تغییر ارجحیت بویایی تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus* Borodin, 1897) از طریق ایجاد حافظه بویایی

مهدی شکوری[۱]، حسین اورجی[۱*]، عبدالصمد کرامت[۱]، حسینعلی عبدالحی[۲]

[*]mehdishakouri@gmail.com

۱- دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری ،کیلومتر ۹ جاده دریا، ساری، ایران

۲- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۶

چکیده

ایجاد حافظه بویایی یکی از روش های امید بخش برای بهبود تغذیه نوزدان در دامپروری است. به منظور بررسی امکان ایجاد حافظه بویایی و بکارگیری این روش در بهبود تغذیه لارو اولیه تاس ماهی ایرانی، تخم لقاح یافته و لاروهای اولیه حاصله تاس ماهی ایرانی، در قالب سه تیمار از ابتدای جنینی تا روز ۲۹ پس از تفریخ در معرض فنیل اتیل الکل با غلظت ۰/۰۰۰۱ مول در لیتر و عصاره غذای کنسانتره ماهی با غلظت ۰/۰۱ گرم در لیتر قرار گرفتند. به تیمار شاهد، ماده محرکی افزوده نگردید. در روز یازدهم و در روز بیست و پنجم پس از تفریخ، رفتار لاروها در مواجهه با بوی ماده محرک و عصاره آرتمیا در آبراهه دو بازویی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصله از این آزمون نشان داد که لاروهای نگهداری شده در معرض محرک های بویایی در روز یازدهم پس از تفریخ برای بوی ماده محرکی که در آن پرورش یافته اند، ارجحیتی قائل نیستند اما در روز بیست و پنجم پس از تفریخ، بوی موادی که در معرض آن رشد یافته اند را نسبت به بوی عصاره آرتمیا به عنوان ماده جاذب به طور معنی داری ترجیح می دهند ($P<۰/۰۵$). در حالی که در روز ۲۵ پس از تفریخ ۸۰ درصد لاروهای تیمار شاهد در اولین انتخاب وارد بازوی حاوی عصاره آرتمیا می‌شوند، لاروهای پرورش یافته در معرض محرک بویایی، بازوی حاوی ماده محرک را برای اولین ورود انتخاب می نمایند. میانگین مدت زمان حضور این لاروها (ارزش واکنش) در بازوی حاوی ماده محرک بویایی نیز به طور معنی داری بیش از میانگین مدت حضور آنها در بازوی حاوی عصاره آرتمیا است ($P<۰/۰۵$). این نتایج نشان داد که قرار گرفتن مستمر جنین و لارو ماهی قره‌برون در معرض فنیل اتیل الکل با غلظت ۰/۰۰۰۱ مول در لیتر و عصاره غذا با غلظت ۰/۰۱ گرم در لیتر موجب تغییر ارجحیت بویایی در لارو های ۲۵ روزه می شود.

لغات کلیدی: حافظه بویایی، قره‌برون، تغذیه لاروی، Y maze

[*]**نویسنده مسئول**

مقدمه

تاس ماهی ایرانی یا قره‌برون (*Acipenser persicus* Borodin, 1897) متعلق به خانواده Acipenseridae (Bonaparte, 1831) و زیر خانواده Acipenserinae (تاس ماهیان) و جنس *Acipenser* است که به همراه چهار گونه دیگر متعلق به این جنس در زمره گونه های در حال انقراض دریای خزر بشمار می‌روند (آذری تاکامی، ۱۳۸۸). میزان پرورش ماهی قره‌برون در ایران نسبت به سایر تاس ماهیان نظیر فیل ماهی (*Huso huso*) و تاس ماهی سیبری (*A. baerii*) بسیار کمتر است (Shakouri, 2016) که از مهمترین دلایل آن به عادت پذیری کمتر لارو این ماهی به غذای کنسانتره و در نتیجه رشد و زنده مانی کمتر آن در مراحل اولیه پرورش می توان اشاره نمود. لارو اولیه قره‌برون پس از خروج از تخم از ذخیره غذایی موجود در کیسه زرده استفاده می‌کند و پس از حدود ۱۰ روز با تکامل اندام ها و اعضای بدن، لاروها تغذیه فعال (تغذیه خارجی) را آغاز می کنند. در شروع این مرحله لاروها به استفاده از غذاهای زنده نظیر آرتمیا، دافنی، روتیفر و شیرونومید) وابستگی زیادی دارند و در مراکز تکثیر معمولا تا رسیدن به وزن ۱۰۰-۸۰ میلی گرم با این غذاها تغذیه می‌شوند(عبدالحی و همکاران، ۱۳۸۴). به دلیل مشکلات تامین غذای زنده در تغذیه لارو ماهیان، مطالعات متعددی در مورد تغذیه لارو ماهی قره‌برون با غذای کنسانتره انجام شده است که از جمله می‌توان به تاثیر زمان شروع غذادهی توسط کردجزی و همکاران (۱۳۸۳) و تاثیر اسیدهای آمینه مختلف در تحریک تغذیه‌ای این ماهی توسط Jafari Shamoushaki و همکاران(۲۰۱۱) اشاره نمود. تاتینا و همکاران (۱۳۸۹) گزارش نمودند که تغذیه با غذای کنسانتره باعث تلفات شدید لاروهای تاس ماهی ایرانی می شود. پورعلی و همکاران (۱۳۹۰) نتیجه گیری نمودند که نگذراندن دوره آداپتاسیون و جایگزینی ناگهانی غذای کنسانتره با غذای زنده در پرورش لاروهای با میانگین وزن ۱۲۱ میلی گرم باعث کاهش بازماندگی و رشد آنها تا بیش از ۵۰ درصد می‌شود. حدادی‌مقدم و همکاران (۱۳۹۳) نیز برای تغذیه لاروهای تاس ماهی ایرانی ترکیب روتیفر و آرتمیا را در مقایسه باغذای کنسانتره مناسب دانستند.

نتایج این بررسی‌ها و تجربیات عملی مراکز تکثیر در ایران حاکی از آن است که استفاده از غذاهای زنده در چند هفته اول شروع تغذیه خارجی ضروری است و تغییر جیره غذایی[1] باید با طی نمودن دوره سازگاری با غذای جدید و تغذیه توام غذاهای کنسانتره و زنده همراه باشد.

ایجاد حافظه بویایی[2] در دوره جنینی به منظور بهبود تغذیه نوزادان یکی از روش‌هایی است که در دو دهه اخیر برای کاهش تلفات و حفظ کیفیت نوزادان در دامپروری مورد توجه قرار گرفته و پیرامون آن تحقیقاتی انجام شده است. Hepper and Waldman, Hudson, 1993; Sneddon *et al.*, 1996; Porter and Pikard, 1998; Hepper and Welles, Harden *et al*., 2006; *1998;* 2006; Miller and Spear, 2008; Figueroa, 2012; Dixson *et al*., 2014 بترتیب در مورد ایجاد حافظه بویایی در خرگوش آبستن، تخم قورباغه، تخم مرغ، تخم اردک، لارو گورخر ماهی، سگ آبستن، موش، بچه خوک و دلقک ماهی مطالعه نمودند و نتایج بدست آمده از این مطالعات امید بخش و در برخی موارد نتیجه بخش بوده است.

با توجه به وابستگی لارو تاس ماهیان به حس چشایی و بویایی در آغاز تغذیه خارجی و نتایج تحقیقات انجام شده در مورد سایر جانوران، پژوهشی به منظور امکان ایجاد حافظه بویایی در دوران جنینی و لاروی تاس ماهی ایرانی نسبت به بوهای مشخص انجام شد. در بخشی از این پژوهش ایجاد حافظه بویایی در دوران جنینی و لاوری ماهی قره‌برون از طریق ارزیابی رفتار لارو در آبراهه (ماز) دو بازویی (Y maze) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

یک ماهی ماده پس از تزریق هورمون (اوولین، چین) و دو ماهی نر به صورت طبیعی در مرکز تکثیر و بازسازی

[1] Weaning
[2] Olfactory imprinting

ذخایر تاس ماهیان سد سنگر (شهید بهشتی) واقع در ۲۰ کیلومتری شهر رشت آماده استحصال مواد تناسلی گردید و لقاح تخمک های حاصله از ماهی ماده و اسپرم دو ماهی نر در تاریخ ۹۵/۱/۳۰ به صورت نیمه خشک انجام شد. پس از آبگیری کامل تخم ها، سه گروه ۲۰۰ گرمی تخم لقاح یافته، هر یک شامل۶۰۰۰ عدد تخم به هر یک از پاکت های انکوباتور یوشچنکو با حجم مفید ۲۵/۲۵ لیتر منتقل گردید. با توجه به تعداد زیاد تخم‌ها در هر انکوباتور، تکرار لحاظ نشد.

مواد محرک بویایی

فنیل اتیل الکل (۲-فنیل اتیل الکل)[1] با فرمول شیمیایی $C_8H_{10}O$ ($C_6H_5CH_2CH_2OH$) یکی از محرکهای شیمیایی متداول برای ایجاد حافظه بویایی در جانوران است و در انواع ماهیان و قورباغه‌ها برای تحریک و ایجاد حافظه بویایی بکار گرفته شده است (Hara,1971; Scholz *et al*,1993; Nevitt *et al*, 1994; Harden *et al*, 2006) فنیل اتیل الکل در مقادیر معین می‌تواند موجب مرگ گردد. آستانه مرگ برای لارو تاس ماهی ایرانی قبلا گزارش نشده است، از اینرو قبل از انجام این بررسی نسبت به تعیین این آستانه اقدام شد و مشخص شد که مقادیر ۰/۰۰۱ مول در لیتر و بیشتر برای لاروها کشنده یا تنش زا می‌باشد. غلظت ۰/۰۰۰۱ مول در لیتر فاقد تاثیر تنش زا یا مرگ آور بود (گزارش منتشر نشده). لذا، غلظت ۰/۰۰۰۱ مول در لیتر برای ایجاد حافظه بویایی انتخاب شد. تعیین میزان ماده قابل انحلال در آب غذای کنسانتره لاروی نوترا ۴ تولید شده در کارخانجات اسکریتینگ (Nutra 4, Skretting, Italy) به روش (Hamdani *et al*, 2001) انجام گرفت و معادل ۱۵/۴۵ درصد تعیین شد و محلول عصاره غذا به غلظت ۰/۰۱ گرم در لیتر تهیه گردید.

با توجه به حجم مفید آب انکوباتورها، مقدار مورد نیاز ماده محرک بویایی شامل محلول فنیل اتیل الکل (Merck KGaA, Germany, CAS No:60-12-8) با غلظت ۰/۰۰۰۱ مول در لیتر (تیمار P) و یا عصاره غذای کنسانتره نوترا با غلظت ۰/۰۱ گرم در لیتر (تیمار F) تهیه و به یک انکوباتور اضافه شد. به یک انکوباتور هیچ ماده دیگری افزوده نشد (تیمار C). سه ظرف سرم و ست سرم دارای فیلتر هوای ۱۵ میکرون (تجهیزات پزشکی سوپا، ایران) برای انتقال مواد محرک در ارتفاع حدود یک متری از انکوباتور نصب گردیدند. در یک ظرف سرم محلول فنیل اتیل الکل و در ظرف دیگر محلول عصاره غذا با غلظت مورد نظر و در ظرف دیگر (تیمار شاهد) آب ریخته شد. با توجه به تراکم پائین تخم های موجود در هر یک از انکوباتورها، میزان تعویض آب درون هر انکوباتور برای ایجاد بهترین شرایط تعلیق تخم ها ۳/۶ لیتر در دقیقه تنظیم شد (آذری تاکامی و کهنه شهری، ۱۳۵۳). جریان ورود مواد محرک بویایی متناسب با تعویض آب، ۴۲ قطره در هر دقیقه (۲/۱ میلی لیتر) تنظیم شد. تخم ها پس از پنج روز در دمای بین ۱/۳۲±۱۷/۶ و ۲/۱۱±۱۸/۲۴ درجه سانتی گراد شروع به تفریخ نموده و در پایان روز ششم تقریبا همه تخم ها تفریخ شدند.

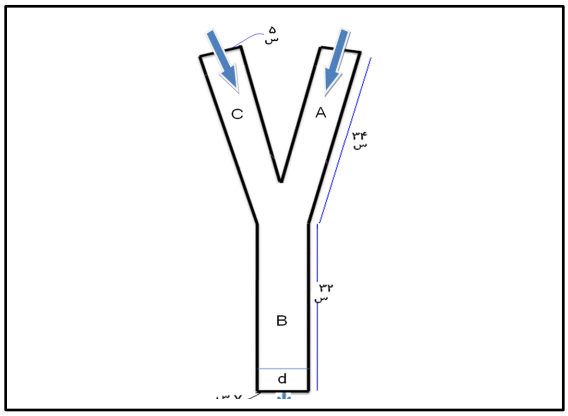
پرورش لاروها

مخازن پرورش لارو با حجم ۹۶ لیتر در محیط بسته قرار داشته و نور مورد نیاز از طریق پنجره و نیز لامپ فلورسنت در حد روشنایی عادی به مدت ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بر اساس روش کار متعارف مرکز تکثیر تامین گردید. پس از آبگیری مخازن، با افزودن عصاره غذا (تیمارF) یا فنیل اتیل الکل (تیمار P) غلظت پایه ماده محرک در مخازن مربوطه ایجاد گردید. به تیمار شاهد هیچ ماده ای افزوده نشد. میزان آب ورودی به این مخازن با کمک شیر کنترل به میزان ۳/۶ لیتر در دقیقه تنظیم و همانند مرحله انکوباسیون، با نصب ست سرم مواد محرک به طور مستمر به آب ورودی افزوده شد. از هر یک از انکوباتورها سه گروه ۸۰۰ عددی لارو اولیه به روش وزنی برداشت و به مخازن پرورش مربوط به همان تیمار منتقل شدند و از روز یازدهم پس از تفریخ (روز اول شروع تغذیه فعال) با اضافه کردن ناپلی آرتمیا (*Artemia fransiscana*) در حد سیری کامل غذادهی شدند.

[1] 2-Phenylethyl alcohol

بررسی رفتار لاروها در آبراهه دو بازویی

آبراهه دو بازویی مورد استفاده از جنس پلکسی گلاس به رنگ آبی بر اساس طرح Olsen (۱۹۸۵) با تغییرات جزئی ساخته شد. طول بازوی پایه (base) ۳۴ و عرض آن ۷ سانتی متر و طول هر یک از دو بازوی دیگر ۳۲ و عرض آنها ۵ سانتی متر و ارتفاع دیواره ها ۱۰ سانتی متر و زاویه بین دو بازو ۴۵ درجه بود. عمق آب در موقع آزمایش ۷ سانتی متر در نظر گرفته شد (شکل ۱).



شکل ۱: آبراهه (فلاویاریوم) آزمون محرک های شیمیایی (اقتباس از اولسن، ۱۹۸۵ با تغییرات)
A: بازوی ورود عصاره آرتمیا، B: بازوی پایه، C: بازوی ورود ماده محرک و d: محوطه رفع تنش احتمالی

Figure 1: Schematic of a Y-maze (fluviarium) for chemical stimuli test (from Olsen, 1985 with some changes).A: artemia extract inlet, B: base arm, C: pertinent stimuli inlet d: adaptation chamber

در فاصله ۵ سانتی‌متری ابتدای بازوی پایه، دو زهوار تعبیه شد تا با کمک یک صفحه امکان جداسازی لارو ماهی از محیط و رفع تنش های احتمالی در موقع وارد نمودن لارو به آبراهه فراهم شود (Hawkins *et al.*, 2008). برای سهولت در انجام کار، آبراهه بر روی قطعات چوب، روی یک چارچوب فلزی در سالن پرورش لاروها مستقر شد. سرعت جریان ورود محرک های شیمیایی در آبراهه و اطمینان از اختلاط جریان های ورودی با کمک محلول رنگ های آبی متیل و پرمنگنات پتاسیم آزمون شد و سرعت مناسب ۴۰ میلی لیتر در هر دقیقه تعیین گردید.

برای فیلم برداری از حرکات لارو در آبراهه، دوربین (سامسونگ، اس تی ۵۰۰) در ارتفاع ۵۰ سانتی متری از آبراهه نصب گردید و تصاویر بر روی حافظه جانبی (میکرو اس دی، ۱۶ گیگابایت، توشیبا) ذخیره شد. نور مورد نیاز با وجود ۴ عدد لامپ فلورسنت مهتابی سقفی ۴۰ وات با شدت ۲۴۷۰ لوم که در فاصله ۱/۵ متری در بالای آبراهه نصب شده بود، تامین گردید. با توجه به شرایط نوری، تقریبا در محیط آبراهه سایه ای ایجاد نشد و شدت نور در همه بازوها یکسان بود. تنها در ناحیه کنار دیواره ها سایه کمرنگی از دیواره با عرض کمتر از ۵ میلی متر قابل رویت بود که قابل قبول است (Jutfelt *et al.*, 2017)

لارو ماهی در دو مقطع زمانی در روز اول و روز پانزدهم شروع تغذیه خارجی (روز ۱۱ و ۲۵ پس از تفریخ) از مخزن پرورش به صورت تصادفی انتخاب و در ناحیه محصور در قاعده بازوی پایه (d) قرار داده شد تا تنش های احتمالی رفع شود. همزمان از یکی از بازوها ماده محرک (فنیل اتیل الکل با غلظت ۰/۰۰۰۲ مول در لیتر و یا عصاره غذای کنسانتره با غلظت ۰/۰۲ گرم در لیتر و یا آب (در مورد لاروهای گروه شاهد) و از بازوی دیگر عصاره ناپلی آرتمیا با غلظت ۰/۰۲ گرم در لیتر با سرعت ۴۰ میلی لیتر در دقیقه وارد هر یک از دو بازو شد. پس از دو دقیقه استراحت در ناحیه d، با برداشتن صفحه جدا کننده به لارو اجازه داده شد تا در مواجهه با بوی ماده محرک و عصاره آرتمیا نسبت به انتخاب بازوی مورد نظر اقدام کند و در مدت یک دقیقه رفتار لارو فیلم برداری شد. پس از هر نوبت استفاده از آبراهه، برای رفع بوی برجای مانده آبراهه چندین نوبت با آب کافی شستشو داده شد. آزمایش ها در دو روز پیاپی و از ساعت ۱۴-۸ انجام شد برای کاهش خطای ناشی از اختلاف زمانی، نمونه های مربوط به هر یک از گروه ها تقریبا در طول این زمان مورد آزمون قرار گرفتند.

تصاویر ضبط شده با استفاده از نرم افزار مایکروسافت اکسپریشن انکودر نسخه ۴ (Microsoft Expression Encoder, Ver. 4) مورد بررسی قرار گرفته و اولین بازویی که لارو پس از خروج از بازوی پایه به آن وارد گردید، دفعات و مدت زمان حضور لارو در هر بازو با دقت

۰/۰۰۱ ثانیه ثبت شد. پس از پردازش داده ها در نرم افزار مایکروسافت اکسل نسخه ۲۰۰۷، ارزش واکنش (Reaction value) لاروها از نظر میانگین مدت حضور لاروها در هر یک از بازوها (RVt) بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید (Olsen,1985; Ishida and Kobayashi, 1995 and Amano *et al.*, 2005) . در این رابطه T1 و T2 به ترتیب مدت زمان باقی ماندن لاروها در بازوی حاوی ماده محرک و بازوی حاوی عصاره آرتمیا می باشند. مقادیر مثبت نشان دهنده ارجحیت قائل شدن لاروها برای بوی ماده محرک نسبت به بوی عصاره آرتمیا و مقادیر منفی نشانه اجتناب از بوی ماده محرک است. عدد ۱۰۰ نشان دهنده ارجحیت کامل و عدد ۱۰۰- نشان دهنده اجتناب کامل است.

$$RVt= \{(T1-T2)/(T1+T2)\}\times 100$$

تجزیه و تحلیل داده‌ها

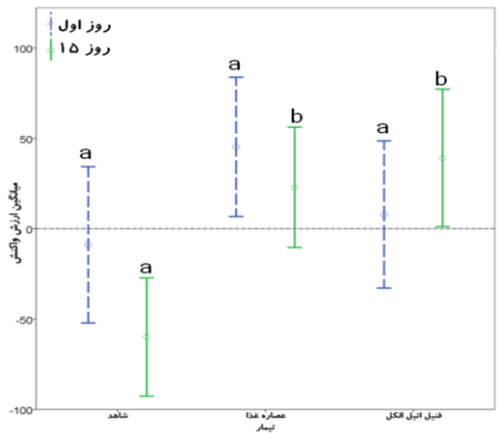
انجام آزمون های آماری با نرم افزار اس پی اس اس نسخه ۲۰ (آی بی ام، آمریکا) انجام شد. با توجه به غیر نرمال بودن داده ها، میانگین ارزش واکنش بین تیمارهای مختلف با آزمون کروسکال والیس مقایسه شد و در صورت معنی دار بودن اختلاف، مقایسه دو به دو میانگین تیمارها با آزمون مان-ویتنی صورت پذیرفت. مقایسه تعداد اولین بازوی انتخاب شده برای ورود در تیمارهای مختلف نیز با استفاده از آزمون کا اسکوئر و توزیع دو جمله‌ای باینومیال (Binomial) انجام شد. کلیه آزمون ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد (α=۰/۰۵) صورت پذیرفت.

نتایج

میانگین ارزش واکنش

روز یازدهم پس از تفریخ (شروع تغذیه فعال)

میانگین ارزش واکنش لاروها در آبراهه دو بازویی در بین تیمارهای مختلف، تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشت (P>۰/۰۵) میانگین ارزش واکنش لاروهای پرورش یافته در گروه شاهد منفی و در دو گروه دیگر مثبت و در تیمار عصاره غذا بیشترین بود (شکل ۲).



شکل ۲: میانگین ارزش واکنش لاروهای قره برون پرورش یافته در تیمارهای مختلف در روز اول و روز پانزدهم تغذیه فعال. حروف مشابه در هر گروه سنی نشانه عدم معنی‌دار بودن اختلاف است (P>۰/۰۵)

Figure 2: Mean reaction value of the Persian sturgeon larvae at the first and 15th day of external feeding. Same letters in the same group shows insignificant mean difference

روز ۲۵ پس از تفریخ (روز پانزدهم پس از شروع تغذیه فعال)

تفاوت میانگین ارزش واکنش در بین تیمارهای مختلف در این مرحله معنی دار بود (P<۰/۰۵). نتیجه آزمون مقایسه دو به دو تیمارها بین گروه ها نشان داد که بین دو گروه عصاره غذا و فنیل اتیل الکل اختلاف معنی داری وجود ندارد (P>۰/۰۵)، در حالی که اختلاف لاروهای گروه شاهد با این دو گروه دیگر معنی دار بود (P<۰/۰۵). میانگین ارزش واکنش لاروهای تیمار شاهد کمتر از صفر (منفی) است که نشان دهنده زمان حضور بیشتر لاروهای این گروه در بازوی عصاره آرتمیا است. در حالی که لاروهای پرورش یافته در تیمارهای عصاره غذا و فنیل اتیل الکل مدت زمان بسیار بیشتری را در بازوی هدف (عصاره غذا یا فنیل اتیل الکل) سپری نموده اند (شکل ۲).

اولین بازوی انتخاب شده برای ورود

روز یازدهم پس از تفریخ (شروع تغذیه فعال)

از مجموع ۶۴ آزمایش صحیح انجام شده، ۲۶ لارو در اولین انتخاب خود پس از خروج از بازوی پایه، بازوی صحیح (آب و یا عصاره غذا و یا فنیل اتیل الکل) و ۲۲ لارو بازوی حاوی عصاره آرتمیا را انتخاب نمودند. ۱۶ لارو نیز پس از خروج از بازوی پایه مجددا به همان بازو بازگشته اند. تعداد لاروهایی که مجددا به بازوی پایه بازگشته اند در تیمار فنیل اتیل الکل بیشتر و معادل ۸ عدد است (جدول ۱). آزمون کا اسکوئر نشان داد که اختلاف بین تیمارهای مختلف برای انتخاب یکی از دو بازوی عصاره آرتمیا یا بازوی صحیح (حاوی عصاره ماده ای که لارو در آن پرورش یافته است) معنی دار نیست ($P>۰/۰۵$).

جدول ۱: اولین بازوی انتخاب شده برای ورود توسط لاروهای ماهی قره برون در تیمارهای مختلف در شروع تغذیه فعال

Table 1: First penetration of the Persian sturgeon larvae to arm after leaving the base arm at the first day of external feeding

تیمار	تعداد کل لاروها	اولین بازوی انتخاب شده برای ورود		
		بازوی صحیح	بازوی پایه	عصاره آرتمیا
شاهد	۱۹	۷	۵	۷
عصاره غذا	۲۳	۱۳	۳	۷
فنیل اتیل الکل	۲۲	۶	۸	۸
مجموع	۶۴	۲۶	۱۶	۲۲

مقایسه درون گروهی هر یک از تیمارها به صورت مستقل از دیگری حاکی از عدم وجود تفاوت معنی دار در انتخاب بازوی هدف است. نتایج آزمون دوجمله ای بای نومیال نیز نشان دهنده معنی دار نبودن اختلاف بین تعداد اولین ورود به بازوی صحیح در هر یک از تیمارها است ($P>۰/۰۵$).

روز ۲۵ پس از تفریخ (روز پانزدهم پس از شروع تغذیه فعال)

از مجموع ۸۰ آزمایش صحیح انجام شده در تمام تیمارها، ۳۶ لارو بازوی حاوی عصاره آرتمیا و ۴۰ لارو بازوی صحیح (آب یا عصاره غذا و یا فنیل اتیل الکل) را برای اولین ورود ترجیح دادند. ۴ لارو نیز پس از خروج از بازوی پایه مجددا به همان بازو برگشته اند (جدول ۲). آزمون کا-اسکوئر نشان داد که بین گروه های مختلف از نظر این شاخص تفاوت معنی داری وجود ندارد ($P>۰/۰۵$).

جدول ۲: اولین بازوی انتخاب شده برای ورود توسط لاروهای ماهی قره برون در تیمارهای مختلف در روز پانزدهم شروع تغذیه فعال

Table 2: First penetration of the Persian sturgeon larvae to arm after leaving the base arm at the 15th day of external feeding

تیمار	تعداد کل لاروها	اولین بازوی انتخاب شده برای ورود		
		بازوی صحیح	بازوی پایه	عصاره آرتمیا
شاهد	۲۴	۴	۴	۱۶
عصاره غذا	۲۶	۱۶	۰	۱۰
فنیل اتیل الکل	۳۰	۲۰	۰	۱۰
مجموع	۸۰	۴۰	۴	۳۶

مقایسه درون گروهی نشان می دهد که در گروه شاهد تعداد لاروهایی که در اولین انتخاب خود وارد بازوی حاوی عصاره آرتمیا شده اند، اختلاف کاملا معنی داری با تعداد لاروهای وارد شده به بازوی صحیح (آب) دارد ($P<۰/۰۵$) اما در گروه فنیل اتیل الکل یا گروه عصاره غذا تعداد لاروهایی که بازوی صحیح و یا بازوی عصاره آرتمیا را انتخاب نموده اند، اختلاف معنی داری ندارند ($P>۰/۰۵$).

بحث

هدف اصلی از انجام این مطالعه بررسی امکان ایجاد تغییر در ارجحیت بویایی لارو ماهی قره‌برون از طریق ایجاد حافظه بویایی در طی دوران پیش از تغذیه فعال بود. نتایج بدست آمده نشان داد که بین لاروهایی که در معرض

محلول فنیل اتیل الکل و عصاره غذای ماهی بوده اند با لاروهای شاهد که در معرض این مواد قرار نداشته اند پس از ورود به مرحله تغذیه فعال از نظر ارزش واکنش و اولین بازوی انتخابی برای ورود، تفاوت معنی داری وجود ندارد در حالی که در روز ۱۵ شروع تغذیه فعال لاروهای تیمار شاهد در این صفات اختلاف معنی داری با سایر تیمارها از خود نشان داده اند به طوری که ۸۰ درصد لاروهای مربوط به این تیمار در اولین انتخاب خود وارد بازوی حاوی عصاره آرتمیا شده اند و ارزش واکنش این لاروها منفی است که به معنی پرهیز از ورود به بازوی هدف است. ایجاد حافظه بویایی در جانوران مختلفی و از جمله ماهیان انجام شده است و در اغلب مطالعات تاثیر پذیری جنین و لارو در هفته‌های اولیه زندگی برای ایجاد حافظه بویایی مورد تایید قرار گرفته است. Scholz و همکاران (۱۹۹۳) و Nevitt و همکاران (۱۹۹۴) در آزاد ماهیان و Harden و همکاران (۲۰۰۶) در گورخرماهی موفق به ایجاد حافظه بویایی با فنیل اتیل الکل شده اند. Boiko and Grigoryan (۲۰۰۲) نیز امکان ایجاد حافظه شیمیایی با استفاده از مورفولین در تاس ماهی روس (*Acipenser gueldenstaedtii*) در طی روزهای ۱۰ تا ۱۸ پس از تفریخ را گزارش نمودند. از آنجایی که بر اساس اغلب گزارش ها ایجاد یا فعالیت سلول های گیرنده بویایی در تاس ماهیان قبل از تفریخ (Zieske *et al.*, 2003) یا در روزهای اول تا هفته اول پس از تفریخ (Gomez *et al.*, 2009; Camacho *et al.*, 2010) انجام می شود در صورتی که حافظه بویایی در روزهای ابتدایی تفریخ و حتی در دوران جنین ایجاد شده باشد، امکان تشخیص بوهای موجود در محیط به درستی مقدور نیست. نتایج این تحقیق نشان داد که در مرحله اول آزمایش در اولین روز پس از شروع تغذیه خارجی لاروها تقریبا به طور کاملاً تصادفی وارد یکی از دو بازوی آبراهه می‌شوند و افزایش پاسخ مثبت به عصاره آرتمیا در تیمار شاهد و ماده محرک در تیمارهای فنیل اتیل الکل و عصاره غذا در روز ۱۵ پس از شروع تغذیه خارجی و با توسعه و رشد سیستم بویایی جانور در طی هفته‌های اول انجام می گیرد.

به طور کلی نتایج این بررسی نشان داد که در معرض قرار گرفتن جنین و لارو تاس ماهی ایرانی می تواند بر ارجحیت بویایی لارو این ماهی در آبراهه دو بازویی تاثیر گذارد. تاکنون گزارشی دیگری در خصوص جذابیت فنیل اتیل الکل برای لاروهای تاس ماهیان منتشر نشده است. نتایج تحقیق حاضر برای اولین بار نشان داد که این ماده می تواند با رعایت ملاحظات خاص به عنوان یک ماده جاذب در خوراک تاس ماهی ایرانی مورد استفاده قرار گیرد. از آنجا که فنیل اتیل الکل ماده اصلی تشکیل دهنده گلاب است، استفاده از عصاره و پسماند گل محمدی در مراکز گلاب گیری در تهیه خوراک تاس ماهی ایرانی قابل بررسی بیشتر است.

تشکر و قدردانی

از جناب آقای مهندس صمد درویشی ریاست و سرکار خانم مهندس همتی و دیگر کارشناسان مرکز تکثیر و بازسازی ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی که در انجام عملیات میدانی تحقیق مساعدت نمودند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

آذری تاکامی، ق. و کهنه شهری، م.، ۱۳۵۳. تکثیر و پرورش مصنوعی ماهیان خاویاری، دانشگاه تهران. ۲۹۸ صفحه.

آذری تاکامی، ق.، ۱۳۸۸. تکثیر و پرورش تاس ماهیان، دانشگاه تهران. ۴۰۶ صفحه.

پورعلی، ح.، پورکاظمی، م.، بهمنی، م.، یگانه، ه. و نظامی، ا.، ۱۳۹۰. بررسی مقایسه ای وضعیت رشد و بازماندگی لارو تاسماهی ایرانی تحت تأثیر غذای کنسانتره و غذای زنده. اقیانوس شناسی، ۲(۶): ۴۲-۳۱

تاتینا، م.، پژند، ذ.ا. و قریب خانی، م. ۱۳۸۹. تاثیر استفاده از پودر دافنی و نرئیس در جیره غذایی بر بازماندگی و برخی شاخص های رشد لارو تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*). مجله علمی پژوهشی علوم دریا، ۲ (۷): ۲۷- ۳۶.

حدادی مقدم، ک.، پژند، ذ.ا.، محسنی، م. و چوبیان، ف.، ۱۳۹۳. تاثیر سطوح مختلف غذایی روتیفر *Brachionus plicatilis* و ناپلیوس آرتمیا *Artemia parthenogenetica* بر میزان رشد و بازماندگی لارو تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*). نشریه توسعه آبزی پروری، ۸ (۳): ۴۱-۳۱.

عبدالحی، ح.، برادران طهوری، ح.، امینی، ک.، ۱۳۸۴. بیوتکنیک مراکز تکثیر ماهیان خاویاری در سالهای ۱۳۷۷ تا ۱۳۸۱. مجله علمی شیلات ایران، ۱۴ (۴): ۱۱۲-۹۷.

کردجزی، س.، کمالی، ا.، نظری، ر.م. و یغمایی، ف.، ۱۳۸۳. اثر زمان شروع غذادهی روی رشد و بقاء تاس ماهی ایرانی. مجله علمی شیلات ایران، ۱۳ (۱): ۱۲۸-۱۱۵.

Amano, M., Iigo, M. and Yamamori, K., 2005. Effects of feeding time on approaching behavior to food odor in goldfish. Fisheries Science, 71(1):183-186. DOI:10.1111/j.1444-2906.2005.00946.x

Boiko, N.E. and Grigoryan , R.A., 2002. Effect of thyroid hormones on imprinting of chemical signals at early ontogenesis of the sturgeon *Acipenser gueldenstaedti*. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology, (Translated from Zhurnal Evolyutsionnoi Biokhimii i Fiziologii), 38 (2): 169-172. DOI:10.1023/A:1016518706986

Camacho, S., Ostos-Garrido, M.V., Domezain, A. and Carmona, R., 2010. Study of the olfactory epithelium in the developing sturgeon characterization of the crypt cells. Chemical Sense, 35: 147-156. DOI:10.1093/chemse/bjp091

Dixson, D.L., Jones, J.P., Munday, P.L., Planes, S., Pratchett, M.S. and Thorrold, S.R., 2014. Experimental evaluation of imprinting and the role innate preference plays in habitat selection in a coral reef fish." Oecologia, 174: 99–107. DOI 10.1007/s00442-013-2755-z

Figueroa, J., 2012. Learning strategies to increase piglets feed intake after weaning. Disertation, Barcelona, Univ. Autonoma de Barcelona, Spain. 213p

Gómez, A., Durán, E., Ocaña, F.M., Jiménez-Moya, F., Broglio, C., Domezain, A., Salas, C. and Rodríguez, F., 2009. Observations on the brain development of the sturgeon *Acipenser naccarii*. In: Carmona, R., Domezain, A., García-Gallegoet, M., Hernando J.A., Rodríguez F., Ruiz-Rejón M (eds). Biology, conservation and sustainable development of Sturgeons. Fish and Fisheries Series, Vol. 29. Springer, Dordrecht**:** pp.155-174.

Hamdani, H., Kasumyan, A.O. and Doving, K.B., 2001. Is feeding behavior in Crusian carp mediated by the lateral olfactory tract? Chemical Senses 26:1133- 1138. DOI: 10.1093/chemse/26.9.1133

Hara, T.S.J., 1971. Chemoreception. In Hoar, W.S. and Randall, D.J. (eds) Fish physiology, Sensory systems and electric organs. Academic Press, New York, USA. pp79-120.

Harden, M.V., Newton L.A., Lloyd, R.C. and Whitlock, K.E., 2006. Olfactory imprinting is correlated with changes in gene expression in the olfactory epithelia of

the Zebrafish. Journal of Neurobiology. 66 (13):1425- 1466. DOI: 10.1002/neu.20328

Hawkins, L.A., Magurran, A.E. and Armstrong, J.D., 2008. Ontogenetic learning of predator recognition in hatchery-reared Atlantic salmon, *Salmo salar*. Animal Behavior 75(5): 1663-1671. DOI: 10.1016/j.anbehav.2007.10.019

Hepper, P.G. and Waldman, B., 1996. Embryonic olfactory learning in frogs. The Quarterly Journal of Experimental Psychology 44B (3/4):179-197. DOI:10.1080/02724999208250611

Hepper, P.G. and Wells, D.L., 2006. Perinatal olfactory learning in the domestic dog. Chemical Senses 31: 207-212. DOI: 10.1093/chemse/bjj020

Hudson, R., 1993. Olfactory imprinting. Current Opinion in Neurobiology 3: 548-552.

Ishida, Y. and Kobayashi, H., 1995. Avoidance behavior of carp to pesticides and decrease of the avoidance threshold by addition of sodium lauryl sulfate. Fisheries Science, 61(3):441-446. DOI: 10.2331/fishsci.61.441

Jafari Shamushaki, V.A., Abtahi, A.O. and Kasumyan, A.O., 2011. Olfactory and taste attractiveness of free amino acids for Persian sturgeon juveniles, *Acipenser persicus*: a comparison with other acipenserids. Journal of Applied Ichthyology, 27:241–245. DOI: 10.1111/j.1439-0426.2011.01687.x

Jutfelt, F., Sundin, J., Raby, G.D., Krang, A.S. and Clark, T.D., 2017. Two- current choice flumes for testing avoidance and preference in aquatic animals. Methods in Ecology and Evolution, 8:379-390. DOI: 10.1111/2041-210X.12668

Miller, S.S. and Spear, N.E., 2008. Olfactory learning in the rat neonate soon after birth Developmental Psychobiology, 50: 554-556. DOI: 10.1002/dev.20318

Nevitt, G.A., Dittman, A.H., Quinn, T.P. and Moody, W.J., 1994. Evidence for a peripheral olfactory memory in imprinted salmon. Proceeding of National Academy of Sciences of USA, 91: 4288-4292. DOI: 10.1073/pnas.91.10.4288

Olse´n, K.H. ,1985. Chemo attraction between fry of Arectic charr *Salvelinus alpinus* studied in a Y- maze fluviarum. Journal of Chemical Ecology, 11(8): 1009- 1017. DOI: 10.1007/BF01020671

Porter, R.H. and Picard, M., 1998. Effects of early odor exposure in domestic chicks. Reproduction Nutrition Development, 38: 441-448.

Scholz, A.T., White, R.J., Tilson, M.B. and Horton, S.A., 1993. Artificial imprinting of Lake Roosevelt Kokanee salmon (*Oncorhynchus nerka*) with synthetic chemicals: Measurement of thyroxin content as an indicator of the sensitive period for imprinting to olfactory cues, Upper Columbia United Tribes Fisheries Research Center, Eastern Washington Univ.,USA, 60 p.

Shakouri, M., 2016. Annual report on sturgeon trade in Iran. Iran's CITES

Sturgeon Management Authority, IFO, Iran: 5P.

Sneddon, H., Hadden, R. and Hepper, P.G., 1998. Chemosensory learning in the chicken embryo. Physiology and Behavior, 64(2): 133–139. DOI: 10.1016/S0031-9384(98)00037-7.

Zeiske, E., Kasumyan, A.O., Bartsch, P. and Hansen, A., 2003. Early development of the olfactory organ in sturgeons of the genus Acipenser: a comparative and electron microscopic study. Anatomy and Embryology**,** 206:357-372. DOI: 10.1007/s00429-003-0309-6.

Changing olfactory preference by olfactory imprinting in Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) larvae

Shakouri M.[1], Oraji H.*[1], Amirkolahi A.K.[1], Abdolhay H.A.[2]

*mehdishakouri@gmail.com

1-Department of Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University , 9th Km. Sea Road, Sari, Iran.
2-Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

Abstract

Olfactory imprinting is one of the affordable approaches for improving neonatal feeding in husbandry. In order to evaluate the possibility of olfactory imprinting in the Persian sturgeon larvae and to evaluate its future application in the feeding of larvae, two groups of early fertilized eggs were exposed to the stimuli solution (phenyl ethyl alcohol (0.0001 mol/L) and the fish feed extract (0.01 g/L) until 29 days after hatching. The third group (control) exposed to neither stimuli solution nor the fish feed extract. Fish larvae behavior was examined in Y-maze at days 11 and 25 posthatch in order to evaluate the larvae preference/avoidance reactions to the stimuli solution and the fish feed extract. The results indicated that the exposed Persian sturgeon larvae did not show any preference/avoidance reaction at day 11 posthatch to the pertinent stimuli, whereas the exposed Persian sturgeon larvae preference was for the stimuli solution rather than the fish feed extract at day 25 posthatch ($P<0.05$). The preference of larvae of the control group was for the fish feed extract rather than the stimuli solution at day 25 posthatch, whereas the exposed Persian sturgeon larvae preference was for the stimuli solution rather than the fish feed extract at day 25 posthatch. The average time of the larvae presence (value for reaction) in the arm containing the pertinent stimuli was significantly higher than the average time of the larvae presence in the arm containing the fish feed extract ($P<0.05$). The result indicated that continues exposure of egg and larvae of the Persian sturgeon to the phenyl ethyl alcohol (0.0001 mol/L) and the fish feed extract (0.01 g/L) could change olfactory preference of the larvae at day 25 posthatch.

Keywords: Olfactory imprinting, Persian sturgeon, Feeding larvae, Y-maze

*Corresponding author