القای واکنش تخم‌گشایی تحت تاثیر برخی عوامل فیزیکی و شیمیایی در تخمهای در حال سکون دافنی پولکس (*Daphnia pulex*)

سارا حق پرست [1]* و کاظم درویش بسطامی [2]

Sarah_haghparast@yahoo.com

١- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ٣٨٦-٤٩١٦٥

٢- موسسه ملی اقیانوس شناسی، تهران صندوق پستی: ١٣٣٨٩-١٤١١٨

تاریخ دریافت: اردیبهشت ١٣٨٩ تاریخ پذیرش: آذر ١٣٨٩

چکیده

با توجه به نقش و اهمیت گونه‌های متعلق به جنس دافنی در صنعت آبزی‌پروری بعنوان غذای طبیعی بویژه در تغذیه و بقای لارو انواع ماهیان، لزوم انجام مطالعه‌ای جامع در زمینه چگونگی واکنش تخم‌گشایی تخمهای درحال سکون آنها به منظور دستیابی به تکنیکی بهینه امری اجتناب‌ناپذیر می‌نمود. در این تحقیق، اثر فاکتورهای غیرزنده بر واکنش تخم‌گشایی تخمهای دافنی پولکس (*Daphnia pulex*) موجود در استخرهای پرورش غذای زنده مورد مطالعه قرارگرفت. تخمهای مذکور پس از جداسازی به دو حالت خشک و مرطوب به مدت دو ماه در تاریکی با دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند . پس از طی دوره انکوباسیون اولیه، دو گروه حاصل به دو زیر گروه یکسان تقسیم و هر زیر گروه بطور مجزا تحت تیمار غوطه‌وری در محلول هیپوکلریت سدیم (NaOCl ۱ درصد) و آب مقطر قرار گرفتند. اثر سطوح متفاوت دما (۱۵، ۲۰ و ۲۵ درجه سانتیگراد) و دوره روشنایی (۱۲L:۱۲Dو ۰L:۲۴D) بر میزان تخم‌گشایی تخمهای در حال سکون این گونه در محیط کشت AdaM طی ۱۵ روز بررسی گردید. نتایج نشان دادند که قراردادن تخمهای نگهداری شده به حالت مرطوب طی روشنایی ۱۲ساعته با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد بدون نیاز به غوطه‌وری در هیپوکلریت سدیم (NaOCl ۱ درصد) موجب افزایش حداکثر درصد و سرعت تخم‌گشایی در آنها می‌گردد.

لغات کلیدی: تکثیر و پرورش، تغذیه، غذای زنده، دافنی پولکس (*Daphnia pulex*)

مقدمه

در میان زئوپلانکتونهای آب شیرین سخت‌پوستان جنس دافنی (Daphnia) در راسته کلادوسرا جای داشته (Martin & Davis, 2001) و از مناطق استوایی گرفته تا مناطق قطبی در استخرهای خاکی کوچک و آب‌بندانها انتشار دارند (Zenkevich, 1962). گونه های متعلق به این جنس از لحاظ تولید مثل پلی‌مورف بوده و علاوه بر تولید تخمهای پارتنوژنز تابستانه، در شرایط سخت محیطی همچون سرمای زمستان، تراکم بالا و تغییر در طول دوره روشنایی، با انجام عمل لقاح میان نرها و ماده‌های پارتنوژنتیک، تخمهایی با پوشش مقاوم بنام افی‌پیوم (ephippium) تولید می‌کنند (Schultz & Kennedy, 1977).

* نویسندهٔ مسئول

[Downloaded from isfj.ir on 2024-07-17]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1389.19.4.7.1]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109961]

پوشش افی‌پیوم در این گونه تخمها قابلیت حفظ حیات جنین خفته در آن را تا حد قابل توجهی افزایش داده به گونه‌ای که پس از طی چندین دهه خشکسالی یا یخبندان به راحتی تخم‌گشایی رخ می‌دهد (Zenkevich, 1962). در میان ماهیان خاویاری تکثیر یافته در شمال کشور، گونه‌های مهاجر پاییزه مانند تاسماهی ایرانی یا قره‌برون (*Acipenser persicus*) و تاسماهی روسی یا چالباش (*Acipenser guldenstadti*)، قابلیت تکثیر مصنوعی در فصل زمستان را داشته (محمدنظری و همکاران، ۱۳۸۵) و این در حالی است که جمعیت کلادوسرهای پارتنوژنتیک (دافنی) مورد تغذیه جهت لاروهای این دو گونه، بدلیل ایجاد شرایط نامساعد مانند کاهش درجه حرارت و دوره نوری، افت شدیدی یافته و با شروع تولید مثل جنسی و القا مرحله خفتگی (diapause)، توده‌هایی انبوه از تخمهای افی‌پیال (ephippial) در سطح و کناره‌های مخازن پرورش کلادوسرا و دریاچه‌های طبیعی مشاهده می‌گردد. لذا مقارن شدن زمان تکثیر مصنوعی ماهیان خاویاری با شرایط نامساعد حاکم در فصل زمستان و عدم دستیابی به غذای زنده در طبیعت (شرایط طبیعی) در درون استخرها موجب می‌گردد تا مراحلی از پرورش لاروهای حاصل از تکثیر را تحت‌الشعاع قرار دهد. نقش دافنی‌ها در تغذیه، بقا و سازگاری بچه ماهیان خاویاری در محیطهای طبیعی از یک سو و اهمیت بالای تجاری و اقتصادی ماهیان خاویاری، در این تحقیق سعی بر این شد تا به تکنیک بهینه تخم‌گشایی تخمهای در حال سکون دافنی پولکس دست یافته و بدین وسیله بتوان با رفع مشکل تغذیه نوزادان گونه‌های قابل تکثیر در فصول سرد زمستان و پاییز (تکثیر خارج از فصل) اقدامی موثر در حفظ نسل و احیای ذخایر این ماهیان با ارزش انجام داد.

مواد و روش کار

جمع آوری تخم های درحال سکون از بخش های ساحلی، پلاژیک و رسوب پنج استخر غذای زنده واقع درمرکز پرورش ماهیان خاویاری گرگان در بهار ۱۳۸۶ صورت گرفت. جهت جدا سازی تخم ها از نواحی ساحلی و پلاژیک از تور پلانکتون‌گیر با چشمه ۵۰ میکرون استفاده و عملیات تورکشی در پنج منطقه تصادفی از هراستخرانجام پذیرفت. تخم های جمع آوری شده از نواحی ساحلی پس از خشک کردن و خارج نمودن خار و خاشاک جداسازی گردیدند. به منظور خارج کردن تخم های مدفون شده از میان رسوب (۳ سانتیمتر بالای کف استخر) از روش شناوری در محلول شکر (Sugar Floatation Method) استفاده گردید (Marcus, 1990).

شناسایی تخمهای در حال سکون *Daphnia pulex* براساس ویژگی‌های مورفولوژیک تخمها و براساس اندازه، شکل و طرح‌های بارز و تطبیق خصوصیات مذکور با کلیدهای شناسایی (Vandekerkhove *et al.*, 2004) و با استفاده از میکروسکوپ بینوکولار (Binocular) و تصاویر دیجیتالی صورت گرفت.

تخمهای جمع‌آوری شده از تمامی نواحی به نسبت حجمی یکسان با یکدیگر ترکیب شده و مخلوط همگن حاصل پیش از شروع آزمایشات، طی دوره‌ای حداقل به مدت ۵ ماه در تاریکی و دمای محیط (۴±۲۲ درجه سانتیگراد) بصورت خشک نگهداری شد. به منظور بررسی اثر نگهداری اولیه در تاریکی بر میزان تخم‌گشایی، تخمهای مذکور در فیلمهای پلاستیکی دربدار و سیاه رنگ قرار داده شده و در یخچال با دمای ۴ درجه سانتیگراد و در دو حالت خشک و مرطوب به مدت دو ماه نگهداری شدند. به منظور نگهداری تخمها به حالت مرطوب، ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت نگهداری تخمهای در حال سکون مطابق جدول ۱ تهیه و به ۱۵۰ گرم تخم اضافه گردید. مرطوب نگهداشتن تخمها طی دوره مذکور با افزودن مقداری محیط کشت تازه هر ۱۵روز یکبار انجام گرفت (Pancella & Stross, 1963).

پس از طی دوره انکوباسیون اولیه در تاریکی، تخمهای هر دو گروه (خشک و مرطوب) به دو زیر گروه تقسیم شده و زیر گروه نخست تحت تیمار غوطه‌وری با محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد قرار گرفته و زیر گروه دوم بعنوان تیمار شاهد در۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر غوطه‌ور گردید. جهت تهیه محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد، محلولی ۲۰ درصد از وایتکس و آب مقطر در ارلن شیشه‌ای دربدار تهیه و غوطه‌وری تخمها به مدت ۵ دقیقه در لوله‌های آزمایش دربدار انجام گرفت (Pancella & Stross, 1963).

اثر قرارگیری در معرض روشنایی به مدت ۱۵ روز و در دو دوره متفاوت (۱۲ و ۲۴ ساعت روشنایی در روز) و همچنین اثر دما طی این دوره در۳ دمای مختلف (۲۵، ۲۰ و۳۰ درجه سانتیگراد) و در محیط کشت AdaM (Artificial *Daphnia* Medium) (Maier, 1990) با ضریب هدایت ۲۰۰ میکروزیمنس بر سانتیمتر بر واکنش تخم‌گشایی تخمهای در حال سکون سنجیده شد. لازم بذکر است که محیط کشت مذکور پیش از استفاده در آزمایشات مطابق جدول ۲ تهیه به مدت ۱۲ساعت هوادهی گردید. میزان روشنایی

[Downloaded from isfj.ir on 2024-07-17]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1389.19.4.7.1]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109961]

در سطح ظروف آزمایشی در تمامی تیمارها بطور متوسط ۱۷۰۰ لوکس بود. تعداد نوزادان دافنی در هر تیمار بطور روزانه ثبت و سپس توسط پیپت‌ها خارج می‌شدند.

نرخ تخم‌گشایی تخمهای در حال سکون برحسب درصد و براساس تعداد نوزادان متولد شده در هر تیمار پس از ۱۵روز قرارگیری در معرض روشنایی تعیین گردید. جهت تعیین تعداد جنین های خفته و با توجه به حضور دو جنین در هر تخم، تعداد تخمهای مورد آزمایش در هر تیمار در عدد ۲ ضرب گردید (Vandekerkhove *et al*, 2005).

$$\frac{N_H}{N_e} = \text{نرخ تخم‌گشایی (درصد)}$$

N_H= تعداد نوزادان متولد شده پس از ۱۵ روز کنترل

N_e= تعداد کل تخمهای در حال سکون مورد استفاده در آزمایش

با در نظر گرفتن ظهور اولین تخم گشایی در روز سوم، ضریب تخم‌گشایی در هر یک از زمانهای مورد بررسی تعیین (جدول ۳) و با توجه به تعداد نوزادهای متولد شده در هر روز، سرعت تخم‌گشایی مطابق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{سرعت تخم‌گشایی} = \sum_{i=3}^{15} \frac{N_i}{N_e} \times I_i$$

N_e= تعداد تخمهای در حال سکون مورد آزمایش

I_i= ضریب تخم‌گشایی در روز کنترل و

N_i = تعداد نوزادان تازه متولد شده درزمان کنترل،

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصله با استفاده از بسته نرم‌افزار SAS (SAS Institute,۹/۱۹۹۶،۱) انجام شده و آزمایشات بصورت فاکتوریل ۲×۲ ×۳×۲×۳ (۲ سطح نگهداری اولیه درتاریکی، ۲ سطح غوطه‌وری در محلول هیپوکلریت سدیم (NaOCl ۱ درصد)، ۳ سطح درجه حرارت، ۲ سطح روشنایی، ۳ تکرار) در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی انجام شد. جهت تجزیه و تحلیل نرخ و سرعت تخم‌گشایی در تیمارهای متفاوت ابتدا داده‌ها توسط تبدیل رادیکالی نرمال شده و سپس با آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و در مواردی که اثر کلی تیمارها و اثر متقابل آنها معنی‌دار شناخته شده از آزمون LSD (Least Significant Difference) در سطح α=۰/۰۵ جهت مقایسه میانگین استفاده گردید.

جدول ۱ : محیط کشت مورد استفاده طی دوره انکوباسیون اولیه درتاریکی جهت نگهداری تخم درحال سکون دافنی پولکس

آب مقطر (۲۰ درجه سانتیگراد)	$CaCl_2$	$MgSO_4$	K_2HPO_4	KNO_3	$NaHCO_3$
۱۰۰۰ میلی‌لیتر	۸۰ میلی‌گرم	۲۲ میلی‌گرم	۵۰ میلی‌گرم	۵۰ میلی‌گرم	۵۰ میلی‌گرم

جدول ۲: طرز تهیه محیط کشت AdaM

آب مقطر تازه (۲۰)	محلول ۱۱۷/٦گرم بر لیتر $2H_2O\ CaCl_2$	نمک دریا	محلول ۰/۰۰۲۵گرم بر لیتر SeO_2	محلول ۲۵/۲ گرم بر لیتر $NaHCO_3$
۱۰ لیتر	۲۳ میلی‌لیتر	۳/۳۳ گرم	۱ میلی‌لیتر	۲۲ میلی‌لیتر

جدول ۳ : ضریب تخم‌گشایی تخمهای در حال سکون در هر یک از زمانهای کنترل

زمان کنترل (روز)	۳	٤	٥	٦	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱٤	۱٥
ضریب تخم‌گشایی (I_i)	۱	۰/۹۲	۰/۸٥	۰/۷۷	۰/۷	۰/٦۱	۰/٥٤	۰/٤۷	۰/٤	۰/۳۱	۰/۲۳	۰/۱٥	۰/۱

نتایج

نتایج آنالیز واریانس نرخ و سرعت تخم‌گشایی در تخمهای در حال سکون دافنی پولکس در سطوح متفاوت عوامل مورد بررسی در این مطالعه به شرح جدول ۴ می‌باشد. مطابق نتایج این جدول اثر متقابل معنی‌داری ($P<0.05$) میان سطوح نگهداری اولیه در تاریکی و دما بر نرخ و سرعت تخم‌گشایی در تخمهای دافنی پولکس مشاهده شد. همچنین اثر مستقل طول دوره روشنایی و اثر متقابل میان سطوح غوطه‌وری در محلول هیپوکلریت سدیم (NaOCl ۱ درصد) و درجه حرارت بر سرعت تخم‌گشایی معنی‌دار بود ($P<0.05$).

[Downloaded from isfj.ir on 2024-07-17]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1389.19.4.7.1]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109961]

جدول ٤ : آنالیز واریانس نرخ و سرعت تخم‌گشایی در تخم در حال سکون دافنی پولکس (***Daphnia pulex***)

	درجه آزادی		مجموع مربعات		F value	
	نرخ تخم‌گشایی	سرعت تخم گشایی	نرخ تخم‌گشایی	سرعت تخم‌گشایی	نرخ تخم‌گشایی	سرعت تخم‌گشایی
اثر PIP	١	١	٦٥٩/٣٣	٠/١٢	٢١/٤٢**	١٦١/٥٤ **
اثر F	١	١	١٩/١	٠/٠٠	٠/٥٩ n.s	٠/٤ n.s
اثر LL	١	١	٦٤/٠٦	٠/٠٠	١/٩٧ n.s	٤/٠٦ *
اثر T	٢	٢	١٤٢٤٢/٣٦	٠/٤٣	٢١٩/٣٣**	٢٧٧/٤٥ **
اثر PIP × اثر F	١	١	٤٠/١٢	٠/٠٠	١/٢٤ n.s	٠/٧٦ n.s
اثر PIP × اثر LL	١	١	٢١/٧٦	٠/٠٠	٠/٦٧ n.s	٢/٥٣ n.s
اثر PIP × اثر T	٢	٢	١٨٨/٤٧	٠/٠٤	٢/٩ **	٢٦/٨٥ **
اثر F × اثر LL	١	١	٤١/٣٨	٠/٠٠	١/٢٧ n.s	٣/١ n.s
اثر F × اثر T	٢	٢	٤٨/٢١	٠/٠١	٠/٧٤ n.s	٤/٠٣ *
اثر LL × اثر T	٢	٢	٧٨/٢٢	٠/٠٠	١/٢ n.s	٢/٥٤ n.s
اثر PIP × اثر F × اثر LL	١	١	٢٥/٥٨	٠/٠٠	٠/٧٩ n.s	٠/٠١ n.s
اثر PIP × اثر F × اثر T	٢	٢	١٠٥/٦٦	٠/٠٠	١/٦٣ n.s	٠/٨٤ n.s
اثر PIP × اثر LL × اثر T	٢	٢	١٢٤/٨	٠/٠٠	١/٩٢n.s	٠/٣١ n.s
اثر F × اثر LL × اثر T	٢	٢	٢٨/٨٥	٠/٠٠	٠/٤٤ n.s	٠/٥٩ n.s
اثر PIP×اثر F×اثر LL×اثر T	٢	٢	٣٧/٤٧	٠/٠٠	٠/٥٨ n.s	١/١ n.s
خطا	٤٨	٤٨	١٥٥٨/٤٥	٠/٠٤		
خطاکل	٧١	٧١	١٧٣١٩/٨	٠/٦٥		

: معنی‌دار در سطح ١ درصد * معنی‌دار در سطح ٥ درصد **n.s : غیر معنی‌دار **PIP**: نگهداری اولیه در تاریکی

F: غوطه‌وری در محلول هیپوکلریت سدیم (**NaOCL** ١ درصد) **LL**: طول دوره روشنایی در روز **T**: درجه حرارت

براساس نتایج جدول ٥، بیشترین میزان نرخ تخم‌گشایی در تخمهای مرطوب و غوطه‌ور شده در محلول هیپوکلریت سدیم (NaOCl ١ درصد) و نگهداری شده طی ١٢ ساعت روشنایی در روز در دمای ٢٥ درجه سانتیگراد مشاهده گردید و آن دسته از تخمهای خشک و تیمار نشده با محلول مذکور و نگهداری شده طی روشنایی مداوم در دمای ٣٠ درجه سانتییگراد کمترین میزان این شاخص را دارا بودند.

بررسی نتایج جدول ٦ نشان می‌دهد که آن دسته از تخمهای خشک و تیمار نشده با محلول هیپوکلریت سدیم (NaOCl ١ درصد) طی نگهداری در سطوح متفاوت طول دوره روشنایی و دمای٣٠ کمترین سرعت تخم‌گشایی را نشان داده در صورتیکه بالاترین میزان این شاخص در تخمهای مرطوب و تیمار نشده با محلول غوطه‌وری و طی نگهداری در دمای ٢٥ درجه سانتیگراد و روشنایی مداوم مشاهده شد.

براساس نتایج آزمون (LSD)، اختلاف معنی‌دار ($P<0.01$) میان سطوح مختلف نگهداری اولیه در تاریکی در هر یک از سطوح دما بر واکنش تخم‌گشایی تخمها وجود داشت به گونه‌ای که در دمای٢٠ یا ٢٥، نرخ و سرعت تخم‌گشایی در تخمهای در حال سکون نگهداری شده به حالت مرطوب بطور معنی‌دار ($P<0.05$) بالاتر از تخمهای خشک بود و لیکن اثر سطوح متفاوت نگهداری اولیه در تاریکی در تخمهای نگهداری شده در دمای٣٠ درجه سانتیگراد معنی‌دار ($P>0.05$) نبود (جدول ٧).

نتایج آزمون LSD نشان داد که نرخ تخم‌گشایی در تخمهای در حال سکون این گونه تحت تاثیر غوطه‌وری در محلول هیپوکلریت سدیم (NaOCl ١ درصد) نبوده و اثرات متقابل آن نیز با سایر فاکتورها معنی‌دار نمی‌باشد ($P>0.05$). سرعت تخم‌گشایی در میان تخم های غوطه ور شده و یا غوطه ور نشده در محلول هیپوکلریت سدیم (NaOCl ١ درصد) در دماهای ٢٥ و ٣٠ درجه سانتیگراد تفاوت معنی‌داری ($P>0.05$) وجود نداشت در حالیکه غوطه‌وری تخمها در این محلول سبب افزایش معنی‌دار ($P<0.05$) سرعت تخم‌گشایی در دمای ٢٠ درجه سانتیگراد شد (جدول ٨).

[Downloaded from isfj.ir on 2024-07-17]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1389.19.4.7.1]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109961]

جدول ٥: میانگین نرخ تخم‌گشایی در تخمهای در حال سکون دافنی پولکس(*Daphnia pulex*)

نگهداری اولیه در روشنایی بصورت مرطوب				نگهداری اولیه در تاریکی بصورت خشک				
عدم غوطه‌وری در NaOCl ١درصد		غوطه‌وری در NaOCl ١ درصد		عدم غوطه‌وری در NaOCl ١ درصد		غوطه‌وری در NaOCl ١ درصد		
٢٤ ساعت روشنایی درروز	١٢ ساعت روشنایی درروز	٢٤ ساعت روشنایی درروز	١٢ ساعت روشنایی درروز	٢٤ ساعت روشنایی درروز	١٢ ساعت روشنایی درروز	٢٤ ساعت روشنایی درروز	١٢ ساعت روشنایی درروز	درجه حرارت (درجه سانتیگراد)
درصد تخم گشایی± انحراف معیار	درصد تخم گشایی± انحراف معیار	درصد تخم گشایی± انحراف معیار	درصد تخم گشایی± انحراف معیار	درصد تخم گشایی ± انحراف معیار	درصد تخم گشایی± انحراف معیار	درصد تخم گشایی± انحراف معیار	درصد تخم گشایی± انحراف معیار	
٣٥±٤/٤٠٩	٣٠/٨٣±٧/٦٣٨	٣٦/٦٧±٣/٨١٩	٣٠/٨٣±٣/٨١٩	٢٥/٥٥±٧/٥١٥	٢٥/٨٣±١٠/١٠٤	٢٧/٥±٧/٥	٢٥±٩/٠١٤	٢٠
٣٦/٦٧±٣/٨١٩	٣٧/٥±٩/٠١٤	٣٨/٣٣±٥/٢٠٤	٣٩/١٧±١٠/١٠٤	٣٣/٣٣±٣/٣٣٣	٣١/٦٧±٧/٦٣٨	٣١/٦٧±٦/٢٩١	١٧/٠٨±١/٩٠٩	٢٥
٢/٢٢±١/٩٢٤	٤/١٦±٤/٠١٨	١/٢٥±١/٢٥	٢/٩٢±٣/١٤٦	٠/٥٥±٠/٩٦٢	١/١١±١/٩٢٤	٠/٨٣±٠/٧٢١	٠/٨٣±١/٤٤٣	٣٠

جدول ٦: میانگین سرعت تخم‌گشایی در تخم در حال سکون دافنی پولکس(*Daphnia pulex*)

نگهداری اولیه در روشنایی بصورت مرطوب				نگهداری اولیه در تاریکی بصورت خشک				
عدم غوطه‌وری در NaOCl ١ درصد		غوطه‌وری در NaOCl ١ درصد		عدم غوطه‌وری در NaOCl ١ درصد		غوطه‌وری در NaOCl ١ درصد		
٢٤ ساعت روشنایی در روز	١٢ ساعت روشنایی در روز	٢٤ ساعت روشنایی در روز	١٢ ساعت روشنایی در روز	٢٤ ساعت روشنایی در روز	١٢ ساعت روشنایی در روز	٢٤ ساعت روشنایی در روز	١٢ ساعت روشنایی در روز	درجه حرارت (درجه سانتیگراد)
سرعت تخم گشایی± انحراف معیار	سرعت تخم گشایی± انحراف معیار	سرعت تخم گشایی± انحراف معیار	سرعت تخم گشایی± انحراف معیار	سرعت تخم گشایی± انحراف معیار	سرعت تخم گشایی± انحراف معیار	سرعت تخم گشایی± انحراف معیار	سرعت تخم گشایی ± انحراف معیار	
٠/١٦±٠/٠٠٨	٠/١٧±٠/٠٢٧	٠/٢٣±٠/٠٣٦	٠/١٩±٠/٠٢٥	٠/٠٩±٠/٠٢٤	٠/٠٧±٠/٠٣	٠/١٢±٠/٠٣٢	٠/٠٨±٠/٠٢١	٢٠
٠/٢٧±٠/٠٤٣	٠/٢٦±٠/٠٤٨	٠/٢٦±٠/٠٤٤	٠/٢٥±٠/٠٤	٠/١٥±٠/٠٤١	٠/١٣±٠/٠٢٥	٠/١٥±٠/٠٢٤	٠/٠٨±٠/٠٠٧	٢٥
٠/٠٢±٠/٠١٦	٠/٠٣±٠/٠٣٣	٠/٠١±٠/٠١	٠/٠٢±٠/٠٢٣	٠/٠٠±٠/٠٠٣	٠/٠٠±٠/٠٠٧	٠/٠٠±٠/٠٠٣	٠/٠٠±٠/٠٠٧	٣٠

[Downloaded from isfj.ir on 2024-07-17]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1389.19.4.7.1]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109961]

جدول ۷: اثر متقابل سطوح نگهداری اولیه در تاریکی و دما بر نرخ تخم‌گشایی در دافنی پولکس(*Daphnia pulex*)

		۲۰ (درجه سانتیگراد)	۲۵ (درجه سانتیگراد)	۳۰ (درجه سانتیگراد)
نرخ تخم‌گشایی	مرطوب	۳۳/۳۳±۱/٤۹^{Aa}	۳۷/۹۲±۱/۸٦۷^{Aa}	۲/٦٤±۰/۷٦^{Ab}
	خشک	۲۵/۹۷±۲/۱۳٦^{Ba}	۲۸/٤٤±۲/۳۷۸^{Ba}	۰/۸۳±۰/۳۳٦^{Ab}
سرعت تخم‌گشایی	مرطوب	۰/۱۹±۰/۰۱^{Aa}	۰/۲٦±۰/۰۱۱$^{A b}$	۰/۰۲±۰/۰۰٦^{Ac}
	خشک	۰/۰۹±۰/۰۰۸^{Ba}	۰/۱۳±۰/۰۱۱^{Bb}	۰/۰±۰/۰۰۱^{Ac}

حروف متفاوت(A-B) نشان دهنده تفاوت معنی داردرهرستون است(P<0.05).

حروف متفاوت (a-c) نشان دهنده تفاوت معنی داردرهرردیف است(P<0.05).

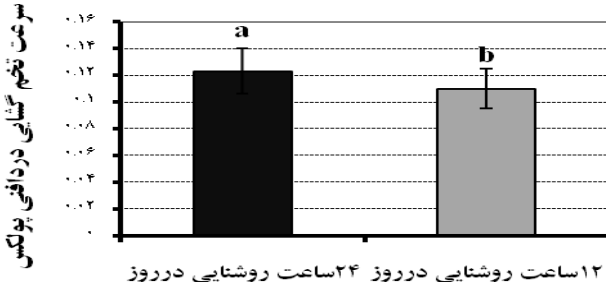
جدول ۸: اثر متقابل سطوح دما وغوطه‌وری در محلول NaOCl بر سرعت تخم‌گشایی دافنی پولکس(*Daphnia pulex*)

	عدم غوطه‌وری در ۱ درصد NaOCl	غوطه‌وری در ۱ درصد NaOCl
۲۰ (درجه سانتیگراد)	۰/۱۲±۰/۰۱٤$^{B b}$	۰/۱۵±۰/۰۲$^{B a}$
۲۵ (درجه سانتیگراد)	۰/۲±۰/۰۲۱$^{A a}$	۰/۱۹±۰/۰۲٤$^{A a}$
۳۰ (درجه سانتیگراد)	۰/۰۱±۰/۰۰٦$^{C a}$	۰/۰۱±۰/۰۰٤$^{C a}$

حروف متفاوت (A-B) نشاندهندهٔ تفاوت معنی‌دار در هرستون است (P<0.05).

حروف متفاوت (a-c) نشاندهندهٔ تفاوت معنی‌دار در هر ردیف است (P<0.05).

تفاوت معنی‌دار میان سطوح متفاوت طول دوره روشنایی در روز و اثر متقابل آن با دیگر عوامل بر نرخ تخم‌گشایی تخمها مشاهده نشد (P>0.05) ولی سطوح متفاوت طول دوره روشنایی اثر معنی‌داری بر سرعت تخم‌گشایی تخمها ایجاد کرد به گونه‌ای که قرارگیری در معرض روشنایی مداوم سبب افزایش معنی‌دار (P<0.05) این نرخ در مقایسه با ۱۲ ساعت روشنایی در روز شد (نمودار ۱).



نمودار ۱: اثر سطوح طول دوره روشنایی برسرعت تخم‌گشایی در دافنی پولکس(*Daphnia pulex*)

[Downloaded from isfj.ir on 2024-07-17]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1389.19.4.7.1]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109961]

با توجه به معنی‌دار بودن ($P<0.01$) اثر متقابل میان سطوح متفاوت دما با سطوح متفاوت نگهداری اولیه در تاریکی و غوطه‌وری در هیپوکلریت سدیم (NaOCl ١ درصد) بر سرعت تخم‌گشایی تخمها، در هر یک از سطوح این ٢ فاکتور، سرعت تخم‌گشایی در دمای ٢٥ درجه سانتیگراد بیشترین مقدار، در دمای ٢٠ به درجه سانتیگراد به میزان متوسط و در دمای ٣٠ درجه سانتیگراد کمترین میزان بود. همچنین نرخ این واکنش در دماهای ٢٠ و ٢٥ درجه سانتیگراد تفاوتی نداشته اما کمترین میزان در دمای ٣٠ درجه سانتیگراد شاهده شد (جداول ٧ و ٨).

بحث

در این بررسی اثر عواملی مانند غوطه‌وری در محلول هیپوکلریت سدیم (NaOCl ١ درصد) و نگهداری در سطوح متفاوت دما و دوره روشنایی بر چگونگی واکنش تخم‌گشایی تخمهای در حال سکون دافنی پولکس بطور همزمان، پس از گذراندن دو ماه دوره انکوباسیون اولیه در تاریکی به حالت مرطوب یا خشک مورد سنجش قرار گرفت. در این تحقیق، حداکثر نرخ تخم‌گشایی در تخمهای در حال سکون ٣٩/١٧ درصد بدست آمد. پایین بودن نسبی نرخ تخم‌گشایی در این گونه در مقایسه با سایر مطالعات را می‌توان بعلت استفاده از تخمهای دکپسوله نشده و عدم کنترل حضور جنین‌های خفته فعال در محفظه افی‌پیوم تخمها دانست. در دکپسوله کردن، تخمهای خفته بطور مستقیم‌تر در معرض محرکهای تخم‌گشایی قرار گرفته و این امر احتمالاً اصلی‌ترین اثر این روش مجازی (Virtual) در تحریک تخمها می‌باشد (De Meester & De Jager, 1993). از طرفی می‌توان کاهش در میزان این شاخص را به امکان حضور مرحله سکون طولانی مدت و مجهول نسبت داد که طی آن به‌رغم فراهم بودن شرایط مساعد، جنین‌ها همچنان خفته بوده و عوامل القاگر نتوانستند در پایان بخشیدن به این مرحله نقش موثری داشته باشند (Gyllstr?m & Hansson, 2004).

تخمهای در حال سکون دافنی معمولاً پیش از آنکه بتوانند قادر به انجام هر گونه عکس‌العمل نسبت به نشانه‌های القاگر و محرک در خروج از مرحله سکون باشند، وارد مرحله‌ای مقاوم موسوم به فازرفراکتوری (Refractory Phase) می‌گردند (Stross, 1966). طول مدت این فاز نه تنها در میان گونه‌های متفاوت بلکه در میان افراد متعلق به یک گونه نیز متغیر بوده و تحت عنوان دوره انکوباسیونی اولیه مطرح می‌باشد (Davison, 1969).

Schwartz و Hebert (١٩٨٧) نیز در بررسی فعال‌سازی مجدد تخمهای در حال سکون جنس دافنی نتیجه گرفتند که سرعت و نرخ تخم‌گشایی وابسته به شرایط متفاوت (دما و نگهداری به حالت خشک یا مرطوب) طی دوره انکوباسیون اولیه در تاریکی و دما طی دوره روشنایی (مرحله تخم‌گشایی) می‌باشد. در این تحقیق، حضور اثر متقابل معنی‌دار ($P<0.01$) میان دما و نگهداری اولیه در تاریکی بر نرخ تخم‌گشایی تخمهای در حال سکون دافنی پولکس بازگوکننده اثر مثبت و سینرژیک (Synergic) میان نگهداری اولیه تخمهای مرطوب و افزایش دما تا ٢٥ درجه سانتیگراد می‌باشد، به گونه‌ای که موجب افزایش میزان این نرخ گشته است (جدول ٨). این نتایج نشان می‌دهد که اثر دماهای بالاتر (٣٠ درجه سانتیگراد) بر نرخ تخم‌گشایی تخمهای در حال سکون در مقایسه با مرطوب نگهداشتن اولیه آنها غلبه و چیرگی دارد.

در مطالعه حاضر، پاسخ گونه *D. pulex* نسبت به غوطه‌وری در محلول هیپوکلریت سدیم (NaOCl ١ درصد) منفی بود و اثر معنی‌داری ($P>0.05$) بر نرخ تخم‌گشایی تخمها نداشت. بنابر نتایج بدست آمده در مطالعه Pancella و Stross (١٩٦٣)، تخمهای در حال سکون حاصل از کلون‌های پرورشی در گونه *D. pulex* به تیمارسازی اولیه با محلول هیپوکلریت سدیم (NaOCl ١ درصد) جهت تحریک به تخم‌گشایی نیاز نداشتند و لیکن غوطه‌وری تخمهای حاصل از کلون‌های وحشی این گونه در محلول اکسیدکننده مذکور جهت افزایش واکنش تخم‌گشایی ضرورت داشت. در این مطالعه، اثر متقابل معنی‌دار ($P<0.01$) میان غوطه‌وری در محلول هیپوکلریت سدیم (NaOCl ١ درصد) و سطوح متفاوت دما بر سرعت تخم‌گشایی تخمهای در حال سکون *D. pulex* نشان می‌دهد که غوطه‌وری در این محلول بعنوان یک فاکتور خارجی می‌تواند در تداخل با اثر اصلی‌ترین عوامل موثر بر تخم‌گشایی مانند دما و دوره روشنایی در روز قرار بگیرد.

براساس مطالعات میدانی انجام گرفته در زمینه تخم‌گشایی عمده زئوپلانکتونها در طول فصل بهار صرف نظر از عوامل زنده و غیرزنده حاکم بر منطقه، روشنایی یکی از مهمترین محرک‌های خارجی اثرگذار بر فعال‌سازی مجدد تخمهای در حال سکون بوده (Schwartz & Hebert, 1987) و دوره روشنایی نشان‌دهندهٔ

[Downloaded from isfj.ir on 2024-07-17]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1389.19.4.7.1]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109961]

الگوهای فصلی مشخص در بسیاری از جمعیت‌های زئوپلانکتونها در مناطق معتدله می‌باشد (Herzig, 1974). دراین بررسی، اثر سطوح متفاوت طول دوره روشنایی در روز بر نرخ تخم‌گشایی تخمهای در حال سکون دافنی پولکس یکسان بوده و این در حالی است که استفاده از روشنایی مداوم یا ۱۲ ساعت روشنایی سبب ایجاد واکنش‌های متفاوتی در سرعت تخم‌گشایی این تخم‌ها گردید (نمودار ۱). Rojas و همکاران درسال ۲۰۰۱ دریافتند که تغییر در طول دوره روشنایی در روز (۸ ، ۱۲، ۱۶ و ۲۴ ساعت) با شدت۶۵۰ لوکس تفاوت عمده‌ای در القا و تحریک تخم‌گشایی در تخمهای خفته *Moina micrura* نداشت. Vandekerkhove و همکاران (۲۰۰۵) با دستیابی به نسبت بالاتر فراوانی نوزادان دافنی در دماهای بالاتر (۲۰ و ۲۵ درجه سانتیگراد) طی دوره روشنایی ۱۶ ساعته در مقایسه با دماهای پایین‌تر (۱۰ و ۱۵ درجه سانتیگراد) بعلت شکوفایی عمده کلادوسرا در دریاچه Danish طی ماه آوریل نسبت به ماه سپتامبر پی بردند چرا که طول دوره روشنایی در روز طی ماههای مذکور تا حد زیادی مشابه بوده ولی دما تفاوت بسیاری را در اکثر مواقع سال در این دریاچه نشان داد. نتایج حاصله در بررسی حاضر در توافق با نتایج بدست آمده از مطالعه مذکور مبنی بر اثر مستقیم کاهش نوسانات بین فصلی دما در کاهش ایجاد اثرات متقابل میان این شاخص و دوره روشنایی در طول شیب جغرافیایی شمال به جنوب می‌باشد.

بنابر مطالعات آزمایشگاهی، نیاز به تغییرات دمایی در القای واکنش تخم‌گشایی در تخمهای در حال سکون متعلق به گونه‌های مختلف زئوپلانکتونها امری ضروری است (Maier, 1990). با توجه به نتایج بدست آمده در جدول ۸، حداکثر نرخ تخم‌گشایی در تخم‌های در حال سکون *D. pulex* پس از نگهداری اولیه به حالت مرطوب در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد (۳۷/۹۲ درصد) مشاهده گردید. همچنین میزان حساسیت واکنش تخم‌گشایی تخمهای در حال سکون نسبت به تغییرات دما از ۲۰ به ۲۵ درجه سانتیگراد تفاوت داشته و کاهش قابل توجهی در این نرخ طی نگهداری در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد مشاهده گردید. این امر از یک سو نشاندهندهٔ ظرفیت دمایی گونه مذکور در واکنش تخم‌گشایی بوده و از سوی دیگر دلیلی روشن برکاهش عمده جمعیت این گونه در طول فصل تابستان در استخرها و آب‌بندان‌های موجود در این منطقه جغرافیایی می‌باشد.

Schwartz و Hebert (۱۹۸۷) نشان دادند که نرخ تخم‌گشایی در تخمهای در حال سکون *D. pulex* در دماهای ۱۴ و ۲۱ درجه سانتیگراد مشابه بوده ولی در دمای ۷ درجه سانتیگراد هیچ واکنش تخم‌گشایی مشاهده نشد. آنها طی بررسی اثر دماهای مذکور بر تخم‌گشایی تخمهای در حال سکون حاصل از کلون‌های پرورشی گونه *D. pulex Leidige* در انگلستان (دامنه تخم‌گشایی ۵-۲۵ درصد در دماهای ۷ و ۱۴ درجه سانتیگراد) و ایالت مانیتوبا (Manitoba) دریافتند که کلون‌های متعلق به یک گونه در عرض‌های جغرافیایی مختلف، واکنش‌های متفاوتی نسبت به یک فاکتور ثابت و مشخص نشان می‌دهند. در مطالعه حاضر، افزایش درجه حرارت تا ۲۵ درجه سانتیگراد با افزایش سرعت تخم‌گشایی در تخمهای افی‌پیال مرطوب یا خشک *D. pulex* همراه بوده در حالیکه افزایش بیشتر درجه حررات (۳۰ درجه سانتیگراد) اثر عکس بر میزان این شاخص بر جای گذاشته است (جدول ۸). Sorgeloos و همکاران (۱۹۸۶) بیان کردند که سیست‌های خفته آرتمیا در دامن درجه سانتیگراد دمایی بین ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتیگراد بیشترین پاسخ را نشان داده ولیکن محدوده دمایی خارج از این دامنه اثرات نامطلوبی مانند کندتر شدن نرخ این پاسخ (<۲۵ درجه سانتیگراد) و از دست رفتن بیشتر انرژی (۳۰< درجه سانتیگراد) ناشی از تسریع متابولیسم در جنین برجای دارد.

منابع

محمدنظری، ر.؛ عبدالحی، ح. و مخدومی، ن.م.، ۱۳۸۵. ماهیان خاویاری: زیست شناسی تکاملی وتکثیروپرورش. سازمان شیلات ایران، معاونت تکثیر و پرورش آبزیان، مدیریت آموزش و ترویج. ۲۸۵ صفحه.

Davison J., 1969. Activation of the epphipial eggs of *Daphnia pulex*. Journal of General Physiology, 53:565-575.

De Meester L. and De Jager H., 1993. Hatching of *Daphnia* sexual eggs. I. Interspecific differences in the hatching response of *D. magna* resting eggs. Freshwater Biology, 30:219-226.

Gyllstrom M. and Hansson L-A., 2004. Dormancy in freshwater zooplankton: Induction, termination and the importance of benethic-pelagic coupling. Aquatic Science, 66:274-295.

[Downloaded from isfj.ir on 2024-07-17]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1389.19.4.7.1]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109961]

Herzig A., 1974. Some population characteristics of planktonic crustaceans in Neusidler See. Oecologia. 15:127-141.

Maier G., 1990. Spatial distribution of resting stages rate of emergence from diapause and times to adulthood and to the appearance of the first clutch in 3 species of cyclopoid copepods. Hydrobiologia. 206:11-18.

Marcus N.H., 1990. Calanoid copepod, cladoceran, and rotifer eggs in sea bottom sediments of northern Californian coastal waters: Identification, occurrence and hatching. Mrine Biology, 105:413-418.

Martin J.W. and Davis G.E., 2001. An updated classification of the recent crustacea. Natural History Museum of Los Angeles County Contributions in Science, 39:1-124.

Pancella J.R. and Stross R.G., 1963. Light induced hatching of *Daphnia* resting eggs. Chesapeake Science. 4:135-140.

Rojas N.E.T., Marins M.A. and Rocha O., 2001. The effect of abiotic factors on the hatching of *Moina micrura* Kurz, 1874 (Crustacea Cladocera) ephippial eggs. Brazilian Journal of Biology, 61:371–376

Schultz T.W. and Kennedy JR., 1977. Analyses of the integument and muscle attachment in *Daphnia pulex* (Cladocera: Crustacea). Journal of Submicroscopic Cytology, 9:37-51.

Schwartz S.S. and Hebert P.D.N., 1987. Methods for the activation of the resting eggs of *Daphnia*. Freshwater Biology, 17:373-379.

Sorgeloos P., Lavens P., Léger P., Tackeart W. and Versichele D., 1986. Manual on the cultivation and use of Artemia in aquaculture. Ed. United Nations Organization for Agriculture and Nutrition, Aquila Project Doc. 10, 301P.

Stross R.G., 1966. Light and temperature requirements for diapause development and release in Daphnia. Ecology, 47:368-374.

Vandekerkhove J., Vanhove M., Declerck S., Jeppesen E., Conde Porcuna J.M., Brendonck L. and De Meester L., 2004. Use of ephippial morphology to assess anomopod richness: Potentials and pitfalls. Journal of Limnology, 63:74-84.

Vandekerkhove J., Declerck S., Brendonck L., Conde-Porcuna J.M., Jeppesen E. and Meester L.D., 2005. Hatching of cladoceran resting eggs: Temperature and photoperiod. Freshwater Biology, 50:96-104.

Zenkevich L.A., 1962. The Animal Life (Zhizn' Zhivotnykh), Volume 2. Chapter 7-Phylum Arthropoda.

[Downloaded from isfj.ir on 2024-07-17]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1389.19.4.7.1]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109961]

Daphnia pulex through physical and chemical factors

Haghparast S.[(1)]* and Darvish Bastami K.[(2)]

Sarah_haghparast@yahoo.com

1-Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, P.O.Box: 14915-386 Gorgan, Iran

2- Iranian National Institute for Oceanography (INIO), P.O.Box: 14118-13389 Tehran, Iran

Received: May 2010 Accepted: December 2010

Keywords: Aquaculture, Feed, Live food, *Daphnia pulex*

Abstract

Regarding the key role and importance of *Daphnia* in aquaculture, particularly for survival and adaptation of fishes in larval stages, a comprehensive study on hatching rate of *Daphnia* ephippial eggs was implemented to obtain an optimum technique. The effects of abiotic factors was investigated on the hatching response of *Daphnia pulex* diapausing eggs collected from live food ponds in Cultivation and Breeding Centre of Gorgan. After isolation, the eggs were kept in dry and wet conditions at 4°C for 2 months in darkness. Following the pre-incubation period, the eggs in each group were subdivided into 2 parts and treated with 1% NaOCl and distilled water. The effect of temperature levels (15˚C, 20˚C, 25˚C) and photoperiod levels (12L: 12D, 24L: 0D) were identified on the hatching of eggs in AdaM medium during 15 days. Results indicated that the exposure of wet-kept eggs to 12-hour photoperiod and 25˚C without soaking in 1% NaOCl, caused the maximum rate and speed of hatching.

*Corresponding author

[Downloaded from isfj.ir on 2024-07-17]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1389.19.4.7.1]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109961]