



## مقاله مروری:

## مروری بر زیست فناوری تکثیر و پرورش دلقک ماهی ها (*Amphiprion* sp.) به عنوان گونه مدل آزمایشگاهی

علیرضا خیابانی<sup>\*</sup>

\*khiabani@uast.ac.ir

۱- گروه کشاورزی و منابع طبیعی، سازمان مرکزی دانشگاه جامع علمی کاربردی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: آبان ۱۴۰۲

## چکیده

شقایق ماهی ها، ماهیان زیبا و منحصر به فرد از راسته اووالنتاریا (*Ovalentaria*)، خانواده دوشیزه ماهیان (*Pomacentridae*) و زیرخانواده دوشیزه ماهیان (*Pomacentrinae*) هستند که با ۳۰ گونه مختلف در آب های نواحی استوایی و نیمه استوایی جهان پراکنش دارند. شقایق ماهیان به دلیل بسیاری از ویژگی های زیستی از جمله برخورداری از جثه کوچک، تمایل به قلمروهای کوچک، دوشکلی جنسی، همافرو دیتیسم متوالی، فرکانس تولید مثلی بالا، جذابیت بصری، سهولت در تخم ریزی و منطبق شدن با محیط اسارت، به سرعت به یکی از محبوب ترین ماهیان زینتی دریایی تبدیل شدند که این برای مقاصد اکولوژیک، مباحث علمی و اهداف تجاری بسیار ارزشمند است. آنها نخستین ماهیان مناطق مرجانی بودند که در محیط اسارت با موفقیت تکثیر شدند، هرچند در مقیاس تجاری پرورش آنها همواره با چالش هایی همراه بوده و موفقیت در این خصوص، منوط به رعایت قواعد فنی تولید، به ویژه افزایش نرخ بقاء نوزادان است. توسعه روش های تکثیر و پرورش مناسب در مقیاس تحقیقات آزمایشگاهی، برای دانشمندان علاقه مند به استفاده از شقایق ماهیان به عنوان یک ارگانیزم مدل بسیار ارزشمند است. از این رو، در این مطالعه به قواعد زیست فناوری تولید این ماهیان شامل سیستم پرورش مولدین، مولد سازی و نگهداشت مولدین، رژیم غذایی، بستر تخم گذاری، سیستم های معمول پرورش لارو، روش پرورش بدون مراقبت مولدین و سایر نکات کاربردی ذیربط براساس آخرین یافته های علمی پرداخته شد.

**کلمات کلیدی:** شقایق ماهی، دلقک ماهی، نگهداری مولدین، سیستم های پرورش لارو، آکواریوم های دریایی، تحقیقات آزمایشگاهی.

## مقدمه

شقایق‌ماهی‌ها به دلیل بسیاری از ویژگی‌های زیستی‌شان از جمله برخورداری از جثه کوچک (حدود ۲۰ سانتی‌متر)، تمایل به قلمروهای کوچک طبیعی، دوشکلی جنسی<sup>۱</sup>، هرمافرودیتیسم متوالی<sup>۲</sup>، جذابیت بصری، سهولت در تخم‌ریزی و منطبق شدن به محیط اسارت، به‌سرعت به یکی از محبوب‌ترین ماهیان زینتی دریایی تبدیل شدند (Khiabani and Esmaeili Ferydoni, 2017). به‌طوری‌که از دهه ۱۹۵۰ در سراسر جهان تجارت می‌شوند (Wittenrich, 2007). چنین محبوبیتی همچنین به این دلیل است که هنگامی که یک جفت شقایق‌ماهی مولد در محیط پرورشی نگهداری می‌شوند، در تمام طول سال با فرکانس تولیدمثلی بالا، ۸۰۰-۲۰۰ تخم در ماه تولید می‌کنند که این برای مقاصد اکولوژیک، مباحث علمی و اهداف تجاری بسیار ارزشمند است، زیرا اجازه می‌دهد تا یک ذخیره ثابت ژنی و بدون نیاز به لقاء تولیدمثل هورمونی یا استخراج دستی گامت در دسترس باشد. چنین ویژگی‌هایی نیز احتمالاً یکی از دلایل اصلی محبوبیت شقایق‌ماهیان برای دانشمندان رشته‌های مختلف تحقیقاتی است (Roux et al., 2021). از این‌رو، محققان برای عدم وابستگی به مزارع پرورش ماهیان زینتی به علت عدم اطمینان از خلوص جمعیت، بیماری‌ها و سایر چالش‌هایی که نتایج آزمایش‌های علمی را تحت شعاع قرار می‌دهد، از جمع‌آوری این ماهیان از سطح مزارع تولیدی اجتناب نموده و برای دستیابی به نتایج مطلوب علمی، اقدام به ابداع روش‌هایی برای تولید این ماهی‌ها در محیط اسارت نموده‌اند که مجموعاً منجر به شناسایی بیوتکنیک تکثیر و پرورش تجاری شقایق‌ماهیان شده است (Anil et al., 2012, Roux et al., 2021). توسعه روش‌های پرورش مناسب در مقیاس تحقیقات آزمایشگاهی، برای دانشمندان علاقه‌مند به استفاده از شقایق‌ماهیان به عنوان یک ارگانیسم مدل برای تبیین روابط بوم‌شناسی تکامل و توسعه زیستی<sup>۳</sup> بسیار ارزشمند است. از سوی دیگر، تجارت ماهیان زینتی دریایی در دهه‌های گذشته رشد قابل‌توجهی در سراسر جهان داشته است به‌طوری‌که به عنوان یک فعالیت پر رونق شیلاتی در دهه ۸۰،

از درآمد تخمینی ۲۴-۴۰ میلیون دلار آمریکا در سال (Wood, 1985)، به ۳۰۰ میلیون دلار در سال ۲۰۱۷ رسید (Calado et al., 2017) و در سال ۲۰۲۰ به ۳۳۰ میلیون دلار افزایش یافت (OECD, 2022). بر اساس تعداد ماهی‌های وارداتی طی سال‌های ۱۷-۲۰۱۴، اروپا به عنوان یک منطقه، بزرگترین مقصد ماهیان زینتی دریایی (۱۵.۶ میلیون قطعه) بوده است. کشورهای بریتانیا (۴.۲ میلیون)، هلند (۳.۳ میلیون)، آلمان (۲.۲ میلیون)، ایتالیا (۱.۵ میلیون) و فرانسه (۱.۴ میلیون قطعه) در صدر کشورهای اروپایی مقصد قرار داشتند. کشور ژاپن نیز با واردات ماهیان زینتی آب شیرین و دریایی به ارزش ۱۵.۹۸ میلیون دلار در سال ۲۰۱۶، چهارمین مقصد بزرگ ارقام زینتی دریایی بوده است (Biondo and Burki, 2019). ارزش تجارت جهانی ماهیان زینتی تقریباً ۱۵-۳۰ میلیارد دلار آمریکا در سال ۲۰۲۱ اعلام شده که شامل گونه‌های زینتی آب شیرین و دریایی است (INFOFISH, 2021). طی سال‌های ۲۰۰۳-۱۹۸۸، در مجموع ۱۴۷۱ گونه مختلف از ماهیان آکواریومی دریایی در سراسر جهان تجارت شدند. سهم ماهیان متعلق به خانواده دوشیزه‌ماهیان (Pomacentridae) از این تجارت، ۴۳ درصد از کل گونه‌ها بود (Wabnitz, 2003). الگوی مشابهی برای ایالات متحده آمریکا طی سال‌های ۲۰۰۴-۲۰۰۵ گزارش شد و با ۱۷۰ گونه مختلف از دوشیزه‌ماهیان که شامل بیش از ۵۰ درصد از کل واردات ماهی می‌شد (Rhyne et al., 2012). همچنین ۴.۶ میلیون قطعه از ماهیان متعلق به خانواده دوشیزه‌ماهیان (تقریباً ۳۰ درصد کل نمونه‌های وارداتی) طی سال‌های ۱۷-۲۰۱۴ به اروپا وارد شدند (Biondo and Burki, 2019). تنها ۴/۲-۱ درصد از گونه‌های زینتی دریایی تجارت شده در ایالات متحده آمریکا در اسارت تکثیر می‌شوند درحالی‌که اکثریت قریب به اتفاق آنها محصول صید از حیات وحش بوده که این یک عمل برای محیط زیست مخرب بوده و مغایر با توسعه پایدار آبی‌پروری است (Cañedo-Orihuela et al., 2023). در کشور ما نیز آمار دقیقی از میزان واردات، تولید و صادرات شقایق‌ماهیان در دسترس نیست، اما بر اساس اطلاعات موجود، حداقل ۵ تولید کننده در سطح استان‌های تهران، اهواز و هرمزگان در این راستا فعالیت دارند. شایان ذکر است، خانواده دوشیزه‌ماهیان شامل گونه‌های متعددی از ماهیان صخره‌های مرجانی با رنگ‌های چشم نواز و

- 1- Sexual dimorphism
- 2- Sequential hermaphroditism
- 3- Eco-evo-devo

حرکات پر جنب و جوش است که معمولاً با نام‌های دلقک‌ماهی‌ها (Clownfish)، شقایق‌ماهی‌ها (Anemonefish) و دوشیزه‌ماهی‌ها (Damsel fish) شناخته می‌شوند. بهترین نمونه شناخته شده از دوشیزه‌ماهیان در صنعت آکواریوم های دریایی احتمالاً دلقک‌ماهی *Amphiprion ocellaris* و دلقک‌ماهی نارنجی (A. *percula*) است که با فیلم کارتونی "Finding Nemo" رایج شد و به طور گسترده در سراسر جهان معرفی شد (Fricke et al., 2018; Foale, 2017). لذا، تکثیر و پرورش در محیط اسارت بدون شک راهبردی مناسب برای حرکت در مسیر توسعه پایدار است. در میان گونه‌های ماهیان زینتی دریایی تولیدی در محیط اسارت، تا کنون چشمگیرترین پیشرفت‌ها در تولید دلقک‌ماهی‌ها صورت گرفته است به طوری که حداقل ۲۵ گونه از این ماهیان برای مقاصد تجاری در محیط اسارت پرورش داده شده‌اند. علاوه بر این، انواع شقایق‌ماهی‌ها یا اشکال رنگی متعددی از آن (وارته‌های مختلف) از طریق پرورش انتخابی و هیبریداسیون بین گونه‌ها ایجاد شده است (Cañedo-Orihuela et al., 2023). در این مطالعه سعی بر آن شد زیست‌فناوری تکثیر و پرورش دلقک‌ماهی‌ها براساس روش‌ها و تکنیک‌های توسعه یافته توسط محققان مختلف مرور شده و مدل مناسب برای انجام کار در محیط‌های آزمایشگاهی پیشنهاد شود.

## رده‌بندی و اصالت

شقایق‌ماهی‌ها، ماهی‌های زیبا و منحصر به فرد از راسته اووالنتاریا (Ovalentaria)، خانواده دوشیزه‌ماهیان (Pomacentridae) و زیرخانواده دوشیزه‌ماهیان (Pomacentrinae) هستند. از این زیرخانواده تنها یک جنس آمفی‌پریون (*Amphiprion*) در ۳۰ گونه مختلف در آب‌های نواحی استوایی و نیمه‌استوایی جهان شناسایی شده است (Betancur-R et al., 2017; Fricke et al., 2018, 2020). پیش‌تر شقایق‌ماهی‌ها را در راسته سوف‌ماهی‌شکلان (Perciformes)، خانواده دوشیزه‌ماهیان (Pomacentridae) و زیرخانواده شقایق‌ماهیان (Amphiprioninae) جای می‌دادند و علاوه بر جنس آمفی‌پریون، جنس *Premnas* را تنها با یک گونه به نام دلقک

مارون (دلقک‌ماهی شاه‌بلوطی<sup>۴</sup>) طبقه‌بندی می‌کردند. اما با بازنگری صورت گرفته در طبقه‌بندی سیستماتیک این ماهیان، این جنس دیگر معتبر نبوده و نام علمی آن به عنوان سی‌امین گونه آمفی‌پریون با عنوان *Amphiprion biaculeatus* تصحیح گردیده است (Colley et al., 2016; Khiabani, 2020). امروزه وارته‌ها و هیبریدهای مختلفی را می‌توان در این زیرخانواده ملاحظه کرد که با رشد چشمگیری در صنعت آکواریوم و ماهیان زینتی جهان در تبادله هستند. در حال حاضر، مکانیسم احتمالی تکاملی این ماهیان به خوبی شناخته شده که چگونه تنوع فنوتیپی بین دودمان‌ها ممکن است با تغییر در فرآیندهای تکاملی به دست آید (Carroll, 2008; Brakefield, 2011). آنها یک الگوی رنگی نسبتاً ساده از صفر الی ۳ نوار عمودی سفید را نشان می‌دهند که به خوبی روی پس‌زمینه زرد تا قرمز، قهوه‌ای یا حتی سیاه بدن قابل مشاهده است (Colley et al., 2016). زیست‌شناسان مدت‌هاست که مجذوب تنوع چشمگیر الگوهای رنگی پیچیده در ماهی‌های صخره‌های مرجانی شده‌اند. با این حال، منشأ و تکامل این تنوع هنوز به خوبی درک نشده است. ظاهر متمایز و توسعه نوارهای نارنجی و سفید شقایق‌ماهی‌ها برای تشخیص درون یا بین‌گونه‌ای بودن آنها، کاربرد دارد (Salis et al., 2018; Merilaita and Kelley, 2018). به درستی اشاره کرد که ما وارد عصر دلقک‌ماهی‌های طراحی شده (دستکاری شده) شده‌ایم، اما ابهامات یا نگرانی‌هایی در میان علاقه‌مندان و عموم مردم در مورد تولید دلقک‌ماهی‌های غیراصیل وجود دارد، برای مثال، این که آیا این ماهی‌ها از ارقام وحشی هستند یا خیر، صید شده‌اند یا پرورشی، هیبرید هستند یا اصلاح ژنتیکی شده (Calado, 2017). همچنین گزارش‌هایی مبنی بر اصلاح ژنتیکی برخی ارقام این ماهیان وجود دارد. از این‌رو، استفاده از مولدین غیر اصیل در انجام فعالیت‌های تحقیقاتی و آزمایشگاهی به عنوان گونه مدل آزمایشگاهی توصیه نمی‌شود. با وجود این، بسیاری از شرکت‌های پیشرو آبریز پروری، انواع مختلفی از دلقک‌ماهی‌های طراحی شده را تجاری‌سازی کرده‌اند. این شرکت‌ها بسیاری از این گونه تغییرات رنگی یا متاثر از جهش

4- *Premnas biaculeatus* (Bloch, 1790): Maroon Anemonefish

ژنتیکی را توسعه داده و در حال حاضر، تقریباً ۴۰ الگوی رنگی مختلف را با نام‌های تجاری مختلف در صنعت آکواریوم و ماهیان زینتی جهان وارد کرده‌اند (Klann et al., 2021a). لذا، ماهی‌شناسان از هر دو ابزار طبقه‌بندی کلاسیک و روش‌های مولکولی برای تعیین منشأ هویت واریته‌ها و هیبریدهای دلقک‌ماهی‌ها استفاده می‌کنند. برای مثال، توالی‌های جزئی زیرواحد سیتوکروم سی اکسیداز<sup>۵</sup> دلقک‌ماهی Picasso و دلقک‌ماهی Platinum به‌ترتیب با شماره‌های دسترسی MT947238 و MT947239، حداکثر شباهت به توالی‌های دلقک‌ماهی نارنجی (*A. percula*) را نشان داده‌اند (Anikuttan et al., 2022).

### زیست‌شناسی تولیدمثل و رفتارشناسی

برخلاف اکثر ماهیان ساکن صخره‌های مرجانی که پخش‌کننده تخم<sup>۶</sup> در ستون آب محسوب می‌شوند، دوشیزه‌ماهیان (Anemonefishes) و شقایق‌ماهیان (Damsel fishes) تخم‌گذار بستر دریا<sup>۷</sup> هستند (Khiabani and Esmaeili, 2017). آنها تحت سلسله مراتب سخت‌گیرانه‌ای در گله زندگی می‌کنند که به دلیل تفاوت در اندازه بدن تعریف می‌شود. تولیدمثل به بزرگترین ماده (غالب‌ترین ماده) و نر کمتر غالب اختصاص دارد (Buston, 2004). شقایق‌ماهی‌های غالب با اعمال پرخاشگری به طبقه پایین‌تر گله، مرتبه خود را یادآور می‌شوند درحالی‌که ماهی‌های سطح دوم اغلب با نشان دادن حالت‌های مطیع بدن پاسخ می‌دهند (Camp et al., 2016; Wong et al., 2017). آنها به طور کلی، به به دارا بودن روابط تک همسری و چند همسری تقسیم می‌شوند (Fishelson, 1998).

### تغییر جنسیت

به عنوان یک گروه بسیار متنوع، ترتیبات پیچیده سیستم‌های جنسی و سیستم‌های جفت‌گیری در میان دوشیزه‌ماهیان یافت می‌شود. سیستم‌های جنسی به الگویی اشاره دارد که از طریق آن جنسیت در موجودات زنده تعیین می‌شود (Leonard, 2018). Gonochorism نوعی سیستم جنسی

است که به حضور جنسیت‌های مجزا (نر یا ماده) در طول چرخه زندگی آنها اشاره دارد و به طور گسترده در ماهی شناخته شده است. اما دوشیزه‌ماهیان Gonochorism معمولاً دوشکلی جنسی را نشان نمی‌دهند (Fishelson, 1998) و تنها در مراحل نهایی بلوغ گنادهایی که می‌توان ماده‌ها را با شکم متورم‌تر و پر از تخم از نرها تشخیص داد. در این خانواده، Gonochorism به طور معمول در جنس‌های *Chromis*, *Parma*, *Pomacentrus*, *Abudefduf*, *Teixeirichthys* و *Plectoglyphidodon* مشاهده می‌شود (Cañedo-Orihuela et al., 2023). سیستم جنسی دیگر هرمافرودیتیسیم است که در آن غدد جنسی مردانه و زنانه در یک فرد وجود دارد. هرمافرودیتیسیم تنها در ۲ درصد از ماهی‌های استخوانی رخ می‌دهد (De Mitcheson and Liu, 2008)، اما در خانواده دوشیزه‌ماهیان گسترده است و غالباً هرمافرودیتیسیم متوالی وجود دارد (Kuwamura et al., 2020) و می‌تواند به دو دسته پروتاندروس و پروتوزینوس طبقه‌بندی شود. در هرمافرودیتیسیم پروتاندری، ماهی‌ها در مرحله اولیه زندگی خود به عنوان نر بالغ می‌شوند و با افزایش سن یا در غیاب ماده، به ماده تبدیل می‌شوند. بنابراین، می‌توان به راحتی ماده یک جفت مولد را با اندازه بزرگتر آن تشخیص داد (Gopakumar et al., 2011). تغییر جنسیت در این ماهی‌ها تحت کنترل هورمونی است. در مقایسه با ماده‌ها، نرها دارای غلظت بالاتری از آندروژن ۱۱-کتوتستوسترون<sup>۸</sup> در خون هستند. ماده‌ها به نوبه خود، دارای غلظت بالاتری از ۱۷-بتا-استرادیول (E2)<sup>۹</sup>، آندروستندیون<sup>۱۰</sup> و تستوسترون نسبت به نرها هستند (Godwin and Thomas, 1993). در هر صورت هرمافرودیتیسیم ممکن است یک نقص برای تولیدمثل محسوب شود، زیرا ثابت شده است که ایجاد تغییر جنسیت در یک محیط کنترل شده یا اسارت، طی یک فرآیند پیچیده رخ می‌دهد. در بسیاری از موارد، این فرآیند به طور خودبه‌خود در اسارت انجام می‌شود و تحت تأثیر نسبت جنسیتی و فشار اجتماعی در جمعیت موجود در گله قرار دارد. شواهدی مبنی بر اثربخشی کورتیزول به عنوان حلقه واسط هرمافرودیتیسیم وجود دارد (Iwata et al., 2019; Navarro-Flores et al., 2019).

8- 11-ketotestosterone

9- 17 $\beta$ -estradiol (E2)

10- Androstenedione

5- Cytochrome c-oxidase

6- Broadcast spawners

7- Benthic spawners

پروتاندیری در دلقک‌ماهیان جنس *Amphiprion* گزارش شده است که در آن ماهی ماده بزرگ‌ترین و غالب‌ترین عضو این جفت است (Iwata et al., 2019). برعکس، در هرمافرودیتیسیم پروتوژینوس، ماهی‌ها ابتدا به صورت ماده رشد می‌کنند و سپس در زندگی ممکن است تغییر جنسیت داده و نر شوند که می‌توان با اندازه بزرگ‌تر آنها شناسایی کرد (Colley et al., 2016). هرمافرودیتیسیم پروتوژینی در برخی از دوشیزه‌ماهیان به‌ویژه در جنس *Dascyllus* به عنوان یکی از ماهیان زینتی تجاری مطرح رخ می‌دهد (McCafferty et al., 2002). هرمافرودیت‌های دو طرفه<sup>۱۱</sup> در شرایط کمیاب بودن جفت یا مرگ جفت سابق، در برخی ماهی‌ها ممکن است رخ دهد و عامل تغییر جنسیت در هر جهت، به منظور حفظ شریک برای جفت‌گیری و بقاء نسل باشد. این مطلب در مورد گونه *D. aruanus* رخ می‌دهد (Kuwamura et al., 2020).

### تخم‌گذاری و چرخه زندگی

شقایق‌ماهیان تخم‌های بیضوی و چسبنده را روی سطوح سنگ‌های سخت یا در مجاورت شقایق‌های دریایی<sup>۱۲</sup> قرار می‌دهند و در نزدیکی آنها تخم‌گذاری می‌کنند. والدین تا زمان تخم‌گشایی از تخم‌ها مراقبت می‌کنند. با توجه به تراکم آبزیان در زیست‌بوم‌های مرجانی، دفاع از لانه یا سنگ‌تخم<sup>۱۳</sup> و نگهداری تخم‌ها، موفقیت فرزندان را برای بقاء افزایش می‌دهد که این مراقبت شامل مراقبت در برابر شکارچیان، بادکش کردن سنگ‌تخم برای اطمینان از تامین آب تازه، جلوگیری از نشست غبار رو تخم‌ها و جدا کردن تخم‌های مرده به‌وسیله دهان است (Green and McCormick, 2005). پس از غروب آفتاب در روز تخم‌گشایی، والدین هدایت جریان آب به سمت تخم‌ها را تشدید می‌کنند و تسریع در تخم‌گشایی جنین را تحریک می‌کنند. جنین‌ها معمولاً در عرض چند ساعت پس از غروب خورشید یا خاموش شدن چراغ‌ها در آکواریوم، از پوشش کوریون تخم بیرون می‌آیند (Barbasch et al., 2022). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که تخم‌گشایی شقایق‌ماهی‌ها به تاریکی کامل و تلاطم مکانیکی آب نیاز دارد (Fobert et al., 2019; Fobert et al., 2021; )

11- Bi-directional hermaphrodites

12- Sea anemone

13- Clutch

(Yamanaka et al., 2021). بررسی‌ها نشان داد افزایش دمای آب، تعداد دفعات مراقبت از لانه یا سنگ‌تخم را در طول روز کاهش داد اما بر هیچ جنبه دیگری از رفتار مراقبتی مولدین تأثیری نداشت. این نتایج نشان می‌دهد که ماهی‌ها رفتار مراقبتی را همزمان با تغییر شرایط در لانه، به صورت روزانه و در طول رشد جنین‌ها تنظیم می‌کنند (Green and McCormick, 2005). این موضوع بر سطوح اکسیژن محلول در آب که در زیستگاه‌های صخره‌های مرجانی به دلیل فرآیندهای زیستی (تنفس و فتوسنتز جلبک‌ها و مرجان‌ها) و فرآیندهای غیر زیستی (جریان‌های آبی، جزر و مد و گردش آب در مقیاس کوچک) به طور مداوم در نوسان است، حائز اهمیت خواهد بود، زیرا در این زیستگاه‌های پیچیده فرآیند اکسیژن‌رسانی به تخم‌های روی بستر ممکن است، به‌واسطه گردش ضعیف آب ایجاد اختلال کند. پس رفتار مراقبتی مولدین که همراه با حرکت دادن باله‌ای سینه‌ای است، چاره‌ساز خواهد بود (Kraines et al., 1996). از آنجایی‌که اکسیژن‌رسانی به تخم‌ها می‌تواند یک عامل تعیین‌کننده حیاتی برای موفقیت تولیدمثل و رشد لاروها باشد، برخی از گونه‌های ماهی، مکان لانه را با توجه به ظرفیت اکسیژنی موجود انتخاب می‌کنند (Takegaki, 2001; Fernández et al., 2003). مراقبت دوره رشد جنینی دلقک‌ماهی دارجینی (*A. melanopus*) نشان داد، زمان صرف شده برای نگهداری از لانه در مراحل اولیه جنینی کم بود و سپس با پیشرفت جنین‌زایی و افزایش نیاز اکسیژنی جنینی، افزایش یافت. این موضوع با افزایش ظهور هموگلوبین در گردش خون همراه بود (Green, 2004). دوره جنینی در این ماهیان در واقع یک دوره ۸-۶ روزه است و تا ۵۰ روز پس از هج (۷ هفته) دوره‌های لاروی ادامه دارد. چرخه زندگی شقایق‌ماهیان شامل یک فاز لاروی پلانکتونیک نسبتاً کوتاه با قابلیت پراکندگی در آبهای گرم اقیانوسی است، به دنبال آن استقرار بچه‌ماهی‌ها در مجاورت شقایق‌های دریایی که در یک گله اجتماعی متشکل از یک جفت مولد غالب و تعداد متفاوتی از اعضای نابالغ جنسی هستند، رخ می‌دهد (Berumen et al., 2010). زمان لازم برای تخم‌گشایی به دما (درجه حرارت-روز) بستگی دارد. برای مثال، در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، دقیقاً ۸ روز طول می‌کشد تا تخم‌گشایی انجام شود (Yamanaka et al., 2021).

## همزیستی با شقایق‌های دریایی

تمام ۳۰ گونه از جنس *Amphiprion* می‌توانند در ارتباط نزدیک با ۳ خانواده غیر مرتبط از شقایق‌های دریایی شامل *Actinidae*، *Thalassianthidae* و *Stichodactilidae* همزیستی داشته باشند (Roux et al., 2019). روابط متقابل بین این جانوران از اواخر قرن نوزدهم مورد مطالعه قرار گرفته است و به عنوان یک رابطه همزیستی در نظر گرفته می‌شود، زیرا شقایق‌های دریایی علاوه بر محافظت، مواد مغذی را برای دلقک‌ماهی‌ها فراهم کرده و دلقک‌ماهی‌ها نیز علاوه بر تهویه هوای پیرامون، نیتروژن و کربن را برای میزبان و *Zooxanthellae* درون همزیست شقایق‌های دریایی فراهم می‌کنند (Holbrook and Schmitt, 2005). گرچه بسیاری از محققان تلاش کرده‌اند تا مقاومت شقایق‌ماهی‌ها در برابر نیش شقایق‌های دریایی را بهتر درک کنند، اما این سوال حل نشده باقی‌مانده است. یکی از دلایل احتمالاً این است که ۳۰ گونه شقایق‌ماهی لزوماً از مکانیسم‌های مشابهی برای محافظت از خود در برابر گونه‌های مختلف شقایق‌دریایی پیروی نمی‌کنند (Roux et al., 2019). در بیشتر مطالعات تکثیر و پرورش تجاری، دلقک‌ماهی‌ها به عنوان گونه مدل آزمایشگاهی استفاده از شقایق‌های دریایی مرسوم بوده است.

## پرورش در مقیاس آزمایشگاهی

Lee Chin Eng (۱۹۷۰) به عنوان نخستین فردی است که موفق به تکثیر دلقک‌ماهی در آکواریوم شد. به دلیل عدم شناخت از احتیاجات غذایی لاروها، پس از مدت زمان کوتاه (تا ابعاد ۱۲ میلی‌متر)، تلفات لاروها را شاهد بود و وی آخرین فردی هم نبود که این چالش رو تجربه می‌کرد (Khiabani and Esmaeili Ferydoni, 2017). در واقع، اندازه کوچک تخم‌ها و وضعیت توسعه نیافته لاروهای دوشیزه‌ماهیان به سبب دوره‌های طولانی لاروی (تا ۵۰ روز پس از هچ) و نرخ پایین بقا (معمولاً کمتر از ۱۰ درصد)، موانعی را برای موفقیت در تولید تجاری دوشیزه‌ماهیان ایجاد می‌کند. از سوی دیگر، عدم تکامل معده و عدم ترشح آنزیم‌های معدوی در این ابتدای این دوره، امکان استفاده از غذای کنسانتره را ممکن نمی‌سازد. با توجه به سرعت رشد مطالعات علمی به‌ویژه مسائل تغذیه‌ای، بهبود نرخ بقا لارو این ماهیان را در آینده می‌توان انتظار داشت، زیرا جنبه‌های بیوتکنیک پرورش لاروها

بیشتر جانداران، چرخه‌های ثابتی از دوره‌های تاریکی و روشنایی را به عنوان روند تکاملی تجربه کرده‌اند که به طور قابل پیش‌بینی با فازهای قمری و فصلی تغییر می‌کنند (Gaston and Bennie, 2014). این دوره‌های تاریکی و روشنایی منجر به ایجاد ساعت‌های زیستی و ریتم‌های شبانه‌روزی شده است که رفتارها و فیزیولوژی را برای اکثر موجودات روی زمین هماهنگ و تنظیم می‌کند. تغییرات در مدت زمان روشنایی-تاریکی اغلب با زمان رویدادهای مهمی مانند جفت‌یابی، تولیدمثل، مهاجرت، تعامل گونه‌ها (شکار، رقابت) و استفاده از زیستگاه ارتباط نزدیکی دارد (Gaston et al., 2017). با این حال، اختراع و بکارگیری نورهای مصنوعی، محیط شب را در بخش قابل‌توجهی از سطح زمین تغییر داده که منجر به عدم تطابق بین سازگاری‌های تکاملی و شرایط محیطی کنونی شده است که بسیاری از حیوانات اکنون با آن روبرو هستند (Longcore and Rich, 2004). برای درک بیشتر اثرات نورهای مصنوعی و آلودگی نوری بر نرخ تولیدمثل ماهیان دریایی مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۹ بر ۱۰ جفت دلقک‌ماهی *A. ocellaris* صورت گرفت. آنها دریافتند که در معرض تماس قرار گرفتن این ماهی در برابر نور مصنوعی (۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی با استفاده از لامپ LED سفید ۵۰۰۰ درجه کلوین)، هیچ تاثیری بر دفعات تخم‌ریزی یا موفقیت لقاح ندارد، اما این موضوع اثرات چشمگیری بر تخم‌گذاری دارد. تخم‌های دلقک‌ماهی *A. ocellaris* که در حضور نور مصنوعی انکوبه شده بودند، به‌سادگی از تخم خارج نشدند و در نتیجه بقا فرزندان صفر شد (Fobert et al., 2019). مطالعه دیگری نشان داد که نوارهای نارنجی و سفید نمادین شقایق‌ماهیان بسیار منعکس‌کننده اشعه ماوراءبنفش هستند و دید رنگی آنها به‌خوبی برای درک کنتراست رنگی پوست تنظیم شده است که در نتیجه، با افزایش رتبه اجتماعی آنها در گله، میزان بازتاب نور فرابنفش (UV) کاهش می‌یابد. بازتاب نور فرابنفش یا کنتراست ناشی از آن در شقایق‌ماهی‌ها می‌تواند پرخاش‌گری را تعدیل کرده و نشانه‌های غالب و مطیع بودن را در میان آنها رمزگذاری کند. لذا، استفاده صحیح از نور مصنوعی می‌تواند حتی در روابط اعضای گله در شقایق‌ماهیان تعیین‌کننده باشد (Mitchell et al., 2023).

گرفته شده و پاسخگوی نیاز آن بوده‌اند (Ostrowski and Laidley, 2001).

### سیستم پرورش مولدین

اولین نکته برای محققان در طراحی سیستم‌های پرورش آزمایشگاهی ویژه شقایق‌ماهیان، دسترسی به آب با کیفیت دریاست. از آنجایی که اکثر امکانات تحقیقاتی و آزمایشگاهی در نزدیکی ساحل و با دسترسی به منابع با ثبات آب دریا که برای یک سیستم پرورشی باز مورد نیاز است، میسر نخواهند بود، اکثر سیستم‌های طراحی شده با استفاده از مدل سیستم‌های مدار بسته پرورش آبزیان توسعه یافته‌اند (جدول ۱).

ضرب‌آهنگ خوبی را نشان می‌دهد (Cañedo-Orihuela et al., 2023). به طور کلی، تکثیر ماهیان دریایی در محیط اسارت دو چالش مهم دارد. اولین چالش، رسیدن به بلوغ جنسی مولدین و دومین چالش، پرورش لاروست که به دلیل اندازه کوچک غذای زنده مورد نیاز برای تغذیه لاروهای ماهی، دوران زندگی لاروی را شکننده، حساس و پیچیده می‌نماید (Ostrowski and Laidley, 2001). چنین چالش‌هایی برای تکثیر و پرورش ماهیان زینتی دریایی نیز صادق است (Moorhead and Zeng, 2010). خوشبختانه، روش‌ها و فن‌آوری‌هایی که ابتدا در آبی‌پروری برای تولید غذای زنده در اسارت توسعه داده شده‌اند، برای ماهیان زینتی دریایی به‌کار

جدول ۱: مقایسه سیستم‌های پرورش دلقک‌ماهی‌ها در برخی از مطالعات آزمایشگاهی

| منبع                      | pH    | دوره نوری (L/D) | درجه حرارت (درجه سانتی‌گراد) | شوری (ppt) | میزان تعویض آب     | نوع آب دریا           | سیستم چرخش آب دریا | حجم مخزن مولدین | استفاده از شقایق دریایی | گونه           |
|---------------------------|-------|-----------------|------------------------------|------------|--------------------|-----------------------|--------------------|-----------------|-------------------------|----------------|
| Dhaneesh et al., 2012a    | ۸     | ۱۲/۱۲           | ۲۷                           | ۲۵         | در هفته ۵۰٪        | آب فیلتر شده مصب دریا | بسته               | L۴۰۰            | بله                     | A. akallopisos |
| Ghosh et al., 2011        | -     | -               | -                            | ۲۶         | -                  | آب لب شور             | بسته               | L۷۵۰            | بله                     | A. clarkii     |
| Ghosh et al., 2012        | -     | -               | -                            | ۲۶         | -                  | آب لب شور             | بسته               | L۷۵۰            | بله                     | A. clarkii     |
| Olivotto et al., 2008     | ۸-۲/۸ | ۱۰/۱۴           | ۲۸                           | ۳۰         | -                  | -                     | بسته               | L۲۰۰            | خیر                     | A. clarkii     |
| Olivotto et al., 2008     | -     | -               | ۲۸                           | -          | -                  | -                     | -                  | -               | خیر                     | A. melanopus   |
| Green and McCormick, 2001 | ۸-۲/۸ | -               | ۲۷                           | ۳۰-۳۲      | ۱۰٪ هر روز یک بار  | آب فیلتر شده دریا     | بسته               | L۵۰۰            | خیر                     | A. nigripes    |
| Anil et al., 2012         | ۸-۳/۸ | ۱۱/۱۳           | ۲۶                           | ۳۴-۳۵      | در هفته ۵۰٪ یک بار | آب فیلتر شده دریا     | بسته               | ۱۰۰۰ L          | بله                     | A. nigripes    |
| Kumar et al., 2012        | ۸-۹/۸ | -               | ۲۹-۲۶                        | ۳۲ تا ۳۶   | در هفته ۲۵٪        | آب فیلتر شده دریا     | بسته               | L۵۰۰            | بله                     | A. ocellaris   |
| Madhu et al., 2006b       | -     | ۱۲/۱۲           | ۳۲-۲۵                        | -          | ۱۰ تا ۲۰           | آب فیلتر شده          | بسته               | L۷۵۰            | بله                     | A. ocellaris   |

| منبع                            | pH    | دوره نوری (L/D) | درجه حرارت (درجه سانتی‌گراد) | شوری (ppt) | میزان تعویض آب            | نوع آب دریا            | سیستم چرخش آب دریا | حجم مخزن مولدین | استفاده از شقایق دریایی | گونه                  |
|---------------------------------|-------|-----------------|------------------------------|------------|---------------------------|------------------------|--------------------|-----------------|-------------------------|-----------------------|
|                                 |       |                 |                              |            | درصد آب هر ۲ روز تجدید شد | مصوب دریا              |                    |                 |                         |                       |
| Kumar and Balasubramanian, 2009 | ۸-۵/۸ | ۱۰/۱۴           | ۲۶                           | ۳۴         | یک بار در ماه             | دریا (نمک مصنوعی)      | بسته               | L۶۰             | خیر                     | <i>A. ocellaris</i>   |
| Roux et al., 2021               | ۸-۵/۸ | ۱۱/۱۳           | ۲۸                           | ۳۰         | -                         | -                      | -                  | L۲۰۰            | خیر                     | <i>A. ocellaris</i>   |
| Dhaneesh et al., 2012b          | -     | ۱۲/۱۲           | ۲۴ تا ۲۸                     | ۲۴         | در هفته ۲۰٪               | آب فیلتر شده مصوب دریا | بسته               | ۱۰۰۰ L          | بله                     | <i>A. percula</i>     |
| Kumar and Balasubramanian, 2009 | ۷-۲/۸ | ۱۲/۱۲           | ۲۸                           | ۲۲-۲۴      | ۲۰ تا ۴۰٪ هر روز          | آب فیلتر شده مصوب دریا | بسته               | ۱۰۰۰ L          | بله                     | <i>A. sebae</i>       |
| Ignatius et al., 2001           | -     | -               | ۳۲-۲۸                        | ۳۳-۳۵      | -                         | -                      | -                  | L               | بله                     | <i>A. sebae</i>       |
| Madhu et al., 2006a             | -     | -               | ۲۹-۲۷                        | -          | -                         | -                      | بسته               | L۵۰۰            | بله                     | <i>P. biaculeatus</i> |

مزارع آزمایشگاهی که در نزدیکی دریا قرار دارند، می‌توانند این فرصت را داشته باشند که از آب طبیعی مناسب، اما تحت پوشش یک سیستم مدار بسته و کاملاً کنترل شده، استفاده کنند. با افزایش فاصله سایت آزمایشگاهی تا منبع آب دریا، محققان معمولاً کار با آب مصنوعی را در یک سیستم چرخشی بسته، دنبال می‌کنند (Roux et al., 2020). گونه‌های مختلف شقایق ماهیان در صورت حفظ کیفیت آب، نسبت به نوع آب دریا (طبیعی یا مصنوعی) سازگار هستند. تمامی سیستم‌های پرورشی طراحی شده، ذاتاً دارای مزایا و معایب مختص به خود از نظر هزینه‌ها، تأمین منابع آب پایدار و سایر نگرانی‌هایی بوده که وابسته به موقعیت هستند. در

صورت استفاده از آب طبیعی دریا، مهم‌ترین پارامترهایی که باید در نظر گرفته شود، موقعیت قرارگیری سیستم پمپاژ در دریا، کیفیت سیستم فیلتراسیون و دمای آب محیط (متناسب با برنامه تحقیق) است. در واقع، از آنجایی که این آب برای نگهداری مولدین و پرورش لارو استفاده می‌شود، بهتر است از هر گونه اختلال در کیفیت آب به دلیل تأثیر مکانیکی یا محیطی مانند خرابی در سیستم پمپاژ، تراوش روغن موتور، وجود انگل‌ها، کدورت، رویدادهای جوی و ... پرهیز کرد. مزیت اصلی کار با سیستم باز این است که نیازی به تعویض دستی آب ندارد درحالی که در مورد سیستم‌های بسته، پارامترهای کیفیت آب باید به طور منظم پایش شوند تا فرکانس تغییرات

آب تعیین شود. این فرکانس تبادل به شدت به حجم کل سیستم، در مقایسه با تعداد ماهیان نگهداری شده (زیست توده)، نرخ تغذیه و در نتیجه میزان دفع و قدرت فیلتراسیون سیستم (فیلتراسیون مکانیکی و زیستی) بستگی دارد. هدف این تغییرات آب جلوگیری از تجمع نیترات‌ها یا فسفات‌ها در سیستم نگهداری مولدین است. ملاحظات اصلی بعدی هنگام طراحی یک سیستم پرورشی، حفظ دمای آب دریاست، زیرا فعالیت تولیدمثلی را محدود می‌کند. به طور کلی، شقایق‌ماهیان در طبیعت در طول بهار تا تابستان در یک چرخه قمری<sup>۱</sup> تخم‌ریزی می‌کنند (Madhu and Madhu, 2007; Dhaneesh et al., 2012b)، اما در مکان‌های کنترل شده، تولیدمثل می‌تواند در تمام طول سال اتفاق بیفتد (Thresher, 1984). در برخی شرایط، آزمایشگاه‌ها ممکن است به دلایلی تصمیم بگیرند که مستقیماً به دمای طبیعی آب دریا به صورت فصلی وابسته باشند. بدین ترتیب، نوساناتی در نرخ تخم‌ریزی و مشکلاتی در سرعت رشد جنین‌ها ایجاد خواهد کرد (Dhaneesh et al., 2012a).

#### مولدسازی و نگهداشت مولدین

جفت‌های مولد را می‌توان از فروشگاه‌های ماهیان زینتی، مزارع تکثیر (با انتخاب یک بچه‌ماهی نابالغ بزرگ‌تر و کوچک‌تر) یا با مجوز قانونی، مستقیماً از طبیعت تهیه کرد. اولین نکته‌ای که باید هنگام وارد کردن ماهی جدید به محیط پرورشی مورد توجه قرار گیرد، طی حداقل دوره قرنطینه ۳۰-۱۵ روزه (یا بیشتر با توجه به وضعیت سلامت ماهی) در مخازن قرنطینه است که می‌بایست برای جلوگیری از انتشار هر گونه خطر آلودگی، در یک سیستم بسته جداگانه (یک مخزن مستقل نگهداری) یا جدا از مدار اصلی چرخش آب قرار داد. بسیاری از کارشناسان مراکز تحقیقاتی، درمان ماهی (حمام آب شیرین یا فرمالین) را قبل از ورود به مخازن قرنطینه برای حذف هر گونه پاتوژن بالقوه پیشنهاد می‌کنند. در طول دوره قرنطینه، ماهی‌ها باید برای بروز علائم بیماری تحت نظر باشند تا دوره درمان سپری شده یا تمدید شود. هنگامی که ماهی از طبیعت جمع‌آوری می‌شود، اولین تخم‌ریزی معمولاً ۳-۶ ماه پس از جفت‌گیری اتفاق می‌افتد. اولین تخم‌ریزی در شقایق‌ماهی دلفک یا دلفک‌ماهی A.

1- Lunar cycle

*ocellaris* می‌تواند تا ۲۴ ماه (Roux et al., 2021) و برای شقایق‌ماهی مالدیو (*A. nigripes*) در ماه دوم رخ دهد (Anil et al., 2012). این بازه زمانی احتمالاً با سن، اندازه، سن بلوغ، زمان لازم برای سازگاری با محیط جدید و سازگاری مولدین با یکدیگر مرتبط است. در واقع، اگر بعد از ۲ سال تخم‌ریزی اتفاق نیفتاد، توصیه می‌شود که مولد نر را تغییر داد و بچه‌های کوچک‌تر که از نظر جنسی نابالغ هستند، به مخزن مولد ماده اضافه کرد تا جفت‌های جدید تشکیل دهند. علاوه بر این شرایط، برای اطمینان از تخم‌ریزی بهینه از نظر فراوانی و کیفیت، باید شرایط متعددی رعایت شود. اولاً، سیستم پرورش در حالت ایده‌آل باید در فضایی آرام باشد که در مقاله Roux و همکاران (۲۰۲۱) توصیف شده است. دوم، جدا کردن جفت‌های مولد از یکدیگر با قرار دادن آنها در مخازن جداگانه یا استفاده از توری برای جلوگیری از تماس و تهاجم بین آنها مهم است. اگر مخزن پرورش از مخازن شیشه‌ای تشکیل شده است، توصیه می‌شود امکان رویت سایر ماهی‌ها و حتی انعکاس تصویر آنها، با صفحات سفید مات یا رنگ روشن بین هر مخزن جلوگیری شود. هنگامی که ماهی‌ها از طبیعت صید می‌شوند و در حداکثر اندازه خود بسر می‌برند، بهتر است حجم بزرگ‌تر از ۶۰ لیتر برای بزرگ‌ترین گونه در نظر گرفته شود، اما اگر اندازه آنها کمتر از ۱۰ سانتی‌متر باشد، استفاده از مخازن با حجم کمتر توصیه می‌شود (Roux et al., 2021). با توجه به این‌که مولدین نسبتاً قوی هستند، می‌توانند تحت طیف وسیعی از شرایط محیطی تکثیر شوند، اما باید توجه داشت ایده‌آل‌ترین شرایط محیطی برای تکثیر، شرایطی است که منطبق بر فصل تولیدمثل طبیعی و نیز شرایط محیطی آن گونه در طبیعت باشد. دمای مناسب، pH و سایر شرایط تکثیر منتشره در مقالات علمی به طور خلاصه در جدول ۱ ارائه شده است. طبق گزارش Roux و همکاران (۲۰۲۱) در سیستم‌هایی که دما برای تخم‌ریزی در تمام طول سال حفظ می‌شود، جفت‌های مولد می‌توانند خسته شوند که منجر به کاهش نرخ موفقیت تولیدمثل می‌شود. برای پیشگیری از این اتفاق توصیه می‌شود دمای مخزن، یک یا دو درجه به مدت چند هفته کاهش یابد تا قبل از بازگشت به دمای پرورش، مولدین امکان بازیابی خود را داشته باشند. مرور مقالات علمی نشان می‌دهد که شوری آب ۳۶-۲۴ قسمت در هزار را می‌توان برای تولید شقایق‌ماهیان استفاده کرد، با این حال، هنگام استفاده از شوری کمتر باید احتیاط کرد، زیرا می‌تواند بر بقاء

### بستر تخم گذاری

اگرچه وجود شقایق دریایی برای تکثیر شقایق ماهیان الزامی نیست، اما آنها تقریباً در تمامی روش های منتشره گنجانده شده اند. فقدان شقایق های دریایی می تواند طراحی و نگهداری سیستم پرورش را تسهیل کند و هزینه ها را کاهش دهد به ویژه در سیستم های مدار بسته (Roux et al., 2021) یا زمانی که دسترسی به نور طبیعی یا مصنوعی مکفی، امکان پذیر نباشد. زیرا شقایق ها بی مهرگان بسیار ظریفی هستند که به مختصات نوری ویژه و گردش آب قوی نیاز دارند. یکی دیگر از عناصر حیاتی که در پرورش شقایق ماهیان باید در نظر گرفته شود، تهیه بستر مناسب برای تخم گذاری است. انواع مختلفی از مواد را می توان به عنوان محل لانه از جمله کاشی های سرامیکی یا سفالی، سنگ های زنده، گلدان های سفالی یا قطعات مرجانی مرده، استفاده کرد. در صورت فقدان محل مناسب برای تخم گذاری، مولدین تخم ها را روی دیواره مخزن می گذارند که این امر کارکنان فنی را مجبور می کند که برای گرفتن لاروها و انتقال آنها به مخزن پرورش، متحمل زحمت مضاعفی در شب شوند (تخم گشایی این ماهیان همیشه در شب اتفاق می افتد). در هر صورت این فرآیند ایده آل نیست، زیرا می تواند به لاروها استرس وارد کند و منجر به کاهش نرخ بقاء شود. همچنین احتمال به دام افتادن لاروهای جمع آوری نشده، در سیستم فیلتراسیون نیز دور از ذهن نیست.

### سیستم های معمول پرورش لارو

پرورش لارو شقایق ماهیان همیشه در مخزن متفاوتی نسبت به والدین انجام می شود، اما پارامترهای آب دریا باید یکسان باشد. پر کردن آب مخزن پرورش لارو به طور مستقیم از طریق استفاده از آب مخزن والدین صورت می گیرد، زیرا تغییر کیفیت آب در مرحله حساس لاروی می تواند سبب مرگومیر ناشی از استرس تغییرات شیمیایی آب شود. حجم مخازن پرورش به فضای موجود برای سیستم پرورش بستگی دارد و می تواند در دامنه ۱۰۰-۳۰ لیتر متغیر باشد. شکل مخزن نیز می تواند گرد، گرد با پایه مخروطی، مربع یا مستطیل باشد.

لاروها تأثیر منفی بگذارد. ترکیبات نیتروژنه برای حفظ سلامت مولدین و کیفیت لاروها باید در سطوح پایین باقی بمانند. برای این منظور حداکثر سطوح مجاز آمونیوم ( $\text{NH}_4^+$ ) ۵/۵، نیتريت ( $\text{NO}_2$ ) ۰/۲ و نترات ( $\text{NO}_3$ ) ۵ میلی گرم در لیتر اعلام شده است (Callan, 2007).

### رژیم غذایی

برای اطمینان از کارایی تولیدمثل، در نظر گرفتن کیفیت و کمیت غذای مصرفی از اهمیت به سزایی برخوردار است، زیرا مشخص است که ترکیبات غذای غنی از اسیدهای چرب ضروری، اسیدهای آمینه و ویتامین ها باعث افزایش باروری مولدین و زنده ماندن جنین و رشد لاروها می شود (Callan, 2007; Khiabani et al., 2019). مقالات متعددی پیشنهاد می کنند که نه تنها از غذاهای تجاری آماده استفاده نشود بلکه ترکیب متنوعی از انواع غذاهای کامل از جمله انواع صدف، اوپرستر، ماهی مرکب و اختاپوس، کریل، میگوهای *Acetes* و آرتمیا زنده استفاده شود (Wittenrich, 2007). غذادهی معمولاً ۲-۳ بار در روز در حد سیری انجام می شود. Dhaneesh و همکاران (۲۰۱۲a) توانست موفقیت باروری و تعداد تخم های تولیدی دلقک ماهی نارنجی (*A. percula*) را با استفاده از مواد مغذی تری مانند میگوهای زنده *Acetes* (۲۷۶±۲۲/۳ تخم) و گوشت صدف (۲۰۴±۱۶/۴ تخم) تا دو برابر به نسبت غذای خشک (۱۱۰±۱۰ تخم) افزایش دهد. علاوه بر این، کیفیت غذا ممکن است مستقیماً بر بقاء لارو تأثیر بگذارد همان طوری که در دلقک ماهی *A. sebae* و بسیاری از ماهیان مدل، منجمله ماهی دانیوی گورخری مشاهده شده است (Varghese et al., 2009; Khiabani, 2019; Khiabani et al., 2020b). در واقع، جفت های مولد تغذیه شده با میگوهای اعماق دریا<sup>۲</sup> (۶۲٪/۷±۶/۷)، گوشت اسکوئید<sup>۴</sup> (۵۹٪/۱۰±۵/۳)، گوشت ماهی مرکب<sup>۵</sup> (۵۴٪/۷±۱۱/۲) و گوشت صدف نابالغ<sup>۶</sup> (۴۴٪/۳±۵/۷) به نرخ بقاء بالاتری منجر شد (Varghese et al., 2009) (جدول ۲).

- 2- Deep-sea prawns
- 3- Mature mussel meat
- 4- Squid meat
- 5- Sepiidae (cuttlefish)
- 6- Immature mussel meat

جدول ۲: مقایسه رژیم غذایی و نرخ تخم‌گذاری دلقک‌ماهی‌ها در برخی از مطالعات آزمایشگاهی

| منبع                            | نرخ تخم‌گذاری | بستر تخم‌ریزی                                    | تعداد تخم | فرکانس تخم‌ریزی | اولین تخم‌ریزی پس از تشکیل جفت | دفعات تغذیه (در روز) | جیره غذایی                                        | گونه                   |
|---------------------------------|---------------|--------------------------------------------------|-----------|-----------------|--------------------------------|----------------------|---------------------------------------------------|------------------------|
| Dhaneesh <i>et al.</i> , 2012a  | -             | کاشی و سرامیک یا سنگ زنده                        | ۳۰۰-۴۰۰   | -               | ۳ ماه                          | ۳                    | میگو، صدف آب‌پز و گوشت صدف                        | <i>A. akallopis</i>    |
| Gopakumar <i>et al.</i> , 1999  | %۹۰           | گلدان سفالی یا سنگ گرانیات                       | ۳۰۰-۸۰۰   | ۱۰-۴۵ روز       | -                              | ۲                    | گوشت چرخ کرده گاو و صدف آب‌پز                     | <i>A. chrysogaster</i> |
| Ghosh <i>et al.</i> , 2011      | %۹۳           | کاشی و سرامیک                                    | ۵۱۳       | دو بار در ماه   | -                              | ۳                    | گوشت صدف و میگو پخته شده                          | <i>A. clarkii</i>      |
| Ghosh <i>et al.</i> , 2012      | %۹۳           | -                                                | ۵۱۳       | دو بار در ماه   | ۳ ماه                          | ۳                    | گوشت صدف و میگو پخته شده                          | <i>A. clarkii</i>      |
| Olivotto <i>et al.</i> , 2008   | %۹۶           | گلدان سفالی                                      | ۳۵۰-۴۰۰   | هر ۱۲ روز       | ۱۲ ماه                         | ۲                    | آرتمیا منجمد، پلانکتون منجمد، ماهی خرد شده و میگو | <i>A. clarkii</i>      |
| Anil <i>et al.</i> , 2012       | %۹۴           | گلدان سفالی                                      | ۳۵۰-۴۵۰   | هر ۱۲-۱۶ روز    | ۷۴ روز                         | ۳                    | پلت، صدف آب‌پز، ناپلی آرتمیا، کوپه‌پود            | <i>A. nigripes</i>     |
| Kumar and Balasubramanian, 2009 | %۹۵-۹۰        | قطعات شکسته مرجان، پوسته های مرده و سنگ های زنده | ۴۰۰-۸۰۰   | دو بار در ماه   | ۴ ماه                          | ۳                    | میگو، صدف، ماهی مرکب                              | <i>A. ocellaris</i>    |
| Ignatius <i>et al.</i> , 2001   | %۷۰           | تکه ورق‌های آّبست                                | ۳۰۰-۶۰۰   | هر ۱۰ روز       | ۳ ماه                          | ۲                    | ماهی، صدف دوکفه‌ای و کرم‌های پرتار                | <i>A. sebae</i>        |

به کارایی تغذیه کمک می‌کند و استفاده از بستر سفید، نظارت بصری لاروها را آسان‌تر می‌کند (Wittenrich, 2007). یک درپوش سیاه نیمه مات یا پارچه سایه‌دار می‌تواند درون مخزن را تا پایان دگرذیسی به‌خوبی بپوشاند تا نور و انعکاس نور وارده از سطح مخزن را کاهش دهد. انعکاس نور می‌تواند لاروها را جذب کند و باعث بروز استرس، کاهش اکسیژن، کاهش تغذیه، افزایش گرسنگی و در نتیجه مرگ شود. این موضوع به‌ویژه در صورت عدم استفاده از آب سبز بیشتر نمایان می‌شود (Calado *et al.*, 2017). تخم‌گذاری شقایق‌ماهیان

مخازن مربع یا مستطیلی‌شکل نیاز به توجه ویژه‌ای دارد، زیرا گوشه‌ها ممکن است از اختلاط همگن آب جلوگیری کنند. این مسئله را می‌توان به‌راحتی با افزودن دو پخش‌کننده هوا در زوایای مخالف مخازن حل کرد (Wittenrich, 2007, Roux *et al.*, 2020). مخازن پرورش لارو در حالت ایده‌آل باید تیره‌رنگ و غیرشفاف باشند. برای این منظور توصیه می‌شود، جداره مخازن شیشه‌ای پرورش لارو با استفاده از پلاستیک سیاه پوشانده شود. رنگ تیره مخزن امکان ایجاد کنتراست در پس‌زمینه را در مواجهه با اقلام طعمه می‌دهد که

همیشه در شب و معمولاً کمی پس از غروب اتفاق می افتد. روش معمول برای پرورش لارو این ماهیان، انتقال آرام و با دقت سنگ بستر حاوی تخم (سنگ تخم) از مخزن مولدین به مخزن پرورش لاروست که می بایست به صورت کاملاً غرق در آب این جابه جایی صورت گیرد. از آنجایی که مولدین به همراه سنگ تخم، به مخزن پرورش لاروها منتقل نمی شوند، برای جایگزینی رفتار مراقبتی والدین (باد زدن و نظافت تخم ها) و اطمینان از درصد تخم گشایی مناسب، باید به اکسیژن رسانی لازم به تخم ها صورت گیرد. این کار به راحتی با استفاده از پخش کننده های هوا و در مجاورت تخم ها انجام می شود. استفاده از حباب های ظریف تر هوا ترجیح داده می شود و جریان هوا باید تا ۱۵ لیتر در ساعت تنظیم شود (Roux et al., 2021). سرعت جریان هوای بسیار کم یا زیاد و محبوس شدن حباب های هوا در اطراف سنگ، تخم می تواند فرآیند تخم گشایی شقایق ماهیان را به مخاطره اندازد. در اکثر روش های پرورش، هر مخزن لارو را به صورت مدار بسته و مستقل (بدون استفاده سیستم فیلتراسیون مرکزی-مشترب)، با هوادهی مستقیم و بدون استفاده از جریان آب مشترک سالن پرورش، تعریف می کنند. استفاده از این تنظیم سیستم بدین معناست که مخازن به تعویض دستی آب روزانه برای حذف لاروهای مرده، خوراک اضافی، مدفوع و ترکیبات زائد، نیاز دارند. مقدار تعویض دستی آب روزانه می تواند در هر سه روز به میزان ۲۵ درصد باشد، اما معمولاً شامل ۶۰-۱۰ درصد حجم کل مخزن در روز می شود (جدول ۲). با این حال، طراحی یک سیستم نیمه بسته نیز امکان پذیر است که در آن، ورودی مخازن در ساعات روشنایی روز مسدود می شوند و در صورت فراهم شدن آب سبز و غذا، به طور خودکار با آب تصفیه شده دریا در شب جایگزین می شود (Munday et al., 2010; Dixon et al., 2009). شبیه سازی تغییرات آب و هوایی و جایگزینی خودکار آب مخازن لاروی، در مدیریت تجربی مزارع شقایق ماهیان رایج است.

هنگام تکمیل ظرفیت آب مخازن لاروی توصیه می شود که آب جدید با جریان کاملاً ملایم (برای مثال، از طریق لوله های باریک ۴-۴۵ میلی متری) به مخزن وارد شود تا منجر به ایجاد چرخش و جابه جایی زیاد آب نشود، زیرا لاروها در این مرحله بسیار ظریف و آسیب پذیرند و وجود جریان آب سطح انرژی آنها را به شدت کاهش می دهد و می تواند موجبات مرگومیر آنها را فراهم کند. ورود جریان ملایم آب می تواند فرصت

تطبیق و سازگاری با شرایط فیزیکی و شیمیایی آب را بدهد (Roux et al., 2020). لاروها معمولاً تا ۳۰-۲۰ روز پس از تخم گشایی در مخزن پرورش لارو نگهداری می شوند، زیرا این مدت مصادف با پایان دگردیسی آنهاست. هنگامی که لاروها به این سن می رسند، بچه ماهی ها پس از یک دوره سازگاری حداقل ۲۰ دقیقه ای، به مخازن پرورش نوجوان<sup>۱</sup> منتقل می شوند تا به رشد خود ادامه دهند. در این مرحله پرورشی، شکل، رنگ و ابعاد مخزن نسبت به دوره لاروی انعطاف پذیرتر بوده و نیازمند مواردی است که برای مخازن مولدین بالغ توضیح داده شده است. همچنین مهم است که توجه داشته باشید که نوجوانان می توانند بسیار تهاجمی شوند و در صورت تداوم درگیری ممکن است سبب افزایش نرخ مرگومیر، حتی تا ۹۰ درصد جمعیت مخزن شود (Donelson, 2015). برای جلوگیری از این امر توصیه می شود بچه ماهی ها با تراکم ۴۰-۳۰ قطعه در ۱۰۰ لیتر آب پرورش داده شوند تا نرخ بقاء بیش از ۸۰ درصد داشته باشند (Chambel et al., 2015; Pietoyo et al., 2020). همچنین توصیه می شود که از قرار دادن اشیاء و اجسام در مخزن خودداری شود تا از استقرار ماهی های قدرتمندتر، ایجاد یک قلمرو متمایز و شیوع رفتار پرخاش گرایانه جلوگیری شود (Munday et al., 2009; Roux et al., 2021).

### غذای لارو

اگرچه پرورش ماهیان دریایی در سرتاسر جهان توسعه خوبی دارد و طیف متنوعی از گونه ها را دربرمی گیرد، بقاء کم لارو، همراه با کیفیت پایین لارو و ماهیان جوان، به عنوان یک مشکل اصلی برای تولیدکنندگان مطرح است (Bell et al., 2003). برای اطمینان از دستیابی به نرخ بقاء بالاتر لارو شقایق ماهیان، تغذیه با طعمه های زنده در طول مراحل رشد ضروری است (Calado et al., 2017). بنابراین، مدیریت صحیح استفاده از طعمه های زنده، یک پیش نیاز ضروری برای رشد لارو شقایق ماهیان است هرچند این موضوع، یکی از مراحل زمان گیر پرورش لارو قلمداد می شود. برای آماده سازی تغذیه لاروها، روتیفرها باید در مخازن حجیم زنده نگهداری و پرورش داده شوند و سطح تولید به صورت پایدار در طول مدت پرورش لارو ماهیان حفظ شود. از سوی دیگر، پرورش

1- Juvenile rearing tanks

روتیفر خود مستلزم تغذیه فراوان از ریز جلبک‌ها و تبادل منظم آب برای حفظ کیفیت آب است (Roux et al., 2021). آرتمیا در صورت نیاز راحت‌تر آماده می‌شود، زیرا کیست‌ها را می‌توان به مدت طولانی در یخچال یا فریزر نگهداری کرد و در عرض ۲۴ ساعت از تخم خارج کرد تا برای تغذیه آماده شود. با پرورش متراکم آرتمیا می‌توان آن را نگهداری کرد. با این حال، باید مراقب بود که مخازن روتیفر در نزدیکی آرتمیا قرار نگیرد، در غیر این صورت خطر آلوده شدن محیط پرورش روتیفر و آرتمیا وجود دارد. مهم است که اندازه طعمه مطابق با مرحله رشد لارو باشد (حدت بینایی، گنجایش دهان، توانایی شنا) و برای لاروها در مراحل مختلف رشد واجد جذابیت باشد که هر دو مختص گونه هستند. به طور کلی، پس از هچ شدن لاروها، تغذیه با روتیفرها (*Brachionus* sp.) آغاز می‌شود (روتیفرهای دارای ابعاد ۲۰۰-۵۰ میکرومتر) و به دنبال آن استفاده از ناپلی آرتمیا (*Artemia* sp.) با ابعاد تقریبی ۴۰۰ میکرومتر و در نهایت مقدار کمی غذای خشک پودری که اندازه مشابهی داشته باشد (۲۰۰-۴۰۰ میکرومتر). تغییر در اندازه غذا معمولاً برای چند روز تا یک هفته باید با هم همپوشانی همراه باشد و به لاروها زمان کافی برای تغییر غذا داده شود. در برخی موارد، زئوپلانکتون‌های وحشی را می‌توان با رعایت اصول ذی‌ربط جمع‌آوری و بین لاروها توزیع کرد (Dhaneesh et al., 2012a). روتیفرها و آرتمیا به طور طبیعی از نظر تعدادی از مواد مغذی مورد نیاز برای رشد و نمو طبیعی ماهیان دریایی به‌ویژه اسیدهای چرب ضروری، ضعیف هستند (Bell et al., 2003). لذا، از آنجایی که ارزش غذایی طعمه‌های زنده برای تضمین بقا و رشد لاروها حیاتی است، گاهی اوقات آنها با اسیدهای چرب چند غیراشباع یا بسیار غیراشباع (HUFA, PUFA) غنی‌سازی می‌کنند (Sargent et al., 1999; Khiabani et al., 2020a). این غنی‌سازی شامل آماده‌سازی روتیفرها و آرتمیا از قبل و خیساندن خوراک‌ها در محلول غنی‌سازی است که امکان جذب ارزش غذایی اضافی را فراهم می‌کند (Avela et al., 2007; Olivotto et al., 2008). Kumar (2012) نشان دادند که روتیفرهای تغذیه شده با ریز جلبک یا PUFA به طور قابل توجهی میزان بقا لارو *A. nigripes* را در مقایسه با روتیفرهای تغذیه نشده، افزایش می‌دهد (۵۵-۵۰ درصد در مقابل ۲۰ درصد نرخ بقا) (Kumar et al., 2012). در این راستا، از جلبک‌های کوچک (*Nanochloropsis* sp.)

*Chlorella* sp., *Isochrysis* sp.) که اغلب آب‌سبز نامیده می‌شود نیز در مخازن پرورش دوره اولیه رشد لاروی استفاده می‌شود تا ضمن کاهش نفوذ نور در مخزن (به دلیل حساسیت بالای نور در مراحل اولیه رشد لارو) با ارائه پس زمینه، امکان رویت طعمه را افزایش دهد (Naas et al., 1996). لاروهای شقایق‌ماهی حتی اگر ریز جلبک‌ها را مستقیماً مصرف نکنند، به افزایش نرخ بقا از طریق حفظ کیفیت غذایی روتیفرها، ناپلی آرتمیا و حفظ کیفیت آب کمک می‌کنند. ریز جلبک‌ها را می‌توان به صورت زنده کشت کرده یا در اقسام تجاری مختلف خریداری کرد. با این حال، باید به کیفیت ریز جلبک‌های خریداری شده توجه زیادی کرد، زیرا کیفیت محصول جلبکی می‌تواند با تغییرات دما در طول مدت حمل‌ونقل تغییر کند. سطح مناسبی از آب سبز باید در اختیار لاروها باشد، زیرا مصرف بیش از حد آنها می‌تواند کیفیت آب را کاهش دهد (سطح آمونیاک افزایش می‌یابد) به‌ویژه در مواردی که از جلبک‌های مرده یخ‌زده استفاده شود (Wittenrich, 2007). نکته مهمی که باید مورد توجه قرار گیرد، ارزش غذای مصرفی و تأثیر آن بر الگوی رنگدانه لارو هست. از آنجایی که رنگ دلک‌ماهی‌ها تأثیر زیادی بر ارزش تجاری آنها دارد، چگونگی توسعه رنگ‌های چشمگیر و نوارهای سفید خوش فرم مورد مطالعه قرار گرفته که عمدتاً بر زیستگاه و تغذیه آنها تمرکز شده است. در این بین مشخص گردید که غذای زنده، نقش مهمی در رنگ‌آمیزی و دگردیسی ماهی ایفاء می‌نماید (Vissio et al., 2021). بنابراین، بسیاری از محققین به بررسی نقش کاروتنوئیدها (به‌ویژه آستاگزانتین) در رنگ‌آمیزی شقایق‌ماهیان و تأثیر آن بر افزایش رنگدانه‌های بدن علاقه‌مند شده‌اند (Díaz-Jiménez et al., 2020). تحقیقات نشان داده است که هنگامی که گونه‌هایی از شقایق‌ماهی‌ها (*A. ocellaris*, *P. biaculeatus*, *A. frenatus* و *A. clarkii*) با جیره‌های غذایی حاوی آستاگزانتین یا آستاگزانتین استری شده تغذیه می‌شوند، مقدار کاروتنوئیدها در اپیدرم افزایش می‌یابد و بر این اساس رنگ پوست قرمزتر می‌شود. همچنین مشخص شده است که شقایق‌ماهی‌ها یک مسیر متابولیک کاهشی برای آستاگزانتین دارند (Yasir and Qin, 2010). پیش از این، فقط متابولیسم اکسیداتیو کاروتنوئیدها در ماهی‌ها شناخته شده بود، اما یک مسیر متابولیک تقلیل‌دهنده کاروتنوئیدها در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (Schiedt et al., 1985) و سالمون چام (Kitahara, 1983) گزارش شده بود.

همچنین مشخص شد، بین اسیدهای چرب به‌ویژه اسیدهای چرب غیراشباع بالا (HUFA) و الگوهای رنگی نامنظم نواری سفید سطح بدن شقایق‌ماهی‌ها، ارتباطی وجود دارد. شقایق‌ماهی‌ها دارای الگوهای رنگی پوستی<sup>۲</sup> متنوعی هستند و برخی از گونه‌ها الگوی رنگی چندشکلی<sup>۳</sup> زیادی را در سطح آن گونه نشان می‌دهند. برخی از این پلی‌مورفیسم‌ها یا الگوهای رنگی با عوامل ژنتیکی و برخی دیگر به‌وسیله عوامل محیطی تعیین می‌شوند (Klann et al., 2021b). درصد معینی از بچه شقایق‌ماهی‌ها در یک مخزن پرورش معمولی بدون الگوهای رنگی<sup>۴</sup> هستند. بنابراین، شرایط تغذیه‌ای و استرس لاروها و بچه ماهیان در طول ماه اول پس از تخم‌گذاری ممکن است تأثیر قابل‌توجهی بر تشکیل الگوهای رنگی داشته باشد. در مطالعاتی که در کفشک‌ماهی‌ها صورت گرفت، مشخص شد سطح اسیدهای چرب غیراشباع بالا جیره، نه تنها بر عامل رشد بلکه بر رنگدانه‌ها و دگردیسی لاروها نیز تأثیر می‌گذارد (Bell et al., 2003). اگرچه مطالعات اندکی رابطه بین الگوهای رنگی نواری سفید و رژیم غذایی را در شقایق‌ماهی‌ها بررسی کرده‌اند، اما Avella و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که روتیفر و آرتمیای غنی شده با اسیدهای چرب غیراشباع بالا در توسعه و مهار حذف الگوهای رنگی نواری سفید در لارو *A. ocellaris* موثر بودند. علاوه‌براین، Chambel و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که درصد پیدایش لاروهای *A. percula* فاقد الگوهای رنگی، با افزایش تراکم لاروها افزایش می‌یابد اما تحت تأثیر محتوای پروتئین جیره قرار ندارند. لذا، اکنون مطالعات بیشتری برای درک این‌که چگونه اسیدهای چرب غیراشباع بالا ممکن است با مسیر سیگنال‌دهی دخیل در تشکیل الگوهای رنگی نواری سفید در شقایق‌ماهیان ارتباط برقرار کند، مورد نیاز است (Avella et al., 2007).

## روش‌های اختصاصی برای اهداف آزمایشی

### پرورش در حجم کم

یکی از علایق اصلی محققان در کار با ارگانیس‌های مدل در حوزه‌های تحقیقاتی خاص (سم‌شناسی و زیست‌شناسی

تکوینی)، امکان قرار دادن لارو در معرض ترکیبات مختلف مانند آفت‌کش‌ها، میکروپلاستیک‌ها، مختل‌کننده‌های غدد درون ریز و سایر درمان‌های دارویی برای ارزیابی اثرات سمی آنها یا کمک به دستیابی به بینش لازم در مورد نقش ژن‌ها یا مسیرهای خاص فیزیولوژیک (اثرات هورمون‌های تیروئیدی بر تشکیل الگوهای رنگی نواری سفید)، در شقایق‌ماهیان است (Salis et al., 2021). یکی از محدودیت‌های اصلی چنین آزمایش‌هایی این است که آنها در بیشتر موارد به ترکیبات شیمیایی گران‌قیمتی نیاز دارند که اغلب می‌بایست مستقیماً تزریق شوند. با این‌حال، با توجه به اندازه کوچک لارو شقایق‌ماهیان، تزریق یک گزینه مناسب نیست و تیمارهای شیمیایی با روش غوطه‌وری در مخازن کلاسیک پرورش لارو نیز نمی‌تواند در نظر گرفته شوند. به این دلایل، Roux و همکاران (۲۰۲۱) یک روش پرورش در کم حجم را با استفاده از بشرهای شیشه‌ای شفاف با حجم کمتر از یک لیتر را برای تجویز دارو یا ماده شیمیایی مورد نظر پیشنهاد دادند. این روش شامل استفاده از همان اصول حاکم بر یک سیستم پرورش کلاسیک است (مدیریت دما، دوره نوری، سیستم نوری و شوری)، اما اندازه مخزن و تعداد لاروها در هر مخزن کاهش می‌یابد. به طور خاص، بیش از ۱۰ لارو در بشر شیشه‌ای (۵۰۰ میلی‌لیتر یا ۸۰۰ میلی‌لیتر) قرار داده نمی‌شوند. بشرهای شیشه‌ای در حمام آب تیره با دمای مورد نظر و تحت تأثیر دمای آب یکنواخت (مجهز به بخاری و پمپ آب) قرار داده می‌شوند. از آنجایی‌که بشرها شفاف هستند، آنها با یک درب نیمه مات پوشانده می‌شوند تا شدت نور را کاهش دهد (شرایط پرورش کلاسیک). آب سبز باید همواره برای کمک به کاهش نور و افزایش شانس شکار طعمه تامین شود. اکسیژن دائماً به‌وسیله پمپ‌های شیشه‌ای متصل به یک پمپ هوا تامین می‌شود که امکان هوادهی ملایم آب بشرها را با سرعت ۱۵۰ حباب در دقیقه فراهم کند.

تخم‌گذاری لاروها در یک مخزن پرورش کلاسیک ۳۰ لیتری اتفاق می‌افتد و سپس لاروها در ظروف پرورش کوچکتر تقسیم می‌شوند. جمع‌آوری لاروها باید با ملایمت باشد و با یک ظرف شیشه‌ای انجام شود تا استرس آنها کاهش یابد. روش‌های پرورش در حجم کم با روش‌های پرورش کلاسیک از جمله تبادل آب روزانه (۱۰۰ میلی‌لیتر در روز - حدود ۲۰-۱۳ درصد) و تغذیه با غذای زنده و جلبک‌های سبز با میزان دوز متناسب با حجم پرورش همخوانی دارد. با این روش لاروهای

- 2- Skin patterns
- 3- Color pattern polymorphisms
- 4- Miss bar

*A. ocellaris* در معرض ترکیبات مختلفی مانند T3 (هورمون تیروئید) و MPI (ترکیبی از متیمازول، پرکلرات پتاسیم و اسید آیوپانویک) برای درک نقش TH در دگردیسی شقایق ماهیان موفق بوده است (Salis et al., 2021). بنابراین، بسیار محتمل است که از روش پرورش کم حجم برای انجام آزمایش‌های عملکردی بیشتر برای این ماهیان استفاده شود.

### روش پرورش و تخم‌گذاری بدون مراقبت والدین

یک جنبه از زیست‌شناسی شقایق ماهیان نکته‌هایی است که همچنان برای زیست‌شناسان تکوینی که می‌خواهند از روش‌هایی مانند فناوری CRISPR استفاده کنند، چالش‌برانگیز است. تخم‌ریزی شقایق ماهیان در سنگ بستر یک مزیت است که امکان پرورش در آکواریوم را فراهم می‌کند، اما استفاده از تکنیک‌هایی که نیاز به دسترسی آسان و دستکاری تخم‌ها برای میکرواینجکشن دارد نیز دشوار است. اساساً جداسازی تخم‌ها مشکل خاصی ندارد و این کار را می‌توان با شکستن تکیه‌گاه سنگ بستر تخم (کاشی‌ها و گلدان‌های سفالی) به قطعات کوچک (۴×۲ سانتی‌متر) با استفاده از ابزارهایی همچون چکش، اسکنه یا مغار انجام داد (Mitchell et al., 2021). روش دیگر، جدا کردن تخم‌ها از تکیه‌گاه سنگ بستر (سنگ تخم)، استفاده از فورسپس و جدا کردن آرام تخم‌ها بدون فشردن آنها یا آسیب‌رساندن به پوسته تخم است. به جای فورسپس، می‌توان از تیغه چاقوی تیز برای بریدن دیسک چسبی که تخم را متصل می‌کند، استفاده کرد (Yamanaka et al., 2021). هنگامی که تخم‌ها از والدین یا از تکیه‌گاه جدا می‌شوند، مسئله اصلی این است که چگونه از رشد صحیح آنها اطمینان حاصل شود. مراقبت از والدین برای اطمینان از رشد موفقیت‌آمیز ضروری است، زیرا هوادهی و نظافت تخم‌ها باعث اکسیژن‌رسانی و پاک‌سازی آنها می‌شود (Green, 2004). Yamanaka و همکاران (۲۰۲۴) اعلام کردند، دلقک‌ماهی *A. ocellaris* یک استراتژی تخم‌گذاری را مبتنی بر محیط زیست نشان می‌دهد که در آن والدین جریان آب تولید می‌کنند تا جنین‌ها را تشویق کنند تا پس از غروب آفتاب در روز هشتم پس از تخم‌ریزی از تخم بیرون بیایند. اگرچه مطالعات قبلی نشان داده است که تخم‌گذاری نیاز به تاریکی کامل و تلاطم آب دارد، مکانیسم‌های عمل این موضوع ناشناخته بود. آنها به بررسی الگوهای بیان آنزیم‌های

تخم‌گذاری و چگونگی تأثیر تاریکی و تلاطم آب بر ترشح آنها و هضم پوشش کوریون تخم در پرداختند و نشان دادند که آنزیم‌های تخم‌گذاری مشابه سایر گونه‌های ماهی، از مراحل اولیه رشد فعال شده و تا روز تخم‌گذاری کاهش یافته است. سلول‌های تخم‌گذاری در دم قرار دارند که ممکن است با شکل تخم و شکستن کوریون توأم باشد. در روز تخم‌گذاری، هضم کوریون صرفاً در تاریکی کامل و بدون توجه تلاطم آب اتفاق می‌افتد. علاوه‌براین، یونومایسین (یونوفور  $Ca^{2+}$  و محرک ترشح آنزیم هج)، حتی در شرایط روشنایی نور باعث هضم کوریون شد. اما تلاطم آب هضم کوریون را در تاریکی تسریع کرد. در نتیجه، یافته‌های Yamanaka و همکاران (۲۰۲۴) نشان داد که تاریکی باعث ترشح آنزیم‌های تخم‌گذاری می‌شود که با تغییرات در سطوح  $Ca^{2+}$  انجام می‌شود درحالی‌که تلاطم آب به فعالیت هضم کوریون یا ترشح آنزیم تخم‌گذاری کمک می‌کند. این پاسخ‌ها به نشانه‌های محیطی تخم‌گذاری سریع و هماهنگ دلقک‌ماهی *A. ocellaris* کمک می‌کند (Yamanaka et al., 2024). Mitchell و همکاران (۲۰۲۱) توصیه می‌کنند، اگر تخم‌ها همچنان به سنگ بستر خود متصل هستند، می‌توانید آن را در موقعیت عمودی در یک ظرف پلاستیکی کوچک (مخزن ۳۶ لیتری) یا در مخزنی مشابه با آنچه معمولاً برای پرورش سایر لارو ماهیان استفاده می‌شود، قرار دهید. این مخزن انکوباسیون باید با آب دریا پر شود، در همان دمای مخزن تکثیر نگهداری شود و برای جلوگیری از مرگ‌ومیر ناشی از توسعه قارچی و باکتریایی، باید یک تیمار ضد قارچ/ضد باکتری (متیلن‌بلو) اضافه شود. مراقبت‌های والدینی در بعد هوادهی تخم‌ها، با افزودن یک سنگ‌هوا (پخش‌کننده حباب ریز هوا) جایگزین می‌شود. سنگ‌هوا در فاصله ۱۰ سانتی‌متری از تخم‌ها و سنگ تخم قرار می‌گیرد. اگر سنگ‌هوا خیلی نزدیک قرار گیرد یا فشار خروجی حباب‌ها خیلی قوی باشند، می‌تواند باعث ایجاد فشار مکانیکی به تخم‌ها شود. مراقبت‌های منظم باید برای حذف جنین‌های مرده و جلوگیری از انتشار پوسیدگی در میان سایر تخم‌ها با افزودن مواد ضدعفونی‌کننده مانند متیلن بلو انجام شود (Mitchell et al., 2021). روز تخم‌گذاری مصادف است با زمانی که چشم‌های براق جنین‌ها از زیر پوشش تخم قابل مشاهده است. در این هنگام باید سنگ‌تخم به یک مخزن جدید واجد آب دریای تمیز (همیشه در همان دما) منتقل شود، جریان هوا روی تخم‌ها افزایش یابد. هج به طور معمول ۵۳

سوربن فرانسه) و مؤسسه علم و فناوری<sup>۸</sup> (اوکیناوی ژاپن)، انجام شده است که موفقیت‌هایی را نشان می‌دهد، اما برای ارزیابی دقیق میزان تخم‌گذاری و میزان بقای لاروها پس از چنین مدل تخم‌گذاری، کار بیشتری لازم است.

### جمع‌بندی

آزمایش بر حیوانات مدل به توسعه علوم زیستی و پزشکی و سلامت بشریت بسیار کمک نموده به‌طوری‌که همواره در زمینه شناخت و درمان و پیشگیری از بیماری‌ها کمک‌های شایانی نموده است. بسیاری از پیشرفت‌های علمی حیطه دانش پزشکی که به صورت بنیادی و کاربردی مطرح می‌شوند، برای استفاده در پیشگیری و درمان بیماری‌هایی که روش‌های مناسب مهار آنها هنوز در دسترس نیستند، نیازمند انجام آزمایش‌هایی بر حیوانات مدل است که در این رابطه پیش‌درآمد بسیاری از پیشرفت‌های گذشته و پیشرفت‌های آتی، آزمایش‌هایی است که بر حیوانات صورت می‌گیرد. به عبارت دیگر، علوم پزشکی بر پایه این تلاش‌های آزمایشگاهی بر حیوانات مدل استوار است. از سوی دیگر، طبق معاهدات اخلاقی بین‌المللی، مواد یا تجهیزات جدید نباید برای اولین بار بر انسان آزمایش شوند، مگر این‌که آزمایش‌های قبلی بر حیوانات آزمایشگاهی مدل، مبنی بر بی‌خطر بودن آنها گزارش شده باشد. از این‌رو، محافظت از سلامت بشر و جانوران، به انجام آزمایش‌هایی بر گونه‌های مختلفی نیاز دارد که برای هر موردی باید گونه و مدل مناسب به‌کار گرفته شود. حتی تا حد امکان، پیش از انجام آزمایش بر جانوران، استفاده از روش‌هایی مثل مدل‌سازی ریاضی، شبیه‌سازی رایانه‌ای و سیستم‌های زیستی آزمایشگاهی و نظایر آن توصیه می‌شود (Khiabani, 2019). اگرچه استفاده از شقایق‌ماهیان در تحقیقات آزمایشگاهی با چالش‌هایی مواجه است، اما آنها به‌سرعت به عنوان یک مدل آزمایشگاهی در حال ظهور هستند. به طور خاص، توسعه روش‌های پرورش و تخم‌گذاری بدون مراقبت والدین، پیشرفت عمده در انجام تحقیقات مهیج آینده است که شقایق‌ماهی‌ها را در تراز تحقیقاتی گونه‌های مدل ماهی‌های آب‌های شیرین مانند ماهی دانیوی گورخری یا مداکای ژاپنی (*Oryzias latipes*) قرار می‌دهد. استحکام شقایق‌ماهی‌ها برای سازگاری با انواع سیستم‌ها و شرایط نگهداری

طی شب اتفاق می‌افتد. اگر تخم‌ها از سنگ‌تخم جدا شوند، برخی تنظیمات برای تخم‌گذاری لازم است. تخم‌ها باید طوری هچ شوند که تعلیق ملایم آنها و حرکت مداوم آب فراهم باشد (Yamanaka et al., 2021). برای این روش می‌توان ۱۰۰ تخم را در یک لوله سانتریفیوژ ۱۰۰ میلی لیتری یا یک فلاسک ته‌گرد ۳۰۰ میلی لیتری پر از آب دریا با حرکت آب است. همچنین می‌توان از ظروف تجاری مخصوص که معمولاً برای تخم‌گذاری ماهی‌های دهان‌پرور، مانند African cichlids یا ماهی‌های Cardinal با عنوان زایشگاه ماهی<sup>۵</sup> استفاده کرد (Haesler et al., 2011). در زایشگاه، تخم‌ها در محفظه‌ای تحت حرکت ملایم آب نگهداری می‌شوند که دلیل آن جریان آب و گردشی است که در اثر هوادهی در محفظه دوم ایجاد می‌شود. در تمام روش‌های تخم‌گذاری، مشاهدات روزانه برای حذف تخم‌های مرده و جلوگیری از انتشار آلودگی باید ثبت شود. از دیگر گزینه‌ها برای مدیریت تخم‌گذاری تخم‌های جدا شده از سنگ‌تخم، می‌توان به استفاده از استوانه‌ای تیره<sup>۶</sup> اشاره کرد. در شب تخم‌گذاری، این ظروف استوانه‌ای را روی شیکر آزمایشگاهی (با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت یک ساعت) قرار می‌دهند تا به‌خوبی تکان داده شود و یک محرک فیزیکی مناسب برای تخم‌گذاری لاروها فراهم کند. پس از یک ساعت تکان دادن، لاروهای هچ شده به مخزن پرورش لارو منتقل می‌شوند. جنین‌های خارج نشده دوباره در تاریکی قرار می‌گیرند و یک ساعت دیگر تکان داده می‌شوند تا زمان بیشتری برای بیرون آمدن از تخم برای آنها فراهم شود. چنین روش‌هایی امکان دستیابی به نرخ بقاء ۳۳.۶ درصد ( $\pm 6.89$ ) را در مقایسه با زمانی که تخم‌ها هنوز در حضور والدین بودند [نرخ بقاء ۳۸.۸ درصد ( $\pm 3.82$ )] نشان داد. با این حال، باید توجه داشت که این درصد نسبتاً کمتر از بقاء در مقایسه با حجم وسیعی از روش پرورش لارو شقایق‌ماهیان بوده و تحقیقات بیشتری برای بهبود این پروتکل‌ها مورد نیاز است (Yamanaka et al., 2021). روش دیگری که شایسته بررسی است، تخم‌گذاری در پتری‌دیش با کمک انکوباتور تاریک با تنظیم حرارتی است همان‌طوری‌که در ماهی دانیوی گورخری (*Danio Rerio*) انجام می‌شود. برخی از تحقیقات در رصدخانه ملی اقیانوس‌شناسی<sup>۷</sup> (دانشگاه

5- Egg tumblers

6- Cylindrical hatching container

7- Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-Mer

breeding of black-finned anemone fish *Amphiprion nigripes* Regan, 1908 under captive conditions. *Indian Journal of Fisheries*, 59(1), 77-82. Retrieved from <http://eprints.cmfri.org.in/id/eprint/8939>

**Avella, M., Olivotto, I., Gioacchini, G., Maradonna, F. and Carnevali, O., 2007.** The role of fatty acids enrichments in the larviculture of false percula clownfish *Amphiprion ocellaris*. *Aquaculture*, 273(1), 87-95.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.09.032>

**Barbasch, T.A., DeAngelis, R., Rhodes, J. and Buston, P.M., 2022.** Parental care: Patterns, proximate and ultimate causes, and consequences. In *Evolution, Development and Ecology of Anemonefishes* (pp. 159-166): CRC Press.

**Beldade, R., Bernardi, G. and Mills, S.C., 2022.** Anemonefish behavior and reproduction. In *Evolution, Development and Ecology of Anemonefishes* (pp. 129-142): CRC Press.

**Bell, J., McEvoy, L., Estevez, A., Shields, R. and Sargent, J., 2003.** Optimising lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae. *Aquaculture*, 227(1-4), 211-220. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00504-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00504-0)

**Berumen, M.L., Walsh, H.J., Raventós, N., Planes, S., Jones, G.P., Starczak, V. and Thorrold, S.R., 2010.** Otolith geochemistry does not reflect dispersal history of clownfish larvae. *Coral Reefs*, 29, 883-891. <https://doi.org/10.1007/s00338-010-0652-z>

(سیستم‌های بسته یا باز، آب دریا فیلتر شده یا طبیعی، دماهای مختلف و تحمل شوری و...)، تأکیدی برای استفاده از آنها به عنوان ارگانسیم مدل است. این به محققان امکان انعطاف‌پذیری بیشتری می‌دهد تا به جای این‌که به شدت با نیازهای گونه‌ها محدود شوند، روش کار آزمایشگاهی را با توجه به محدودیت‌های اهداف آزمایشگاهی و تحقیقاتی خود انتخاب کنند. پیشرفت‌های اخیر امکان پرورش جنین‌ها را بدون مراقبت والدین و در حجم‌های کم فراهم می‌کند. چنین روش‌هایی از جذابیت خاصی برخوردارند، زیرا شقایق‌ماهی‌ها را به عنوان یک ارگانسیم مدل بالقوه روی نقشه قرار می‌دهند که امکان استفاده از ابزارهای مولکولی (میکروآینجکشن)، آزمایش‌های عملکردی و رویکردهای زیست‌توکسیکولوژیک را فراهم می‌کند. شایان ذکر است، تا به امروز دانش در مورد تکثیر و پرورش و اصلاح نژاد شقایق‌ماهی‌ها می‌تواند به عنوان مبنایی برای تحقیقات و پیشرفت‌های آتی در زمینه تکثیر و پرورش سایر گونه‌های صخره‌های مرجانی به‌ویژه سایر تخم‌گذاران کفزی که تقریباً ۲۰ درصد از ماهیان این زیستگاه‌ها را تشکیل می‌دهند، باشد (Donelson et al., 2022). به طور کلی، قوانین و قواعد کارهای مطالعاتی و آزمایشگاهی، ابزارهای ضروری برای مدیریت پروژه تلقی می‌شوند. تبعیت مستمر از قواعد خاص، حجم کار نگهداری از دلفک‌ماهی‌ها را کاهش می‌دهد و از بروز مشکلات احتمالی جلوگیری می‌کند. مطالب مذکور، راهنمایی کلی برای توجه بیشتر به قواعد اخلاقی و فنی کار با این ماهی‌ها به عنوان گونه مدل زیستی نوظهور در مطالعات علوم زیستی است، اما مراکز آزمایشگاهی و تولیدی، باید قواعد کار را متناسب با شرایط و ضوابط استاندارد مدنظر قرار دهد.

## منابع

**Anikuttan, K.K., Rameshkumar, P., Nazar, A.K., Jayakumar, R., Tamilmani, G., Sakthivel, M., . . . Krishnaveni, N., 2022.** Designer clown fishes: Unraveling the ambiguities. *Frontiers in Marine Science*, 9, 907362.

**Anil, M., Santhosh, B., Prasad, B. and George, R. M., 2012.** Broodstock development and

- Betancur-R, R., Wiley, E.O., Arratia, G., Acero, A., Bailly, N., Miya, M., . . . Orti, G., 2017.** Phylogenetic classification of bony fishes. *BMC Evolutionary Biology*, 17, 1-40. doi:<https://doi.org/10.1186/s12862-017-0958-3>
- Biondo, M.V. and Burki, R.P., 2019.** Monitoring the trade in marine ornamental fishes through the European Trade Control and Expert System TRACES: Challenges and possibilities. *Marine Policy*, 108, 103620. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2019.103620>
- Brakefield, P.M., 2011.** Evo-devo and accounting for Darwin's endless forms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1574), 2069-2075. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0007>
- Buston, P., 2004.** Does the presence of non-breeders enhance the fitness of breeders? An experimental analysis in the clown anemonefish *Amphiprion percula*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 57, 23-31. <https://doi.org/10.1007/s00265-004-0833-2>
- Calado, R., 2017.** The need for cultured specimens. *Marine ornamental species aquaculture*, 15-22. <https://doi.org/10.1002/9781119169147.ch2>
- Calado, R., Olivotto, I., Oliver, M.P. and Holt, G.J., 2017.** *Marine ornamental species aquaculture* (Vol. 712): Wiley Online Library.
- Callan, C.K., 2007.** Assessment of the flame angelfish (*Centropyge loriculus*) as a model species in studies on egg and larval quality in marine fishes. Retrieved from <https://digitalcommons.library.umaine.edu/etd/126>
- Camp, E.F., Hobbs, J.P.A., De Brauwer, M., Dumbrell, A.J. and Smith, D.J., 2016.** Cohabitation promotes high diversity of clownfishes in the Coral Triangle. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1827), 20160277. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.0277>
- Cañedo-Orihuela, H., González-Félix, M.L. and Perez-Velazquez, M., 2023.** Maturation, reproduction, and larval culture of pomacentrids for the ornamental fish trade: Successes and challenges. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 33(4), 1155-1197. <https://doi.org/10.1007/s11160-023-09789-0>
- Carroll, S.B. 2008.** Evo-devo and an expanding evolutionary synthesis: a genetic theory of morphological evolution. *Cell*, 134(1), 25-36. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.030>
- Chambel, J., Severiano, V., Baptista, T., Mendes, S. and Pedrosa, R., 2015.** Effect of stocking density and different diets on growth of *Percula Clownfish*, *Amphiprion percula* (Lacepede, 1802). *Springerplus*, 4, 1-7. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-0967-xi>
- Colley, O., Iwata, E. and Parmentier, E., 2016.** Clownfishes. In *Biology of damselfishes* (pp. 246-266): CRC Press.
- De Mitcheson, Y.S. and Liu, M., 2008.** Functional hermaphroditism in teleosts. *Fish and Fisheries*, 9(1), 1-43. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2979.2007.00266.x>
- Dhaneesh, K.V., Ajith Kumar, T.T., Swagat, G. and Balasubramanian, T., 2012a.** Breeding and mass scale rearing of clownfish *Amphiprion percula*: Feeding and rearing in brackishwater. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 30, 528-534. <https://doi.org/10.1007/s00343-012-1184-x>
- Dhaneesh, K., Devi, K.N., Kumar, T.A., Balasubramanian, T. and Tissera, K., 2012b.**

- Breeding, embryonic development and salinity tolerance of Skunk clownfish *Amphiprion akallopisos*. *Journal of King Saud University-Science*, 24(3), 201-209. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2011.03.005>
- Díaz-Jiménez, L., Hernández-Vergara, M.P. and Pérez-Rostro, C.I., 2020.** Protein/lipid ratio for the growth of juvenile clownfish, *Amphiprion ocellaris*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 51(3), 666-678. <https://doi.org/10.1111/jwas.12613>
- Dixon, D.L., Munday, P.L. and Jones, G.P., 2010.** Ocean acidification disrupts the innate ability of fish to detect predator olfactory cues. *Ecology letters*, 13(1), 68-75. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01400.x>
- Donelson, J.M., 2015.** Development in a warm future ocean may enhance performance in some species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 472, 119-125. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.07.008>
- Donelson, J.M., Romans, P., Yamanaka, S., Kinoshita, M. and Roux, N., 2022.** Anemonefish husbandry. In *Evolution, Development and Ecology of Anemonefishes* (pp. 237-252): CRC Press.
- Fernández, M., Ruiz-Tagle, N., Cifuentes, S., Pörtner, H.O. and Arntz, W., 2003.** Oxygen-dependent asynchrony of embryonic development in embryo masses of brachyuran crabs. *Marine Biology*, 142, 559-565. <https://doi.org/10.1007/s00227-002-0965-8>
- Fishelson, L., 1998.** Behaviour, socio-ecology and sexuality in damselfishes (Pomacentridae). *Italian Journal of Zoology*, 65(S1), 387-398. <https://doi.org/10.1080/11250009809386853>
- Fobert, E.K., Burke da Silva, K. and Swearer, S.E., 2019.** Artificial light at night causes reproductive failure in clownfish. *Biology Letters*, 15(7), 20190272. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2019.0272>
- Fobert, E.K., Schubert, K.P. and da Silva, K.B., 2021.** The influence of spectral composition of artificial light at night on clownfish reproductive success. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 540, 151559. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2021.151559>
- Fricke, R., Eschmeyer, W. and Van der Laan, R., 2018.** Catalog of fishes: Genera, species, references. *California Academy of Sciences, San Francisco, CA, USA* <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>.
- Fricke, R., Eschmeyer, W.N. and Van der Laan R., 2020.** Eschmeyer's catalog of fishes: Genera, species, references. <http://researcharchive.calacademy.org/research/Ichthyology/catalog/fshcatmain.asp>. Accessed 6 June 2022.
- Gaston, K.J. and Bennie, J., 2014.** Demographic effects of artificial nighttime lighting on animal populations. *Environmental Reviews*, 22(4), 323-330. <https://doi.org/10.1139/er-2014-0005>
- Gaston, K.J., Davies, T.W., Nedelec, S.L. and Holt, L.A., 2017.** Impacts of artificial light at night on biological timings. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 48, 49-68. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110316-022745>
- Ghosh, S., Kumar, T.A., Nanthinidevi, K. and Balasubrananian, T., 2011.** Hatchery Production of Clark's Clownfish, *Amphiprion*

- clarkii (Bennett, 1830) Using Brackishwater. *IPCBEE*, 22, 51-56.
- Ghosh, S., Kumar, T.A., Nanthinidevi, K. and Balasubramanian, T., 2012.** Reef fish breeding and hatchery production using brackishwater, a sustainable technology with special reference to Clark's clownfish, *Amphiprion clarkii* (Bennett, 1830). *International Journal of Environmental Science and Development*, 3(1), 56.
- Godwin, J.R. and Thomas, P., 1993.** Sex change and steroid profiles in the protandrous anemonefish *Amphiprion melanopus* (Pomacentridae, Teleostei). *General and Comparative Endocrinology*, 91(2), 144-157. doi:<https://doi.org/10.1006/gcen.1993.1114>
- Gopakumar, G., George, R.M. and Jasmine, S., 1999.** Breeding and larval rearing of the clownfish *Amphiprion chrysogaster*. *Marine Fisheries Information Service, Technical and Extension Series*, 161, 8-11.
- Gopakumar, G., Madhu, K., Madhu, R., Anil, M. and Ignatius, B., 2011.** Marine ornamental fish culture—package of practices. *CMFRI Special Publication* (101), 1-100. Retrieved from <http://eprints.cmfri.org.in/id/eprint/8395>
- Green, B., 2004.** Embryogenesis and oxygen consumption in demersally spawned egg clutches of a tropical clownfish (Pomacentridae). *Comp Biochem Physiol A*, 138, 35-40.
- Green, B.S. and McCormick, M.I., 2001.** Ontogeny of the digestive and feeding systems in the anemonefish *Amphiprion melanopus*. *Environmental Biology of Fishes*, 61, 73-83. <https://doi.org/10.1023/A:1011044919990>
- Green, B.S. and McCormick, M.I., 2005.** O2 replenishment to fish nests: males adjust brood care to ambient conditions and brood development. *Behavioral Ecology*, 16(2), 389-397. <https://doi.org/10.1093/beheco/ari007>
- Haesler, M.P., Lindeyer, C.M., Otti, O., Bonfils, D., Heg, D. and Taborsky, M., 2011.** Female mouthbrooders in control of pre-and postmating sexual selection. *Behavioral Ecology*, 22(5), 1033-1041.
- Holbrook, S.J. and Schmitt, R.J., 2005.** Growth, reproduction and survival of a tropical sea anemone (Actiniaria): Benefits of hosting anemonefish. *Coral Reefs*, 24, 67-73. <https://doi.org/10.1007/s00338-004-0432-8>
- Ignatius, B., Rathore, G., Jagadis, I., Kandasamy, D. and Victor, A., 2001.** Spawning and larval rearing technique for tropical clown fish *Amphiprion sebae* under captive condition. *Journal of Agriculture in Tropics*, 16(3), 241-249.
- INFOFISH, 2021.** 3rd International Ornamental Fish Trade and Technical Virtual Conference. (ORNAMENTAL FISH -2021), Organised by INFOFISH and OFI. ([http://ornamentalfish.infofish.org/images/pdf/3rd\\_ORNAMENTAL2021\\_brochure\\_fa.pdf](http://ornamentalfish.infofish.org/images/pdf/3rd_ORNAMENTAL2021_brochure_fa.pdf)).
- Iwata, E., Suzuki, N. and Ohno, S., 2019.** Influence of social stability on the sex determination process in false clown anemonefish (*Amphiprion ocellaris*). *Marine and freshwater behaviour and physiology*, 52(3), 107-119. <https://doi.org/10.1080/10236244.2019.1655408>
- Khiabani, A. and Esmaeili Ferydoni, A., 2017.** Review of biology & breeding of the clownfish under captivity. *Journal of Ornamental Aquatics*, 4(1), 13-19.

- <http://dorl.net/dor/20.1001.1.24234575.1396.4.1.3.9>
- Khiabani, A., 2019.** Review of the ethical and technical principles of qorking with Zebrafish as a species of the biological model in medical science studies. *Iranian Journal of Medical Ethics and History of Medicine*, 12(1), 58-72.
- Khiabani, A., Keramat, A. and Tahergorbi, R., 2019.** Use of Highly unsaturated fatty acid (HUFA) in Ornamental Fish Feeds. *Survey in Fisheries Sciences*, 6(1), 64-76. <https://doi.org/10.18331/SFS2019.6.1.7>
- Khiabani, A., Keramat Amirkolaie, A., Ouraji, H., Esmaili Fereidouni, A. and Hosseinzadeh Sahafi, H., 2020a.** Effect of dietary Arachidonic acid on cortisol, glucose levels and whole Zebrafish (*Danio rerio*) fatty acid composition. *Journal of Fisheries*, 73(2), 135-148. <https://doi.org/10.22059/JFISHERIES.2020.301525.1162>
- Khiabani, A., Keramat, A.S., Orji, H., Esmaili Fereidouni, A. and Hosseinzadeh Sahafi, H., 2020b.** Influence of different levels of dietary Arachidonic Acid Supplementation on growth parameters and survival of Zebrafish (*Danio rerio*). *ISFJ*, 29(2), 179-191. <https://doi.org/10.22092/isfj.2020.122050>
- Kitahara, T., 1983.** Behavior of carotenoids in the chum salmon (*Oncorhynchus keta*) during anadromous migration. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 76(1), 97-101. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(83\)90177-3](https://doi.org/10.1016/0305-0491(83)90177-3)
- Klann, M., Mercader, M., Carlu, L., Hayashi, K., Reimer, J.D. and Laudet, V., 2021b.** Variation on a theme: Pigmentation variants and mutants of anemonefish. *EvoDevo*, 12(1), 8.
- Klann, M., Mercader, M., Salis, P., Reynaud, M., Roux, N., Laudet, V. and Besseau, L., 2021a.** Anemonefishes. In *Handbook of Marine Model Organisms in Experimental Biology* (pp. 443-464): CRC Press.
- Kraines, S., Suzuki, Y., Yamada, K. and Komiyama, H., 1996.** Separating biological and physical changes in dissolved oxygen concentration in a coral reef. *Limnology and Oceanography*, 41(8), 1790-1799. <https://doi.org/10.4319/lo.1996.41.8.1790>
- Kumar, T.A., Gopi, M., Dhaneesh, K.V., Vinoth, R., Ghosh, S., Balasubramanian, T. and Shunmugaraj, T., 2012.** Hatchery production of the clownfish *Amphiprion nigripes* at Agatti island, Lakshadweep, India. *Journal of Environmental Biology*, 33(3). Retrieved from <https://www.proquest.com/openview/381d5733bb99ddaae035ce3daae8a5f8/1?pq-origsite=gscholar&cbl=636374>
- Kumar, T. and Balasubramanian, T., 2009.** Broodstock development, spawning and larval rearing of the false clown fish, *Amphiprion ocellaris* in captivity using estuarine water. *Current Science (00113891)*, 97(10).
- Kuwamura, T., Sunobe, T., Sakai, Y., Kadota, T. and Sawada, K., 2020.** Hermaphroditism in fishes: An annotated list of species, phylogeny, and mating system. *Ichthyological Research*, 67, 341-360. <https://doi.org/10.1007/s10228-020-00754-6>
- Leonard, J.L., 2018.** The evolution of sexual systems in animals. *Transitions between sexual systems: understanding the mechanisms of, and pathways between, dioecy,*

- hermaphroditism and other sexual systems, 1-58. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-94139-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-94139-4_1).
- Longcore, T. and Rich, C., 2004.** Ecological light pollution. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2(4), 191-198. [https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2004\)002\[0191:ELP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2004)002[0191:ELP]2.0.CO;2)
- Madhu, K., Madhu, R., Gopakumar, G. and Sasidharan, C., 2006b.** Breeding, larval rearing and seed production of maroon clown *Premnas biaculeatus* under captive conditions. *Marine Fisheries Information Service, Technical and Extension Series*, 190, 1-5.
- Madhu, K., Madhu, R., Krishnan, L., Sasidharan, C. and Venugopal, K., 2006a.** Spawning and larval rearing of *Amphiprion ocellaris* under captive condition. *Marine Fisheries Information Service, Technical and Extension Series*, 188, 1-5.
- Madhu, K. and Madhu, R., 2007.** Influence of lunar rhythm on spawning of clown anemone fish *Amphiprion percula* under captive condition in Andaman and Nicobar islands. *Journal of the Marine Biological Association of India*, 49(1), 58-64.
- McCafferty, S., Bermingham, E., Quenouille, B., Planes, S., Hoelzer, G. and Asoh, K., 2002.** Historical biogeography and molecular systematics of the Indo-Pacific genus *Dascyllus* (Teleostei: Pomacentridae). *Molecular Ecology*, 11(8), 1377-1392. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01533.x>
- Merilaita, S. and Kelley, J. L., 2018.** Scary clowns: adaptive function of anemonefish coloration. *Journal of Evolutionary Biology*, 31(10), 1558-1571. <https://doi.org/10.1111/jeb.13350>
- Militz, T.A. and Foale, S., 2017.** The “Nemo Effect”: perception and reality of Finding Nemo's impact on marine aquarium fisheries. *Fish and Fisheries*, 18(3), 596-606. <https://doi.org/10.1111/faf.12202>
- Mitchell, L.J., Cheney, K.L., Lührmann, M., Marshall, J., Michie, K. and Cortesi, F., 2021.** Molecular evolution of ultraviolet visual opsins and spectral tuning of photoreceptors in anemonefishes (Amphiprioninae). *Genome Biology and Evolution*, 13(10), evab184.
- Mitchell, L.J., Cortesi, F., Marshall, N.J. and Cheney, K.L., 2023.** Higher ultraviolet skin reflectance signals submissiveness in the anemonefish, *Amphiprion akindynos*. *Behavioral Ecology*, 34(1), 19-32. <https://doi.org/10.1093/beheco/arac089>
- Moorhead, J.A. and Zeng, C., 2010.** Development of captive breeding techniques for marine ornamental fish: A review. *Reviews in Fisheries Science*, 18(4), 315-343. <https://doi.org/10.1080/10641262.2010.516035>
- Munday, P.L., Dixson, D.L., Donelson, J.M., Jones, G.P., Pratchett, M.S., Devitsina, G.V. and Døving, K.B., 2009.** Ocean acidification impairs olfactory discrimination and homing ability of a marine fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(6), 1848-1852. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809996106>
- Naas, K., Ingvar H. and Iglesias, J., 1996.** Illumination in first feeding tanks for marine fish larvae. *Aquacultural Engineering*, 15(4), 291. [https://doi.org/10.1016/0144-8609\(95\)00019-4](https://doi.org/10.1016/0144-8609(95)00019-4)

- Navarro-Flores, J., Ibarra-Castro, L., Martinez-Brown, J.M. and Zavala-Leal, O.I., 2019. Hermafroditismo en peces teleósteos y sus implicaciones en la acuicultura comercial. *Revista de biología marina y oceanografía*, 54(1), 1-10. <http://dx.doi.org/10.22370/rbmo.2019.54.1.1427>
- OEC, 2022. The Observatory of Economic Complexity. *Ornamental fsh, Live*. <https://oec.world/en/profile/hs/live-fish?redirect=true>. Accessed 4 July 2022.
- Olivotto, I., Capriotti, F., Buttino, I., Avella, A., Vitiello, V., Maradonna, F. and Carnevali, O., 2008. The use of harpacticoid copepods as live prey for *Amphiprion clarkii* larviculture: Effects on larval survival and growth. *Aquaculture*, 274(2-4), 347-352. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.027>
- Ostrowski, A.C. and Laidley, C.W., 2001. Application of marine foodfish techniques in marine ornamental aquaculture: reproduction and larval first feeding. *Aquarium Sciences and Conservation*, 3, 191-204. <https://doi.org/10.1023/A:1011349931035>
- Pietoyo, A., Hidayat, K.W., Nurazizah, S., Arifin, I.F.Z., Prabowo, D., Widianto, F.T. and Mustakim, I., 2020. The effect of stocking density on the growth of ocellaris clownfish (*Amphiprion ocellaris* Cuvier, 1830) with recirculation. *Journal of Aquaculture and Fish Health*, 9(3), 189. <https://doi.org/10.20473/jafh.v9i3.16191>
- Rhyne, A.L., Tlustý, M.F., Schofield, P.J., Kaufman, L., Morris Jr, J.A. and Bruckner, A.W., 2012. Revealing the appetite of the marine aquarium fish trade: the volume and biodiversity of fish imported into the United States. *PloS one*, 7(5), e35808. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035808>
- Roux, N., Lami, R., Salis, P., Magré, K., Romans, P., Masanet, P., . . . Laudet, V., 2019. Sea anemone and clownfish microbiota diversity and variation during the initial steps of symbiosis. *Scientific reports*, 9(1), 19491.
- Roux, N., Salis, P., Lee, S.H., Besseau, L. and Laudet, V., 2020. Anemonefish, a model for eco-evo-devo. *EvoDevo*, 11(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s13227-020-00166-7>
- Roux, N., Logeux, V., Trouillard, N., Pillot, R., Magré, K., Salis, P., . . . Romans, P., 2021. A star is born again: Methods for larval rearing of an emerging model organism, the False clownfish *Amphiprion ocellaris*. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 336(4), 376-385. <https://doi.org/10.1002/jez.b.23028>
- Salis, P., Roux, N., Soulat, O., Lecchini, D., Laudet, V. and Frédérick, B., 2018. Ontogenetic and phylogenetic simplification during white stripe evolution in clownfishes. *BMC Biology*, 16, 1-13. doi:<https://doi.org/10.1186/s12915-018-0559-7>
- Salis, P., Roux, N., Huang, D., Marcionetti, A., Mouginot, P., Reynaud, M., . . . Parichy, D.M., 2021. Thyroid hormones regulate the formation and environmental plasticity of white bars in clownfishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(23), e2101634118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2101634118>
- Sargent, J., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J. and Tocher, D., 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: Current status and future

- directions. *Aquaculture*, 179(1-4), 217-229. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00191-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00191-X)
- Schiedt, K., Leuenberger, F., Vecchi, M. and Glinz, E., 1985.** Absorption, retention and metabolic transformations of carotenoids in rainbow trout, salmon and chicken. *Pure and Applied Chemistry*, 57(5), 685-692. <https://doi.org/10.1351/pac198557050685>
- Takegaki, T., 2001.** Environmental factors affecting the spawning burrow selection by the gobiid *Valenciennaea longipinnis*. *Journal of fish biology*, 58(1), 222-229. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb00509.x>
- Thresher, R.E., 1984.** Reproduction in reef fishes.
- Varghese, B., Paulraj, R., Gopakumar, G. and Chakraborty, K., 2009.** Dietary influence on the egg production and larval viability in true Sebae clownfish *Amphiprion sebae* Bleeker 1853. *Asian Fisheries Science*, 22(1), 7-20. Retrieved from <http://eprints.cmfri.org.in/id/eprint/5729>
- Vissio, P.G., Darias, M.J., Di Yorio, M.P., Sirkin, D.I.P. and Delgadin, T.H., 2021.** Fish skin pigmentation in aquaculture: The influence of rearing conditions and its neuroendocrine regulation. *General and Comparative Endocrinology*, 301, 113662. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113662>
- Wabnitz, C., 2003.** From ocean to aquarium: the global trade in marine ornamental species: UNEP/Earthprint.
- Wittenrich, M.L., 2007.** The complete illustrated breeder's guide to marine aquarium fishes. Vol. 304. TFH Publications Neptune.
- Wong, M.Y., Beasley, A.L., Douglass, T., Whalan, S. and Scott, A., 2017.** Some anemonefish lack personality: a comparative assessment of behavioral variation and repeatability in relation to environmental and social factors. *Coral Reefs*, 36, 1307-1316. <https://doi.org/10.1007/s00338-017-1625-2>
- Wood, E., 1985.** Exploitation of coral reef fishes for the aquarium trade.
- Yamanaka, S., Okada, Y., Furuta, T. and Kinoshita, M., 2021.** Establishment of culture and microinjection methods for false clownfish embryos without parental care. *Development, Growth & Differentiation*, 63(9), 459-466. <https://doi.org/10.1111/dgd.12759>
- Yamanaka, S., Kawaguchi, M., Yasumasu, S., Sato, K. and Kinoshita, M., 2024.** Effect of light and water agitation on hatching processes in clown anemonefish *Amphiprion ocellaris*. *bioRxiv*, 2024.2002. 2014.580270. <https://doi.org/10.1101/2024.02.14.580270>
- Yasir, I. and Qin, J.G., 2010.** Effect of dietary carotenoids on skin color and pigments of false clownfish, *Amphiprion ocellaris*, Cuvier. *Journal of the World Aquaculture Society*, 41(3), 308-318. <http://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2010.00373.x>

## **A review on the reproduction and breeding biotechnology of clownfish (*Amphiprion* sp.) as a laboratory model species**

**Alireza Khiabani<sup>1\*</sup>**

\*khiabani@uast.ac.ir

1- Department of Agriculture and Natural Resources, The Central Organization of the University of Applied Science & Technology, Tehran, Iran.

### **Abstract**

Anemones are beautiful and unique fish from the Ovalentaria order, the Pomacentridae family, and the Pomacentrinae subfamily, which are distributed with 30 different species in the waters of the tropical and subtropical regions of the world. Anemones have quickly become one of the most popular ornamental fish due to many biological characteristics, including small size, tendency to small territories, sexual dimorphism, sequential hermaphroditism, high reproductive frequency, visual appeal, ease of spawning and adaptation to the captive environment. They became marine, which is very valuable for ecological, scientific, and commercial purposes. They were the first fish in coral areas that were successfully reproduced in captivity, although their commercial breeding has always been accompanied by challenges, and success in this regard depends on compliance with the technical rules of production, especially increasing the survival rate of newborns. The development of appropriate breeding and breeding methods at the scale of laboratory research is of great value to scientists interested in using anemones as a model organism. Therefore, in this article, the biotechnological rules of the production of these fish, including broodstock breeding system, breeding and maintenance of broodstock, diet, spawning bed, common larval rearing systems, breeding method without broodstock care, and other relevant practical points were discussed based on the latest scientific findings.

**Keywords:** Anemonefish, Clown fish, Broodstock maintenance, Larval rearing systems, Marine aquariums, Laboratory research.