

اثر تزریق تیامین (ویتامین B₁) بر عملکرد تولیدمثلی ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*)

ساره قیاسی^۱، بهرام فلاحتکار^{۲*}

۱- کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، گیلان

۲- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، گیلان

تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۳

تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۱۸

*نویسنده مسئول مقاله: falahatkar@guilan.ac.ir

چکیده:

اثر تزریق ویتامین B₁ (تیامین هیدروکلراید) در سه سطح صفر (T₀)، ۵ (T₅) و ۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و در سه تکرار، بر شاخص‌های تولید مثلی ۴۵ عدد ماهی ماده (۸/۹ ± ۶۹۸/۶ گرم) استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) در تانک‌های فایبرگلاس بررسی گردید. ماهیان با جیره‌ای حاوی ۱ g/kg آمپرولیوم هیدروکلراید (به‌عنوان آنتی تیامین) در جیره یک بار در روز به مدت ۵ ماه پیش از تولید مثل تغذیه شدند. در انتهای دوره ۵ ماهه، شاخص قطبیت هسته اختلاف معناداری در تیمارها نشان نداد (p>۰/۰۵). هورمون استرادیول اختلاف معناداری در بین تیمارها نداشت (p>۰/۰۵)، اما هورمون تستوسترون تحت تأثیر تزریق تیامین بود (p<۰/۰۵). همآوری و زمان پاسخ به تزریق تفاوت معناداری در بین تیمارها نشان ندادند (p>۰/۰۵)، اما تعداد تخمک در گرم و درصد هچ تفاوت معناداری داشت (p<۰/۰۵). با توجه به نتایج، تزریق تیامین هیدروکلراید به میزان ۵۰ میلی گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن دارای اثرهای مثبت بر عملکرد تولیدمثلی داشته و می‌تواند اثرهای منفی ناشی از آنتی تیامین را در محیط‌های طبیعی کاهش دهد.

کلید واژگان: ویتامین B₁، تولید مثل، کیفیت تخم، استرلیاد.

مقدمه

با وجود اهمیت ماهیان خاویاری برای تولید گوشت و خاویار امروزه جمعیت این ماهیان به دلایل مختلفی از جمله صید بیش از حد، مدیریت ضعیف صید، عدم حفاظت، آلودگی‌های شدید زیست محیطی و ساخت سد روی رودخانه‌ها در سراسر جهان رو به کاهش است، به‌طوری که بسیاری از آن‌ها در فهرست گونه‌های در معرض خطر قرار گرفته‌اند. ماهی استرلیاد کوچک‌ترین عضو از خانواده ماهیان خاویاری است که به علت شرایط زیستی و رسیدگی جنسی کوتاه‌تر آن نسبت به دیگر ماهیان خاویاری و کمبود مولدین وحشی اغلب به‌عنوان یک الگوی زیستی در نظر گرفته می‌شود (Piros et al., 2002; Lahnsteiner et al., 2004; Williot et al., 2005).

امروزه درباره گونه‌های در حال انقراض از جمله ماهیان خاویاری، مدیریت صحیح مولدین در فصل تکثیر یکی از مهم‌ترین اقدامات در بحث توسعه آبی‌پروری و تولید تخم و لارو با کیفیت است. از این‌رو مواد غذایی مورد نیاز بدن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. یک جیره مناسب حاوی مواد مختلفی است که یکی از مهم‌ترین و ضروری‌ترین آن‌ها ریزمغذی‌ها و به‌خصوص ویتامین‌ها هستند (Graff et al., 2002; De Andrade et al., 2007).

ویتامین B₁ یا تیامین، اولین ویتامین کشف شده از گروه B بوده و جزء ویتامین‌های محلول در آب است که به‌عنوان کوآنزیم در مراحل متابولیک سلولی و در متابولیسم طبیعی کربوهیدرات، چربی و زنجیره‌های آمینو اسید شرکت می‌کند. همچنین حضور این ویتامین در تبدیل پیروات به استیل کوآ و در نهایت تولید آدنوزین تری فسفات (ATP)، برای تأمین انرژی مورد نیاز بافت‌های بدن ضروری است (Brown et al., 1998; Morris and Devis, 1995). اما با توجه به اطلاعات اندک به‌دست آمده، مکانیسم دقیقی

درباره اثر تیامین بر تولیدمثل شناخته نشده است. در محیط‌های طبیعی تیامین با آنتی تیامین‌هایی مانند تیامیناز که در ماهیان خام وجود دارد، از بین می‌رود و باعث بروز کمبود تیامین شدید در مولدین وحشی که در محیط‌های طبیعی از این ماهیان تغذیه می‌کنند، می‌شود (Honeyfield et al., 2005).

با توجه به کاهش روزافزون این ماهیان امروزه به‌کار بردن روش‌هایی برای افزایش کارایی تکثیر با تعداد محدود مولد امری مهم تلقی می‌شود، زیرا کیفیت تخم که یکی از شاخصه‌های تعیین‌کننده موفقیت در تولیدمثل است، متأثر از کمبود مواد غذایی در جیره مولدین می‌تواند دستخوش تغییرات شود و بر کیفیت باروری اثر گذارد به‌طوری که همآوری و اندازه تخم با کیفیت جیره غذایی که مولدین با آن تغذیه می‌شوند، تغییر می‌یابد (Blom and Dabrowski, 1995). همچنین مطالعات جدید نشان می‌دهد که حضور تیامین در مراحل ابتدایی زندگی ماهیان بسیار حیاتی بوده و میزان تیامین موجود در تخم با افزایش مرگ و میر در آلون آزاد ماهیان ارتباط دارد (Fitzsimons et al., 2009; Lee et al., 2009; Amcoff et al., 2000)، تا جایی که کمبود تیامین در ماهیان مولد پیش از فصل تولیدمثل، باعث کم شدن میزان این ویتامین در تخم‌های تولید شده (Wiegand et al., 2011) و بروز سندروم مرگ و میر زودرس (Early Mortality Syndrome) و در نهایت تلفات عمده در لارو ماهیان می‌شود (Brown et al., 1998).

امروزه در بحث ماهیان خاویاری به علت کیفیت مناسب‌تر مولدین و حفظ تنوع ژنتیکی در رهاسازی، در اکثر موارد از مولدین صید شده از محیط‌های طبیعی استفاده می‌شود. به نظر می‌رسد این ماهیان در اثر تغذیه با گونه‌های حاوی تیامیناز در طی زمان زندگی در دریا و سپس نگهداری در شرایط کارگاهی به‌دلیل عدم تغذیه،

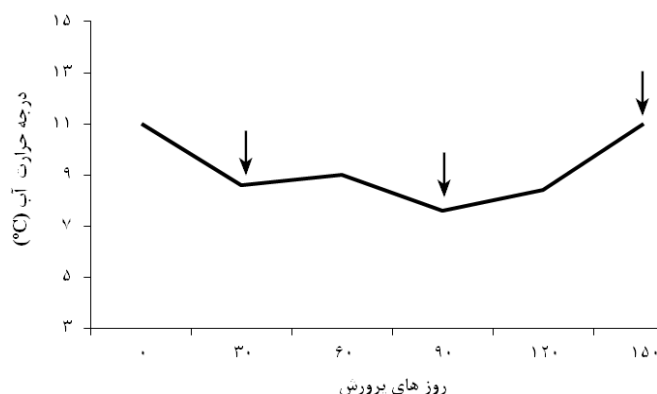
ذخایر تیامین بدن کاهش یابد. با توجه به عدم سنتز تیامین در بدن، کاهش تیامین می‌تواند اثرهای نامطلوبی بر محتوای تیامین بدن و در نهایت کاهش تیامین تخم و بروز تلفات در لاروهای حاصل شده داشته باشد. به‌طوری‌که با توجه به نقش حیاتی تیامین در دوران لاروی می‌توان انتظار داشت درصدی از تلفات تخم و لارو در زمان انکوباسیون و در هچری‌ها مربوط به کاهش تیامین در مولدین باشد. بنابراین برای افزایش تیامین در بدن و کاهش اثرهای منفی ناشی از تغذیه در محیط‌های طبیعی، نیاز است مولدین از زمان صید از محیط‌های طبیعی تا رسیدن فصل تکثیر در کارگاه‌ها نگهداری شوند تا راهکارهایی برای جبران کاهش تیامین در مولدین انجام پذیرد. با در نظر گرفتن اینکه مولدین در این مدت نسبتاً طولانی تغذیه فعالی نخواهند داشت و در شرایط زمستان‌گذرانی به‌سر می‌برند، بنابراین روش‌هایی غیر از تغذیه، مانند تزریق می‌تواند راهکاری برای افزایش تیامین در مولدین باشد و مطالعات مشابه صورت گرفته نیز تأیید کننده اثرهای مثبت این روش است (Amcoff et al., 2000; Ketola et al., 2000; Fitzsimons et al., 2005). مطالعه حاضر به بررسی مشکلات ناشی از کمبود تیامین و اثرهای آن بر عملکرد تولیدمثلی در ماهیان خاویاری با استفاده از تغذیه ماهیان با آنتی تیامین و تزریق دوره‌ای تیامین می‌پردازد. به‌علت محدودیت مولدین وحشی در دسترس، مولدین ماهی استرلیاد به‌عنوان گونه مورد مطالعه در نظر گرفته شد تا با آگاهی از اثرهای مثبت این ویتامین

در تولیدمثل ماهیان در فصل تکثیر و اعمال مدیریت صحیح منجر به بهبود هر چه بیشتر عملکرد تولیدمثلی مولدین و در نهایت افزایش بقای تخم و لارو این ماهیان با ارزش گردد.

مواد و روش‌ها

ماهی، شرایط پرورش و غذادهی

این مطالعه در مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی استان گیلان انجام شد. در این مطالعه ماهی استرلیاد به‌عنوان الگوی آزمایشگاهی برای تعمیم به دیگر ماهیان خاویاری در نظر گرفته شد. به این منظور تعداد ۱۲۰ ماهی مولد استرلیاد بیومتری شده و شاخص قطبیت هسته (GVM) در آن‌ها اندازه‌گیری شد. سپس ۴۵ ماهی با میانگین وزنی $9/8 \pm 696/6$ گرم، که از لحاظ سن و مرحله رسیدگی جنسی به هم نزدیک بودند، انتخاب شده و در ناحیه باله سینه‌ای پلاک‌گذاری شدند. ماهیان در سه تیمار و سه تکرار در ۹ تانک فایبرگلاس ($2 \times 2 \times 0/5$ متر) با حجم آبگیری $1063/3$ لیتر (هر تانک ۵ ماهی) به‌طور تصادفی توزیع شدند. آزمایش در یک محیط سرپوشیده با دوره نور طبیعی انجام گرفت. میانگین دمای آب در طول دوره زمستان‌گذرانی $8/9 \pm 0/3$ سانتی‌گراد و میانگین اکسیژن محلول برابر $7/5 \pm 0/2$ میلی‌گرم در لیتر بود. روند تغییرات دما در شکل ۱ آورده شده است.



شکل ۱ روند تغییرات دما در طی دوره پرورش. محل‌های علامت‌گذاری شده با فلش بیان‌کننده زمان تزریق تیامین به مولدین است.

جدول ۱ اجزای تشکیل‌دهنده و تجزیه و تحلیل تقریبی جیره

تهیه شده در تحقیق حاضر	
درصد	اجزای جیره
۳۴	آرد ماهی
۵	آرد گندم
۲۰	کنجاله سویا
۲۰	پودر گوشت
۹	سبوس گندم
۳	روغن ماهی
۳	روغن گیاهی
۲/۹	کربوکسی متیل سلولز
۱/۵	مکمل معدنی ^۱
۱/۵	مکمل ویتامینه ^۲
۰/۱	آمپرولیوم هیدروکلراید ^۳
آنالیز تقریبی جیره (n=۳)	
درصد	
۴۳/۰ ± ۰/۷	پروتئین
۱۳/۱ ± ۰/۲	چربی
۹/۷ ± ۰/۱	خاکستر
۱۳/۴ ± ۰/۱	رطوبت

۱- مکمل معدنی استفاده شده ساخت شرکت سیانس

(قزوین، ایران) است که هر ۱۰۰۰ گرم پرمیکس حاوی ۶

گرم آهن، ۱۰ گرم روی، ۲۰ میلی‌گرم سلنیوم، ۱۰۰ میلی‌گرم

ماهیان به مدت ۵ ماه (آذر ۱۳۹۰ تا اردیبهشت ۱۳۹۱) با جیره‌ای حاوی ۱g/kg آمپرولیوم هیدروکلراید برای شبیه‌سازی شرایط کمبود تیامین به میزان ۰/۵ درصد وزن بدن یک نوبت در روز (ساعت ۱۲ ظهر) تغذیه شدند. برای تهیه جیره ابتدا اقلام غذایی از نظر میزان تیامین بررسی شد (www.nutritiondata.self.com)؛ سعی بر آن بود تا از اقلامی استفاده شود که حداقل میزان تیامین را در ساختار غذایی خود دارا باشند. جیره به گونه‌ای تنظیم شد که از لحاظ میزان تیامین به حداقل میزان یعنی حدود ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره کاربردی رسید. تیامین مورد استفاده (Vitamin B1hydrochloride; Sigma, Germany) از شرکت سیگما و آمپرولیوم هیدروکلراید از شرکت تولید داروهای دامی ایران (تهران، ایران) خریداری و جیره‌های آزمایشی به صورت دست‌ساز تهیه شدند. برای رسیدن به رطوبت مناسب، پلت‌های تهیه شده (وزن ۰/۵ ± ۰/۰۱ گرم و طول ۰/۰۱ ± ۰/۰۸ سانتی‌متر) به مدت ۳۶ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و تا زمان مصرف در دمای صفر درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. اقلام غذایی و آنالیز تقریبی جیره پایه در جدول ۱ نشان داده شده است.

تعیین شاخص قطبیت هسته

برای بررسی اثر تیامین بر مهاجرت هسته به سمت قطب حیوانی، شاخص GVM در ابتدا و انتهای دوره پرورش (صفر و ۱۵۰ روز پس از شروع آزمایش) اندازه‌گیری شد. در این اندازه‌گیری از ماهیان پلاک‌دار هر تانک، ۳ ماهی به‌طور تصادفی در مرحله اول انتخاب و در انتها نیز همان ماهیان بررسی شدند. ماهیان پس از بیهوشی روی میز کار قرار گرفته و با یک سوند کوچک مقدار کمی تخمک از ناحیه شکمی بیرون کشیده شد (Chebanov and Galich, 2011). سپس نمونه تخمک هر ماهی درون یک اپندورف حاوی فرمالین ۴ درصد ریخته و نمونه‌ها برای بررسی به آزمایشگاه منتقل و میزان GVM با روش Chapman and Van Eenennaam (۲۰۰۷) اندازه‌گیری شد.

استروئیدهای جنسی

برای تعیین استروئیدهای جنسی ابتدا ماهیان بیهوش شده و ۲ میلی‌لیتر خون با استفاده از سرنگ هپارینه از ناحیه دمی گرفته شد و پس از جداسازی پلاسما، به‌وسیله سانتریفیوژ سطوح هورمون‌های تستوسترون (T) و استرادیول (E₂) با استفاده از کیت تشخیص آزمایشگاهی Immunotech (Marseille, France) با روش رادیوایمونواسی (RIA) پس از دو استخراج با سیکلو هگزان اتیل استات با روشی مشابه روش Foster and Jalabert (۱۹۸۶) محاسبه شد. همچنین ضریب تغییرات intra assay و inter-assay برای هورمون‌های T و E₂ به‌ترتیب برابر ۰/۲۷، ۰/۶۹ و ۶۳، ۹۰ بود و تجزیه همه نمونه‌ها و استانداردها در دو تکرار انجام شد.

عملکرد تولیدمثلی

برای تعیین عملکرد تولیدمثل در انتهای دوره پرورش (۵ ماه)، پس از قطع غذاهای به ماهیان و گذشت ۱۰ روز با

کبالت، ۶۰۰ میلی‌گرم مس، ۶ گرم آهن، ۵ گرم منگنز ۶۰۰ میلی‌گرم ید ۱ گرم کولین کلراید وجود دارد.

۲- مکمل ویتامینه استفاده شده ساخت شرکت مکمل‌سازی هشتگرد (هشتگرد، ایران) است که هر ۱۰۰۰ گرم پریمیکس حاوی: ۱۶۰۰۰۰۰ IU ویتامین A، ۴۰۰۰۰۰ IU ویتامین D₃، ۶۰ گرم ویتامین E، ۸ گرم ریبوفلاوین، ۱۲ گرم نیاسین، ۴۰ گرم اسید پانتونیک، ۴ گرم پیریدوکسین، ۲ گرم اسید فولیک، ۸ میلی‌گرم سیانوکوبالامین، ۶۰ گرم ویتامین C، ۲ گرم ویتامین K₃، ۴۰ میلی‌گرم بیوتین و ۲۰ گرم ویتامین اینوزیتول است.

۳- شرکت داروهای دامی ایران (تهران، ایران).

تزریق تیامین

پس از گذشت ۴ هفته از شروع تغذیه با جیره‌های مورد نظر، به تیمارهای در نظر گرفته شده به‌ترتیب با سه دوز صفر (T₀)، ۵ (T₅) و ۵۰ mg/kg (T₅₀) وزن بدن (Ketola et al., 2000; Fitzsimons et al., 2005) تیامین هیدروکلراید تزریق شد. برای تأمین تیامین مورد نیاز در طی دوره پرورش، تزریق در سه مرحله (۳۰، ۹۰ و ۱۵۰ روز پس از شروع آزمایش) صورت گرفت. برای این کار تیامین مورد نظر با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم وزن شده و در سرم فیزیولوژیک ۰/۹ درصد حل شد (Ketola et al., 2000). ماهیان ۲۴ ساعت پیش از تزریق قطع غذادهی شده و تزریق در ساعات اولیه صبح و پس از بیهوشی با عصا بودر گل میخک به میزان ۴۰۰ ppm صورت گرفت. سپس محلول سرم فیزیولوژیک و تیامین به میزان ۲ ml/kg (Fitzsimons et al., 2005) متناسب با وزن بدن در قسمت شکمی ماهی (Amcoffe et al., 2000) تزریق شد و ماهیان به‌سرعت برای ریکاوری به تانک‌های مربوط با آب تازه منتقل شدند.

و جذب آب به مخزن‌های کوچک شیشه‌ای (12 cm^2) و $10 \times 10 \times 10$ که کف آن‌ها با توری پلاستیکی محصور شده بود، منتقل و در انکوباتور یوشچنکو با دمای آب $1 \pm$ ۱۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از تفریح تخم‌ها، تعداد لاروها و تخم‌های مرده شمارش و درصد هچ تعیین شد.

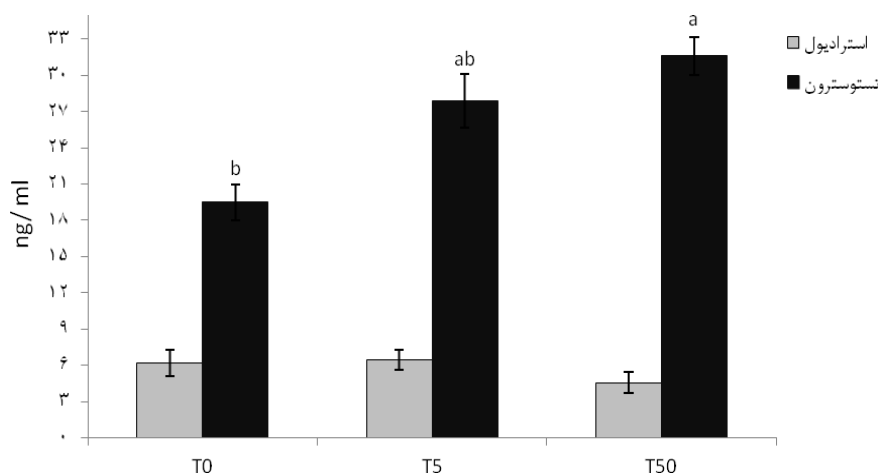
تجزیه و تحلیل آماری

برای انجام تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، ابتدا وضعیت طبیعی بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov – Smirnov و همگنی واریانس‌ها با آزمون Levene بررسی شد. با استفاده از تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و آزمایش Tukey به‌عنوان post hoc، مقایسه میانگین‌ها انجام گردید. اختلاف میانگین‌ها در تمام موارد با سطح اطمینان $p < 0.05$ تعیین شد. تجزیه و تحلیل با نرم‌افزار SPSS 16 انجام شد. داده‌های درون متن به‌صورت میانگین $\pm$ خطای معیار ($\text{mean} \pm \text{SE}$) ارائه شده‌اند.

نتایج

در انتهای دوره پرورش نتایج نشان داد که در خصوص استرادیول اختلاف معناداری در بین تیمارها در انتهای دوره مشاهده نمی‌شود (شکل ۲، $p > 0.05$) اما مقایسه آماری نشان داد میزان تستوسترون در تیمارهای تزریق شده افزایش معناداری را نسبت به تیمار شاهد داشت به‌طوری‌که بیشترین میزان در تیمار T_{50} و کمترین آن مربوط به تیمار T_0 بود (شکل ۲، $p < 0.05$).

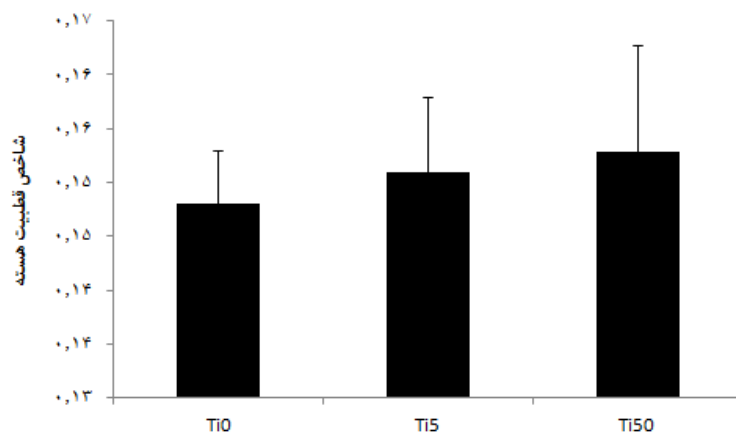
رسیدن به دمای مناسب تکثیر (۱۶ تا ۱۷ درجه سانتی‌گراد) و اطمینان از رسیدگی جنسی ماهیان با اندازه‌گیری GVM ماهیان تکثیر شدند. القای تخم‌ریزی در ماهیان با تزریق هورمون LHRH-A_2 (San Sheng, China, Ningbo) صورت گرفت. ماهیان با 400 ppm عصاره گل میخک بیهوش و هورمون موردنظر در ناحیه عضله پشتی تزریق شد. تزریق ماهیان با دوز $2/5\text{ }\mu\text{g/kg}$ به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در ۲ مرحله به فاصله ۱۲ ساعت صورت گرفت. تزریق ماهیان نر با دوز $2/5\text{ }\mu\text{g/kg}$ به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و هم‌زمان با تزریق مرحله دوم ماهیان ماده صورت گرفت. ۲۰ ساعت پس از اولین تزریق، با اطمینان از سیال شدن تخمک‌ها در محوطه شکمی، پس از بیهوشی تکثیر ماهیان به روش سزارین انجام گرفت (Falahatkar and Efatpanah, 2011). تخمک‌های حاصل شده پس از بررسی کیفیت و تحرک اسپرم‌ها با مخلوط اسپرم سه ماهی به روش‌های معمول لقاح داده شدند. کل تخمک استحصالی از هر ماهی به‌طور جداگانه جمع‌آوری و با دقت 0.01 گرم وزن شد سپس تعداد تخمک در یک نمونه حدود $2-1/5$ گرمی، از تخمک هر ماهی شمارش و با توجه به آن تعداد تخمک در هر گرم تعیین شد. هم‌آوری کاری در ماهیان با توجه به تعداد تخمک، تعیین گردید (Bromage et al., 1992) همچنین فاصله زمانی اولین مرحله تزریق هورمون تا رسیدگی نهایی ماهی برای هر ماهی به‌طور جداگانه ثبت و به‌عنوان زمان پاسخ به تزریق هورمون در نظر گرفته شد. تخمک‌های لقاح داده پس از رفع چسبندگی با گل رس



شکل ۲ سطوح هورمون استرادیول و تستوسترون ($\pm$ میانگین) در مولدین ماهی استرلیاد پس از ۵ ماه تغذیه با آمپرولیوم و تزریق دوره‌ای تیامین ($n=15$). حروف a و b بیانگر وجود اختلاف معنادار بین گروه‌های آزمایشی است ($p<0/05$).

درصد تغییرات و مهاجرت هسته به قطب حیوانی در تیمار T_{50} (۲/۸ درصد) و کمترین درصد در تیمار T_0 (۱/۸ درصد) مشاهده شد.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری شاخص GVM در طول دوره و پس از ۵ ماه تغذیه با آمپرولیوم و تزریق تیامین نشان داد اختلاف معناداری در انتهای دوره در بین تیمارها وجود ندارد (شکل ۳، $p>0/05$). با این حال بیشترین



شکل ۳ میزان GVM ($\pm$ میانگین) در مولدین ماهی استرلیاد پس از ۵ ماه تغذیه با آمپرولیوم و تزریق دوره‌ای تیامین ($n=9$). اختلاف معنادار آماری در بین تیمارها مشاهده نشد ($p>0/05$).

تیمار T_0 کمترین زمان و تیمار T_{50} بیشترین زمان را به خود اختصاص دادند (جدول ۲، $p>0/05$). نتایج نشان داد در خصوص درصد هج، تفاوت معناداری در تیمار کنترل و تیمار T_{50} نسبت به تیمار T_5 وجود دارد (جدول ۲، $p<0/05$).

در خصوص همآوری بین تیمارها تفاوت معناداری مشاهده نشد (جدول ۲، $p>0/05$). تیمار T_0 بیشترین و تیمار T_{50} کمترین تعداد تخمک در یک گرم را دارا بودند (جدول ۲، $p<0/05$). با وجود اینکه تفاوت معناداری مشاهده نشد، اما در خصوص زمان پاسخ‌گویی به تزریق،

جدول ۲ نتایج حاصل از عملکرد تولیدمثلی و محتوای تیامین تخمک ($\pm$ میانگین) در مولدین ماهی استرلیاد پس از ۵ ماه تغذیه با آمپرولیوم و تزریق دوره‌ای تیامین ($n=15$).

تیما	هماوری کاری (تعداد تخمک)	تعداد تخمک در گرم	زمان پاسخ به القای هورمونی (ساعت)	نرخ هچ (درصد)
T ₀	۳۵۶۴/۶ ± ۶۳۷/۶	۱۴۱/۲ ± ۲/۲ ^a	۲۲/۱ ± ۲/۶	۷۱/۲ ± ۱۲/۱ ^a
T ₁₅	۳۴۸۹/۴ ± ۱۱۱۶/۹	۱۲۷/۰ ± ۶/۴ ^{ab}	۲۷/۹ ± ۲/۲	۴۵/۱ ± ۱۵/۲ ^b
T ₁₅₀	۴۹۹۸/۲ ± ۴۱۷/۳	۱۱۳/۴ ± ۴/۹ ^b	۲۸/۵ ± ۳/۰	۶۶/۵ ± ۱۷/۱ ^a

حروف a و b بیانگر وجود اختلاف معنادار بین گروه‌های آزمایشی است ($p<0.05$).

بحث

مطالعه حاضر نشان داد در خصوص هورمون‌های جنسی مولدین استرلیاد، تفاوت معناداری در استرادیول مشاهده نشده اما در میزان تستوسترون افزایش معناداری در تیمار T₅₀ نسبت به تیمار T₀ وجود داشت. درباره اثر تیامین و دیگر ویتامین‌های گروه B بر هورمون‌های جنسی ماهیان مطالعه‌ای تاکنون صورت نگرفته است، با توجه به نتایج حاصل از مطالعه Audet و همکاران (۲۰۰۹)، زمانی که میزان تیامین در جیره گراز ۱۰ برابر بیشتر از تیمار کنترل باشد، افزایش معناداری در خصوص سنتز تستوسترون و استرادیول پلاسما در تیمار تحت تغذیه با تیامین نسبت به گروه کنترل مشاهده می‌شود.

همچنین مطالعات محدودی درباره اثر مواد غذایی و یا دیگر ویتامین‌ها بر استروئیدهای جنسی صورت گرفته است. در مطالعه Dabrowski و همکاران (۱۹۹۵) در مولدین قزل‌آلای رنگین کمان میزان تستوسترون افزایش معناداری در تیمارهای تغذیه شده با اسکورییک اسید داشت، اما میزان استرادیول پلاسما تحت تأثیر میزان ویتامین قرار نگرفت که با نتایج حاضر در خصوص اثر تیامین بر استروئیدهای جنسی مولدین استرلیاد مطابقت داشت. در حد فاصل زرده‌سازی و رسیدگی نهایی، تستوسترون به تدریج زیاد شده و به عنوان یک پیش‌ساز

باعث تولید استرادیول می‌شود (Fostier et al., 1986). در مطالعه حاضر نیز نتایج نشان داد که غلظت دو هورمون عکس همدیگر بودند. در خصوص اثر تیامین بر استروئیدهای جنسی دلایل شفافی وجود ندارد، اما به نظر می‌رسد ذخیره‌سازی تیامین در بافت‌های مغز و کبد، که از جمله بافت‌های تأثیرگذار بر سنتز هورمون‌های استروئیدی هستند، از جمله دلایل این افزایش در میزان تستوسترون باشد زیرا مغز به عنوان اولین عضو دخیل در ایجاد ارتباط بین محور هیپوتالاموس - هیپوفیز، یکی از مکان‌های ذخیره تیامین است و در صورت کمبود تیامین دچار آسیب می‌شود (Morito et al., 1986; Singleton and Martin, 2011). همچنین تیامین به عنوان کوآنزیم مهم در تولید نهایی ATP می‌تواند تأمین‌کننده انرژی مورد نیاز بافت گناد برای سنتز استروئیدها باشد.

در این تحقیق GVM در سه مرحله (روز صفر، ۷۵ و ۱۵۰) اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد تغذیه و تزریق تیامین اثر معناداری بر شاخص قطبیت هسته در میانه و انتهای دوره پرورش ندارد. شاخص قطبیت هسته شاخصی برای اندازه‌گیری GVM است و نشان‌دهنده میزان مهاجرت ژرمینال و زیکول به سمت قطب حیوانی است که هر چه میزان این شاخص کمتر باشد، هسته مهاجرت بیشتری داشته و در نتیجه ماهی به مراحل انتهایی رسیدگی

نزدیک‌تر است (Stoeckel, 2000; Chapman and Van Eenennaam, 2007). در تکثیر مصنوعی ماهیان خاویاری دانستن میزان GVM برای تعیین دوز هورمون تزریقی بسیار ضروری است. با این حال مطالعات بسیار محدودی درباره اثر تغذیه بر GVM در ماهیان خاویاری انجام شده و اغلب مطالعات به بررسی اثر دما، روند تغییرات آن تحت تأثیر هورمون‌ها در طی بلوغ و یا بررسی GVBD (germinal vesicle breakdown) پرداخته‌اند (Webb et al., 2001; Vizziano et al., 2006; Hajirezaee et al., 2010) و درباره اثر ویتامین‌ها بر GVM تاکنون مطالعه‌ای انجام نشده است. Yue (۲۰۱۱) اثر تغذیه بر GVM را در تاس‌ماهی سفید *Acipenser transmontanus* بررسی کرد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد میزان GVM تحت تأثیر میزان چربی و پروتئین جیره است هرچند این اختلاف معنادار نبود. در مطالعه حاضر، تزریق با تیامین اثر معناداری بر GVM نداشت، اما بیشترین درصد مهاجرت هسته در تیمار تحت تزریق ۵۰ میلی‌گرم تیامین مشاهده شد که با توجه به دوره طولانی مدت بلوغ و تولیدمثل در ماهیان خاویاری به نظر می‌رسد اثر تیامین بر تکامل تخمک‌ها و در مرحله تکثیر بر GVM در مدت زمان طولانی بیشتر نمایان شود.

تاکنون مطالعه‌ای درباره تزریق تیامین بر میزان پاسخ‌دهی به زمان تزریق و هم‌آوری در ماهیان خاویاری صورت نگرفته است. مطالعات بیان می‌کنند که هم‌آوری به‌عنوان یکی از شاخصه‌های مهم در تولیدمثل ماهیان تنها به طول و وزن ماهی وابسته نبوده و تحت تأثیر مواد غذایی در دسترس مولدین از جمله ویتامین‌ها در فصل تولیدمثل است (Izquierdo et al., 2001). مطالعه بر روی ویتامین C نشان داد که میزان هم‌آوری در ماهیان مولد تغذیه شده با جیره‌های حاوی ویتامین در مقایسه با تیمارهای کنترل افزایش معناداری داشته است (Blom and Dabrowski, 2004).

همچنین بیان شده که افزایش هم‌آوری در ماهیان ممکن است به علت اثرهای مواد غذایی بر هیپوفیز و افزایش میزان تولید هورمون و در پی آن افزایش تخم‌ریزی باشد (Izquierdo et al., 2001). در مطالعه حاضر، بیشترین میزان هم‌آوری در تیمار T₅₀ مشاهده شد که به نظر می‌رسد اثر تیامین بر بافت‌های سستز کننده هورمون باعث القای بهتر هورمونی و در نهایت اوولاسیون بیشتر در ماهیان تحت این تیمار شده باشد.

مطالعه حاضر نشان داد در خصوص زمان پاسخ به القای هورمونی تفاوت معناداری در تیمارهای مشاهده شده وجود ندارد، ولی بیشترین زمان در تیمار T₅₀ و کمترین آن در تیمار T₀ مشاهده شد که به نظر می‌رسد افزایش هم‌آوری و افزایش اندازه تخم به‌طور هم‌زمان باعث شده که ماهیان تحت تیمار T₅₀ نسبت به تیمار T₀ گناد بزرگ‌تری داشته باشند. با توجه به این مسئله، تأخیر در زمان اوولاسیون در ماهیان تیمار T₅₀ به این علت است که زمان طولانی‌تری نیاز بوده تا القای هورمونی در سراسر گناد اثر گذاشته و باعث اوولاسیون شود. با توجه به اهمیت افزایش حجم گناد برای تولید تخمک بیشتر و عدم اختلاف معنادار در زمان پاسخ به القای هورمونی در بین تیمارها، به نظر می‌رسد تیامین توانسته است در این خصوص اثر مثبتی بر مولدین داشته باشد. این مسئله بیانگر اثر مثبت و دوگانه تیامین بر روی تعداد تخمک و افزایش قطر تخمک است که بسیار قابل توجه است و نیاز به توجه بیشتر در مطالعات تکمیلی دارد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد تیمار T₅₀ کاهش معناداری در تعداد تخمک در هر گرم نسبت به تیمار T₀ داشت. مطالعات نشان می‌دهند که اندازه تخم با کیفیت مواد غذایی که مولدین با آن تغذیه می‌کنند، ارتباط دارد (Wiegand et al., 2004; Johnston et al., 2008).

توجه به اثرهای مثبت آن درباره مولدین دیگر گونه‌های ماهیان خاویاری موجود در کارگاه‌های تکثیر، تزریق‌های چند مرحله‌ای در طی دوره‌های طولانی مدت نگهداری و تزریق یک مرحله‌ای در فصل تکثیر اعمال کرد که این امر در نهایت به بهبود کیفیت تکثیر در ماهیان خاویاری منجر خواهد شد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مسئولان و کارکنان محترم مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی و از تمام همکارانی که در اجرای این پروژه با کمک‌ها و زحمات بی‌دریغ‌شان پشتیبان ما بودند به خصوص پروفسور کنراد دابرووسکی از دانشگاه ایالتی اوهایو که با نقطه نظرهای ارزنده‌شان راهنمای انجام این پروژه بودند، کمال تشکر را داریم.

منابع

Amcoff, P., Akerman, G., Borjeson, H., Tjarnlund, U., Norrgren, L. and Balk, L. 2000. Hepatic activities of thiamine-dependent enzymes, glucose-6-phosphate dehydrogenase and cytochrome P4501A in Baltic salmon (*Salmo salar*) yolk-sac fry after thiamine treatment. *Aquatic Toxicology*, 48: 391-402.

Audet, N., Rube, B., Bailey, J. L., Laforest, J. P., Quesnel, H. and Matte, J. J. 2009. Effects of dietary vitamin supplementation and semen collection frequency on hormonal profile during ejaculation in the boar. *Theriogenology*, 71: 334-341.

Blom, J. H. and Dabrowski, K. 1995. Reproductive success of female rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in response to graded dietary ascorbyl monophosphate levels. *Biology of Reproduction*, 52: 1073-1080.

Bromage, N. R., Porter, M. J. R. and Randall, C. F. 2001. The environmental regulation of maturation in farmed fish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture*, 197: 63-98.

مقابل، Wiegand و همکاران (۲۰۱۱) در بررسی تخم مولدین وحشی سوف *Sander vitreus* که در محیط طبیعی از شگ ماهیان تغذیه کرده بودند، بیان کردند که کاهش تیامین اثری بر اندازه تخمک ندارد. هر چند در مطالعه حاضر قطر تخمک اندازه‌گیری نشد، اما کاهش تعداد تخمک بیانگر این بود که در تیمار T₅₀ تخم‌های درشت‌تری تولید شده است. افزایش اندازه تخم در ماهیان به علت افزایش ویتلوژنین در تخم است که یک ذخیره پروتئینی در تخم است. ویتلوژنین، در ماهیان خاویاری ماده مولکول گلیکوفسفولیپو پروتئینی بزرگی است که از لیپید و مقدار قابل توجهی کربوهیدرات تشکیل شده است (Lu, 2009). با توجه به اهمیت تیامین در سنتز کربوهیدرات (Fynn-Aikins et al., 1998)، به نظر می‌رسد افزایش تیامین در ماهیان باعث افزایش ویتلوژنین و در نهایت درشت‌تر شدن اندازه تخم شده باشد.

در مطالعه حاضر در خصوص تستوسترون و شاخص قطبیت هسته، بیشترین میزان هورمون و مهاجرت هسته به قطب حیوانی در تیمار تحت تزریق ۵۰ میلی گرم تیامین مشاهده شد. بنابراین تزریق تیامین بر بلوغ ماهیان و تغییرات هورمونی در این دوره می‌تواند اثرگذار باشد. همچنین افزایش هم‌زمان اندازه تخم و هم‌آوری در تیمار تحت تزریق ۵۰ میلی گرم تیامین نشان داد که تیامین می‌تواند اثر مثبتی بر شاخصه‌های تکثیر بگذارد و تا حدودی بیانگر ایجاد روند مثبت بر تکامل گناد و بهبود عملکرد آن باشد. به نظر می‌رسد تزریق تیامین یک اقدام مؤثر در بهبود تولیدمثل و بلوغ ماهیان خاویاری است که نیاز به مطالعات تکمیلی درباره دوز بهینه و زمان‌های مناسب تزریق در ماهیان دارد. با دانستن این اطلاعات در آینده می‌توان این روش را به عنوان یک راهکار کاربردی و عملی به مزارع تکثیر و پرورش این ماهیان ارائه داد تا با

- Fontagné-Dicharry, S., Lataillade, E., Surget, A., Brèque, J., Zambonino-Infante, J. L. and Kaushik, S. D. 2010. Effects of dietary vitamin A on broodstock performance, egg quality, early growth and retinoid nuclear receptor expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 303: 40-49.
- Fostier, A. and Jalabert, B. 1986. Steroidogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at various preovulatory stages: changes in plasma hormone levels and in vivo and in vitro responses of the ovary to salmon gonadotropin. *Fish Physiology Biochemical*, 2: 87-99.
- Furuita, H., Ishida, T., Suzuki, T., Unuma, T., Kurokawa, T., Sugita, T. and Yamamoto, T. 2009. Vitamin content and quality of eggs produced by broodstock injected with vitamins C and E during artificial maturation in Japanese eel *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 289: 334-339.
- Fynn-Aikins, K., Bowser, P., Honeyfield, D. C., Fitzsimons, J. D. and Ketola, G. 1998. Effect of dietary amprolium on tissue thiamin and Cayuga syndrome in Atlantic salmon. *Transactions of the American Fisheries Society*, 127: 747-757.
- Graff, E., Waagbo, R., Fivelstad, S., Vermeer, C., Lie, O. and Klundeb, A. 2002. A multivariate study on the effects of dietary vitamin K, vitamin D3 and calcium, and dissolved carbon dioxide on growth, bone minerals, vitamin status and health performance in smolting Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 25: 599-614.
- Hajirezaee, S., Rafiee, G. H. R., Hushangi, R., Rahimi, R., Niksirat, H. and Kazemi, R. 2010. Germinal vesicle breakdown rates in oocytes and steroid levels in blood and ovarian fluid of the Persian sturgeon *Acipenser persicus*. *International Aquatic Research*, 2: 71-75.
- Honeyfield, D. C., Hinterkopf, J. P., Fitzsimons, J. D., Tillitt, D. E., Zajicek, J. L. and Brown, S. B. 2005. Development of thiamine deficiencies and early mortality syndrome in lake trout by feeding experimental and feral fish diets containing thiaminase. *Journal of Aquatic Animal Health*, 17: 4-12.
- Izquierdo, M. S., Fernández-Palacios, H. and Tacon, A. G. 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, 197: 25-42.
- Brown, S. B., Fitzsimons, J. D., Palace, V. P., Vandenbyllaardt, L. 1998. Thiamine and early mortality syndrome in lake trout. *Journal of American Fisheries Society*, 21: 18-25.
- Carvalho, P. S. M., Tillitt, D. E., Zajicek J. L., Dale, R. A., Honeyfield, D. C., Fitzsimons, J. D., Brown, S. B. 2009. Thiamine deficiency effects on the vision and foraging ability of lake trout fry. *Journal of Aquatic Animal Health*, 21: 315-325.
- Chapman, F. A., 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. Fisheries and Aquatic Sciences Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 4 pp.
- Chebanov, M. S., Galich, E. V. 2011. Sturgeon hatchery manual. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. No. 558. Ankara, FAO. 303 p.
- Dabrowski, K., Ciereszko, R. E., Blom, J. H., Ottobre, J. S. 1995. Relationship between vitamin C and plasma concentrations of testosterone in female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 14: 409-414.
- De Andrade, J. A., Akifumi, E. O., Menezes, G. C., Brasil, E. M., Roubach, R., Urbinati, E. C., Tavares, M., Marcon J. M., Affonso, E. G. 2007. Influence of diets supplemented with vitamins C and E on pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 146: 576-580.
- Falahatkar, B., Efatpanah Komae, I. 2011. Egg extraction of sterlet sturgeon, *Acipenser ruthenus*, through surgery. *Journal of Veterinary Research*, 4: 349-353.
- Fitzsimons, J. D., Brown, S. B., Williston, B., Williston, G., Brown, L. R., Moore, K., Honeyfield D. C., Tillitt, D. E. 2009. Influence of thiamine deficiency on lake trout larval growth, foraging, and predator avoidance. *Journal of Aquatic Animal Health*, 21: 302-314.
- Fitzsimons, J. D., Williston, B., Amcoff, P., Balk, L., Pecor, C., Ketola, H. G., Hinterkopf, J. P., Honeyfield, D. C. 2005. The effect of thiamine injection on upstream migration, survival, and thiamine status of putative thiamine-deficient coho salmon. *Journal of Aquatic Animal Health*, 17: 48-58.

- Singleton, C. K. and Martin, P. R. 2001. Molecular mechanisms of thiamine utilization. *Current Molecular Medicine*, 1: 197-207.
- Stoeckel, J. N. 2000. A method for viewing the germinal vesicle in oocytes of commercial Catfishes. *North American Journal of Aquaculture*, 62: 240-247.
- Vizziano, D., Barrios, F., Astigarraga, I., Breton, B. and Williot, P. 2006. Unusual conditions for Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt) spawning. *Journal of Applied Ichthyology*, 22: 325-330.
- Webb, M. A. H., Eenennaam, J. P. V., Feist, G. W., Linares-Casenave, J. M., Fitzpatrick, M. S., Schreck, C. B. and Doroshov, S. I. 2001. Effects of thermal regime on ovarian maturation and plasma sex steroids in farmed white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Aquaculture*, 201: 137-151.
- Wiegand, M. D., Johnston, T. A., Brown, L. R., Brown, S. B., Casselman, J. M. and Leggett, W. C. 2011. Maternal influences on thiamine status of walleye (*Sander vitreus*) ova. *Journal of Fish Biology*, 78: 810-824.
- Wiegand, M. D., Johnston T. A., Martin J. and Leggett W. C. 2004. Variation in neutral and polar lipid compositions of ova in ten reproductively isolated populations of walleye (*Sander vitreus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 61: 110-121.
- Williot, P., Brun, T. R., Rouault, T., Pelard, M., Mercier, D. and Ludwig, A. 2005. Artificial spawning in cultured sterlet sturgeon, *Acipenser ruthenus* L., with special emphasis on hermaphrodites. *Aquaculture*, 246: 263- 273.
- Yuan, C. T., Pan, X. P., Gong, Y., Xia, A. J., Wu, G. H., Tang, J. Q. and Han, X. D. 2008. Effects of astragalus polysaccharides (APS) on the expression of immune response genes in head kidney, gill and spleen of the common carp, *Cyprinus carpio* L. *International Immunopharmacology*, 8: 51-58.
- Yue, Z. 2011. Husbandry and dietary effects on sturgeon (*Acipenser transmontanus*) farmed for caviar. MSc thesis in Animal Biology, University of California, Davis, 48p.
- Johnston, T. A., Wiegand, M. D., Mittermuller S., Casselman J. M., Pyle, G. G. and Leggett, W. C. 2008. Metal provisioning of ova in walleye and lake whitefish. *Aquaculture*, 281:131-137.
- Ketola, H. G., Bowser, P. R., Wooster, G. A., Wedge, L. R. and Hurst, S. S. 2000. Effects of thiamine on reproduction of Atlantic salmon and a new hypothesis for their extirpation in Lake Ontario. *Transactions of the American Fisheries Society*, 129: 607-612.
- Lahnsteiner, B., Berger, F., Horvath, A. and Urbanyi, B. 2004. Studies on the semen biology and sperm cryopreservation in the sterlet, *Acipenser ruthenus* L. *Aquaculture Research*, 35:519-528.
- Lee, B., Jaroszewska, M., Dabrowski, K., Czesny, S. and Rinchar, J. 2009. Effects of vitamin B₁ (Thiamine) deficiency in lake trout alevins and preventive treatments. *Journal of Aquatic Animal Health*, 21: 290-301.
- Lee, K. J., Dabrowski, K. 2004. Long-term effects and interactions of dietary vitamins C and E on growth and reproduction of yellow perch, *Perca flavescens*. *Aquaculture*, 230: 377-389.
- Lu, X. 2009. Determining sexual maturity in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) to maximize yield and quality of caviar. Washington state university. Chapter 1. A review of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) female reproductive physiology and its importance for caviar production. pp 124.
- Morito, C. L. H., Conrad, D. H. and Hilton, J. W. 1986. The thiamin deficiency signs and requirement of rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson). *Journal of Fish Physiology and Biochemistry*, 1: 93-104.
- Morris, P. C. and Davis, D. J. 1995. Thiamin supplementation of diets containing varied lipid, carbohydrate ratio given to gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Journal of Aquatic Animal Health*, 61: 597-603.
- Piros, B., Glogowski, J., Kolman, R., Rzemieniecki, A., Domagala, J., Horvath, A., Urbanyi, B. and Ciereszko, A. 2002. Biochemical characterization of Siberian sturgeon *Acipenser baeri* and sterlet *Acipenser ruthenus* milt plasma and spermatozoa. *Journal of Fish Physiology and Biochemistry*, 26: 289-295.

Effect of thiamine injection on reproductive performance of sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*)

Effect of thiamine injection on reproductive index of sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*)

Sareh Ghiasi¹, Bahram Falahatkar^{2*}

1-M.Sc. Graduated student, Department of Fisheries., Natural Resources Faculty, Guilan University, Sowmeh Sara

2- Associate Prof., Department of Fisheries., Natural Resources Faculty, Guilan University, Sowmeh Sara

Received: 9/12/2013

Accepted: 24/5/2014

*Corresponding author: falahatkar@guilan.ac.ir

Abstract

The effect of thiamine injection at doses of 0 (T_0), 5 (T_5) and 50 (T_{50}) mg kg^{-1} body weight on reproductive performance of 45 females (698.7 ± 8.9 g) sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*) was investigated in fiberglass tanks. Fish were fed practical diets supplemented with 1 g/kg amprolium hydrochloride (as the anti-thiamine) once a day for 5-month before spawning. At the end of 5 months trial, no significant difference was observed in germinal vesicle migration among treatments ($p > 0.05$). Estradiol level was not significantly different ($p > 0.05$), but testosterone was affected by injection of thiamine ($p < 0.05$). Fecundity and latency time was not significantly different ($p > 0.05$) among the treatments, but number of eggs per gram and hatching rate were significantly different ($p < 0.05$). According to the results, injection of 50 mg thiamine hydrochloride per kg body weight had a positive effect on reproductive performance and could reduce the negative impacts of anti thiamines in natural environment.

Keywords: Vitamin B₁, Reproduction, Egg quality, Sterlet Sturgeon