰، ۱۰۰ میکرون استفاده گردید . تعویض آب در هفته اول ده درصد حجم تانک ، در هفته دوم ۳۰-۲۰ درصد و درهفته های بعد ۵۰-۴۰ درصد به صورت روزانه انجام می گردید.

در تکرار اول که از ده تانک مدور پرورشی با حداکثر عمق آبگیری ۸۰ سانتی متر استفاده گردید که کلیه لاروها پس از ۱۲ روز از بین رفتند ، درحالیکه در سری دوم آزمایش پرورش از سه تانک ۴ تنی سیاه رنگ فایبرگلاس با عمق آبگیری ۱۰۰ سانتی متر استفاده گردید که درصد بازماندگی آن پس از ۵۵ روز ۰/۹درصد برآورد گردید .

کلمات کلیدی: کفال خاکستری، *Mugil cephalus* ، تلفات، تکثیر، انگشت قد

۱- مقدمه

روند نزولی صید آبزیان از ذخایر طبیعی و افزایش تقاضا نسبت به پروتئین با منشاء دریایی متخصصین علوم زیستی شیلاتی را با این حقیقت مواجه می کند که یکی از راهکارهای اساسی جهت پاسخ به این نیاز ، معرفی گونه های آبزی جهت تکثیر و پرورش می باشد .

ماهی کفال خاکستری با نام علمی *Mugil cephalus* یکی از ماهیان با ارزش تجاری بسیارمهم می باشد که پراکنش آن در آبهای ساحلی بین عرض های جغرافیایی ۴۰درجه شمالی و ۴۰ درجه جنوبی گزارش شده است (Tamaru et al ., 1993) به دلیل شرایط مناسب جهت پرورش ، مقاومت زیاد در برابر دامنه وسیعی ازدرجه حرارت و شوری ، pH ،ضریب رشد خوب ، ضریب تبدیل غذایی مناسب ، بازارپسندی عالی ، امکان پرورش بصورت(Polyculture) پلی کالچر با میگو ، خامه ماهی وحتی کپور ماهیان به عنوان یکی از بهترین گونه های ماهیان دریایی پرورشی در سراسر جهان به شمار می آید و در نواحی متعددی از دنیا مانند اروپا ، آفریقای شمالی ، اسرائیل ، هند ، پاکستان ، ژاپن ، هنگ کنگ ، تایوان، ویتنام ، اندونزی ، کشورهای ساحلی اقیانوس آرام جنوبی و هاوایی پرورش می یابد .

فصل تولید مثل این گونه در شرایط اقلیمی شمال کشور در ماههای سرد سال (آذر تا اسفند) می باشد .این گونه در این فصول به آبهای باز اقیانوسی مهاجرت کرده و در اکثر مواقع از سال در رودخانه ها ، دریاچه ها ، مصب دارای آب لب شور ، خلیج ها و تالابها یافت می شوند و می توان مولدین نر و ماده بالغ را اغلب به هنگام مهاجرت تولید مثلی از مصب به قسمتهای باز دریا صید کرد . فرای Fry و افراد جوان بطورمعمول در مصب ها و تالابهای دارای آب های لب شور زندگی می کنند و پرورش آن گونه با توجه به فن آوری مطمئن جهت تکثیر مصنوعی این گونه در دو دهه قبل باز وابسته به جمع آوری بچه ماهیان از آبهای ساحلی می باشد . روش های تکثیر کنترل شده کفال خاکستری در سی سال اخیر در حال رشد و نمو بوده است ، اما فن آوری مطمئن که منتج به رشد و نمو مناسب و درصد بقاء بالا گردد ، هنوز در بسیاری از کشورها وجود ندارد(Harel et al . , 1998).

این ماهیان درحالت اسارات دارای بلوغ جنسی کامل می باشند اما قادر به تخمریزی نمی باشند که علت آن می تواند کمبود هورمونهای گنادو تروپین باشد ، بنابراین تولید تخمهای لقاح یافته در این حالت منوط به تخمریزی و اسپرم ریزی با القاءهورمونی می باشد (Tamaru et al .,1993). استفاده از انواع هورمونها برای کنترل فعالیت تولید مثلی ماهیان استخوانی هم اکنون یکی از اعمال پذیرفته شده در آبزی پروری می باشد (Lam.,1982, Donaldson and Hunter, 1983).

امروزه با توجه به منابع آب لب شور و شور در نواح ساحلی شمال و جنوب ونیز استانهای مرکزی در کشور و همچنین زمین های نامرغوب و کم بازده از نظر کشاورزی که برای پرورش این گونه مناسب تشخیص داده شده است ، دسترسی به منابع غذایی ارزان قیمت جهت تغذیه و ... محققین علوم شیلاتی کشور را بر آن داشت که

این ماهی را به عنوان یک گونه پرورشی آبهای شور داخلی معرفی نمایند . لذا با توجه به اهیمت این گونه و بومی نبودن آن در کشورمان در سال ۱۳۷۲ مؤسسه تحقیقات شیلات ایران با مدیریت مرکز تحقیقات مازندران تعداد بیست هزار قطعه فرای آن به وزن حدو ۰/۵ گرم از کشور هنک کنگ وارد کرده و سپس آنها در کارگاه گمیشان پرورش یافتند (قانعی ، ۱۳۸۰) .

پس از کسب نتایج موفقیت آمیز در امر پرورش ماهی کفال خاکستری در کشورمان و وجود ذخایر مولدین بالغ و رسیده در استخرهای خاکی کارگاه گمیشان ، کارشناسان را بر آن داشت که بتوانند فن آوری زیستی تکثیر مصنوعی این گونه را بدست آورند که موفقیت هایی نیز حاصل گردید (قانعی ، ۱۳۸۰) . اما با توجه به اینکه این گونه در شرایط پرورش و اسارت نمی تواند بدون تزریق هورمونی تخمریزی و یا اسپرم ریزی نماید ، لذا در این پروژه سعی گردید با بکارگیری هورمونهای مناسب وهمچنین نحوه و میزان و مدت زمان بکارگیری آنها و بررسی تغییرات فیزیولوژیک اقدام به تحریک رسیدگی نهایی مولدین و اوولاسیون و اسپرم ریزی آنان نمود و سپس بتوان به فن آوری استفاده از هورمونها جهت تکثیر مصنوعی کفال خاکستری و تولید لارو در شرایط کشورمان دست یافت . زیرا افزایش تقاضابری فرای وحشی درطول سالهای گذشته و همچنین آلودگی محیط زیست باعث کاهش شدید ذخایر طبیعی این گونه گردیده است . به همین جهت توسعه یک دستورالعمل ، جهت تولید انبوه فرای در بسیاری از نقاط دنیا ضروری به نظر می رسد (Harel et al ., 1998).

در این باره تامارو و همکاران در سال ۱۹۹۳ اظهار داشتند که توسعه راهکار مطمئن جهت پرورش انبوه لارو ماهی یکی از متصویرات اساسی برای تکثیر موفقیت آمیز گونه های زیای از ماهیان دریایی می باشد.

۲- مواد و روشها

۲-۱- عملیات اولیه جهت آماده سازی مولدین برای تکثیر مصنوعی :

جهت این پژوهش ، مولدین پرورشی نه ساله این ماهی در مرکز میگوی گمیشان واقع در شمال شهرستان گمیشان انتخاب شدند . در تاریخ ۸۲/۳/۲۲ از ذخیره مولدین موجود ، تعداد ۳۰۰ قطعه مولد نرو ماده توسط تور پره (تصویر ۱) انتخاب گردیده و به دو استخرنیم هکتاری با تراکم ۱۵۰ قطعه درهر استخر به نسبت ۲:۱ نر به ماده رهاسازی شدند . مولدین موردنظر تا نیمه آبان ماه با غذای دستی کنسانتره BTF_2 قزل آلای رنگین کمان تغذیه شدند . تعویض آب و هوادهی استخرها و اندازه گیری شرایط فیزیکوشیمیایی آب نیز بر حسب ضرورت ونیاز انجام می شد .جهت اندازه گیری فاکتورهای زیستی مورد نظر پس از صید با تور پره طول با متر پارچه ای با دقت میلی متر و وزن ترازوی دیجیتال AND با دقت میلی گرم استفاده گردید.

تصویر (۱) : صید مولدین توسط تور پره

جهت نمونه گیری از گنادها و تشخیص رسیدگی جنسی ، مولدین ابتدا از نظر ریخت شناسی و سلامت ظاهری مورد بررسی قرار گرفتند . مولدین مناسب و سالم در ظرف یونولیتی ۴۰ لیتری حاوی ماده بیهوش کننده ۲ فنوکسی اتانول با غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر بیهوش شدند و پس از انجام عملیات به تانکهای بهبودی ۳۰۰ لیتری با هوادهی جهت بهبودی منتقل گشتند (Tamaru et al .,1993). برای نمونه برداری از مولدین ماده از تخمکهای استحصالی از سوند پلاستیکی به طول ۳۰ سانتی متر و قطر داخلی ۱ میلی متر بادو سوراخ در سرآن(تصویر ۲) استفاده گردید ، سپس به منظور اندازه گیری میانگین قطر تخمکها در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شدند .

تصویر(۲) : سوند زدن مولدین کفال خاکستری

بررسی تخمکها در زیر میکروسکوپ نوری Nikon ژاپنی با بزرگ نمایی X ۱۰ و اندازه گیری میانگین قطر تخمکها به تعداد یکصد قطعه توسط لوپ روسی (MBC 10) مجهز به عدسی مدرج چشمی با دقت ۱۰ ± میکرون تعیین گردید.

برای مولدین نر ، میزان رسیدگی بیضه ها به وسیله میزان ترشح اسپرم بامالش ملایم محفظه شکمی به سمت گونادوپور (منفذ تناسلی) تعیین گردید . در هنگام تکثیر مصنوعی کمیت اسپرم خارج شده از گنادوپور توسط علامت مثبت مشخص گردید و مولدین با توجه به میزان اسپرم کم یا زیاد خارج شده در طبقه ۱ تا ۳ طبقه بندی شدند و اگر در اثر مالش اسپرمی خارج نمی گشت مولد نر با علامت منفی نشان داده می شد و از چرخه تکثیر مصنوعی خارج می گشت . زیست سنجی مولدین تا تاریخ ۸۲/۸/۱۴ هر ماه یکبار صورت پذیرفت .

۲-۲- تکثیر مصنوعی

برای عملیات تکثیر مصنوعی در تاریخ ۸۲/۸/۱۷ قبل از اینکه دمای آب استخر به زیر بیست درجه سانتی گراد کاهش یابد ، تعداد ۷۶ قطعه مولد ماده و ۴۹ قطعه مولد نر که از لحاظ وضعیت گنادها و سلامت ظاهری که در شرایط مناسبی قرار داشتند ، انتخاب گردیده و به یک استخر گلخانه ای ۵۰۰ متر مربعی (تصویر۳) منتقل گشتند . در استخر گلخانه ای نیز شرایط دمایی و درجه حرارت و هوادهی مناسب برای مولدین کنترل شد . عملیات تکثیر مصنوعی نیز در تاریخ ۸۲/۹/۲۸ آغاز گردید . بدین منظور پس از صید و زیست سنجی مولدین ، مولدین ماده ای که میانگین قطر تخمکهای آن ۶۰۰ میکرون و یا بیشتر از آن بودند ، بعنوان مولدین کامل و رسیده انتخاب و وارد چرخه مصنوعی شدند (Kuo et al .,1973 , Greeley et al .,1987, Tamaru et al .,1991) .

برای مولدین نر ، سعی گردید از مولدین طبقه ۲ و ۳ استفاده گرد د (Liu and Kelley ,1994) . در این پژوهش، هشت سری تحریک مصنوعی مولدین صورت پذیرفت که به شرح زیر می باشد :

تصویر (۳) : استخر گلخانه

۳-۲- تزریق مولدین ماده

مولدین ماده کاملا رسیده ، پس از حمل از گلخانه ، به سالن هچری منتقل می شدند . این مولدین پس از سازگاری کامل با شرایط هچری ، به منظور عملیات تزریق و تکثیرمصنوعی ، ابتدا زیست سنجی و علامتگذاری توسط نخ های مناسب شدند و سپس در ظرف یونولیتی ۴۰ لیتری بیهوش شده و آماده تزریق گشتند . از هشت سری آزمایشات ، ۵-۱ تزریق ، از روش دوپرتکلی صورت گرفت (Lee et al .,1990).

زمان تزریق معمولا ساعت ۹ تا ۱۰ صبح انتخاب گردید . فواصل بین دو تزریق اولیه و نهایی ۲۴ ساعت در نظر گرفته شد . در تزریق مولدین ماده ، از هورمونهای LHRH -A_2(ساخت کشور چین) ، HCG(ساخت ایران) ، CPH (تهیه شده از داخل کشور) و نیز دامپریدون به عنوان ضد دو پامین و محلول کلسیم و آب مقطر استفاده گردید . گاهی نیز بر حسب نیاز به همراه هورمونهای ذکر شده ، از ویتامین های C و B.Complex استفاده گردید (جدول ۱) که در آن نتایج کسب شده به تفکیک شرح داده شده است .

پس از آماده سازی هورمونها ، تزریق توسط سرنگ پزشکی با شماره سوزن ۲۳ بصورت عضلانی در دو تا سه ردیف فلس در زیر اولین باله پشتی صورت گرفت . در آزمایشات ۸-۶ از روش تزریق تدریجی استفاده گردید که در این آزمایشات ، ابتدا به مدت ۵ روز هورمون HCG به میزان ۵۰۰ IU به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تزریق شد تا به تدریج مولد آماده تخمریزی شود و سپس تزریق نهایی صورت پذیرفت . در مدت زمان تزریق (ماده ـ نر) سعی گردید که از ایجاد عوامل استرس زا جلوگیری شود .

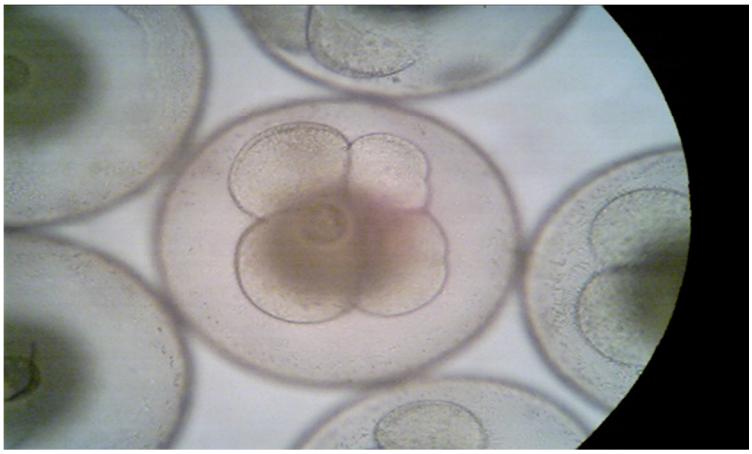
٤-۲- تزریق مولدین نر

مولدین نر نیز پس از انتقال به هچری و سازگاری با شرایط آن ، زیست سنجی ، علامتگذاری و سپس برای عملیات تزریق بیهوش گشته و توسط سرنگ انسولین ۲CC با توجه به شرایط رسیدگی جنسی آنها با استفاده از هورمونهای نظیر HCG و IU ۱۰۰ به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بری مولدین مرحله ۳ +تا IU۵۰۰۰ برای مولدین مرحله ۲+ (غالبا از HCG استفاده گشت) و یا MT – α-17 ، mg ۱۰ به ازای هر کیلوگرم وزن بدن برای مولدین مرحله ۲+ و ۳+ گاهی نیز A_2 ـ LHRH ، µg ۱۰۰ به ازای هر کیلوگرم وزن بدن برای مولدین مرحله ۲+ و ۳+ همانند مولدین ماده تزریق شدند . برای تزریق تدریجی مولدین نر ، به مدت حداقل ۵ روز ، هورمون HCG به مقدار IU/ kg.Bw ۵۰۰۰-۵۰۰ و با توجه به میزان شرایط رسیدگی جنسی و 17-α-MT به میزان mg ۱۰-۵ به ازای هر کیلوگرم وزن بدن استفاده گردید .

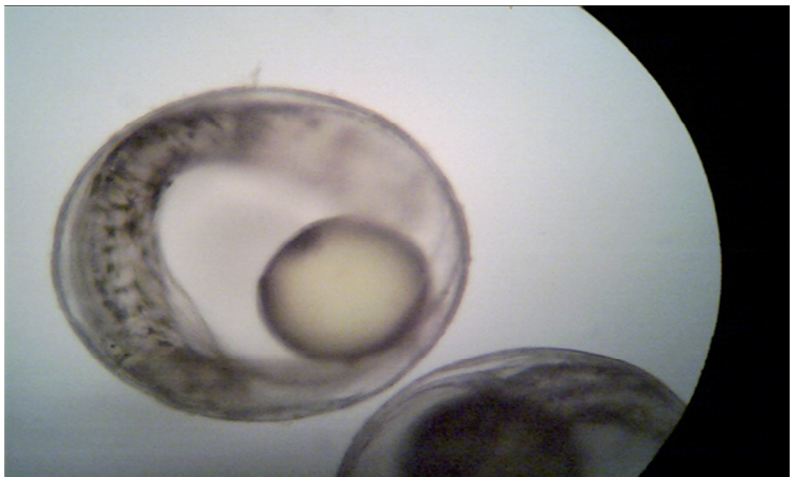
مولدین نر و ماده پس از تزریق ، در تانکهای نگهداری مولدین ۳ تنی بتونی که با پلاستیک مشکی پوشیده بود و هوادهی مناسب در آن انجام شد به مدت ۸-۶ ساعت نگهداری گشتند . سپس مولدین به تانکهای تخمریزی بتونی ۳ تنی تنی پوشیده شده با پلاستیک مشکی با هوادهی نسبتاً شدید با نسبت جنسی ۲:۱ نر به ماده منتقل شدند . مدت زمان آخرین تزریق هورمونی تا تخمریزی نیز ثبت گردید (جدول ۱) تخمریزی ممکن بود به صورت کامل نیمه تخمریزی ـ بسیار ناچیز و یا بدو ن تخمریزی (سوراخ تناسلی بسته) صورت گیرد و یا اینکه ماهی در اثر تزریق تلف شود (جدول ۱) . دمای آب و شوری در سالن هچری به ترتیب °C ۲۶-۲۳ و ۳۲ در هزار ثابت نگهداری شد .

۵-۲- تعیین درصد لقاح و جمع آوری تخمها و انکوباسیون و درصد تفریخ

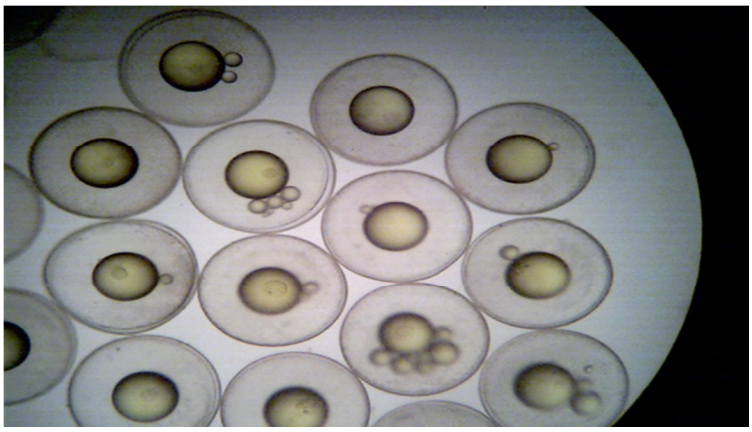
جهت تعیین درصد لقاح پس از تخمریزی مولدین ، تعداد یکصد قطعه تخم درزیر میکروسکوپ بررسی شدند و سپس این درصد از فرمول «۱ » محاسبه گردید و در این زمان تخم های لقاح یافته در زیر میکروسکوپ به راحتی توسط اولین شکاف جنینی قابل تشخیص می باشد (تصویر ۴ و۵) . سعی گردید قطر تخمهای لقاح یافته و میانگین قطر قطره چربی (تصویر ۶) تخم مورد نظر (جدول ۱) نیز توسط لوپ روسی اندازه گیری شود . سپس تخمها به منظور ذخیره سازی در تانکهای انکوباسیون ، توسط ساچوک جمع آوری شده و با تراکم ۵۰۰ ≤ قطعه تخم د ر هر لیتر در تانکهای انکوباسیون ۳۰۰۰-۳۰۰ لیتری ذخیره سازی شدند Tamaru et al (1993,.). هوادهی نیز بطور کامل در تانکها صورت گرفت . همچنین شوری آب ۳۲ در هزار و دمای آن ۲۶-۲۴ درجه سانتی گراد تنظیم گردید . برای محاسبه درصد تفریخ ، پس از کامل شدن تفریخ تخمها در تانک انکوباسیون (که بستگی به درجه حرارت آب دارد) از فرمول « ۲ » استفاده گردید . تعداد تخمها و لاروهای حاصله (تصویر ۷) نیز از روش حجمی محاسبه شد (Tamaru et al .,1993) (جدول ۱).



تصویر (٤) : تخم لقاح یافته در حال تقسیمات سلولی



تصویر (٥) : لارو در حال تفریخ



تصویر (٦) : نمایش قطره چربی در تخم

تصویر (۷) : لارو همراه با کیسه زرده

فرمول ۱:

$$\text{درصد لقاح} = \frac{\text{تعداد تخم‌های لقاح یافته}}{\text{تعداد تخم‌های بررسی شده}} \times ۱۰۰$$

فرمول ۲:

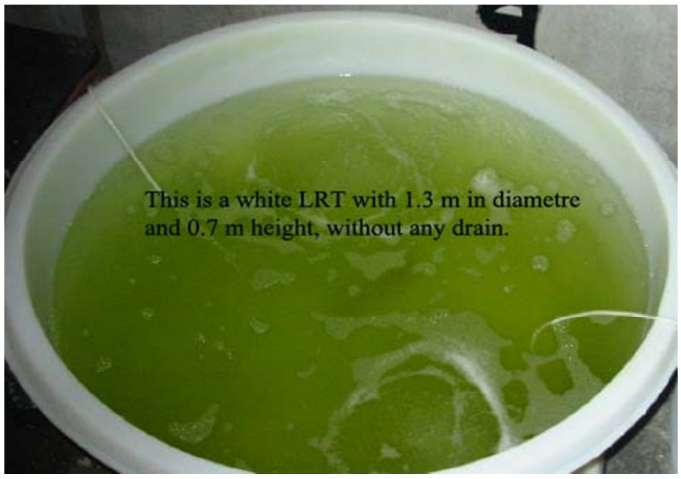
$$\text{درصد تفریخ} = \frac{\text{تعداد کل لاروهای هچ شده}}{\text{تعداد تخم‌های لقاح یافته ذخیره شده}} \times ۱۰۰$$

٦-۲- پرورش لارو

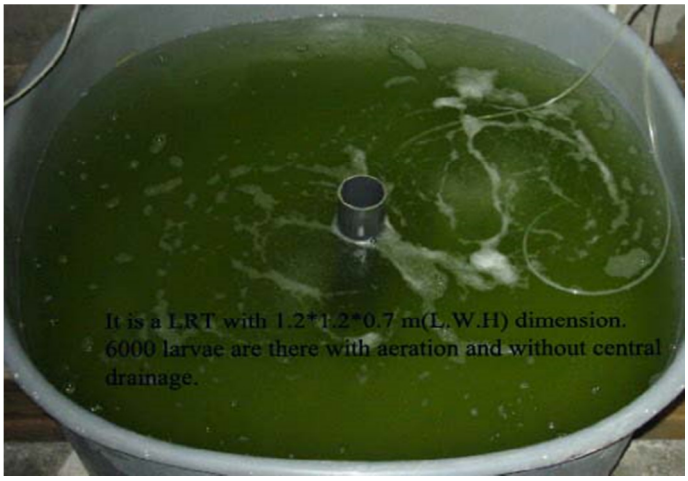
در این پژوهش ، جهت پرورش لاروهای حاصل از تکثیر مصنوعی دو تکرار صورت پذیرفت که به شرح زیر می باشد :

الف) تکرار اول :

این سری آزمایش از ۸۲/۱۰/۱۹ آغاز و تا ۸۲/۱۰/۳۰ به طول انجامید . برای پرورش لارو از ده تانک پرورشی مدور (۵ تانک ۳۰۰ لیتری ، ۴ تانک ۵۰۰ لیتری و یک تانک ۲۵۰۰ لیتری) استفاده گردید (تصویر۸ و ۹) .



تصویر (۸) : تانک ۳۰۰ لیتری پرورش لارو در سری اول آزمایشات



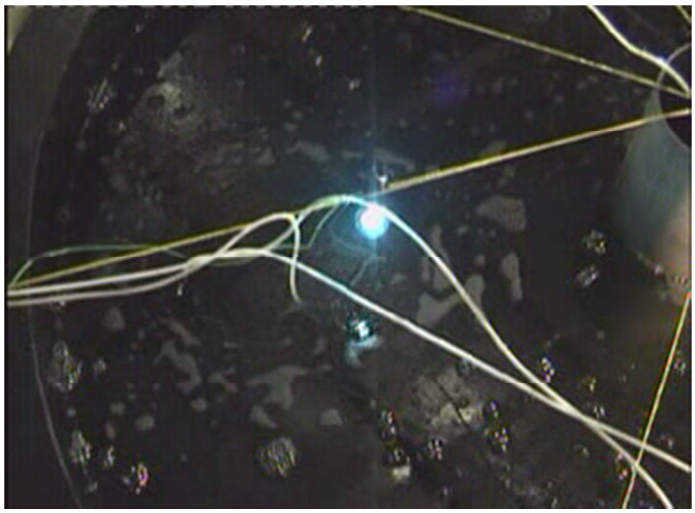
تصویر(۹) : تانک ۵۰۰ لیتری پرورش لارو در سری اول آزمایشات

پس از تفریخ کامل تخمها و جمع آوری لاروها ، آنها به درون این تانکها ذخیره سازی شدند . درزمان ذخیره سازی ، تراکم نهایی کشت لاروها ۲۰ قطعه در هر لیتر در نظر گرفته شد . در زمان پرورش ، هوادهی نسبتا شدیدی در تانکها صورت گرفت ، بطوریکه کل حجم آب در حالت تلاطم بود و سطح آرام آب مشاهده نمی شد . همچنین سعی گردید شرایط فیزیکوشیمیایی آب شامل درجه حرارت آب ۲۴-۲۲ درجه سانتی گراد و شوری ۳۳-۳۲ در هزار ثابت نگه داشته شود . این عوامل به همراه pH آب تانک دو بار در روز بررسی گردید . حداکثر عمق آب در تانکها ۸۰ سانتی متر در نظر گرفته شد . تعویض آب در تانکها نیز روزانه صورت پذیرفت . بطوریکه در هفته اول پرورش به میزان ده درصد از کل حجم آب تانک پرورشی و در دو هفته دوم

۳۰-۲۰ درصد انجام گرفت . همچنین سیفون کردن آب نیز از کف تانک همراه با تعویض آب انجام شد . غذادهی لاروها از روز دوم پس از تفریخ آغاز گردید که شرح آن در قسمت تغذیه لارو آورده خواهد شد . این مرحله از پرورش ۱۲ روز به طول انجامید . اما از روز هفتم پرورش تلفات شروع گشته و تا روز دوازدهم همه لاروها کاملا از بین رفتند .

ب) تکرار دوم :

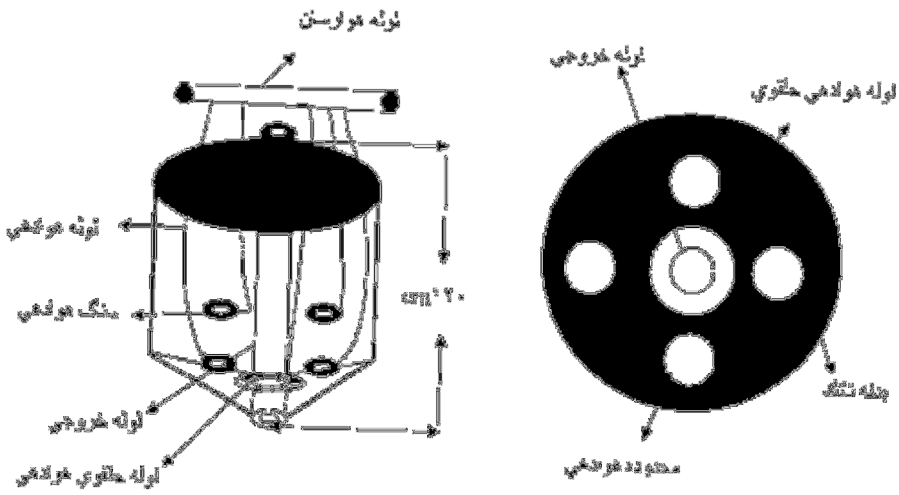
سری دوم پرورش از ۸۲/۱۱/۱۶ تا ۸۳/۱/۱۲ به طول انجامید . در این مرحله از ۳ تانک فایبرگلاس مدور چهارتنی به حجم ۳۵۰۰ لیتر آب و به ارتفاع ۱۲۰ سانتی متر (ارتفاع آبگیری یک متر) استفاده گردید(تصویر ۱۰) .



تصویر(۱۰) : تانک پرورش لارو در سری دوم آزمایشات همراه با پوشش رنگ اپوکسی و خروجی مرکزی

این تانکها بارنگ اپوکسی سیاه رنگ آمیزی شدند. همچنین دارای یک خروجی مرکزی جهت انجام عملیات پرورش بودند . در این مرحله از پرورش نیز تراکم ذخیره سازی لارو و تنظیم و بررسی فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب تانکهای پرورش همانند سری اول آزمایشات بود . تعویض آب در هفته اول و دوم همانند روش قبلی و در هفته های بعدی مطابق شرایط آب تانکها ۵۰-۴۰ درصد از حجم کل آب تعویض گردید . سیفون تانکها از روز سوم آغاز شد ، در روز سوم کلیه تخم های تفریخ نشده و مرده توسط شلنگ پلاستیکی یک اینچی از کف تانک سیفون گشتند . سپس سیفون تا روز دهم متوقف گردید .پس از آن این عمل ، روزانه با توجه به شرایط کف تانک پرورشی تا انتهای دوره پررش انجام پذیرفت . در این مرحله هوادهی درتانک از طریق یک حلقه ازلوله اسفنجی هوادهی که دراطراف لوله خروجی مرکزی نزدیک به کف تانک مستقر بود و همچنین چهار سنگ هواده در حد واسط خروجی و بدنه تانک به فاصله مساوی از یکدیگر قرار داشتند صورت

پذیرفت . در واقع هوادهی در این مرحله طوری انجام شد که جریان آرامی در کل حجم آب بوجود آید و همانند مرحله اول پرورش سطح تانک پرورشی متلاطم نگردد(Liu and Kelley,1994) تصویر (۱۱). غذادهی لاروها نیز در قسمت تغذیه لارو شرح داده خواد شد .



نما از بالا نما از پهلو

تصویر (۱۱) : نحوه هوادهی و آرایش هواده ها در تانک های چهار تنی پرورشی لارو کفال خاکستری

۷-۲- تغذیه لارو

پایه و اساس پرورش لارو اکثر ماهیان دریایی وابسته به تولید غذای زنده می باشد . اندازه کوچک تخمهای کفال خاکستری (۸۰۰ μ) و به تبع آن اندازه کوچک دهان لارو تازه تفریخ از تخم و نیز ذخیره محدود زرده و دوره کوتاه جذب کیسه زرده (۲ روز) موجب ایجاد متصویراتی جهت تهیه غذای مناسب در زمان لاروی می شود که بتواند احتیاجات تغذیه ای آن را مرتفع کند (Harel et al ., 1998). لذا با توجه به منابع موجود ما را بر آن ساخت که از غذاهای زنده زیر به منظور تغذیه لارو کفال خاکستری استفاده گردد که شامل بخش تولید جلبک ـ روتیفر و آرتمیا می باشد و در ادامه نیز می توان به استفاده از غذای دستی اشاره نمود.

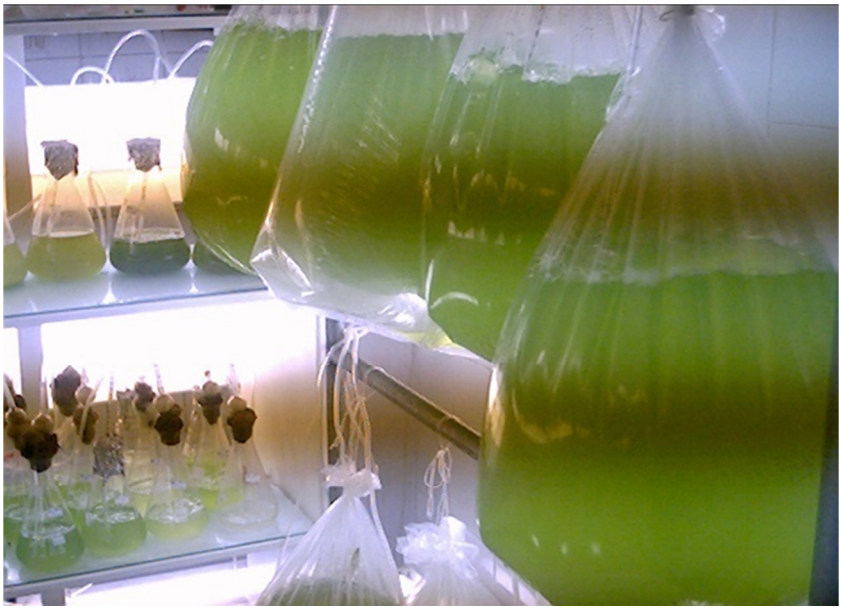
الف) کشت جلبک برای تغذیه روتیفر و لارو کفال خاکستری :

در این پژوهش منحصرا از جلبک *Nannochloropsis oculata* جهت پرورش روتیفر و لاروهای کفال خاکستری استفاده گردید . برای کشت این جلبک روش Batch culture درنظر گرفته شد که یکی از ساده ترین و انعطاف پذیرترین روش های مرسوم کشت جلبک در دنیا می باشد . مدت زمان پرورش ۷-۵ روز بود . در این روش ، شوری آب تانکهای پرورشی ۳۲-۳۰ گرم در لیتر و درجه حرارت آنها ۲۶-۲۴ درجه سانتی گراد ، شدت نور

مورد استفاده ۵۰۰۰-۳۰۰۰ لوکس تنظیم گردید و هوادهی به نسبت شدید انجام گرفت . کشت این گونه در دوسیستم پرورش Indoor و Outdoor صورت پذیرفت .

سیستم پرورش Indoor :

در این سیستم کشت جلبک در ۴ مرحله لوله آزمایش ، ظرف یک لیتری ، ۲۰ لیتری انجام شد . همچنین از محیط کشت گیلارد (f/2) با اندکی تغییر در فرمول آن استفاده گردید (تصویر ۱۲) .



تصویر (۱۲) : پرورش جلبک در شرایط (Indoor)

سیستم پرورش Outdoor :

در این سیستم از ظروف ۳۰۰ لیتری و ۳۰۰۰ لیتری جهت کشت جلبک استفاده گردید . محیط کشت مورد استفاده در این مرحله TMRL بود(تصویر ۱۳) .نتایج حاصل از کشت جلبک در جدول (۲) بخش نتایج ذکر شده است .

تصویر (۱۳) : پرورش جلبک در شرایط (Outdoor)

ب) پرورش روتیفر :

در پرورش روتیفر ، ازسویه S-type گونه Brachionus plicatilis به اندازه ۲۱۴-۵۰ میکرون و از روش Batch culture با پریود ۴۸ ساعته استفاده گردید . (تصویر ۱۴). پرورش در ۶ تانک پلی اتیلنی ۳۰۰ لیتری در دو سری ۳ تایی انجام شد . تراکم ذخیره سازی اولیه ۱۵۰-۱۰۰ قطعه در هر میلی لیتر و تراکم برداشت ۱۵۰۰-۸۰۰ قطعه درهر میلی لیتر برآورد گردید .

تصویر (١٤) : پرورش روتیفر به روش Batch culture

تغذیه از جلبک *N.oculata* ، مخمر نان و گاهی ازماده غنی ساز Algamac 2000 (DHA ، بیش از ۲۴ درصد به میزان ۳۰۰ میلی گرم برای یک میلیون روتیفر به مدت ۱۲ ساعت) صورت پذیرفت .

درجه حرارت آب تانکهای پرورش ۳۰- ۲۸ درجه سانتی گراد ، شوری ۲۵-۲۴ در هزار ، میزان متوسط هوادهی و دوره نوری ۶/۱۸ تاریکی به روشنایی رعایت گردید . همچنین سیفون تانکهای پرورش روزانه یکبار انجام شد . تغذیه لاروها از روز دوم پس از تفریخ به میزان ۵۰۰۰۰۰ سلول جلبک در هر سی سی ۲ بار در شبانه روز (یکبار صبح و دیگری شب) و میزان ۲۰ قطعه روتیفردر هر میلی لیتر انجام شد . غذادهی هر بار پس از شمارش تعداد روتیفر و جلبک در تانک پرورش لارو و تعیین وضعیت موجود صورت گرفت.

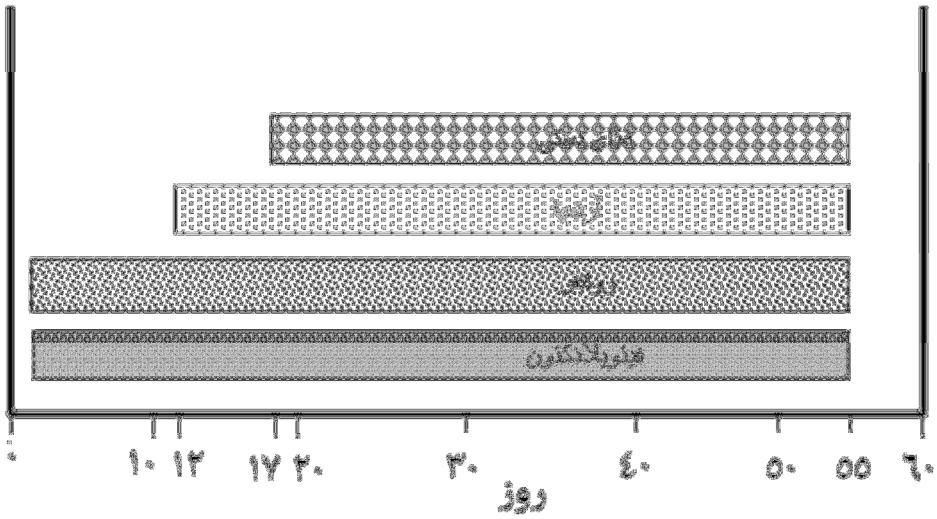
ج) آرتمیا :

در این پرورش ، جهت تغذیه لارو از نائوپلی های تازه تفریخ گونه *Artemia fransiscana* استفاده گردید . نائوپلی های آرتمیا پس از تفریخ توسط محلول غنی ساز Super selco و ویتامین C غنی شدند . برای غنی سازی به ازای هر ۳۰۰۰۰۰ قطعه نائوپلی در یک لیتر آب دریا ، ۰/۰۶ گرم سوپرسلکو اضافه گردید . مدت زمان غنی سازی ۲۴-۱۲ ساعت به طول انجامید . بعد از آنکه غنی سازی انجام شد ، نائوپلی ها یا به طورمستقیم به مصرف لارو رسیده و یا دریخچال ذخیره گردیده وسپس طبق برنامه زمانبندی به مصرف لاروها رسیدند . غذادهی لاروها با نائوپلی آرتمیا از روز ۱۳-۱۲ پرورش آغاز گردید . میزان مورد استفاده از ۱۰۰۰۰ قطعه در هر تانک ۳۵۰۰ لیتری (۳ قطعه در هر لیتر) آغاز و تا ۶۰۰۰۰۰ قطعه (۲۰۰ قطعه در هر لیتر) ادامه داشت .

د : غذای خشک (دستی) :

از غذای پلت شده بااندازه ۱۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میکرون شرکت INVE با علامت تجاری Frippak به همراه پودر ویتامین C به میزان یک دهم وزن غذای دستی محاسبه شده در این مرحله استفاده گردید .

غذای دستی از روز هفدهم پرورش (پس از تفریخ تخمها) آغاز گردید . تغذیه با غذای دستی به میزان ۳-۲ گرم به ازای هر تانک ۴۰۰۰ لیتری از پلت یکصد میکرونی شروع شد . همچنین متناسب با اندازه دهان بچه ماهی و رشد و نمو آنها ، روزانه به ۴ بار نیز افزایش یافت (نمودار ۱) .



روز پس ازتفریخ

غذای دستی ۳-۲ گرم به ازای هر تانک ٤۰۰۰ لیتری
روتیفر ۲۰ قطعه در هر میلی لیترنائوپلی آرتمیا ۲۰۰-۳ قطعه در هر لیتر
جلبک ۵۰۰۰۰۰ در هر میلی لیتر
نمودار (۱) : رژیم غذایی پیشنهادی برای پرورش لارو ماهی کفال خاکستری

۸-۲- آزمایش استرس جهت انتقال فرای به استخر

حدود ۵۰ روز پس از پرورش فرای جهت انتقال به استخر تست استرس برای تعیین اینکه آیا فرای ها توانایی مقاومت در برابر استرس ناشی ازدستکاری یاصید برای خروج از هچری هستند ، ضرورت دارد . برای این تست باید تعدادی فرای به طور تصادفی به وسیله ساچوک با تور نرم صید گردد و حدود ۲۰-۱۵ ثانیه در خارج از آب نگهداری شوند . سپس در ظرف ۵۰-۴۰ لیتری به مدت ۱ ساعت ریخته و در این ظروف نگهداری شوند ، چنانچه درصد بقاء بیش از ۹۰ درصد برآورد گردد بچه ماهیان آماده برداشت می شوند (Liu and Kelly , 1994). در این پژوهش نیز پس از انجام موفقیت آمیز آزمایش استرس در روز ۵۵ ، اقدام به کاهش سطح آب پرورشی شد. ابتدا این کاهش ۲۰ سانتی متر صورت گرفت . پس ازتخلیه آب تانک اقدام به صید بچه ماهیان توسط ساچوک با دسته بلند و تور نرم گردید . سپس بچه ماهیان در استخرگلخانه که توسط توری به دو قسمت تقسیم شده بود، رهـاسازی شدند (به علت بچه ماهیانی از دو مولد مختلف) .

۹-۲- زیست سنجی لاروها و بچه ماهیان

الف : زیست سنجی بچه ماهیان در هنگام تفریخ تخم

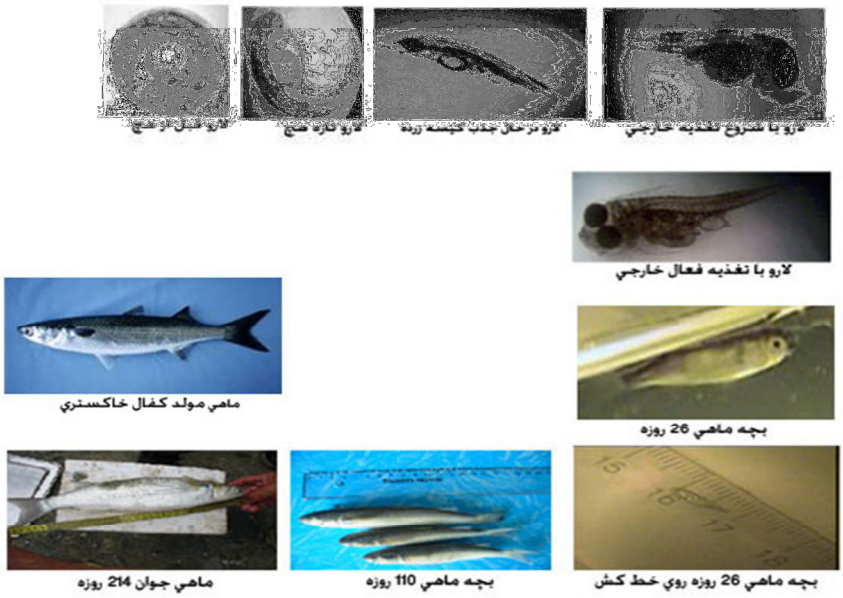
جهت زیست سنجی لاروها ابتدا بطور تصادفی تعدادی از آنان انتخاب شدند . سپس توسط لوپ روسی MBC 10 طول کل آنها اندازه گیری گردید .

ب : زیست سنجی بچه ماهیان در هنگام انتقال به استخر گلخانه :

جهت زیست سنجی بچه ماهیان ابتدا بطور تصادفی تعدادی ازآنان انتخاب شدند . سپس آنهادر محلول ۲ـ فنوکسی اتانول با غلظت ppm ۱۰۰ بیهوش گردیدند . وزن آنها توسط ترازوی دیجیتال AND با دقت میلی گرم و طولشان نیز باخط کش معمولی با دقت میلی متر اندازه گیری شد .

ج : زیست سنجی ماهیان در هنگام انتقال به استخر خاکی و در طول دوره پرورش:

درتاریخ ۸۳/۴/۲ بچه ماهیان ازاستخر گلخانه به استخر خاکی منتقل گشتند . برای این کار ابتدا آب استخر گلخانه را آرام آرام تخلیه نموده و بچه ماهیان باساچوک جمع آوری گردیدند . قبل از ورود به استخر خاکی طول کل و وزن کل آنها اندازه گیری گردیدند . سپس به استخر خاکی که توسط توری به دو قسمت مجزا شده بود ، رهاسازی شدند . در طول دوره پرورش در تاریخ ۸۳/۸/۱۳ نیز زیست سنجی از ماهیان شامل اندازه گیری طول کل و وزن کل انجام شد .

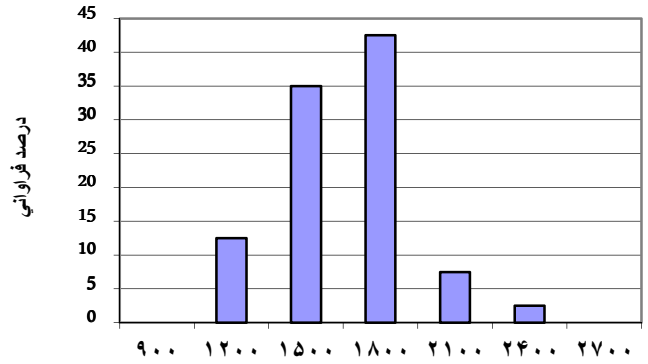


تصویر (۱۵) : چرخه تولید و پرورش ماهی کفال خاکستری حاصل از تکثیر مصنوعی مولدین آ ن در کارگاه گمیشان

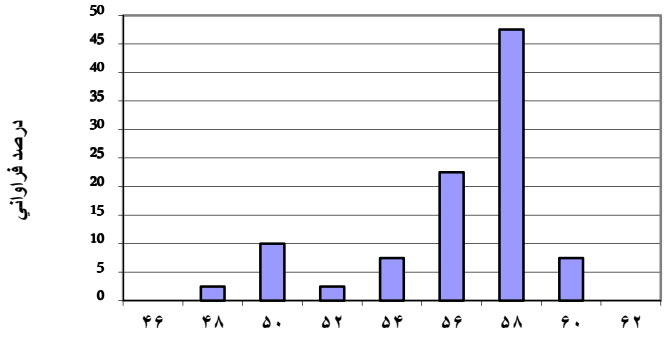
۳- نتـــایـج

۱-۳-بررسی توزیع فراوانی وزنی و طولی مولدین نرو ماده دردوره تکثیر مصنوعی در سال ۱۳۸۲ :

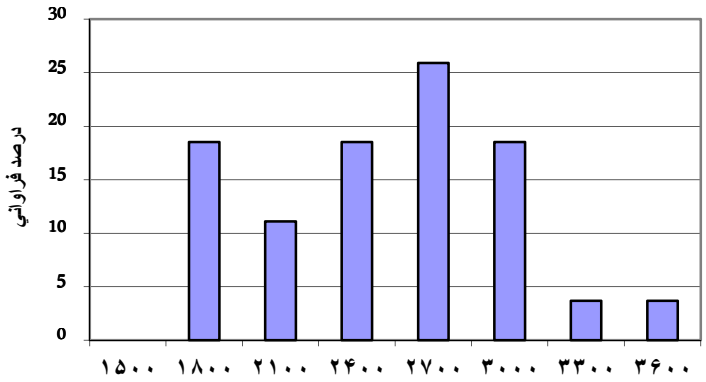
نمودار (۲و۳) (۴و۵) توزیع فراوانی وزنی و طولی مولدین نر و ماده را در دوره تکثیر مصنوعی در سال ۱۳۸۲ نشان میدهد . مطابق نمودار (۲و۳) در توزیع فراوانی مولدین نر بیشترین درصد فراوانی وزنی در طبقه gr ۱۸۰۰-۱۵۰۰ به میزان ۴۲/۵ درصد و بیشترین درصد فراوانی در طبقه ۵۸-۵۶ سانتی متر به میزان ۴۷/۵ درصد می باشد . همچنین بر اساس نمودار (۴و۵) بیشترین درصد فراوانی وزنی مولدین ماده در طبقه gr ۲۷۰۰-۲۴۰۰ به میزان ۲۹/۵ درصد و بیشترین درصد فراوانی طولی در طبقه ۶۱-۵۸ سانتی متر بود .



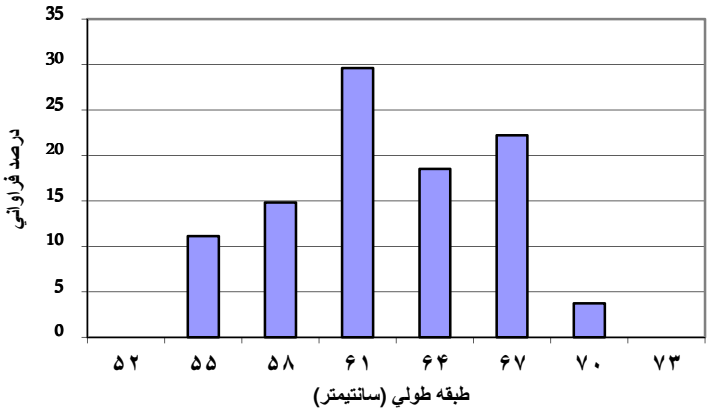
نمودار(۲): توزیع درصد فراوانی وزنی مولدین نر کفال خاکستری (*Mugil cephalus*)



نمودار(۳): توزیع در صد فراوانی طولی مولدین نر کفال خاکستری (*Mugil cephalus*)



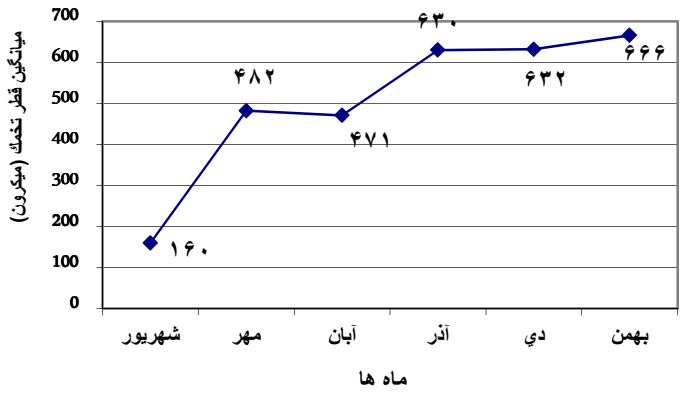
نمودار (٤) :توزیع درصدفراوانی وزنی مولدین ماده کفال خاکستری (*Mugil cephalus*)



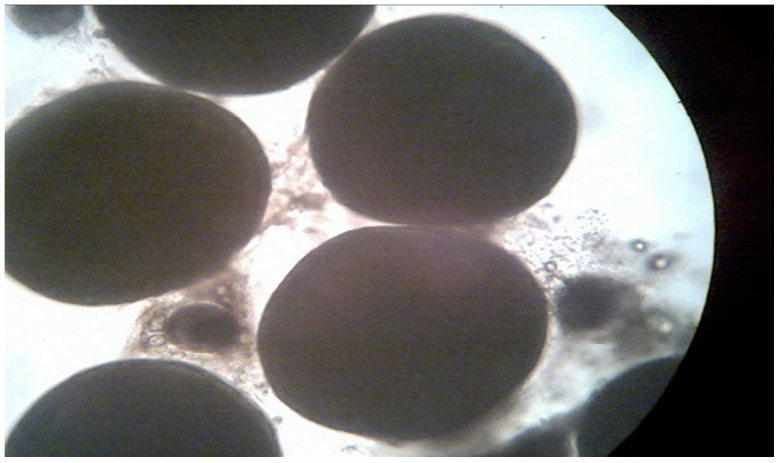
نمودار (۵): توزیع درصد فراوانی طولی مولدین ماده کفال خاکستری (*Mugil cephalus*)

۲-۳- بررسی تغییرات قطر تخمکها برای تعیین زمان تکثیر مصنوعی

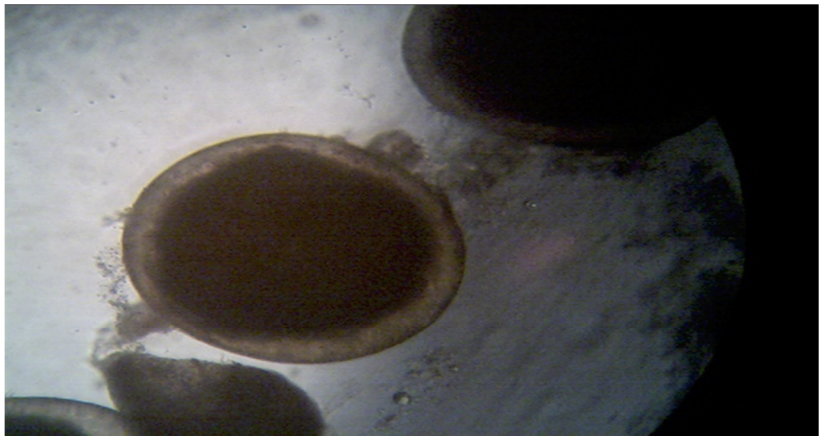
نموار (۶) تغییرات قطر تخمکها را در طول شش ماه نشان می دهد . مطابق نمودار ، میزان قطر تخمکها در کارگاه گمیشان با توجه به شرایط آب و هوایی این منطقه در آذر ماه ۶۰۰ ≤ میکرون می باشد . لذا از آنها می توان جهت تکثیر مصنوعی استفاده نمودو درصورت بازجذب و یا تحلیل رفتن مناسب برای این عمل نمی باشند (تصویر۱۶ و ۱۷) .



نمودار(٦): تغییرات قطر تخمک مولدین کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) در طول ماه های شهریور تا بهمن در منطقه گمیشان



تصویر (١٦) : تخمک کفال خاکستری زیر میکروسکوپ قبل از تزریق مقدماتی



تصویر (۱۷) : تخمک کفال خاکستری در حال بازجذب و تحلیل یافتن (آترزیا)

۳-۳-نتایج حاصل از تکثیر مصنوعی مولدین ماده کفال خاکستری

جدول ۱ اطلاعات حاصل از تکثیر مصنوعی مولدین ماده کفال خاکستری در سال ۱۳۸۲ را ارائه می دهد . همانطوریکه جدول(۱) نشان می دهد در تزریق مقدماتی مولدین هر دو گروه (دو تزریقی ـ چند تزریقی) منحصرا از هورمون CPH به میزان ۴۰-۲۵ میلی گرم در کیلوگرم وزن بدن استفاده شده ، نتایج نشان داد که این هورمون می تواند در تحریک اولیه جهت شروع رسیدگی نهایی نقش موثر خود را ایفا نماید .

هر چند بسیاری از مولدین پس از دریافت هورمون در مرحله تزریق نهایی اقدام به تخمریزی نمودند ، ولی همان طور که ملاحظه می شود نتایج حاصل از مولدینی که پس از ۲۴ ساعت بعد از تزریق نهایی ، مجددا در تزریق نهایی ثانویه ، هورمون به ویژه $LHRH-A_2$ به میزان ۱۰۰-۵۰ µg/kg.Bw دریافت کردند ، از نظر نرماتیوهای تکثیر شرایط بهتری را نشان دادند .

جدول (۱): اطلاعات مربوط به تحریک هورمونی (روش دو تزریقی) و برخی پارامترهای تکثیر مصنوعی مولدین ماده کفال خاکستری *Mugil cephalus*

شماره آزمایش	تعداد مولد (قطعه)	مشخصات مولد			دوز تزریق هورمون و مواد افزودنی (ماهی/واحد)			LP(ساعت)	(D1میکرون)	D2/D3) میکرون)	وضعیت تخم ریزی	وضعیت لقاح(درصد)	تعداد تخم (قطعه)	تعداد لارو(قطعه)	درصدتخمه گشایی لارو
		علامت	طول کل (cm)	وزن کل (gr)	تزریق اولیه	تزریق نهایی۱ (بعداز۲٤ ساعت)	تزریق نهایی ۲ (بعداز۲٤ ساعت)								
۱	۲	بی علامت	۶۲	۲۶۰۰	mg۱۰۵CPH=	LRH-A2=300µg DOMP=25mg	تزریق نگردید	۲۱.۳	۷۰۱	۴۰۵/۹۵۶	کامل	بدون لقاح	۱۰۰۰۰۰۰	—	
		پنفش	۶۶	۳۰۰۰	mgV۵CPH=	CPH=75 mg HCG=50000 IU	LRH-A2=150µg DOMP=25mg	۲۶.۳	۷۰۷	۴۳۷/۹۵۷	کامل	بدون لقاح	۱۲۰۰۰۰۰	—	
۲	۳	زرد	۵۹	۲۵۰۰	mg۶۵CPH=	CPH=60 mg HCG=65000 IU	تزریق نگردید	—	۶۸۵	—	تلفات	تلفات	تلفات	—	
		بی علامت	۶۰.۵	۲۲۰۰	mg۶۰CPH=	LRH-A2=450µg DOMP=20mg	LRH-A2=250µg DOMP=20mg	—	۶۹۹	—	تلفات	تلفات	تلفات	—	
		قرمز	۶۲	۲۱۰۰	mg۸۰CPH=	LRH-A2=250µg DOMP=20mg	تزریق نگردید	۲۴	۶۹۹	اندازه گیری نگردید	بسیار ناچیز	بدون لقاح	بسیارناچیز	—	

۳	۱	صورتی	۵۴	۱۸۰۰	mg۵۰CPH=	LRH-A2=200µg DOMP=15mg	LRH-A2=150µg	۱۹.۳	۷۰۴	اندازه گیری نگردید	نیمه تخمریزی	بدون لقاح	۱۰۰۰۰۰۰	—	
۴	۳	بی علامت	۷۰	۳۵۰۰	mg۹۰CPH=	LRH-A2=400µg DOMP=30mg	LRH-A2=400µg DOMP=20mg	۲۷.۳	۶۹۷	اندازه گیری نگردید	کامل	بدون لقاح	شمرده نشد	—	
		قرمز	۶۵	۲۹۰۰	mg۷۵CPH=	LRH-A2=350µg DOMP=25mg	تزریق نگردید	—	۶۸۵	—	از چرخه خارج شد	از چرخه خارج شد	—	—	
		آبی	۶۲	۲۵۰۰	mg۷۵CPH=	LRH-A2=500µg DOMP=25mg	LRH-A2=250µg DOMP=20mg	۸	۶۰۴	۳۴۷/۸۵۰	کامل	بدون لقاح	شمرده نشد	—	
۵	۲	سبز	۵۹.۵	۲۲۰۰	mg۷۰CPH=	CPH=60 mg HCG=65000 IU	تزریق نگردید	۲۰.۳	۶۴۲	۳۸۸/۸۹۴	تقریبا کامل	70	۲۰۰۰۰۰۰	۱۱۷	۰.۰۰۸
		زرد	۵۸	۱۷۰۰	mg۵۵CPH=	LRH-A2=300µg DOMP=17mg	LRH-A2=200µg	۱۰.۴۵	۶۴۶	اندازه گیری نگردید	کامل	بدون لقاح	شمرده نشد	—	

٤-۳- نتایج حاصل از تکثیر مصنوعی مولدین نر کفال خاکستری

دربررسی مولدین نر ۲+ و ۳+ در هر دو روش تزریق (دو تزریقه ـ چند تزریقه) ، نتایج نشان داد هورمون HCG گاها ۶-۲ بار در آزمایش تکثیر مصنوعی استفاده شدند .

۵-۳- بررسی نتایج حاصل از کشت جلبک *Nannochloropsis oculata*

جـــدول نتایـج حاصـل از کشـت جلبک درطـول دوره کشـت را نشـــان می دهد . بر اساس جدول می توان استنباط نمود که میزان جلبک تولیدی که به بخش تولید روتیفر و هچری برای تولید لارو تحویل داده شده است به میزان $۱۰^{۶}$*۱۵-۱۰ سلول در هر میلی لیتر بود .

جدول(۲) : نتایج حاصل از کشت جلبک *N.oculata* (میلیون در میلی لیتر)

روزها	یک لیتری	٤ لیتری	۲۰ لیتری	۳۰۰ لیتری	٤۰۰۰ لیتری
اول	۸	۵	۷	۵	۴/۷
دوم	۹	۹	۱۸	۱۱	۷/۲
سوم	۱۸	۱۴	۲۵	۱۵	۸
چهارم	۲۱	۲۰	۲۸	۱۹	۱۴/۵
پنجم	۵۰	۳۵	۳۵	۲۵	۱۶/۳
ششم	۵۱	۵۲	۳۷	۳۱	۱۵/۸
هفتم		۴۵	۳۵		

٦-۳- بررسی نتایج حاصل از کشت روتیفر *Brachionus plicatilis*

نتایج حاصل از این مرحله نشان می دهد که میزان روتیفر تولیدی بصورت روزانه حدود ۱۵۰۰ روتیفر در هر میلی لیترمی باشدکه نتیجه ای مناسب در شرایط کشورمان می باشد .

۷-۳- زیست سنجی بچه ماهیان پس از تفریخ تخم

نتایج حاصل از اندازه گیری طول کل لارو ماهیان پس ازتفریخ از تخم نشان می دهد که میانگین طول کل آنها ۲/۷۵ و ۳/۳۶ می باشد .

۸-۳- زیست سنجی بچه ماهیان قبل از ورود به استخر گلخانه

در هنگام انتقال بچه ماهیان از هچری به استخر گلخانه میانگین وزنی بچه ماهیان در یک تانک ۶۰۰ میلی گرم و درتانک دیگر ۳۷۶/۵ میلی گرم با میانگین طول ۳۲ میلی متر برآورد گردید .

۹-۳- زیست سنجی ماهیان در هنگام انتقال به استخرخاکی ودر طول دوره پرورش

میانگین وزنی و طولی ماهیان در هنگام انتقال به استخر خاکی در یک قسمت گلخانه به ترتیب ۳۸/۸۷ گرم و ۱۴/۹۱ سانتی متر و در طرف دیگر ۲۴/۵۹ گرم و ۱۲/۷۸ سانتی متر برآورد گردید.

در تاریخ ۸۳/۸/۱۳ میانگین وزنی و طولی ماهیان به ترتیب ۵۲۸ گرم و ۳۵/۷ سانتی متر محاسبه گردید (تصویر ۱۸) .

تصویر (۱۸) : اندازه گیری وزن ماهی کفال خاکستری در چرخه تولید و پرورش

٤- 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 معمولا ۲/۵-۲ ماه بطول می انجامد که در پایان این مرحله اندازه تخمک ۶۰۰ میکرون می باشد. پس از آن فرایند بلوغ و رسیدگی نهایی گنادها درشرایط پرورش متوقف می گردد (Tamaru et al .,1993).

طبق نمودار شماره ۶ که رشد و نمو تخمکها در شرایط گمیشان را نشان می دهد ، می توان استنباط نمود که در منطقه گمیشان قبل از رسیدن قطر تخمکها به اندازه ۶۰۰ دمای آب به زیر ۲۰ درجه سانتی گراد تنزل پیدا می کند که این شوک حرارتی به همراه کاهش دوره نوری باعث بازجذب (آترزیا) زود هنگام تخمکها و همچنین کاهش و یا توقف اسپرم دهی مولدین نر می شود و در نتیجه مانع از حفظ شرایط بلوغ شود و یا می تواند دوره زمانی فصل تولید مثل مولدین را کاهش دهد (Kuo ,1993) . لذا نتایج این پژوهش نشان داد با انتقال تعدادی از مولدین به استخر گلخانه ای که درجه حرارت (درجه سانتیگراد ۲۴ -۲۱) و دوره نوری (۱۲-۱۰ ساعت در شبانه روز) در آن تحت کنترل قرار گرفت ، نه تنها از بازجذب گامتهای جنسی ممانعت بعمل آمده بلکه گلخانه توانست مدت زمان نگهداری گامتهای جنسی توسط مولدین رادرشرایط بهینه ۳ ماه به درازا بکشاند در حالیکه دراین مدت در اثر استرس های محیطی وارده به مولدین موجود در فضای باز استخر همانند سالهای قبل (قانعی ، ۸۰-۱۳۷۷) تخمکها و اسپرم ها کیفیت خود را به مقدار زیادی از دست داده بودند.

Tamaru و همکاران در سال ۱۹۹۳ گزارش نموده اند که ماهیان مولد کفال خاکستری می توانند در شرایط پرورش در استخر به بلوغ کامل برسند ولی تاکنون گزارشی بر تخم ریزی و اسپرم ریزی این ماهیان در شرایط پرورش وجود ندارد. همچنین شهاده و همکاران در سال ۱۹۷۳ اظهار نموده اند مولدین ماده بالغ و باردار که از لحاظ قطر تخمک بزرگتر از ۶۰۰ میکرون می باشند جهت تخمریزی موفقیت آمیز نیاز به تحریک هورمونی دارند نتیجه اینکه ، مولدین نر و ماده موردآزمایش با وجود بلوغ کامل ، هر گز خود بخودی اقدام به تخمریزی و اسپرم ریزی نمی نمایند ، بلکه ثابت شده است که جهت تخمریزی و اسپرم ریزی نیاز به تحریک هورمونی دارند.

Tamaru و همکاران در سال ۱۹۹۳ اعلام نمودند که تاکنون موثرترین روش برای تحریک هورمونی مولدین کفال خاکستری جهت تخمریزی بکارگیری روش دو تزریقی شامل یک تزریق اولیه گنادوتروپین (CPH و HCG) و پس از ۲۴ ساعت انجام تزریق نهایی توسط LHRH-A می باشد. دراین پژوهش 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 . همچنین Kuo درسال ۱۹۹۳ گزارش نمود اگرچه میزان گنادو تروپین غده هیپوفیز با شرایط فیزیولوژیکی در وضعیت بلوغ ماهی متغیر می باشد بکارگیری هموژن غده هیپوفیز خشک شده در استون جهت

شروع رسیدگی نهایی تخمکها یعنی برانگیختن آنها از مرحله گلبول سوم زرده به مرحله Subperipheral germinal vesicle از مرحله بلوغ نهایی تخمکها موثر می باشد .

Lee و همکاران در سال ۱۹۸۷ گزارش نمودند که مولدنی بالغ کفال با میانگین قطر تخمک بیش از ۶۰۰ میکرون با بیش از ۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن CPH تزریق شده و همچنین LHRH-A جهت تزریق نهایی با بیش از ۲۰۰ میکروگرم به ازای هرکیلوگرم وزن بدن ، تخمریزی موفقیت آمیزی را در مدت زمان ۲۰-۱۱/۵ ساعت (با دو تزریق) و ۵۰-۳۴ ساعت (با سه تزریق) بعداز نزریق نهایی داشتند. به همین ترتیب بررسی نتایج آزمایشات تکثیر مصنوعی حاضر بر اساس جدول ۱ نشان می دهد که استفاده از هورمون $LHRH-A_2$ به همراه دامپریدون و یا ترکیب هورمونی CPH و HCG و تزریق نهایی توانسته نقش موثری را ارائه دهد ، بطوریکه از ۲۷ مولد بکارگرفته شده ، ۲۲ قطعه پس از دریافت دوز نهایی اولیه و ثانویه اقدام به جذب آب و به تبع آن اوولاسیون نموده و در نتیجه تخم ریزی موفقیت آمیزی داشته باشند .

Tamaru در سال ۱۹۹۳ ، اظهار نمود اگرچه CPH ابتدا به عنوان گنادوتروپین مطرح بوده ولی استفاده از هورمون HCG به دلیل استاندارد بودن درواحدهای بین المللی (IU) و توان بالای آن توجیه پذیر تر می باشد. تیمار LHRH-A / CPH مطمئن ترین و مقرون به صرفه ترین در تحریک هورمونی این گونه می باشد. Lee و همکاران در سال ۱۹۸۸ نیز گزارش دادند که هورمون HCG می تواند در این روش جایگزین CPH شود اما با هزینه بیشتر و پاسخ مناسبتر.

Liu و Kelly در سال ۱۹۹۴ گزارش نمودند که بکارگیری روش طولانی مدت کاشت هورمون LHRH-A به میزان ۲۰۰ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن می تواند رشد تخمکها رابه میزان ۱۰ میکرون در روز افزایش دهد و همچنین کاشت هورمون 17-α — MT به میزان ۱۰ میلی گرم به ازای هر مولد می تواند پس از سه هفته در هر زمان از سال اسپرم روان (Runing sperm) تولید نماید.

Zaki و همکاران نیز در سال ۱۹۹۸ طی تحقیقی در کشور مصر گزار ش نمودند که مولدین ماده کفال خاکستری طی ۱۰ تـزریـق به فاصله زمانی ۵ روز میزان IU ۵۰۰ به ازای هر کیلوگرم وزن ماهی هورمون HCG دریافت کردند ، رشد تخمک و مرحله زرده سازی آنان کاملا تحریک شده بود. نتایج پژوهش این محققین نشان می دهد که مکانیسم عمل HCG از طریق افزایش فعالیت ترشح سلولهای اپیتلیال فولیکولی و افزایش سنتز هورمونهای جنسی استروئیدی می باشد که به تبع آن موجب افزایش تدریجی هورمونهای تستسترون و β ـ ۱۷ استرادیول در زمان زرده سازی می گردد . سطوح بالای β ـ ۱۷ استرادیول ، سنتزو ترشح ویتلوجنین (Vitellogenin) را افزایش داده که یک پیش ماه پروتئین های زرده می باشد و از این طریق باعث رشد اووسیت ها یا تخمک ها در مولدین ماده کفال می گردد .نتایج حاصل از جدول(۱) در این پژوهش در مرکز گمیشان مؤید این نکته است که مولدین نر و ماده ایی که روزانه به مدت هفت روز هورمون HCG دریافت نمودند نسبت به سایرمولدین نتایج بهتری را ارائه نمودند .

Tamaru (1993) , Hickling (1970) , Erman (1961) , Sarojini(1958) وBromhall(1954) گزارش نمودند که در چندین گونه کفال همانند *Mugil cephalus* ، چرخه فصلی رشد و نمو گنادها اغلب با بیش از یک بار تولید تخم و تخم‌ریزی (One –Batch) به مدت یک‌ماه طول میکشد.درمورد این تخم‌ریزی مصنوعی و تحریک شده با هورمون،که منجر به آزاد سازی کلیه تخمکها در یک زمان میشود، ممکن است یک عکس‌العمل غیرطبیعی بوده و تأثیر منفی دررشد ونمو مراحل جنینی داشته باشد .

از مطالب ارائه شده اخیر چنین استنباط می‌گردد که هرچه زمان دریافت هورمونها توسط مولدین طولانی‌تر و میزان جذب آنها تدریجی‌تر باشد، تأثیر فیزیولوژیکی آنها بر محور هیپوتالاموس، هیپوفیز، گنادها مؤثرتر واقع شده و در نتیجه راندمان بهتری از نظر فاکتورهای زیستی تکثیر مصنوعی بدست خواهد آمد.

تشکر و قدردانی :

خردآفرینا ، تو را سپاس می گوییم ، به خاطر الطاف بیکرانت که بر ما نمودی تا بتوانیم این طرح تحقیقاتی را با تمام مشکلاتش با موفقیت به پایان برسانیم.

از ریاست محترم وقت مؤسسه جناب آقای دکتر رضوانی و نیز دکتر متین فر ریاست محترم بخش آبزی‌پروری مؤسسه برای توجه ویژه و همچنین حمایتهای بی‌دریغ و همه جانبه آنها نهایت سپاسگزاری می‌شود.

از ریاست محترم وقت مرکز تحقیقات شیلات گلستان جناب آقای مهندس امینی برای رهنمودهای علمی و حمایتهای دلسوزانه و زحمتهای بی‌شائبه، کمال قدردانی صورت می‌گیرد.

همچنین از کلیهٔ عزیزان و همکاران ذیل که در این طرح تحقیق ما را یاری نموده و از هیچ کوششی دریغ نورزیده‌اند، آقایان حالت قلی قزل ، محمد صلواتیان، احمد حامی طبری، ، ممی شافعی، عبدالقادر سالکی ، جمشید الیاسی، رضا عسگری ، حسین پیری و بهروز منصوری سپاسگزاری می‌شود.

در پایان از جناب آقای دکتر ستهی(Sethi) از کشور هندوستان و پروفسور تامارو (Tamaru) از کشور آمریکا که تلاش و همکاری آنان فراموش نشدنی است، نهایت قدردانی می‌گردد.

منابع

۱- قانعی تهرانی، م. ۸۰- ۱۳۷۷. مولدسازی و تکثیر مصنوعی کفال خاکستری. وزارت جهاد کشاورزی. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران.۱۰۴ صفحه.

۲- قانعی تهرانی، م . ۱۳۸۰. پرورش انگشت قدهای کفال خاکستری وارداتی در شرایط آب و هوایی شمال. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران.۹۰ صفحه.

3-Bromhall, J. 1954. A note on the reproduction of grey mullet. Hong Kong Univ. Fish. J., 1: 19-34

4-Donaldson,E.M.;Hunter,G.A.1983.Induced final maturation, ovulation, and spermiation in culture fish.W.S. Hoar and D.J.Randall (Editors), Fish Physiology, vol. 98.Academic press, New york.NY, 351-403.

5- Erman, F.1961.On the biology of the thick – lipped grey mullet (M.Chelocuv.). Rapp. P.V.Reun.Commn Int. Explor.Sci. Mer Mediterr., 16:276-285.

6-Greeley., M.S.Jr, D.R.Calder and R.A.Wallace. 1987.Occyte growth and development in the striped.Mullet, *Mugil ceohalus*, during seasonal ovarian recrudescence: relationship of fecundity and size at maturity. Fishery Bulletin 85(2), 187-200

7-Harel.,M. Sachi,B.A ., Vered.,Z and A. Tandler .1998. Mass production of grey mullet, *Mugil cephalus*: Effect of environmental and nutritional factors on larval performance. The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh 50(3) , 91-98

8-Hickling, C.F. 1970. A contribution to the natural history of the English grey mullets (Pisces, Mugilidae).J.Mar. Biol. Ass. U.K.50: 609-633.

9-Kuo,C.M.1993.Manipulation of ovarian maturation and spawning in grey mullet *Mugil cephalus* Linnaeus. The Third Indian Fisheries Forwn proceedings. Pantnagar, 81-88.

10-Kuo,C.M,Nash, C.E.and Z.H, Shehadeh, 1973. Induced spawning of captive grey mullet *(Mugil cephalus)* Females by injection of human chorionic gonadotrophin Aquaculture, 1:429-432.

11-Lam, T.J, 1982. Application of endocrinology to fish culture. Can. J.Fish. Aquat. Sci, 39:111-137.

12-Lee, C.S, Kelley, C.D. and C.S.Tamaru. 1988. The Cost and effectiveness of CPH, HCG and LHRH-A on the induced spawning of grey mullet, *Mugil cephalus*. Aquaculture, 73: 341-347.

13-Lee,C.S.,Tamaru, C.S., Kelly, C.D., Moriwake., A., and G.T., Miyamoto.1992a. The effect of salinities on the induction of spawning and fertilization in the striped mullet, *Mugil cephalus* .Aquaculture, 102:289-296.

14-Lee, C.S., Tamaru, C.S., Miyamoto, G.T and Kelley, C.D., 1987.Induced spawning of grey mullet *(Mugli cephalus)* by LHRH-a.Aquaculture, 62:327-336.

15-Liu, K.M. and C.D.Kelley. 1994. The oceanic institute hatchery manual series striped mullet *(Mugil cephalus)*. The Oceanic institute, Honolulu, Hawaii 96825.

16-Sarojini,K. 1958. Biology and Fisheries of the grey mullets of Bengal.ll. Biology of *Mugil cephalus* Val. Indian J. Fish, 5: 57-65.

17-Shehadeh, Z.H, Kuo, C.M and Milisen, K.K. 1979. Induced Spawning of grey mullet, *Mugil cephalus* L, with fraction ated salmon pituitary extract. J.Fish Biol, 5: 471-478.

18-Tamaru, C.S. Fitz Gerald, W. and V.Sato. 1993. Hatchery manual for the artificial propagation of striped mullet (*Mugil cephalus L*). Guam Aquaculture development and training center technical report.

19-Tamaru, C.S., Kelly, C.D., Lee, C.S., Aida, K., Hanyu., I and F. Goetz. 1991. Steroid profiles during maturation and induced spawning of the striped mullet *Mugil cephalus*. Aquaculture, 95: 149-168.

20-Zaki, M.I., Mousa, M., Kamel, S. and EL. Banhawy. 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.

Abstract:
In this study, nine years old farmed broodstocks of striped grey mullet have been induced artificially by hormones. Eight experiments of artificial propagation carried out during three months (from October to February) in 2003. The hormones used for males were HCG and 17-α- Methyltestosterone and to induce females the hormones such as LHRH-α_2, HCG and CPH were used. During these experiments, 27 females injected which 22 of them spawned along with larval production. Water temperature and salinity were 20-23°c and 32 ppt during artificial propagation respectively.
For larval culture, two different experiments carried out which final larval density in tanks, water temperature and salinity were 20 in/liter, 22-24°c and 32-33 ppt respectively. Larvae fed with live foods such as *Nannochloropsis oculata* , *Brachionus plicatilis,* Artemia nauplii with density of 500000 cell/ml, 20 ind/ml and 3-200 ind/liter respectively. Water exchange in larval culture tanks during first week
Was 10 percent of tank volume, and this amount in the second and next weeks were higher which have been 20-30 and 40-50 percent of tank volume respectively.
At the first experiment of larval culture, the tanks with maximum depth of 80 cm used that whole larvae died after 12 days post hatching; whereas at the next trial, three numbers of 4000 liters fiberglass black colure tanks with maximum depth of 120 cm used which tend to the survival rate of 0.9 percent after 55 days post hatching.

Keywords: Grey mullet, *Mugil cephalus,* mortality, artificial propagation, fingerling.

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION – Inland Waters Aquatics Stocks Research Center

---

Project Title : Study on the reason of striped mullet (*Mugil cephalus*) larvae mortality and the production of its fingerlings
Approved Number:2-77-12-91150
Author: Seyed Amin Mirhashemi Rostami
Project Researcher : Seyed Amin Mirhashemi Rostami
Collaborator(s) *:* H.A.Khoshbavar Rostami,A.Akhondi,M.Soghrli,A.Bordi Torik,M.Jorjani,M.Binaei,M.Eari,Gh.Shafei
Advisor(s): –

Supervisor:–

Location of execution : Golestan province
Date of Beginning : 2012
Period of execution : 1 Year & 6 Montsh
Publisher : ***Iranian Fisheries Research Organization***
Date of publishing : ***2014***

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION - Inland Waters Aquatics Stocks Research Center

Project Title :

Study on the reason of striped mullet (*Mugil cephalus*) larvae mortality and the production of its fingerlings

Project Researcher :

Seyed Amin Mirhashemi Rostami

Register NO.

43633