CC BY

مقاله علمی – پژوهشی:

اثر غوطه‌وری تخم در سطوح مختلف تیامین محلول در آب بر بهبود شاخص‌های انکوباسیون و رشد لارو فیل‌ماهی (*Huso huso*) پرورشی

محمود محسنی*[۱]، ذبیح‌اله پژند[۱]، ساره قیاسی[۲]، میرحامد سید حسنی[۱]، محمد پوردهقانی[۱]، رضا قربانی واقعی[۱]، هوشنگ یگانه[۱]، سجاد قاسمیان[۱]

*mahmoudmohseni73@gmail.com

۱-انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران.

۲- دانش آموخته دانشگاه گیلان، دانشکده علوم کشاورزی صومعه سرا، رشت، ایران.

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۱

چکیده

به منظور بررسی اثر تیامین بر شاخص‌های انکوباسیون فیل‌ماهی (*Huso huso*) تخم‌های حاصل از تکثیر مولدین نر و ماده پرورشی پس از لقاح و در زمان جذب آب به‌ترتیب با چهار تیمار و سه تکرار در هر تیمار شامل غلظت‌های شاهد (صفر میلی‌گرم تیامین در لیتر آب)، T_{500} (۵۰۰ میلی‌گرم تیامین در لیتر آب)، T_{1000} (۱۰۰۰ میلی‌گرم تیامین در لیتر آب) و T_{1500} (۱۵۰۰ میلی‌گرم تیامین در لیتر آب) به مدت ۳۰ دقیقه تحت درمان با تیامین محلول در آب به روش غوطه‌وری قرار گرفتند. سپس آنها را پنج بار با آب تازه شستشو داده و تا زمان تخم‌گشایی در انکوباتورهای مخصوص نگهداری شدند. شاخص‌های انکوباسیون و رشد لارو از ۲۴ ساعت پس از لقاح تخم تا ۴۴ روز پس از شروع تغذیه فعال لارو بررسی شدند. نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین بازماندگی تخم از ۲۴ ساعت پس از لقاح تا زمان تخم‌گشایی به‌ترتیب در تیمار T_{500} و تیمار شاهد بود ($p<۰/۰۵$). تیامین در سطوح T_{1000}و T_{1500} توانست منجر به افزایش معنی‌دار طول، وزن و وزن حاصله در انتهای دوره شود ($p<۰/۰۵$). همچنین غوطه‌وری تخم در تیامین محلول توانست منجر به افزایش نرخ رشد ویژه و درصد افزایش وزن بدن در دو تیمارT_{1000} و T_{1500} در روز ۳۶ پس از شروع تغذیه فعال شود ($p<۰/۰۵$). ضریب تبدیل غذایی، کارایی پروتئین و کارایی چربی در تیمارهای T_{500} و شاهد کاهش معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها داشت ($p<۰/۰۵$). کمترین درصد بازماندگی لارو از زمان شروع تغذیه فعال تا ۴۴ روز بعد در تیمار شاهد مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). در مجموع نتایج تحقیق نشان داد، غوطه‌وری تخم در محلول تیامین می‌تواند منجر به افزایش رشد و بازماندگی لارو گردد، لذا پیشنهاد می‌شود که تخم فیل‌ماهی پس از لقاح در محلول تیامین حداقل به میزان ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر قرار داده شود.

لغات کلیدی: ویتامین B1، درصد تخم‌گشایی، بازماندگی لارو، غوطه‌وری تخم، انکوباسیون، فیل‌ماهی

*نویسنده مسئول

مقدمه

فیل‌ماهی (*Huso huso*) به علت بومی بودن، رشد سریع، سازگاری با شرایط پرورشی و امکان تکثیر مصنوعی گونه اصلی پرورش در صنعت ماهیان خاویاری در کشور است (Mohseni *et al.*, 2021). از مشکلات مهم در بحث تکثیر این ماهیان مدت زمان طولانی برای رسیدگی جنسی است. لذا، مدیریت صحیح مولدین در فصل تکثیر به منظور توسعه آبزی‌پروری و تولید تخم و لارو با کیفیت بسیار حائز اهمیت است (Chebanov and Billard, 2001). کیفیت تخم یکی از اولین عوامل موثر در بقاء، رشد لارو و به طور کلی موفقیت تولیدمثل است به‌طوری‌که مطالعات نشان می‌دهند، تخم‌های بی‌کیفیت منجر به کاهش درصد تخم‌گشایی و تولید لاروهایی با ناهنجاری‌های زیستی می‌شوند که به‌تدریج مرگ‌ومیر لاروها را افزایش می‌دهند (Ruban *et al.*, 2019).

ریزمغذی‌ها اهمیت زیادی بر کیفیت تخم دارند، زیرا جنین برای رشد و تکمیل ساختارهای سلولی خود به آنها نیاز ضروری دارد (Graff *et al.*, 2002). تیامین از مهم‌ترین ویتامین‌های محلول در آب است که نقش کوآنزیمی مهمی در اعمال متابولیک سلولی و متابولیسم طبیعی آمینواسیدها، چربی و کربوهیدرات دارد (Harder *et al.*, 2018). حضور تیامین در مراحل ابتدایی زندگی ماهیان نقش بسیار حیاتی داشته و میزان تیامین موجود در تخم با افزایش مرگ‌ومیر در آلوین آزادماهیان ارتباط مستقیم دارد (Amcoff *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2009). کاهش میزان تیامین در تخم منجر به بروز نوعی سندروم به نام مرگ‌ومیر زودرس شده (EMS)[1] و تحقیقات نشان داده است که اگر غلظت تیامین در تخم آزاد ماهیان به زیر ۸/ نانومول در گرم برسدT تقسیمات جنینی تخم زودتر از زمان عادی انجام می‌شود که در نهایت موجب مرگ لارو را در زمان تخم‌گشایی (Brown *et al.*, 2005) یا بروز تلفات هنگام جذب کیسه زرده را تا ۹۶/۶ درصد به‌دنبال دارد (Ketola *et al.*, 2000). در ارتباط با ماهیان خاویاری نیز مطالعات محدود انجام شده نشان می‌دهد که تزریق تیامین به مولدین در فصل تکثیر می‌تواند منجر به افزایش بقاء و رشد لارو در تاسماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) شود (Ghiasi *et al.*, 2017). از این‌رو، به منظور بهبود ذخیره تیامین در تخم، روش‌هایی نظیر تزریق تیامین به مولدین (Ketola *et al.*, 2000; Ketola *et al.*, 2008; Ghiasi *et al.*, 2017)، روش غوطه‌وری تخم و آلوین در محلول تیامین (Lee *et al.*, 2009; Harder *et al.*, 2020; Romanova *et al.*, 2019) را محققین پیشنهاد می‌دهند. زیرا اثبات گردیده است که این این ویتامین می‌تواند وارد تخم شده و منجر به افزایش ذخیره تیامین تخم و در نهایت افزایش بازماندگی و سلامت لارو گردد.

به رغم تلاش‌های بسیار جهت بهبود شرایط انکوباسیون در ماهیان خاویاری همچنان در مواردی بروز تلفات سنگین در مرحله انکوباسیون مشاهده می‌گردد. بنابراین، تحقیق حاضر در نظر دارد تا به بررسی امکان بهبود کیفیت تخم و لارو فیل‌ماهی با استفاده از غوطه‌وری تخم در سطوح مختلف تیامین محلول بپردازد.

مواد و روش کار

القاء تخم‌ریزی و تکثیر ماهیان

تحقیق حاضر در انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری در شرایط یکسان پرورشی طراحی و اجرا گردید. تخم‌گیری از فیل ماهیان مورد استفاده در این تحقیق با استفاده از تزریق هورمون LHRH به دو عدد ماهی مولد ماده ۸ ساله با میانگین وزن حدود ۵۰ کیلوگرم صورت گرفت. سپس تخمک‌ها با اسپرم ۳ عدد مولد نر (۱۰ میلی‌لیتر اسپرم به ازاء هر کیلوگرم تخمک) پرورشی ۷ ساله با میانگین وزن ۳۷ کیلوگرم لقاح یافت. القاء تخم‌ریزی در ماهیان با تزریق هورمون به صورت مصنوعی در شرایط یکسان انجام گرفت. پس از معاینه ماهیان و اطمینان از رهاشدن تخمک در محوطه شکمی، تخمک به‌روش سزارین از محوطه شکمی خارج شد. تخمک‌ها به طور جداگانه جمع‌آوری و بعد از جداکردن مایع تخمدانی به‌وسیله یک پارچه توری با ترازوی با دقت ۰/۰۱ گرم وزن شدند. یک نمونه ۲-۱/۵ گرمی از تخمک هر ماهی برداشته شد و تعداد تخمک در هر گرم شمارش گردید. ماهیان نر نیز معاینه و اسپرم آنها با سرنگ ۵۰ میلی‌لیتری

[1] Early Mortality Syndrome (EMS)

از ناحیه تناسلی استحصال و کیفیت اسپرم زیر میکروسکوپ بررسی شد. تراکم اسپرم‌ها در حدود ۹۰-۸۰ درصد تخمین زده شد.

غوطه‌وری تخم در محلول تیامین

تیامین هیدروکلراید با خلوص ۹۹ درصد از شرکت سیگما (Vitamin B_1 hydrochloride; Fluka Sigma Aldrich, Stuttgart, Germany) خریداری شد. جهت تهیه بافر تیامین ابتدا تیامین با ترازوی با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن و در مخزنی با حجم ۵ لیتر آب حل و سپس pH آب به‌وسیله سدیم‌هیدروکسید (NaOH; 2M) روی ۷ ثابت نگاه داشته شد. محلول‌های تهیه شده به منظور حذف دی‌اکسیدکربن (Co_2) به‌مدت ۳۰ دقیقه با سنگ هوا، هوادهی شدند. اسپرم به تشت محتوی تخمک اضافه و به مدت ۵ دقیقه غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میلی گرم در لیتر تیامین به آن اضافه و به آرامی هم زده شدند. به منظور بررسی اثر تیامین بر شاخص‌های انکوباسیون و رشد لارو فیل‌ماهی، چهار تیمار و سه تکرار در نظر گرفته شد. بعد از لقاح و ۲ بار آبکشی، به منظور رفع چسبندگی، هر کیلوگرم تخم با ۴ لیتر آب محتوی کائولن (غلظت ۱۰ گرم به ازای هر لیتر آب) و تیامین، (غلظت‌های صفر (شاهد)، ۵۰۰ (T_{500})، ۱۰۰۰ (T_{1000}) و ۱۵۰۰ (T_{1500}) (Brown *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2009) به مدت ۴۵ دقیقه هم زده شد. سپس آب محتوی کائولن و تیامین تخلیه و با آب تمیز، تخم به مدت ۵ دقیقه شستشو شد. تخم‌ها در هشت انکوباتور مک دونالد با حجم آب‌گیری ۱۰ لیتر و دبی آب ۰/۱۴ لیتر در ثانیه قرار گرفتند. در هر انکوباتور یک نمونه ۲۰۰ گرمی تخم معادل ۸۲۰۰ عدد تخم قرار داده شد. انکوباتورها درون تراف‌های جداگانه با ابعاد ۳۰×۷۰×۲۰۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۵ سانتی‌متر با دبی آب ۰/۱۳ لیتر در ثانیه قرار داده شدند. میزان اکسیژن محلول در آب در محلول در محدوده ۸/۱۱-۷/۸۵ میلی‌گرم در لیتر و pH در محدوده ۸/۰۳-۷/۶۳ بود.

بررسی شاخص‌های کیفیت تخم

جهت تنظیم دمای آب ورودی به انکوباتورها در زمان تکثیر، مخلوطی از آب چاه و رودخانه با نسبت ۲۰ به ۸۰ استفاده و دمای آب در ۱۴ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. پس از ۲۴ ساعت تخم‌ها با آویشن با غلظت ۱۰۰۰ قسمت در میلیون ضدعفونی شدند. درصد بازماندگی تخم ها در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از لقاح و در زمان تخم‌گشایی بررسی و نمونه‌های قارچ زده و مرده به رنگ سفید از طریق سیفون نمودن از مخزن خارج و تعداد آنها ثبت شد. سپس درصد بازماندگی، درجه روز چشم‌زدگی و درجه روز چشم‌زدگی تا تخم‌گشایی با در نظر گرفتن دمای آب و تعداد روز از رابطه ذیل به‌دست آمد:

((تعداد کل تخم – تعداد تلفات تخم) / تعداد کل تخم) × ۱۰۰ = بازماندگی تخم (درصد)

پرورش لارو

تخم‌گشایی تخم‌ها ۷ روز پس از شروع انکوباسیون پایان یافت. لاروها در شرایط یکسان پرورشی در تراف‌های فایبرگلاس مستطیلی شکل با ابعاد ۳۰×۷۰×۲۰۰ سانتی‌متر (مساحت ۱/۴ متر مربع - ارتفاع آبگیری ۱۵ سانتی‌متر- حجم آبگیری: ۲۱۰ لیتر - دبی آب ۰/۱۳ لیتر بر ثانیه) پرورش یافتند. طول دوره جذب کیسه زرده لارو در تراف‌ها ۷-۶ روز به‌طول انجامید. پس از گذشت ۷ روز از زمان تخم‌گشایی حدود ۸۰ درصد از لاروها، شنای فعال داشتند. تغذیه نیمه فعال لارو ماهیان خاویاری پرورشی به‌وسیله ناپلیوس آرتمیا (بـه میـزان ۵۰ درصد وزن بدن) در ۱۲ نوبت با فاصله زمانی ۲ ساعت صورت گرفت. این روند تا روز سیزدهم ادامه یافت. از روز ۱۳ تا روز ۲۱ پس از تخم‌گشایی تغذیه با ناپلیوس آرتمیا با تراکم ۵۰ ناپلی در لیتر انجام شد. طی ۲۳-۱۷ روز پس از تخم‌گشایی علاوه بر ناپلیوس آرتمیا (حدود ۳۰-۲۵ درصد وزن بدن) از شیرونومیده و بیوماس آرتمیا (بر اساس اشتها تا حد سیری در حدود ۵۰-۴۰ درصد وزن بدن) جهت تغذیه لارو استفاده گردید. ترکیب بیوشیمیایی غذای زنده (ناپلیوس آرتمیا و شیرونومیده) در ۳ نمونه برای هر غذای زنده تعیین گردید. میزان پروتئین خام با استفاده از شیوه کجلدال (N×6.25) و استفاده از سیستم اتوماتیک

کجلدال (Behrotest WD 40 ,Germany) و میزان چربی خام با استفاده از روش سوکسله تعیین شد (Folch *et al.*, 1957). شایان ذکر است، از روز هشتم برای سازگاری بچه ماهیان (روز هجدهم بعد از تخم‌گشایی لغایت روز بیست و نهم) از غذای پودری ساخته شده در انستیتو تحقیقات با سایز ۱۰۰ میکرون مخصوص لارو خاویاری محتوی ۶۳ درصد پروتئین، ۱۵ درصد چربی و ۱۱ درصد کربوهیدرات نیز به همراه غذای زنده در فواصل زمانی دو ساعته، بـه میزان ۳۰ درصد وزن بـدن استفاده شد. از روز بیست و هفتم لغایت چهل و چهارم بعد از تخم‌گشایی از خوراک استارتر ماهیان خاویاری انستیتو تحقیقات محتوی پروتئین ۵۳-۵۰ درصد، انرژی قابل هضم ۴۶۰۰ کیلوکالری درکیلوگرم و چربی ۱۴-۱۳ درصد، کربوهیدرات قابل هضم ۲۰-۱۸ درصد، ال‌کارنتین ۶۰۰ میلی گرم، اسید چرب لینولئیک ۱ درصد استفاده بـه میزان ۲۰ درصد وزن بـدن در اختیار لارو و بچه ماهیان قرار گرفت (محسنی و همکاران، ۱۳۹۷).

زیست‌سنجی و بررسی شاخص‌های رشد و تغذیه

در طول دوره لاروی به منظور تعیین مقدار جیره روزانه بر اساس بیوماس آنها، هر روز تعداد ۱۰ عدد لارو ماهی از هر تراف پرورشی به طور تصادفی برداشت و میانگین طول و وزن آنها با استفاده از کولیس با دقت ۰/۱ میلی متر و ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ میلی گرم اندازه‌گیری شد. جهت بررسی طول و وزن لاروها در انتهای دوره (۴۴ روز پس از شروع تغذیه فعال) ابتدا لاروها به روش غوطه‌وری در عصاره گل میخک با دوز ۲۰۰ قسمت در میلیون بیهوش، سپس به صورت انفرادی بیومتری و وزن آنها با دقت یک گرم با ترازوی دیجیتال و طول با دقت یک میلی‌متر با خط‌کش مدرج اندازه‌گیری شد. شاخص‌های وزن کسب شده (WG)، نرخ رشد ویژه (SGR)، درصد افزایش وزن (BWI)، فاکتور وضعیت (CF)، ضریب تبدیل غذایی (FCR)، کارایی پروتئین (PER)، کارایی چربی (LER) و بازماندگی با استفاده از فرمول‌های ذیل تعیین شد:

وزن کسب شده (گرم) =وزن نهایی (گرم) - وزن اولیه (گرم)

فاکتور وضعیت= (وزن بدن (گرم) / طول کل ^{3} (سانتی‌متر)) × ۱۰۰

نرخ رشد ویژه (درصد/روز)[=(لگاریتم وزن نهایی (گرم) – لگاریتم وزن اولیه (گرم)) / مدت زمان آزمایش (روز)]× ۱۰۰

درصد افزیش وزن (درصد) =(وزن بدست آمده (گرم) / وزن اولیه (گرم)) × ۱۰۰ (Hung, 1989)

ضریب تبدیل غذایی (درصد) =(غذای خورده شده (گرم) / وزن بدست آمده (گرم) (Ronyai *et al*., 1990)

کارایی پروتئین= وزن بدست آمده (گرم) / پروتئین مصرف شده (گرم) (Moore *et al*., 1988)

کارایی چربی= وزن بدست آمده (گرم) / چربی مصرف شده (گرم) (Abdelghany & Ahmad, 2002)

بازماندگی (درصد) = ((تعداد کل لارو – تعداد تلفات لارو) / تعداد کل لارو) × ۱۰۰

آنالیز آماری

وضعیت داده‌ها با استفاده از آزمون کولوموگروف اسمیرنوف برای نرمال بودن داده‌ها و آزمون لونس برای همگنی واریانس‌ها بررسی شد. سپس با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One way ANOVA) و تست Tukey به عنوان post hoc، مقایسه میانگین‌ها انجام گردید. اختلاف میانگین‌ها در کلیه موارد با سطح اطمینان P<۰/۰۵ تعیین و تجزیه و تحلیل با نرم‌افزار SPSS 19 انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین±خطای معیار (mean±SE) ارائه شده‌اند. کلیه نمودارها با نرم افزار Excel 2015 رسم شدند.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی اثر غوطه‌وری تخم در سطوح مختلف تیامین محلول بر شاخص‌های انکوباسیون تخم فیل‌ماهی در جدول ۱ ارائه شده است. در تمامی گروه‌های تحت تیمار تیامین بازماندگی تخم ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از لقاح نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵). این افزایش بقاء تا زمان تخم‌گشایی تخم

وابسته به دوز تیامین نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). در ارتباط با درجه روز چشم‌زدگی تخم از تخم‌گشایی تا جذب کیسه‌زرده تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد (جدول ۱) ($p>۰/۰۵$).

جدول ۱: شاخص‌های انکوباسیون در فیل‌ماهی *Huso huso* پرورشی پس از غوطه‌وری تخم در سطوح مختلف تیامین شامل صفر (شاهد)، ۵۰۰ ($T_{۵۰۰}$)، ۱۰۰۰ ($T_{۱۰۰۰}$) و ۱۵۰۰ ($T_{۱۵۰۰}$) میلی‌گرم بر لیتر تیامین محلول. تمامی داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شده‌اند.

Table 1: Incubation indices of beluga (*Huso huso*) after eggs immersion in thiamine solution at control (0), 500 (T_{500}), 1000 (T_{1000}) and 1500 (T_{1500}) mg/L. Values are reported as mean ± S.E.

شاخص ها	سطوح تیامین محلول در آب (میلی‌گرم بر لیتر)			
	شاهد	۵۰۰	۱۰۰۰	۱۵۰۰
بازماندگی تخم پس از ۲۴ ساعت (درصد)	۹۵/۸۵ ± ۰/۲۱^{c}	۹۷/۷۵ ± ۰/۳۹^{b}	۹۸/۳۶ ± ۰/۲۴^{ab}	۹۸/۵۳ ± ۰/۰۱^{a}
بازماندگی تخم پس از ۴۸ ساعت (درصد)	۹۳/۸۲ ± ۰/۱۹^{c}	۹۵/۵۶ ± ۰/۱۵^{b}	۹۶/۹۰ ± ۰/۱۷^{a}	۹۷/۲۲ ± ۰/۰۳^{a}
نرخ تخم‌گشایی (درصد)	۲۰/۹۴ ± ۱/۵^{d}	۲۹/۶۷ ± ۰/۴۶^{c}	۴۶/۳۶ ± ۰/۱۲^{b}	۵۵/۸۱ ± ۰/۷۷^{a}
درجه روز چشم زدگی	۲۰۲/۵۰ ± ۳/۶۷	۱۹۳/۵۰ ± ۳/۶۷	۱۹۸/۰۰ ± ۰/۰۰	۱۹۸/۰۰ ± ۰/۰۰
درجه روز از چشم زدگی تا هچ	۱۶۲/۰۰ ± ۴/۸۹	۱۵۶/۰۰ ± ۹/۷۹	۱۶۲/۰۰ ± ۶/۰۰	۱۴۴/۰۰ ± ۰/۰۰

حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مختلف است ($P<۰/۰۵$).

نتایج حاصل از بررسی اثر غوطه‌وری تخم در سطوح مختلف تیامین محلول بر شاخص‌های رشد و تغذیه لارو فیل‌ماهی در جدول ۲ ارائه شده است. تیامین در سطوح ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر توانست منجر به افزایش معنی‌دار طول و وزن نهایی و افزایش وزن بدن (WG) نسبت به تیمارهای شاهد و T500 شود ($p<۰/۰۵$). تفاوت معنی‌داری در شاخص وضعیت (CF) مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$). در انتهای روز ۳۶ پس از شروع تغذیه فعال ضریب رشد ویژه (SGR) و درصد افزایش وزن بدن (BWI) افزایش معنی‌داری را در تیمارهای (T_{1000}) و (T_{1500}) در مقایسه با دو تیمار دیگر نشان دادند ($p>۰/۰۵$). غوطه‌وری تخم در سطوح ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر تیامین توانست افزایش معنی‌داری در ضریب تبدیل غذا (FCR)، نسبت بازده پروتئین (PER) و کارایی چربی (LER) نسبت به تیمارهای T500 و شاهد ایجاد کند ($p<۰/۰۵$). و بازماندگی لارو در زمان شروع تغذیه فعال افزایش معنی‌داری را در تیمارهای T_{1000} و T_{1500} نسبت به دو دوز پایین‌تر نشان داد. اما با گذشت زمان افزایش معنی‌دار در روزهای ۳۰ و ۴۴ نمونه برداری در تمامی گروه‌های تحت تیمار تیامین محلول نسبت به تیمار شاهد ثبت شد ($p<۰/۰۵$).

نتایج حاصل از بررسی اثر غوطه‌وری تخم در سطوح مختلف تیامین محلول بر روند تغییرات وزن لارو فیل‌ماهی پس از شروع تغذیه فعال در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج بیانگر افزایش معنی‌دار رشد در تیمار تیامین نسبت به گروه شاهد از روز ۷ تا ۳۰ بود ($p<۰/۰۵$). اما به‌تدریج در روز سی و ششم پس از تغذیه فعال این روند افزایشی تنها در دو تیمار T_{1000} و T_{1500}مشاهده شد ($p<۰/۰۵$).

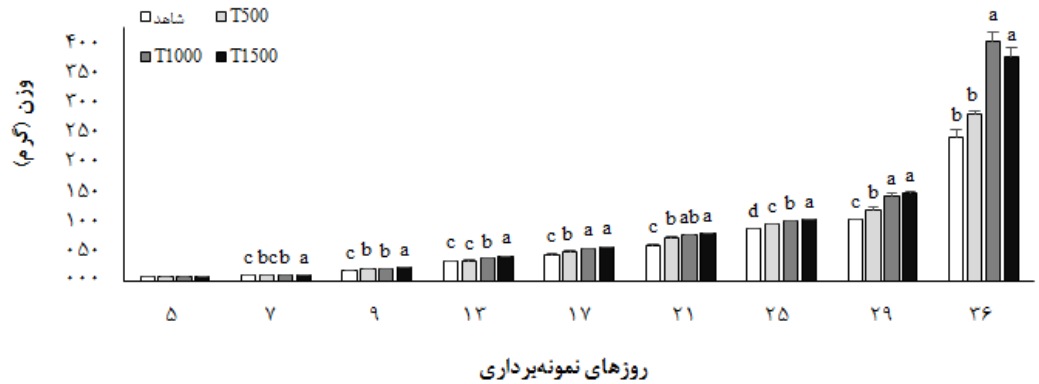
نتایج حاصل از بررسی اثر غوطه‌وری تخم در سطوح مختلف تیامین محلول بر روند تغییرات بازماندگی لارو فیل‌ماهی پس از شروع تغذیه فعال در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که در روز ۷ پس از شروع تغذیه فعال افزایش معنی‌دار در بازماندگی لارو تن‌ها در دو تیمار دوز بالا (T_{1000} و T_{1500}) مشاهده شد. اما با گذشت زمان در تمامی گروه‌های تحت تیمار تیامین بازماندگی لارو نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت ($p<۰/۰۵$).

جدول ۲: شاخص‌های رشد در لارو فیل‌ماهی *Huso huso* پرورشی پس از غوطه‌وری تخم در سطوح مختلف تیامین شامل صفر (شاهد)، ۵۰۰ (T_{500})، ۱۰۰۰ (T_{1000}) و ۱۵۰۰ (T_{1500}) میلی‌گرم بر لیتر تیامین محلول. تمامی داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شده‌اند.

Table 1:Growth indices of beluga larvae (*Huso huso*) after egg immersion in thiamine solution at control (0), 500 (T_{500}), 1000 (T_{1000}) and 1500 (T_{1500}) mg/L. Values are reported as mean ± S.E.

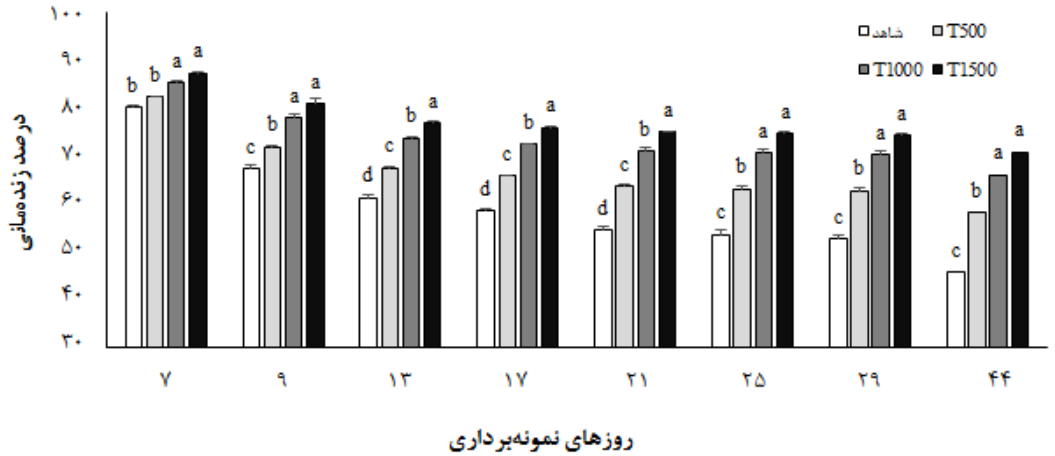
شاخص ها	سطوح تیامین محلول در آب (میلی‌گرم بر لیتر)			
	شاهد	۵۰۰	۱۰۰۰	۱۵۰۰
وزن اولیه (گرم)	۰/۰۰ ± ۰/۰۸	۰/۰۰ ± ۰/۰۹	۰/۰۰ ± ۰/۰۹	۰/۰۰ ± ۰/۱۰
طول اولیه (سانتی‌متر)	۰/۰۲ ± ۱/۳۷	۰/۰۴ ± ۱/۳۴	۰/۰۰ ± ۱/۳۶	۰/۰۱ ± ۱/۳۳
وزن نهایی (گرم)	$۰/۱۳ \pm ۲/۲۶^{b}$	$۰/۰۵ \pm ۲/۶۳^{b}$	$۰/۱۵ \pm ۳/۷۹^{a}$	$۰/۱۵ \pm ۳/۵۶^{a}$
طول نهایی (سانتی‌متر)	$۰/۰۹ \pm ۸/۱۳^{c}$	$۰/۱۱ \pm ۸/۴۸^{bc}$	$۰/۱۶ \pm ۹/۲۸^{ab}$	$۰/۲۷ \pm ۹/۱۲^{a}$
وزن کسب شده (WG) (گرم)	$۰/۱۴ \pm ۲/۱۷^{b}$	$۰/۰۵ \pm ۲/۵۴^{b}$	$۰/۱۵ \pm ۳/۷۰^{a}$	$۰/۱۵ \pm ۳/۵۶^{a}$
شاخص وضعیت (CF)	۰/۰۴ ± ۰/۴۱	۰/۰۲ ± ۰/۴۳	۰/۰۱ ± ۰/۴۷	۰/۰۶ ± ۰/۴۷
نرخ رشد ویژه (SGR) (درصد/روز)	$۰/۱۹ \pm ۴/۲۱^{b}$	$۰/۰۲ \pm ۴/۶۴^{b}$	$۰/۱۲ \pm ۵/۶۴^{a}$	$۰/۱۲ \pm ۵/۴۵^{a}$
درصد افزایش وزن بدن (BWI) (درصد)	$۳۰/۸۸ \pm ۳۵۸/۸۸^{b}$	$۴/۷۳ \pm ۴۳۱/۲۷^{b}$	$۳۳/۱۸ \pm ۶۶۱/۱۸^{a}$	$۳۱/۲۳ \pm ۶۱۳/۲۳^{a}$
ضریب تبدیل غذایی (FCR)	$۰/۰۶ \pm ۳/۵۱^{b}$	$۰/۰۴ \pm ۳/۲۸^{b}$	$۰/۰۶ \pm ۲/۸۸^{a}$	$۰/۱۳ \pm ۰/۹۴^{a}$
کارایی پروتئین (PER)	$۰/۰۲ \pm ۱/۲۴^{b}$	$۰/۰۲ \pm ۱/۳۳^{b}$	$۰/۰۳ \pm ۱/۵۱^{a}$	$۰/۰۷ \pm ۱/۴۸^{a}$
کارایی چربی (LER)	$۰/۰۸ \pm ۴/۵۲^{b}$	$۰/۰۵ \pm ۴/۸۴^{b}$	$۰/۱۱ \pm ۵/۵۱^{a}$	$۰/۲۴ \pm ۵/۴۰^{a}$
بازماندگی لارو در شروع تغذیه فعال	$۰/۴۰ \pm ۸۰/۰۵^{b}$	$۰/۱۲ \pm ۸۲/۱۲^{b}$	$۰/۳۷ \pm ۸۵/۱۲^{a}$	$۰/۴۰ \pm ۸۷/۵۰^{a}$
بازماندگی لارو ۳۰ روز پس از تخم‌گشایی (درصد)	$۱/۰۰ \pm ۵۱/۲۲^{c}$	$۰/۸۹ \pm ۶۱/۷۰^{b}$	$۱/۰۰ \pm ۶۹/۳۵^{a}$	$۰/۶ \pm ۷۳/۳۵^{a}$
بازماندگی لارو ۴۴ روز پس از تخم‌گشایی (درصد)	$۱/۶۱ \pm ۴۵/۷۲^{c}$	$۱/۰۸ \pm ۵۸/۱۲^{b}$	$۱/۳۰ \pm ۶۶/۰۰^{ab}$	$۱/۰۰ \pm ۷۰/۷۵^{a}$

حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مختلف است (P<۰/۰۵).



شکل ۱: رشد در لارو فیل‌ماهی *Huso huso* پرورشی پس از غوطه‌وری تخم در سطوح مختلف تیامین شامل صفر (شاهد)، ۵۰۰ (T_{500})، ۱۰۰۰ (T_{1000}) و ۱۵۰۰ (T_{1500}) میلی‌گرم بر لیتر تیامین محلول. تمامی داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شده‌اند. حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مختلف است (P<۰/۰۵).

Figure 1: Growth of beluga larvae (*Huso huso*) after egg immersion in thiamine solution at control (0), 500 (T_{500}), 1000 (T_{1000}) and 1500 (T_{1500}) mg/L. Values are reported as mean ± S.E. Numbers with different superscripts indicate significant differences between treatments (P<0.05).



شکل ۲: بازماندگی در لارو فیل‌ماهی *Huso huso* پرورشی پس از غوطه‌وری تخم در سطوح مختلف تیامین شامل صفر (شاهد)، ۵۰۰ ($T_{۵۰۰}$)، ۱۰۰۰ ($T_{۱۰۰۰}$) و ۱۵۰۰ ($T_{۱۵۰۰}$) میلی‌گرم بر لیتر تیامین محلول. تمامی داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شده‌اند. حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مختلف است (P<۰/۰۵).

Figure 2: Survival rate of beluga lavae (*Huso huso*) after egg immersion in thiamine solution at control (0), 500 (T_{500}), 1000 (T_{1000}) and 1500 (T_{1500}) mg/L. Values are reported as mean ± S.E. Numbers with different superscripts indicate significant differences between treatments (P<0.05).

بحث

مطالعه حاضر نشان داد غوطه‌وری تخم در محلول تیامین اثر مثبتی بر بازماندگی آن از ۲۴ ساعت پس از لقاح تا زمان تخم‌گشایی دارد به‌طوری‌که این افزایش در تمامی گروه‌های تحت تیمار تیامین نسبت به گروه شاهد به‌وضوح مشاهده شد. اما درجه روز چشم‌زدگی تا تخم‌گشایی تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشت. عمده مطالعات انجام شده در ارتباط با اثر تیامین بر شاخص‌های انکوباسیون در خانواده آزادماهیان انجام شده است که بیان می‌کنند کمبود تیامین در تخم می‌تواند منجر به افزایش تلفات شود (Ketola *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2009; Chalupnicki *et al.*, 2012; Futia and Rinchard, 2019). مطالعه انجام‌شده در ارتباط با تزریق تیامین به مولدین در فصل تکثیر و بررسی اثر آن بر تخم و لارو ماهی استرلیاد نشان می‌دهد که تزریق سه دوره تیامین با دوز ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن می‌تواند منجر به افزایش معنی‌دار ذخیره تیامین در تخمک و در نهایت افزایش نرخ تخم‌گشایی شود (Ghiasi *et al.*, 2017). Futia و همکاران (۲۰۱۷) در بررسی اثر درمان هم‌زمان تیامین تزریقی به مولدین و غوطه‌وری تخم در محلول تیامین در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) نشان دادند، نرخ مرگ‌ومیر لاروهایی که در مرحله تخم در محلول ۱۰۰۰ قسمت در میلیون تیامین غوطه‌ور شده بودند نسبت به لاروهایی که به مولدین آنها تیامین به میزان ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم تزریق شده بود کاهش یافت. Brown و همکاران (۲۰۰۵) درگونه آزاد کوهو (*O. kisutch*) نشان داد که جهت افزایش بازماندگی تخم و کاهش علائم مربوط به سندروم EMS باید غوطه‌وری تخم ماهی حداقل باید در ۵۰۰ میلی گرم در لیتر تیامین اعمال شود. همچنین قرار دادن تخم قزل‌آلای دریاچه‌ای (*Salvelinus namaycush*) در معرض ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر اکسی‌تیامین (به عنوان آنتی‌تیامین)، منجر به کاهش تخم قارچ‌زده و افزایش افزایش درصد تخم‌گشایی شد (Fitzsimons *et al.*, 2012).

در مطالعه حاضر، تیامین توانست منجر به افزایش بقاء تخم در ۲۴ ساعت اول لقاح تا زمان تخم‌گشایی شود و با گذشت زمان، این افزایش ارتباط مستقیمی با دوز تیامین داشت به‌طوری‌که درصد بازماندگی به‌ترتیب با افزایش دوز تیامین افزایش یافت. مطالعات بسیاری ثابت کرده است که

تیامین می‌تواند از طریق غوطه‌وری وارد تخمک شود (Barnes *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2005; Futia *et al.*, 2017; Harder *et al.*, 2018). افزایش تیامین تخم می‌تواند منجر به افزایش تیامین پیروفسفات شود. تیامین پیروفسفات به عنوان یک کوآنزیم مهم در سنتز متابولیسم انرژی عمل می‌کند به‌طوری‌که واکنش‌های دخیل در تنظیم نرخ سنتز کوآنزیم‌های استیل‌کوآنزیم A (acetyl-CoA)، کربوکسیلاز و اسیدچرب سنتتاز بر عهده تیامین پیروفسفات است و این سه کوآنزیم مهم به طور مستقیم در سنتز اسیدهای چرب ضروری مورد نیاز برای توسعه و تکوین جنین نقش دارند (Fitzsimons *et al.*, 2012) زمانی که دسترسی به تیامین کم باشد، آنزیم‌های مربوطه عملکرد مناسبی ندارند و تکامل جنین دچار اختلال می‌شود که که گاهی این اختلالات منجر به مرگ جنین نیز خواهد شد. پس در تحقیق حاضر این احتمال وجود دارد که افزایش تیامین در تخمک طی غوطه‌وری منجر به دسترسی بیشتر جنین به تیامین پیروفسفات و در نتیجه، افزایش درصد تخم‌گشایی شده باشد. این موضوع نیازمند مطالعات تکمیلی در ارتباط با بررسی مراحل آنتوژنی لارو و تغییرات اسیدهای چرب پس از درمان با تیامین در آینده است.

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد در زمان شروع تغذیه فعال اختلاف معنی‌داری بین طول و وزن لارو وجود نداشت. اما با شروع تغذیه فعال طول و وزن لارو و تمامی شاخص‌های تغذیه در تیمارهای T_{1000} و T_{1500} افزایش معنی‌داری نسبت به دو تیمار دیگر داشت. همچنین تزریق ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن تیامین به مولدین تاسماهی استرلیاد در فصل تکثیر می‌تواند منجر به افزایش وزن لارو یک و شش روزه پس از تخم‌گشایی شود (Ghiasi *et al.*, 2017). در روندی مشابه در پی بروز تلفات عمده در لارو ماهی آزاد چینوک (*O. tshawytscha*) قراردادن تخم این ماهی در دوزهای ۲۵۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر منجر به افزایش ذخیره تیامین تخمک از ۱۰/۲ میلی‌گرم درگروه شاهد به ۱۲/۷ میلی‌گرم در گروه تحت درمان با ۱۰۰۰ میلی‌گرم تیامین گردید و در نتیجه افزایش بقاء را از مرحله چشم‌زدگی تا شنای فعال به‌دنبال داشت (Barnes *et al.*, 2001). همچنین مطالعه Fisher و همکاران (۱۹۹۵) بر مولدین وحشی ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) تغذیه شده با شگ ماهی حاوی تیامیناز نشان داد که قرارگیری لاروهای با کیسه زرده (۶۷۵ درجه‌روز و در شروع تغذیه فعال) در محلول ۰/۰۱ تیامین به مدت یک ساعت منجر به افزایش بقاء لارو به میزان ۸۰ درصد پس از دو هفته می‌شود درحالی‌که لاروهای تیمار شاهد (فاقد تیامین) دو روز قبل از مرگ از مرگ علایمی عصبی نظیر شنای نامنظم و عدم پاسخ را از خود بروز دادند که نشان‌دهنده نقش مهم تیامین بر عملکرد سیستم عصبی بود. در گربه ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) نیز قرارگیری تخم پس از لقاح در محلول ۳۰ میلی‌گرم در لیتر تیامین توانست موجب افزایش نرخ تخم‌گشایی از ۴۰/۷ درصد در تیمار شاهد به ۶۳ درصد و کاهش درصد ناهنجاری‌های لاروی از ۲۲ درصد به ۷/۱ درصد (Romanova *et al.*, 2019) شود. در تحقیق حاضر، زمان شروع تغذیه فعال اختلافی بین طول و وزن لاروها وجود نداشت و بر این نکته اذعان دارد که عمده تغییرات لاروی از جمله رشد و علائم ناهنجاری مرتبط با تیامین به‌تدریج پس از شروع تغذیه فعال بروز می‌کند (Werner *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009). به‌همین دلیل به‌نظر می‌رسد، عدم اختلاف طول و وزن لارو در تیمارها منطقی و هم راستا با سایر مطالعات باشد به‌طوری‌که با گذشت زمان تیامین توانست در انتهای دوره در دو سطح ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر منجر به بهبود شاخص‌های رشد و تغذیه در لارو فیل ماهی شود و بازماندگی به‌شدت تحت تاثیر دوز تیامین قرار گیرد. همان‌طوری‌که قبلاً نیز اشاره شد، تیامین ذخیره شده در تخم می‌تواند به فرم فعال تیامین (تیامین پیروفسفات) تبدیل گردد. مطالعات انجام‌شده بیان می‌کنند که آلوین‌های ماهی آزاد که دچار کمبود تیامین می‌شوند، توانایی استفاده از کیسه زرده را ندارند، زیرا تیامین به عنوان کوآنزیم مورد نیاز برای فعالیت آنزیم‌هایی نظیر ترنس‌کتولاز، پنتوزفسفات و پیروات‌دهیدروژناز که برای تولید انرژی و متابولیت های سلولی بسیار ضروری هستند،

فراهم نبود (Fitzsimons *et al.*, 2009; Bettendorff, 2013). تا جایی‌که بیان شد، لاروهای مرده با علائم سندروم EMS همگی دارای کیسه زرده بزرگ‌تری نسبت به لاروهای سالم بودند (Harder *et al.*, 2018). از آن‌جایی‌که کیسه زرده تن‌ها منبع در دسترس لارو برای رشد و تکامل است، منطقی به‌نظر می‌رسد که افزایش تیامین در دسترس لارو منجر به افزایش عملکرد متابولیسم چربی، پروتئین، کربوهیدرات و اسیدهای چرب یعنی تمام مواد ضروری موجود در زرده که لارو برای رشد و سلامت خود به آن نیاز دارد، شده باشد. به‌علاوه، تیامین منجر به افزایش قدرت بینایی، شکارگری و جستجوگری طعمه در لاروها می‌شود (Tillitt and Zajicek, 2005; Fitzsimons *et al.*, 2009) و نقش مهمی در سیستم عصبی ایفاء می‌کند (Morito *et al.*, 1986; Brown *et al.*, 2005). پس بدیهی است که افزایش تیامین با اثر بر سیستم عصبی منجر به بهبود قدرت شنای لارو و در نتیجه، راحت‌ترپیدا کردن غذا در گروه‌های تحت تیمار تیامین می‌شود که این مسئله در ماهیان خاویاری بسیاز حائز اهمیت است.

در تحقیق حاضر، تیامین توانست بر بهبود شاخص‌های انکوباسیون نظیر افزایش درصد تخم‌گشایی به عنوان مهم‌ترین شاخص کیفیت تخم اثر مثبتی داشته باشد. به‌علاوه، تیامین توانست منجر به افزایش رشد و استفاده بهتر از غذای در دسترس لارو در گروه‌های تحت درمان تیامین شود تا جایی‌که کارایی پروتئین، کارایی چربی و ضریب تبدیل غذایی افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشتند. به‌همین منظور توصیه می‌شود، تخم‌های لقاح یافته فیل‌ماهی قبل از انتقال به انکوباتورها و جذب آب تحت غوطه‌وری حداقل ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تیامین محلول قرار گیرند تا اثرات مثبت تیامین منجر به بهبود راندمان تکثیر شود.

تشکر و قدردانی

نگارندگان از کلیه همکارانی که در اجرای این پروژه دست یاری دادند و با کمک‌ها و زحمات بیدریغ خود پشتیبان ما بودند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

محسنی، م.، پورکاظمی، م.، کرمی نسب، م. و راست روان، م.ا.، ۱۳۹۷. بررسی اثرات سطوح مختلف پروتئین جیره غذایی بر میزان رشد، ترکیب شیمیایی بدن و قابلیت هضم مواد مغذی در بچه ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۸(۲): ۱۶۵-۱۷۸.

Abdelghany, A.E. and Ahmad, H.M., 2002. Effects of feeding rates on growth and production of Nile tilapia, common carp and silver carp polycultured in fertilized ponds. *Aquaculture Research*, 33: 415–423. Doi: 10.1046/j.1365-2109.2002.00689.x

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. Doi: 10.1016/S0166-445X(00)00089-8.

Barnes, M.E., Zehfus, M.H., Schumacher, J.A., Stock, K.S., Farrokhi, F. and Nutter, R.L., 2001. Initial observations on thiamine hydrochloride of eggs of landlocked fall Chinook salmon. *North American Journal of Aquaculture*, 63: 338-342. Doi: 10.1577/1548-8454(2001)063<0338 :IOOTHT>2.0.CO;2

Bettendorff, L., 2013. The chemistry, biochemistry and metabolism of thiamin (vitamin B1). In: Preedy, V.R., (ed) B Vitamins and Folate: Chemistry, Analysis, Function and Effects. Royal Society of Chemistry, London, England. pp. 71-92.

Brown, S.B., Brown, L.R., Brown, M., Moore, K., Villella, M., Fitzsimons, J.D., Williston, B., Honeyfield, D.C., Hinterkopf, J.P., Tillitt, D.E., Zaijeck, J.L. and Wolgamood, M., 2005. Effectiveness of egg immersion in aqueous solutions of thiamine and thiamine analogs for reducing early mortality syndrome. *Journal of Aquatic Animal Health*, 17: 106-112. Doi: 10.1577/H03-075.1.

Carvalho, P.S.M., Tillitt, D.E., Zajicek, J.L., Dale, R.A., Honeyfield, D.C., Fitzsimons, J.D. and 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. Doi: 10.1577/H08-025.1.

Chalupnicki, M.C., Ketola, H.G., Zehfus, M.H., Crosswait, J.R. and Rinchard, J., 2012. Thiamine status of rainbow smelt (*Osmerus mordax*) eggs in the Great Lakes USA. *Journal of Freshwater Ecology*, 27: 31-39. Doi: 10.1080/02705060.2011.603204.

Chebanov, M. and Billard, R., 2001. The culture of sturgeons in Russia: production of juveniles for stocking and meat for human consumption. *Aquatic Living Resource*, 14: 375-381. Doi: 10.1016/S0990-7440(01)01122-6.

Fisher, J.P., Spitsbergen, J.M., Iamonte, T., Little, E.E. and DeLonay, A. 1995. Pathological and behavioral manifestations of the "Cayuga Syndrome" a thiamine deficiency in larval landlocked Atlantic salmon. *Journal of Aquatic Animal Health*, 7: 269-283. Doi: 10.1577/1548-8667(1995)007<0269:PABMOT>2.3.CO;2.

Fitzsimons, J.D., Brown,Fitzsimons, J.D., Brown, S.B., Williston, B., Williston, G., Brown, L.R, Moore, K., Honeyfield, D.C. and 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. Doi: 10.1577/H08-019.1.

Fitzsimons, J.D., Williston, B., Vandenbyllaardt, L., El-Shaarawi, A. and Brown, S.B., 2012. Use of a thiamine antagonist to evaluate the effects of thiamine deficiency on lake trout embryonic development. *Journal of Great Lakes Research*, 38: 236-242. Doi: 10.1016/j.jglr.2012.02.015.

Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. Journal of biology and Chemistry, 226(1): 497-509.

Futia, M. H. and Rinchard, J., 2019. Evaluation of adult and offspring thiamine deficiency in salmonine species from Lake Ontario. *Journal of Great Lakes Research*, 45: 811-820. Doi: 10.1016/j.jglr.2019.05.010.

Futia, M.H., Hallenbeck, S., Noyes, A.D., Honeyfield, D.C., Eckerlin, G.E. and

Rinchard, J., 2017. Thiamine deficiency and the effectiveness of thiamine treatments through broodstock injections and egg immersion on Lake Ontario steelhead trout. *Journal of Great Lakes Research*, 43: 352-358. Doi: 10.1016/j.jglr.2017.01.001.

Ghiasi, S., Falahatkar, B., Arslan, M. and Dabrowski, K., 2017. Physiological changes and reproductive performance of Sterlet sturgeon *Acipenser ruthenus* injected with thiamine. *Animal reproduction science*, 178: 23-30. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.01.005.

Graff, E., Waagbo, R., Fivelstad, S., Vermeer, C., Lie1, O. and Klundeby, 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. Doi: 10.1046/j.1365-2761.2002.00403.x.

Harder, A.M., Ardren, W.R., Evans, A.N., Futia, M.H., Kraft, C.E., Marsden, J.E. and Christie, M.R., 2018. Thiamine deficiency in fishes: causes, consequences, and potential solutions. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 28: 865-886. Doi: 10.1007/s11160-018-9538-x.

Harder, A.M., Willoughby, J.R., Ardren, W.R. and Christie, M.R., 2020. Among-family variation in survival and gene expression uncovers adaptive genetic variation in a threatened fish. *Molecular Ecology*, 29: 1035-1049. Doi: 10.1111/mec.15334.

Hung, S.S., 1989. Choline requirement of hatchery-produced juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Aquaculture*, 2: 183-194. Doi: 10.1016/0044-8486(89)90031-8.

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. Doi: 10.1577/1548-8659(2000)129<0607:EOTORO>2.0.CO;2.

Ketola, H.G., Isaacs, G.R., Robins, J.S. and Lloyd, R.C., 2008. Effectiveness and retention of thiamine and Its analogs administered to steelhead and landlocked Atlantic salmon. *Journal of Aquatic Animal Health*, 20: 29-38. Doi: 10.1577/H07-012.1.

Lee, B., Jaroszewska, M., Dabrowski, K., Czesny, S. and Rinchard, J., 2009. Effects of vitamin B_1 (Thiamine) deficiency in lake trout alevins and preventive treatments. *Journal of Aquatic Animal Health*, 21: 290-301.Doi: 10.1577/H07-053.1.

Mohseni, M., Hamidoghli, A. and Bai, S.C., 2021. Organic and inorganic dietary zinc in beluga sturgeon (*Huso huso*): Effects on growth, hematology, tissue concertation and oxidative capacity. *Aquaculture*, 539: 736672. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.736672.

Moore, B.J., Hung, S.S. and Medrano, J.F. 1988. Protein requirement of hatchery-produced juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Aquaculture*, 3:

235-245. Doi: 10.1016/0044-8486(88)90262-1

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. Doi: 10.1007/BF02290209.

Romanova, E.M., Mukhitova, M.E., Romanov, V.V., Lyubomirova, V.N. and Spirina, E.V., 2019. Factors for increasing the survival rate of catfish fertilized eggs and larvae. Paper presented at the at IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Makassar, South Sulawesi, Indonesia 7-8 August 2019, Doi: 10.1088/1755-1315/341/1/012197.

Ronyai, A., Peteri, A. and Radics, F., 1990. Cross breeding of starlet and Lena river sturgeon. *Aquaculture Hungrica (Szarwas)*, 6: 13-18.

Ruban, G., Khodorevskaya, R. and Shatunovskii, M., 2019. Factors influencing the natural reproduction decline in the beluga (*Huso huso*, Linnaeus, 1758), Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*, Brandt & Ratzeburg, 1833), and stellate sturgeon (*A. stellatus*, Pallas, 1771) of the Volga–Caspian basin: A review. *Journal of Applied Ichthyology*, 35: 387-395. Doi: 10.1111/jai.13885.

Tillitt, D.E. and Zajicek, J., 2005. Development of thiamine deficiencies and early mortality syndrome in lake trout *Salvelinus namaycusch* by feeding experimental and feral fish diets containing thiaminase. *Journal of Aquatic Animal Health*, 17: 4-12. Doi: 10.1577/H03-078.1.

Werner, M.R., Rook, B. and Greil1, R., 2006. Egg-thiamine status and occurrence of early mortality syndrome (EMS) in Atlantic Salmon from the St. Marys River. *Michigan. Journal of Great Lakes Research*, 32: 293-305. DOI: 10.3394/0380-1330(2006)32 [293:ESAOOE] 2.0.CO;2.

Effect of egg immersion at different levels of water-soluble thiamine on improving the incubation indices and larvae growth of farmed beluga (*Huso huso*)

Mohseni M.[1*]; Pazhand, Z. [1]; Ghiasi, S. [2]; Pourdeghani, M. [1]; Ghorbani R.[1]; Hassani M.H.[1]; Yeganeh, H. [1]; Ghasemian S.[1]

[*]mahmoudmohseni73@gmail.com

1-International Sturgeon Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.
2-Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Guilan, Sowmeh Sara, Iran

Abstract

To evaluate the effects of thiamine on incubation indices of beluga (*Huso huso*) eggs obtained from farmed males and females after fertilization were immersed in water-soluble thiamine with four treatments and three replicates per treatment including control (0 mg thiamine per liter of water), T_{500} (500 mg thiamine per liter of water), T_{1000} (1000 mg thiamine per liter of water) and T_{1500} (1500 mg thiamine per liter of water) for 30 min. Then, they were washed five times with fresh water and kept in special incubators until especial hatching. Incubation indices and larval growth were investigated 24 h after fertilization to 44 days after starting active feeding phase. Results showed the highest and lowest egg survival rate at 24 h after fertilization until hatching were observed in T_{1500} and control, respectively (p<0.05). Thiamine at T_{1500} and T_{1000} could increase the weight, length, and weight gain at the end of the experiment (p<0.05). Also, the egg immersion in soluble thiamine led to an increase in the specific growth rate and body weight in T_{1000} and T_{1500} at day 36 after the start of active feeding phase (p<0.05). The food conversion ratio, protein efficiency ratio, and lipid efficiency ratio significantly decreased in the control and T_{500} compared to other treatments (p<0.05). The lowest larval survival rate was observed in the control at the beginning of active feeding until day 44 (p<0.05).Overall, the results of the research showed that immersing eggs in thiamine solution can lead to increased growth and survival of larvae, so it is suggested that *Huso huso* eggs be placed in thiamine solution at least 1000 mg L^{-1} after fertilization. Therefore, it is recommended that beluga eggs immersion in thiamine solution at least 1000 mg L^{-1} thiamine after fertilization.

Keywords: Vitamin B1, Hatching rate, Larval survival, Egg immersion, incubation**,** Beluga

[*]Corresponding author