فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۴۱، جلد ۱۱، شماره ۲، بهار۹۷، صفحه ۱۷ تا ۲۶

# مقایسه ی تأثیر تزریق سه مرحله ای عصاره غده هیپوفیز و هورمون LHRHa2 با تزریق دو مرحله ای عصاره هیپوفیز بربرخی شاخص های بافتی، تولید مثلی واستروئیدهای جنسی مولدین نر و ماده شیربت *Arabibarbus grypus*

**حدیده معبودی**[۱]، نرگس جوادزاده[۲]، علی سواری[۳]، محمد تقی آژیر[۴]

۱–استادیار گروه شیلات دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز. ایران.**mikhak1311@yahoo.com**

۲–دانشیار گروه شیلات دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز. ایران.

۳–دانش آموخته کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، مرکز تکثیر ماهیان بومی دشت آزادگان، اهواز. ایران.

٤–دانش آموخته کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، مرکز تحقیقات ماهیان سردابی کشور، تنکابن. ایران.

**تاریخ دریافت:۹٦/۱۰/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱/۲۰**

## چکیده

**زمینه و هدف: ماهی شیربت یکی از گونه های با ارزش اقتصادی از ماهیان بومی استان خوزستان می باشد. هدف از این مطالعه مقایسه تأثیر آنالوگ عصاره هیپوفیز و هورمون LHRHa2به روش سه مرحله ای، با عصاره هیپوفیز به روش دو مرحله ای بر شاخص-های بافتی، تولیدمثلی و هورمون های استروژن، پروژسترن و تستوسترون مولدین نر و ماده این گونه می باشد.**

**روش کار: به این منظور ۵۰ قطعه ماهی مولد شیربت در ٤ تیمار(٤۰ قطعه به روش سه مرحله ای و ۱۰ قطعه به روش دو مرحله ای) مورد مطالعه قرار گرفتند. تیمار شاهد ٤ mg/kg عصاره هیپوفیز، تیمار اول ٤ mg/kg هیپوفیز و$LHRHa_2$ ۳µg/kg، تیمار دوم ٤mg/kg هیپوفیز و$LHRHa_2$ ۷µg/kg و تیمار سوم ٤mg/kg هیپوفیز و$LHRHa_2$ ۱۰ µg/kg دریافت نمودند. از مولدین صید شده قبل و بعد از تزریق خون گیری به روش الایزا، هورمون های تستوسترون، پروژسترون و ۱۷-بتا استرادیول سرم خون، اندازه گیری شده. سپس با انجام تخم کشی دستی(مالشی) مولدین نر و ماده میزان جواب دهی ثبت گردید. پس از ۲٤ ساعت ماهی ها کالبد شکافی شده وضعیت ظاهری گنادها و وزن گنادها و کبد آن ها جهت تعیین تغییرات ماکروسکوپی و شاخص های گنادوسوماتیک و هپاتوسوماتیک اندازه گیری گردید.**

**یافته ها: نتایج در ٤ تیمار نشان داد که میزان هورمون های استروئیدی(E2, P,T)، درصد جواب دهی و شاخص گنادوسوماتیک و هپاتوسوماتیک مولدین ماده در تیمار دوم(تزریق سه مرحله ای) با مقادیر ۰/۳ ± ۵/۲، ۰/۰۵ ± ۰/٤٤و ۰/۰٤ ± ۲/۹ نانوگرم در میلی لیتر۹۰٪ ،۲۸٪ و ۳/۵٪ دارای افزایش معنی داری نسبت به تزریق دو مرحله ای و سایر تیمارها دارد(p<۰/۰۵) و نتیجه مشابهی در مولدین نر به دست آمد. تغییر مورفولوژیک در گنادها مشاهده نگردید و در همه تیمارها بیضه و تخمدان بالغ بودند.**

**نتیجه گیری: روش تزریق سه مرحله ای و دوز ترکیبی به کار رفته در تیمار دوم روش و غلظت مناسب تری نسبت به عصاره هیپوفیز جهت القائ مولدین نر، تولید اسپرم، القائ مولدین ماده و تولید تخمک با کیفیت بالاتر می باشد.**

**واژه های کلیدی:** $LHRHa_2$، غده هیپوفیز، هورمون استروئیدی، شیربت.

## مقدمه

تولیدمثل کنترل شده موضوعی مهم و کلیدی در آبزی پروری است و یکی از عوامل محدود کننده تولیدمثل، کیفیت گامت ها در مولدین نر و ماده می باشد(۱). ماهی شیربت با نام علمی *Arabibarbus grypus* و با نام محلی شیربت یا شبوط(به زبان عربی) از ماهیان بومی استان خوزستان است که در مرکز تکثیر و پرورش ماهیان بومی واقع در دشت آزادگان اهواز تکثیر و پرورش می یابد(۹). در تکثیر مصنوعی از هورمون های سنتتیک مانند اواپریم، LHRH، GnRH، HCG وغیره استفاده می شود. هورمون های محرک غدد جنسی

مترشحه از غده هیپوفیز به نام های GTH-I و GTH-II در گونه های مختلف ماهیان استخوانی ترشح می شود(۱۱). مقادیر GTH-I در ویتلوژنز و قبل از بلوغ جنسی افزایش می یابد. بر عکس، مقدار GTH-II تا قبل از رسیدگی(اوولاسیون) کم و غالباً غیر قابل تعیین است(۳). نتایج آزمایشات محیط In vitro، نشان داد که آزادسازی GTH-II مستقیماً از طریق هورمون آزاد کننده محرک غدد جنسی(GnRH) وغیره تحریک می شود. مطالعات روی تأثیر القائ هورمونی بر مولدین نر نشان داده است که استفاده از هورمون در مولدین نر باعث افزایش حجم اسپرم تولید شده و تغییرات سطوح استروئیدهای جنسی در پلاسمای این ماهیان می شود(۱۳). در ماهیان استخوانی ویتلوزنز با هورمون ۱۷-بتا استرادیول تنظیم می‌شود و افزایش جزئی در میزان این هورمون در ماهی ماده در طول بلوغ و تکامل گناد، بر شروع فرآیند ویتلوژنز دلالت می کند(۱). افزایش ۱۷-بتا استرادیول در سرم خون مانع از تبدیل پروگنولون به پروژسترون و مانع از رسیدگی کاذب در ماهی می گردد(۷). هیپوفیز از سال ۱۹۳۰ در تحریک تولیدمثل و وادار کردن ماهی به تخمک‌گذاری و تخم‌ریزی، مورداستفاده قرارگرفته است. عصاره‌ی غده‌ی هیپوفیز بسیار گران بوده و دارای هورمون‌های ضد تولیدمثلی نیز می باشد(۷)، لذا یک روش دیگر برای القای تخم‌ریزی در بسیاری از ماهیان، استفاده از شکل‌های مختلف با آنالوگ‌های هورمون آزادکننده گنادوتروپین است(۸). درسال ۲۰۰۱حسین-زاده صحافی با بررسی تاثیر هورمون HCG همراه با عصاره هیپوفیزی روی ماهی فیتوفاگ *Hypophthalmichthys molitrix* به روش سه مرحله ای بهترین دوز تزریقی را(۵mg+100iu) پیشنهاد داده است. کاهکش و همکاران در سال ۲۰۱۰ با مقایسه تزریق هورمون های سنتتیک و به صورت ترکیبی $LHRHa_2$ به همراه عصاره هیپوفیز بر روی تکثیر ماهی بنی، بهترین نتایج جواب دهی را در تزریق ترکیبی هورمون $LHRHa_2$ به همراه عصاره هیپوفیز و با دوز (۲µg/kg+۱۰mg/kg) مشاهده کردند. هورمون های تستوسترون و ۱۱-کتوتستوسترون در ماهیان نر با تأثیر بر سلول های لایدیک موجب افزایش تولید اسپرماتید می-شوند، هم چنین هورمون پروژسترون نیز با تغییر pH پلاسما در مجرای اسپرم بر موجب افزایش تحرک و تولید اسپرماتوزوا در این مجرا می گردد(۱۴). گلمرادی-زاده و همکاران در سال ۱۳۹۱ تأثیر هورمون گنادوتروپین انسانی را بر سطح هورمون های جنسی مولدین نر ماهی سوف سفید آزمایش نمودند که سبب افزایش حجم سلول های جنسی تولید شده و تغییرات سطوح استروئیدهای جنسی در این ماهیان می شود. بررسی پوراسماعیلیان و همکاران بر میزان هورمون های جنسی و تغییرات بافتی تخمدان ماهی مولد ماده شاه کولی در سال ۱۳۹۵نشان دهنده افزایش هورمون ۱۷-بتا استرادیول و رشد اووسیت و رسیدگی نهائی تخمدان می‌شود. رشد اووسیت ها یک فرآیند مستمر می باشد و زرده سازی در طول فصل تخم ریزی به شدت در حال انجام و به دلیل مقدار ۱۷-بتا استرادیول در زمان تخم ریزی در حد بالایی است. نقش هورمون های استروئیدی از جمله تستوسترون، ۱۷-بتا استرادیول کنترل رشد و توسعه بافتی گناد ماهیان و بالا رفتن شاخص گنادی در مراحل مختلف تکاملی، هم چنین رفتارهای جنسی ماهیان می باشد. کیفیت گامت ها(اسپرم و تخمک) می تواند بر روی موفقیت لقاح و بقاء لارو تأثیر بگذارند و آزمایش-های متعدد نشان داده اند که القای هورمونی به ویژه استفاده از هورمون های محرک جنسی راه حل مناسبی جهت تغییرات بافتی کبد و گنادها به علت فعالیت زرده-سازی و استروئیدزایی و بهینه نمودن فرآیند تولید اسپرم و تخمک و افزایش جواب دهی مولدین می شود(۶). در حال حاضر عصاره هیپوفیز تنها گزینه مورد استفاده جهت

تکثیر ماهی شیربت است. لذا تحقیق حاضر با هدف مقایسه تزریق سه مرحله ای$LHRHa_2$و عصاره هیپوفیز با روش تزریق دو مرحله ای عصاره هیپوفیز بر برخی شاخص های تولیدمثلی شامل جواب دهی مولدین نر و ماده، شاخص گنادوسوماتیک، هپاتوسوماتیک و استروئیدهای جنسی مولدین ماهی شیربت انتخاب گردیده و نتایج آن می تواند سبب شناخت پایه ای فیزیولوژی تولیدمثل این گونه در زمان تخم ریزی شده و مطالعه ای مقدماتی در مدیریت مولدین نر و ماده در شرایط تکثیر می باشد.

## مواد و روش ها

تعداد ۵۰ قطعه ماهی مولد ماده و ۳۰ قطعه ماهی مولد نر گونه *Arabibarbus grypus* از استخرهای پرورشی مرکز تکثیر ماهیان بومی دشت آزادگان اهواز توسط تورهای انتظاری صید و به استخرهای سرامیکی واقع در سالن تکثیر با گنجایش ۱۰۰۰ لیتر و جریان آب بیشتر نسبت به استخرهای خاکی انتقال داده شدند؛ منبع تغذیه آب استخرها، از آب رودخانه کرخه با pH حدود ۷/۷ ، آب در حال جریان و دمای آن حدود۲۲ درجه سانتی گراد بود. مولدین پس از صید از نظر ظاهری(ماده ها شکم نرم و متورم و منفذ تناسلی گلی رنگ، نرها خروج اسپرم غلیظ)، وزن، اندازه و سلامت بررسی و طول کل و وزن بدن اندازه گیری شد. ماهیان در محدوده وزنی ۲۱۰۰-۱۵۲۰ گرم ، طول کل آن ها ۵۰-۴۰ سانتی متر، سن ۳ سال و از لحاظ جنسی بالغ بودند. پس از زیست سنجی ماهیان جداسازی نر و ماده انجام شد. به منظور سازگاری با محیط جدید مولدین به مدت ۳ روز در استخرهای سرامیکی نگهداری و در طول مدت به منظور کاهش استرس تغذیه نشدند. هورمون $LHRHa_2$ ساخت شرکت Anaspec کشور کانادا و از شرکت تجاری آبزیان خریداری و فرمول شیمیایی آن به صورت ذیل می باشد: A (des-Gly10, { D-Ala6} LH-RH Ethylamid ). برای بیهوشی مولدین از ۲ فنوکسی اتانول با دوز ppm ۲۰۰ به مدت ۴ دقیقه استفاده و هورمون های مذکور به ۴ تیمار به ترتیب ذیل تزریق گردید:تیمار شاهد(تزریق دومرحله ای): عصاره محلول غده هیپوفیز به میزان ۴ میلی گرم به ازاء هر کیلوگرم(۹، ۸)، وزن بدن در دو مرحله(۱۰٪ مرحله اول و ۹۰٪ مرحله دوم ۱۲ ساعت بعد) طبق روند کاری مرکز تکثیر ماهیان بومی استان، تیمار۱: مرحله اول هورمون $LHRHa_2$ ۴ میکروگرم بر کیلوگرم، مرحله دوم ۱۰٪ محلول هیپوفیز ۰/۴ میلی گرم ۲۴ ساعت بعد و مرحله سوم ۹۰٪ یعنی ۳/۶ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره محلول غده هیپوفیز ۱۲ ساعت بعد، تیمار ۲: مرحله اول هورمون $LHRHa_2$ ۷ میکروگرم بر کیلوگرم، مرحله دوم ۱۰٪ محلول هیپوفیز ۰/۴ میلی گرم ۲۴ ساعت بعد و مرحله سوم ۹۰٪ یعنی ۳/۶ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره محلول غده هیپوفیز ۱۲ ساعت بعد و تیمار ۳: مرحله اول هورمون $LHRHa_2$ ۱۰میکروگرم بر کیلوگرم، مرحله دوم ۱۰٪ محلول هیپوفیز یعنی ۰/۴ میلی گرم ۲۴ ساعت بعد و مرحله سوم ۹۰٪ یعنی ۳/۶ میلی گرم عصاره محلول غده هیپوفیز ۱۲ ساعت بعد(۱۰، ۹، ۸). کلیه تزریقات در حالت بیهوشی نارکوزیس به روش داخل عضلانی و زیر باله سینه ای با زاویه حدود ۴۵ درجه انجام پذیرفت. هر ماهی پس از دریافت دوز مربوطه بر اساس وزن بدن در استخر سرامیکی با آب تازه رها شده و هوشیاری مجدد می‌یابد. ۱۴ -۱۲ ساعت پس از تزریق نهایی ماهی ها بیهوشی شده و به روش دستی عملیات استحصال تخمک و اسپرم انجام پذیرفت و درصد مولدینی که جوابدهی داشتند، محاسبه شد. به منظور سنجش هورمونی، خون گیری از ساقه دمی ماهیان به وسیله سرنگ های هپارینه قبل از تزریق ترکیب هورمونی و پس از استحصال اسپرم و تخمک انجام شد. سرم نمونه ها توسط سانتریفوژ با دور ۳۵۰۰ به مدت ده دقیقه جدا شده و در ویال های یک

سی سی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس برای اندازه گیری هورمونی به آزمایشگاه انتقال داده شدند. هورمون های مورد بررسی به روش الایزا با استفاده از دستگاه گاماکانتر LKB(ساخت کشور فنلاند) و به کارگیری کیت ایمونو تک(شرکت مارسل فرانسه) اندازه گیری شدند. جهت بررسی بافتی کبد و گناد، حفره شکمی کلیه ماهی های مورد تیمار ۱۲ ساعت پس از ترزیق مرحله دوم باز شد و گنادها از طریق کلید شناسایی براون و پترسون(۲۰۱۱) به صورت ماکروسکوپی تعیین مرحله و در انتها وزن کل ماهی، کبد و گنادها ثبت و شاخص گنادی از طریق فرمول های زیر محاسبه گردید(۲). مشاهدات و مقایسه مورفو هیستولوژیک تخمدان و بیضه از نظر وضعیت قرارگیری، رنگ و شکل ثبت گردید. شاخص گنادوسوماتیک: درصد نسبت وزن غددجنسی(گرم) به وزن کل ماهی(گرم). شاخص هپاتوسوماتیک: درصد وزن کبد(گرم) به وزن کل ماهی(گرم). جهت تجزیه و تحلیل داده ها درتیمارهای مختلف از نرم افزار SPSS وروش آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تکمیلی دانکن و جهت مقایسه دو به دو مقادیر هورمونی قبل از تزریق و بعد از تزریق از آزمونT student در سطح اطمینان ۹۵٪ استفاده شد.

## نتایج

نتایج سنجش هورمون های تولیدمثلی نر و ماده، قبل و بعد ازتزریق هورمون در جداول ۱و ۲آورده شده است که بیان گر افزایش معنی دار هورمون های استروئیدی(T: تستوسترون، P: پروژسترون و $E_2$:۱۷-بتا استرادیول) در روش تزریق سه مرحله ای نسبت به روش دو مرحله ای می باشد($p<0/05$).

**جدول ۱- میانگین هورمون های استروئیدی ماهی مولد نر در تیمارهای مختلف(نانوگرم بر میلی لیتر)**

| تیمار | T/ قبل تزریق | T/بعد تزریق | P/ قبل تزریق | P/ بعد تزریق | $E_2$/ قبل تزریق | $E_2$/ بعد تزریق |
|---|---|---|---|---|---|---|
| شاهد | ۳/۲ ±۰/۸۷$^{a}$ | ۳/۹ ±۰/۸۷$^{a}$ | ۰/۲۹ ±۰/۰۱$^{a}$ | ۰/۳۱ ±۰/۰۱$^{a}$ | ۱/۹±۰/۰۱$^{a}$ | ۲/۱±۰/۰۸$^{a}$ |
| اول | ۳/۳± ۰/۷۷$^{a}$ | ۴/۶ ± ۰/۹۷$^{b}$ | ۰/۳ ±۰/۰۳$^{a}$ | ۰/۴۵± /۰۲$^{b}$ | ۲/۰۱±۰/۰۷$^{a}$ | ۲/۹۵±۰/۰۷$^{b}$ |
| دوم | ۳/۱۸± ۰/۳۴$^{a}$ | ۵/۵ ± ۰/۶۴$^{ac}$ | ۰/۳۱± ۰/۰۴$^{a}$ | ۰/۵۷± ۰/۰۶$^{ac}$ | ۱/۹۵±۰/۰۹$^{a}$ | ۳/۹± ۰/۰۸$^{ac}$ |
| سوم | ۳/۱۶± ۰/۶۴$^{a}$ | ۵/۴۵ ± ۰/۵۴$^{ac}$ | ۰/۳۲± ۰/۰۳$^{a}$ | ۰/۵۴± ۰/۰۵$^{ac}$ | ۱/۸۷±۰/۰۸$^{a}$ | ۳/۷± ۰/۰۹$^{ac}$ |

حروف غیر مشابه به مفهوم اختلاف معنی دار بین میانگین گروه های مختلف در سطح ۹۵ درصد است.

**جدول ۲-میانگین هورمون های استروئیدی ماهی مولد ماده در تیمارهای مختلف(نانوگرم بر میلی لیتر)**

| تیمار | T/ قبل تزریق | T/بعد تزریق | P/ قبل تزریق | P/ بعد تزریق | $E_2$/ قبل تزریق | $E_2$/ بعد تزریق |
|---|---|---|---|---|---|---|
| شاهد | ۳/۹±۰/۷۶$^{a}$ | ۴/۱±۰/۴۷$^{a}$ | ۰/۲۸±۰/۰۲$^{a}$ | ۰/۲۹±۰/۰۱$^{a}$ | ۱/۶±۰/۰۱$^{a}$ | ۱/۸±۰/۰۵$^{a}$ |
| اول | ۳/۸۷± ۰/۸۷$^{a}$ | ۴/۹± ۰/۲۷$^{b}$ | ۰/۲۹±۰/۰۱$^{a}$ | ۰/۳۸± /۰۱$^{b}$ | ۱/۷۳±۰/۰۵$^{a}$ | ۱/۹۸ ± ۰/۰۷$^{b}$ |
| دوم | ۳/۹۲± ۰/۸۷$^{a}$ | ۵/۲± ۰/۳$^{ac}$ | ۰/۳± ۰/۰۵$^{a}$ | ۰/۴۴± ۰/۰۵$^{ac}$ | ۱/۶۳±۰/۰۴$^{a}$ | ۲/۹ ± ۰/۰۴$^{ac}$ |
| سوم | ۳/۹۳± ۰/۶۴$^{a}$ | ۵/۱± ۰/۳۴$^{ac}$ | ۰/۳۱± ۰/۰۳$^{a}$ | ۰/۴۳± ۰/۰۳$^{ac}$ | ۱/۷۱±۰/۰۶$^{a}$ | ۲/۷ ± ۰/۰۷$^{ac}$ |

حروف غیر مشابه به مفهوم اختلاف معنی دار بین میانگین گروه های مختلف در سطح ۹۵ درصد است.

تحلیل آماری نتایج جداول ۱ و ۲ نشان می دهد که میزان هورمون های تستوسترون، استروژن و پروژسترون قبل از تزریق در کلیه تیمارها اختلاف معنی داری ندارد($p\geq0/05$). اما هورمون های استروئیدی هر دو جنس نر و ماده در تیمار اول دارای اختلاف معنی داری با میزان سرمی آن ها در تیمار شاهد، دوم و سوم می-باشد($p<0/05$). در بررسی آماری سایر تیمارها، اختلاف معنی داری بین تیمار دوم و سوم مشاهده نشد ($p\geq0/05$). مقایسه دو به دو نتایج هورمونی قبل از تزریق و بعد از تزریق نشان دهنده اختلاف معنی دار می باشد به طوری که تزریق در هر دو روش دو و سه مرحله ای در کلیه تیمارها سبب افزایش معنی دار در میزان استروئیدهای

جنسی شده است($p<۰/۰۵$). نتایج مربوط به جواب دهی مولدین نر و ماده در جدول ۳ آورده شده و نشان می‌دهد که تزریق سه مرحله‌ای سبب پاسخ‌دهی بیشتر مولدین و موفقیت بالاتر نسبت به روش تزریق دومرحله‌ای می‌شود. تجزیه و تحلیل آماری نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد که تیمار اول مولدین نر و ماده دارای اختلاف معنی داری با میزان جواب دهی مولدین تیمار شاهد، دوم و سوم می-باشد($p<۰/۰۵$) و اختلاف معنی داری بین تیمار دوم و سوم مشاهده نشد($p\geq۰/۰۵$). بهترین نرخ جواب دهی در تیمار دوم و سوم تزریق سه مرحله‌ای و کم ترین آن در تیمار شاهد با تزریق دومرحله‌ای به دست آمد. مقایسه دو به دو نتایج مولد نر و ماده نشان دهنده اختلاف معنی دار بین آن ها می باشد به طوری که جنس نر در کلیه تیمارها دارای افزایش معنی داری نسبت به جنس ماده و جواب دهی بهتری می باشد($p<۰/۰۵$).

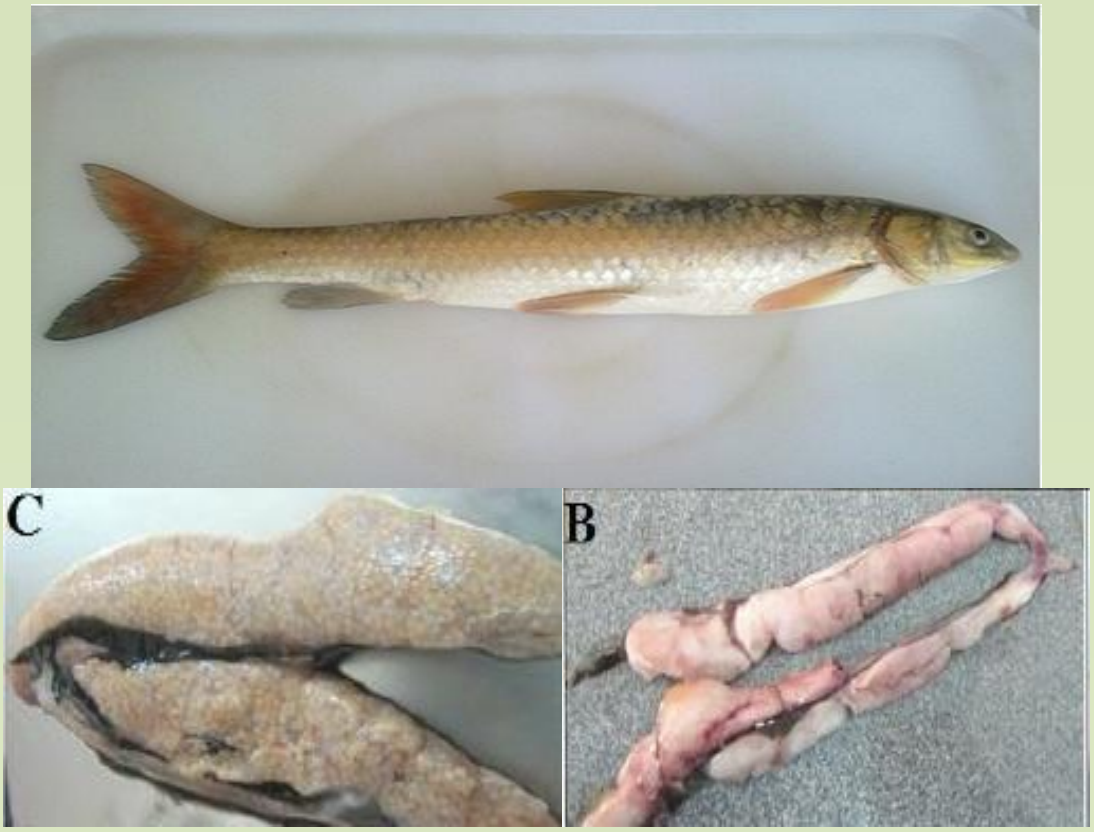
**جدول ۳-جواب دهی مولدین نر و ماده ماهی شیربت در تیمارهای مختلف**

| تیمار | دوز تزریقی | ماده تزریق‌شده | جوابدهی مولدین نر | جوابدهی مولدین ماده |
|---|---|---|---|---|
| **شاهد** | mg ۴ | هیپوفیز CPE | ٪۷۵[a] | ٪۶۰ [a] |
| **اول** | µg۴mg + ۴ | CPE +LHRHa$_2$ | ٪۸۸[b] | ٪۷۵ [b] |
| **دوم** | µg۷mg + ۴ | CPE +LHRHa$_2$ | ٪۸۷ [ac] | ٪۸۷ [ac] |
| **سوم** | µg۱۰mg + ۴ | CPE +LHRHa$_2$ | ٪۸۸[ac] | ٪۹۰ [ac] |

مشاهدات مورفولوژیک تخمدان ها و بیضه ها در مولدین نر و ماده کلیه تیمارها مرحله رشد رسیده(Ripe) را نشان داد(شکل ۱ الف تا ج). تخمدان ها به صورت یک زوج ساختمان های طویل بوده که در طول قسمت جانبی و شکمی کیسه شنا، در زیر دیواره محوطه بطنی قرار گرفته اند و در قسمت خلفی به یک دیگر متصل شده و از طریق منفذ تناسلی به خارج باز می شدند. بیضه-ها به بزرگ ترین حد رشد خود رسیده و اسپرم با یک فشار آرام بر محوطه شکمی خارج می شوند، بیضه ها کاملاً سفید رنگ و لوبوله هستند. تخمدان و بیضه های ماهیان در کلیه تیمارها، از نظر وزنی اندک تفاوتی داشتند و تفاوت قابل ملاحظه ای در تیمارهای مختلف هنگام تشریح داخلی مشاهده نگردید. نتایج اندازه گیری شاخص های کبدی و گنادی در جدول ۴ آورده شده است. نتایج جدول نشان می دهد که در بین ماهیان با افزایش وزن بدن میانگین وزن کبد و گناد افزایش پیدا می کند. تجزیه و تحلیل آماری نتایج جدول ۴ نشان می‌دهد که دو شاخص کبدی و گنادی تیمار اول مولدین نر و ماده دارای اختلاف معنی داری با نتایج تیمار شاهد، دوم و سوم می باشد($p<۰/۰۵$)، و اختلاف معنی داری بین تیمار دوم و سوم مشاهده نشد($p\geq۰/۰۵$). بهترین درصد شاخص ها در تیمار دوم و سوم تزریق سه مرحله‌ای و کم ترین آن در تیمار شاهد با تزریق دو مرحله‌ای به دست آمد. مقایسه دو به دو نتایج مولد نر و ماده نشان دهنده اختلاف معنی دار بین آن ها می باشد به طوری که جنس ماده در کلیه تیمارها دارای افزایش معنی داری نسبت به جنس ماده و دارای درصد بالاتر شاخص کبدی وگنادی می باشد($p<۰/۰۵$).

جدول٤- شاخص کبدی HSI و گنادی GSI مولدین نر و ماده ماهی شیربت در تیمارهای مختلف

| تیمار | HSI نر | GSI نر | HSI ماده | GSI ماده |
|---|---|---|---|---|
| شاهد | ٪۲/۵[a] | ٪۸[a] | ٪۲/۹[a] | ٪۱۹[a] |
| اول | ٪۲/۹[b] | ٪۸/۵[b] | ٪۳/۱[b] | ٪۲۵[b] |
| دوم | ٪۳[ac] | ٪۸/۷[ac] | ٪۳/۵[ac] | ٪۲۸[ac] |
| سوم | ٪۳/۴[ac] | ٪۹[ac] | ٪۳/۶[ac] | ٪۲۹[ac] |




شکل ۱-مشاهدات مورفولوژیک A) ماهی شیربت، B) بیضه،C) تخمدان

## بحث و نتیجه گیری

بررسی بر مطالعات انجام شده بر کیفیت اثر سیستم-های آدرنرژیک و $LHRHa_2$ و روش تزریق(سه یا دو مرحله ای) در ارتباط با تغییرات میزان هورمون های استروئیدی جنسی بر ماهیان بومی نشان می دهد اطلاعات قابل ملاحظه ای در کشور در خصوص اکثر گونه ها وجود ندارد. مقدار آندروژن ها در ماهیان استخوانی، بین کمتر از ۱۰ نانوگرم/میلی لیتر در ماهی پروتاندروس پاراموندی تا ۳۰۰ نانوگرم/میلی لیتر در ماهی کفشک می‌باشد(۸). در پژوهش حاضر میزان استروئیدهای جنسی قبل از تزریق هورمون به منظور مقایسه میزان تأثیر القاء هورمونی اندازه گیری شد و اختلاف معنی داری در کلیه ماهیان در هر جنس مشخص نشد($p\geq ۰/۰۵$). بین جنس نر و ماده اختلاف میزان هورمون ها وجود دارد که با توجه به تفاوت جنسیت و بلوغ ماهیان این نتیجه با سایر مطالعات مطابقت دارد(۱۳)، کمتر بودن مقادیر هورمونی قبل از تزریق نشان می دهد القای هورمونی به ویژه استفاده از محرک های جنسی راه حل مناسبی جهت بهینه نمودن فرآیند تولید اسپرم و تخمک و بالا رفتن کیفیت آن ها می شود(۶). میزان هورمون تستوسترون

تیمار دوم مولدین نر ۰/۶۴ ± ۵/۵ و مولدین ماده ۰/۳ ± ۵/۲ نانوگرم در میلی لیتر به دست آمد که بهترین نتیجه در تیمارها بود. تستوسترون در پلاسمای خون به عنوان پیش ساز تولید ۱۷ بتا استرادیول عمل می نماید و این هورمون سبب کنترل رشد و توسعه گناد ماهی در مراحل مختلف تکاملی و رفتارهای جنسی ماهی می باشد. میزان بالای تستوسترون در مرحله قبل از اوولاسیون می تواند به دلیل فعالیت آنزیم کلیدی در استروئیدزایی باشد به طوری که فولیکول ها آماده سنتز پروژسترون ها می شود لذا این عوامل می تواند موید حضور مقادیر سرمی استروئیدهای جنسی مورد مطالعه قبل از تزریق باشد(۱). سطوح بالای هورمون تستوسترون تا رسیدگی نهایی می-باشد و پس از تخم ریزی کاهش یافته تا به حداقل میزان خود برسد؛ هم چنین با شروع تخم ریزی ۱۷-بتا استرادیول افت شدید می یابد که به نظر می رسد پس از اتمام زرده سازی و رشد حداکثری گنادها اتفاق افتاده است(۸). پس از تزریق بیشترین میزان هورمون های تستوسترون، پروژسترون و ۱۷ بتا استرادیول در تیمار دوم تزریق سه مرحله ای با مقادیر۰/۳± ۵/۲، ۰/۰۵± ۰/۴۴و ۰/۰۴± ۲/۹ نانوگرم در میلی لیتر جهت مولدین ماده و ۰/۶۴ ± ۵/۵، ۰/۰۶ ±۰/۵۷ و ۰/۰۸ ± ۳/۹ نانوگرم در میلی لیتر جهت مولدین نردیده می شود که اختلاف معنی داری با تزریق دو مرحله ای دارد. افزایش استروئیدهای جنسی در اثر القاء هورمونی با پژوهشی که گلمرادی و همکاران در سال ۱۳۹۱ بر میزان استروئیدهای جنسی مولد نر ماهی سوف سفید در اثر القاء هورمونی با هورمون گنادوتروپین انسانی انجام دادند مطابقت دارد. افزایش تستوسترون سبب افزایش ۱۷ بتا استرادیول در خون ماهی می شود تا سبب رشد اووسیت ها و اسپرم شود (۱). هورمون تستوسترون و ۱۱-کتو تستوسترون در ماهی نر با تأثیر بر سلول های لایدیگ موجب افزایش تولید اسپرماتید می شود(۶). با شروع تخم ریزی میزان تستوسترون و به دنبال آن ۱۷ بتا استرادیول افت شدید می‌یابد که این نتیجه با خون گیری از ماهی پس از تخم کشی محتمل است(۸). کاهش مقادیر ۱۷ بتا استرادیول سبب افزایش تبدیل پروگنولون به پروژسترون شده و پروژسترون در یک دوره کوتاه افزایش یافته که بیان گر نقش محدود آن بر عملکرد تخمدان و هم چنین نقش غیر مستقیم آن در رسیدگی نهایی تخمک ها از طریق دی هیدروکسی پروژسترون می باشد(۱) این نتیجه در مطالعه حاضر به دست نیامد چرا که بیشینه مقدار دو هورمون در یک زمان مشاهده گردید و احتمالاً در صورت نمونه برداری در فواصل منظم یک ساعته در طول ۴۸ ساعت بعد از تزریق(و تخم کشی) ازمولدین می‌توان به این مهم دست یافت. هورمون پروژسترون با تغییر pH پلاسما در مجرای اسپرم بر موجب افزایش تحرک و تولید اسپرماتوزوآ در این مجرا می گردد(۶). یکی از معیارهای مهم در شاخص‌های بیوتکنیک گونه‌های مختلف رسیدگی جنسی و جواب دهی مولدین است. ماهی شیربت *A. grypus* در رودخانه مراحل اولیه رسیدگی جنسی را طی می‌نماید و مرحله سوم رسیدگی از آبان تا اسفندماه مشاهده می‌شود(۶). نتایج به‌دست‌آمده از جواب دهی مولدین نر و ماده نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار و موفق درصد جواب دهی در تزریق سه مرحله‌ای تا ۹۰٪ نسبت به روش دومرحله‌ای است. جنس نر جواب دهی بیشتری نسبت به جنس ماده دارد و این نتیجه با نتیجه تحقیقات سواری و همکاران(۱۳۹۱) و محمدیان و همکاران(۱۳۹۳) مطابقت دارد. این نتیجه تأثیر مثبت و مطلوب دوز هورمونی و روش تزریق(سه مرحله‌ای) را در تیمار دوم و سوم(و جنس نر) نسبت به سایر دوزها و روش دومرحله‌ای(و جنس ماده) در تیمارهای دیگر نشان می‌دهد. هم چنین در مقایسه با دیگر کیت‌های القاء کننده مانند اووتاید و اواپریم وغیره در تحقیقات محمدیان و همکاران در سال ۱۳۸۸ بسیار

مؤثرتر و باصرفه‌تر است. نتایج مورفوهیستولوژی بیضه و تخمدان نشان داد که مورفولوژی گنادهای ماهی شیربت در کلیه تیمارها به علت القای هورمونی صورت گرفته و رسیدن ماهی به فاز رسیدگی نهایی Ripe تفاوت قابل توجهی ندارد و از نظر رنگ تخمدان ها همگی شیری، شکل بادامی و بیضه ها سفیدرنگ و پرخون بوده و از نظر حجم و وزن تفاوت معنی داری با یک دیگر ندارند زیرا نمونه ها در طول فصل تکثیر و از بین ماهی های بالغ(رسیده) انتخاب و صید شده و مورد القای هورمونی قرار گرفتند. این نتیجه با پژوهش خدادادی و همکاران در سال ۱۳۸۸ و پوراسماعیلیان و همکاران در سال ۱۳۹۵ مطابقت دارد. بهترین نتیجه شاخص کبدی در جنس نر ۳٪ و در جنس ماده ۳/۵٪ و شاخص گنادی در جنس نر ۸/۷٪ و در جنس ماده ۲۸٪ در تیمار دوم باروش تزریق سه مرحله ای به دست آمد؛ که علاوه بر این که مناسب بودن روش تزریق و غلظت هورمونی به کار رفته را نشان می دهد، بیان گر وجود اختلاف معنی دار در وزن کبد و گنادها بین جنس نر و ماده می باشد، به طوری که جنس ماده دارای شاخص گنادی بالاتری است، لذا وزن نسبی تخمدان بالاتر از وزن نسبی بیضه با اختلاف کمتر اما معنی دار وزن نسبی کبد در جنس ماده بالاتر از جنس نر است. این نتایج نشان دهنده تأثیر هورمون های استروئیدی در فرآیند زرده سازی و افزایش وزن کبد و سپس تخمدان است و توسط بنائی و همکاران در سال ۱۳۹۳ به دست آمد که تأییدی برنتایج این مطالعه است. افزایش معنی دار مقادیر هورمونی در روش تزریق سه مرحله ای در تیمار دوم و سوم نسبت به سایر دوزها و روش دو مرحله ای در تیمارهای دیگر تأثیر مثبت و مطلوب غلظت هورمونی به کار رفته و روش تزریق را نشان می دهد. در تحقیق حاضر اختلاف معنی داری بین تیمار دوم و سوم که از میزان بیشتری هورمون $LHRHa_2$ ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن استفاده می نماید، مشاهده نشده است. با توجه به این که هورمون $LHRHa_2$ از قیمت جهانی بالایی برخوردار است لذا استفاده بیشتر از هورمون علاوه بر این که صرفه اقتصادی ندارد قادر به ایجاد اثر بالاتر بر محور هورمونی نیست لذا غلظت ۴ میلی گرم عصاره هیپوفیز و ۷ میکروگرم در کیلوگرم وزن بدن $LHRHa_2$(تیمار دوم) و روش تزریق سه مرحله‌ای که دارای اختلاف معنی داری از نظر هورمونی با روش تزریق دو مرحله ای و سایر تیمارها می باشد پیشنهاد می گردد.

## تشکر و قدردانی

این مقاله، مستخرج از طرح پژوهشی درون دانشگاهی تحت عنوان بررسی تزریق سه مرحله‌ای هورمون LH و عصاره غده هیپوفیز بر شاخص‌های بیوتکنیک تکثیر مصنوعی مولدین شیربت استخراج شده و هزینه آن توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز تأمین گردیده است که بدین‌وسیله قدردانی می‌گردد.

## منابع

**۱**–پور اسماعیلیان، م.، خارا، ح.، احمد نژاد، م. ۱۳۹۵. بررسی هورمون های جنسی و بافت شناسی تخمدان مولد ماده شاه کولی مهاجر به تالاب انزلی .مجله زیست شناسی جانوری تجربی. سال پنجم. شماره اول. صفحات ۲۲-۹.

**۲**–بنایی، م.، قربانی، م.، نادری، م. ۱۳۹۳. زیست شناسی تولیدمثل ماهی حمری. مجله بوم شناسی آبزیان. دوره ۴. شماره ۲. صفحات ۴۶-۳۵.

**۳**–حسین زاده صحافی، ه. ۱۳۸۱. بیولوژی تولیدمثل در ماهی ها با تأکید بر ماهی های ایران. شماره ۱. تهران. موسسه نشر جهاد دانشگاهی. صفحات ۱۷۰-۱۰۰.

**٤**–خدادادی، م.، دزفولیان، ع.، محمدی، غ.، دستگیر، ت. ۱۳۸۸. مطالعه ی برخی شاخص های مورفولوژیک بیضه ماهی بنی تالاب شادگان. مجله پژوهش های علوم و فنون دریایی. سال چهارم. شماره دوم. صفحات ۴۶-۳۵.

**۵**–ستاری، م. ۱۳۸۱. ماهی‌شناسی۱تشریح و فیزیولوژی. شماره . ۲. تهران. انتشارات نقش مهر. صفحات ۵۲۰–۴۴۰.

۶–سواری، ع. ۱۳۹۱. بررسی تزریق عصاره هیپوفیز و $LHRHa_2$ بر رسیدگی جنسی ماهی گطان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات خوزستان.

**۷**–کد، ب.، عبدلی، ا. ۱۳۷۵. تنوع زیستی ماهیان آب شیرین ایران. ماهنامه آبزیان. سال هفتم. شماره ۱. صفحات ۱۱–۴.

**۸**–گلمرادی، ا.، سجادی، م.، فلاحتکار، ب.، عفت پناه کمایی، ا.، حمزه نژاد بانگودی، م. ۱۳۹۱. تأثیر هورمون گنادوتروپین انسانی و عصاره هیپوفیز کپور بر سطوح هورمون های جنسی، شاخص های استرس و کیفیت اسپرماتوزوآ در مولدین نر ماهی سوف سفید. مجله بهره برداری و پرورش آبزیان. جلد اول، شماره سوم. صفحات ۸۵–۶۵.

**۹**–محمدیان، ت.، کوچینین، پ.، نیکو، س.، شیخ الاسلامی، م.، سراج، ب.، اسکندری، غ. و همکاران. ۱۳۸۸. مقایسه ی تأثیر آنالوگ هورمون به روش لینپه، با عصاره هیپوفیز بر شاخص های رسیدگی بنی. مجله دامپزشکی ایران. سال پنجم. شماره دوم. صفحات ۸۰–۷۱.

**۱۰**–محمدیان، ت.، سیلاوی، م.، حسینی، ا.، روحانی، س.، محمدی، ا. ۱۳۹۳. مقایسه تأثیرتزریق ۳ مرحله ای هورمون و عصاره هیپوفیز با تزریق ۲ مرحله ای عصاره هیپوفیز بر عملکرد تولیدمثلی ماهی بنی. مجله دامپزشکی ایران. دوره دهم، شماره ۱. صفحات ۹۵–۸۵.

**۱۱**–معبودی، ح.، جواد زاده، ن.، سواری، ع. ۱۳۹۳. بررسی تزریق تلفیقی عصاره غده هیپوفیز و $LHRHa_2$ بر شاخص‌های تکثیر مولدین بنی با اوزان بالای ۱/۵ کیلوگرم. گزارش نهایی طرح. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات خوزستان.

**12.**BosakKahkesh, F., YooneszadehFeshalmi, M., Amiri, F. Nickpey, M. (2011). Effect of ovaprim, ovatide, HCG,LHRH-A2, LHRH-A2+CPE and carp pituitary in Shirbut Arabibarbus grypus artificial breeding. World Journal of Fish and Marine Science, 3 (6); 548-552.

**13.**Mussavi, M., Nelson, E. R., Habibi, H. R. (2009). Seasonal regulation of vitellogenin by growth hormone in the goldfish liver. General and Comparative Endocrinology, 161; 79-82.

**13.**Mustafa, A., Al Mukhtar, S., Al Noor, J. H. S. (2006). General reproduction Biology of Bunni (*Arabibarbus sharpyi* Gurter, 1874) in Al Huwaizah Marsh Basra-Iraq. Turkish Journal of fisheries and Aquatic Sciences, 6; 149-153.

**14.**Mylonas, C.C., Fostier, A., Zanuy, S. (2010). Broodstock management and hormonal manipulation of reproduction. Aquaculture, 165; 516-534.

**15.**Pankhurst, N. W., Kime, D. E. (1991). Plasma sex steroid levels in male blue cod (*Paraper ciscolias*) (Pinguipedidade) sampled underwater during the spawning season. Australian Journal of Marine and Freshwater Research, 42; 129-137.

# The Comparison on 3-Phasic Integrated Effect of $LHRHA_2$+CPE with Pituitary Gland Extract on Some Histologic and Reproductive Indexes and Sexual Steroids(Male&Female) of *Arabibarbus grypus*

**H. Mabudi**[1], N. Javadzadeh[2], A. Savari[3], M. Agir[4]

**1.** Assistant Professor Of Fishery Department, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz. Iran.
**mikhak1311@yahoo.com**

**2.**Assiciate Professor Of Fishery Department, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz. Iran.

**3.**Graduated of MSc, Azadegan Breeding and Reproduction Center, Ahvaz. Iran.

**4.**Graduated of MSc, Coldwater fish culture Center, Tonekabon. Iran.

**Received:2018.15.1** **Accepted: 2018.9.4**

## Abstract

**Inroduction & Objective:** ***Arabibarbusgrypus*** **is one of the economic valuable native species that the aim of the project is to assay the effectiveness of $LHRHa_2$ combined with carp pituitary extract(3 steps way) and carp pituitary extract(2 steps way) on some histologic and reproductive indexes,estrogen, progesterone and testosterone hormone in male and female.**

**Methods and material: 50 pieces of fish in 4 treatments(40 fish were treated with 3 steps and 10 fish with 2 steps) were studied. Control treatment 4mg/kg pituitary extracts , first treated 4mg/kg CPE+ 3µg/kg LHRHa2, second treatment 4mg/kg CPE+7µg/kg LHRHa2 and third treatment 4mg/kg CPE+ 10µg/kg LHRHa2. The blood samples were collected before and after injection, then testosterone, progesterone and 17-β,estradiol were measured with ELISA method, then the ovule and sperm were obtained and the answer of male and female bloodstocks was recorded. After 24 hours the fish dissection was done, then the gonad morphology, gonad and liver weight for GSI and HSI measuring were recorded.**

**Results: The results obtained that (in mail) the steroidal hormone (T, P, $E_2$), Answer of broad stocks and GSI, HSI were 5.2 ± 0.3, 0.44 ± 0.05, 2.9 ± 0.04 ng/ml, 90%, ۲5% and 3.5% that was increased in second treatment (3 steps way) compared to the other treatments (2 steps way) ($p < 0.05$). The similar results were obtained in female. No difference was seen in gonad morphology, So, it is mature in all treatments.Therefore, the 3 steps way andsecond treatment dose used is the best way and concentration for artificial reproduction of Shabout.**

**Keywords:** $LHRHa_2$, Pituitary Gland, Steroidal Hormone, Shabout.