مجله شیلات
سال اول، پیش‌شماره سوم، پاییز ۸۶

مطالعه فیزیولوژی تولیدمثل در مولدین ماده کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) با استفاده از پروفیل استروئیدهای جنسی و مطالعات بافت شناسی

[*]افشین قلیچی[۱]، شهربانو عریان[۲]، محمدرضا احمدی[۳]، عبدالمجید حاجی‌مرادلو[۴] و سارا جرجانی[۵]

[۱]استادیار گروه شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزادشهر، [۲]استاد دانشگاه تربیت معلم تهران، [۳]دانشیار دانشگاه تهران،
[۴]دانشیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۵]مربی دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزادشهر
E-mail: afshin_ghelichi@yahoo.com

چکیده

طی یک دوره شش ماهه (از مرداد تا دی ماه سال ۱۳۸۰) مراحل رسیدگی تخمدان ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) (دوره تکامل تخمدان) در استخرهای پرورشی جنوب شرق دریای خزر (گمیشان) از نظر بافت شناسی مورد بررسی قرار گرفت. در طی این بررسی مراحل مختلف تکامل تخمک‌ها (تغییرات هسته و قطر تخمک و چگونگی ایجاد وزیکول‌های زرده، دانه‌های زرده و قطرات چربی) بررسی شد. جهت القاء بلوغ نهایی، به دوازده ماهی ماده کفال خاکستری دو تزریق هورمونی به فاصله ۲٤ ساعت با ترکیبی از هورمون‌های هیپوفیز کپور به‌مقدار ۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در مرحله اول و ترکیبی از hCG به میزان ۲۰ واحد بین‌المللی به ازای ۱۰۰ گرم وزن بدن و هیپوفیز کپور به مقدار ۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در مرحله دوم صورت گرفت. به سه کفال دیگر که به عنوان شاهد در نظر گرفته شد، فقط سرم فیزیولوژی تزریق شد. از تمام ماهیان نمونه‌هایی از تخمدان و خون در چهار زمان (۰، ۲٤، ۳۰ و ٤۸ ساعت پس از تزریق اول) برداشته شد. نمونه‌های خون در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و در پایان نمونه‌برداری، مقادیر۱۷ بتا- استرادیول، تستوسترون و ۱۷ آلفا-هیدروکسی پروژسترون در سرم خون با روش رادیوایمونواسی تعیین شد. هشت قطعه از ماهیانی که به آنها هورمون تزریق شده بود، تخم‌ریزی نمودند. در سرم خون این ماهیان، مقادیر۱۷ بتا- استرادیول و تستوسترون تا ۲٤ ساعت پس از تزریق اول افزایش یافت و به‌ترتیب به ۳/۷۷۸ و ۱٦/۸۰٤ نانوگرم در میلی‌لیتر رسید. افزایش ناگهانی استروئید ۱۷ آلفا- هیدروکسی پروژسترون همزمان با کاهش مقادیر۱۷ بتا- استرادیول و تستوسترون بود. این تغییرات همزمان با مراحل آبگیری تخمک‌ها، شکستن وزیکول زاینده و اوولاسیون بود. تخمک‌های این ماهیان در ابتدای آزمایش مراحل زرده‌زایی را کامل نموده بودند. نوسانات استروئیدها در ماهیانی که تخم‌ریزی نکردند، با تأخیری نسبت به ماهیان تخم‌ریزی کرده همراه بود. تخمک‌های این ماهیان در ابتدای آزمایش مراحل زرده‌زایی را کامل نکرده بودند. هیچ تغییر معنی‌داری در مراحل رسیدگی تخمک‌ها و مقادیر ۱۷ بتا- استرادیول، تستوسترون و ۱۷ آلفا- هیدروکسی پروژسترون ماهیان شاهد مشاهده نگردید. نتایج حاصله از مطالعات بافت‌شناسی نشان داد که مرحله اول و دوم رشد تخمدان در مرداد و اوایل شهریور، مرحله سوم در شهریور و مرحله چهارم در مهر و آبان صورت می‌گیرد. از این مرحله به بعد تکامل تخمک‌ها متوقف می شود. بنابراین از آبان ماه می‌توان مولدین را جهت رسیدگی نهایی، تحت القاء هورمونی قرار داد. همچنین با توجه به نتایج حاصل از بررسی پروفیل استروئیدهای جنسی، تستوسترون، ۱۷ بتا- استرادیول و ۱۷ آلفا- هیدروکسی پروژسترون تحت تاثیر هورمون‌های گنادوتروپین، در تکامل تخمک‌های کفال خاکستری نقش کلیدی را ایفا می‌نمایند.

واژه‌های کلیدی: استروئیدهای جنسی، القاء تخم‌ریزی، رسیدگی تخمک، کفال خاکستری (*Mugil cephalus*)

مقدمه

کفال ماهیان از گذشته های دور مورد توجه بوده‌اند. بیست گونه از این ماهیان در جهان پرورش داده می‌شوند که کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) مهمترین گونه پرورشی است (٦). کفال خاکستری یکی از ماهیان استخوانی یوری هالین است که در استخرهای پرورش ماهی با سیستم نیمه متراکم، پرورش داده می‌شود (٤). کفال خاکستری به دلیل استفاده از موجودات کفزی، بعنوان بهبود دهنده بیولوژیک مؤثردر آبزی پروری به شمار می‌رود (٢١). این ماهی در عرضهای جغرافیایی ٤٠ درجه شمالی و جنوبی گسترش دارد (١٣).

در دریای خزر در سالهای ٣٤–١٩٣٠ دانشمندان شوروی سابق گونه‌های مختلف کفال ماهیان که عبارت بودند از کفال خاکستری (*Mugil cephalus*)، کفال پوزه‌دار (*Liza saliens*) و کفال طلایی (*L.auratus*) را از دریای سیاه پیوند زدند. پیوند دو گونه اخیر موفقیت‌آمیز بود و در حال حاضر از اهمیت اقتصادی زیادی برخوردار بوده و جایگاه شیلاتی مطلوبی را به خود اختصاص داده‌اند. ولی پیوند *M.cephalus* چندان موفقیت‌آمیز نبوده و بندرت صید گردیده است (٣).

امروزه در اغلب موارد بچه ماهیان انگشت قد جهت پرورش از محیطهای طبیعی تهیه می‌شوند (٤). در طبیعت کفال خاکستری در آب دریا تخم‌ریزی می‌کند ولی می‌تواند در آب‌هایی با شوری پائین‌تر رشد نماید. با این وجود مولدین تحت شرایط پرورشی قادر به تخم‌ریزی نیستند، حتی اگر شوری معادل شوری دریا برای آنها فراهم شود (٤). برخی از ماهیان نظیر کفال خاکستری در شرایط پرورشی تخم‌ریزی نمی‌نماید، بنابراین از هورمون‌های مختلفی نظیر هیپوفیز کفال خاکستری (٣٣)، هیپوفیز کپور معمولی (٣٥) و hCG (١٥) جهت القاء تخم‌ریزی این ماهی استفاده می‌شود. تولید مثل در ماهیان تحت کنترل محور هیپوتالاموس– هیپوفیز – گناد می‌باشد. عدم انجام تخم‌ریزی کفال خاکستری در شرایط پرورشی احتمالاً به‌دلیل اختلال در یک یا چند مسیر از این محور می‌باشد. فقدان گنادوتروپین در جریان خون مولدین پرورشی ممکن است ناشی از مقدار ناکافی گنادوتروپین در هیپوفیز، ترشح ناکافی هورمون رهاکننده گنادوتروپین (GnRH) از هیپو تالاموس یا ترکیبی از این دو باشد (٢٣).

تغییرات بافت‌شناسی تخمک‌ها در طول تخمک‌زایی در کفال خاکستری مشابه اکثر ماهیان ماهیان دریایی دیگر است (٧ و٩). اووگونی‌هایی که در تخمدان پراکنده هستند، حاصل تقسیم میتوزی می‌باشند. سپس این اووگونی‌ها شروع به تقسیم میوزی می‌نمایند. از این مرحله به آنها اووسیت اولیه می‌گویند. سپس اووسیت‌های اولیه در یک مدت طولانی که شامل چند مرحله است، رشد می‌نمایند. در ابتدا مرحله پیش زرده‌زایی[1] انجام می‌شود که در طی این مرحله هم رشد سیتوپلاسمی و هم رشد هسته‌ای صورت می‌گیرد (مرحله ١ و٢). شکل‌گیری فولیکول در مرحله دوم می‌باشد که تا مرحله چهارم توسعه می‌یابد. یکی از وظایف فولیکول‌ها ترشح استروئیدهای تخمدان می‌باشد. به محض شکل‌گیری فولیکول مرحله زرده‌زایی آغاز می‌گردد. در طول این مرحله، مواد زرده‌ای با فرمول‌های مختلف شیمیایی در تخمک تجمع می‌یابند. این مواد در پاسخ به ترشح ١٧بتا– استرادیول (E_2) از فولیکول به خون، توسط سلول‌های کبدی بداخل جریان خون راه یافته و در نهایت بوسیله مویرگ‌هایی که در مجاورت فولیکول قرار دارند، از طریق میکروپینوسیتوز وارد تخمک می‌گردند (٣٤). به محض پایان یافتن زرده‌زایی در صورت تحریک مصنوعی اتفاقاتی در فولیکول رخ می‌دهد که به موجب آن رسیدگی نهایی و اوولاسیون تخمک صورت می‌گیرد. این مراحل با مهاجرت هسته (که در این حال وزیکول زاینده[2] نامیده می‌شوند) از مرکز به قطب حیوانی در حاشیه تخمک صورت می‌گیرد. سپس غشای وزیکول زاینده شکسته شده و تقسیم میوز که در مراحل اولیه تخمک‌زایی متوقف شده بود، دنبال می‌گردد. در طول بلوغ تخمک اولین تقسیم میوز پایان‌یافته و اولین جسم قطبی خارج می‌گردد. در این هنگام تغییراتی چون ترکیب دانه‌های

1- Previtellogenesis
2- Germinal vesicle

زرده و قطرات چربی اتفاق می‌افتد که به موجب آن تخمک‌ها شفاف‌تر شده و قطر آن به‌علت آبگیری افزایش می‌یابد (مرحله ۵). سپس تقسیمات میوز تا متافاز دوم ادامه یافته و تخمک‌ها در این مرحله اوول و آماده لقاح می‌شوند.

در این تحقیق روند رسیدگی جنسی تخمدان این ماهی به مدت شش‌ماه (همزمان با شروع مراحل تکامل تخمک‌ها) به‌منظور اطمینان یافتن از تکمیل مرحله زرده‌زایی در تخمک‌های ماهیان کفال نگهداری شده در گمیشان، بررسی شده است. همچنین تعیین زمان مراحل مختلف رشد تخمک و در نتیجه زمان شروع استفاده از القاءکننده‌های رسیدگی از طریق تعیین زمان تکمیل مرحله زرده‌زایی، مورد بررسی قرار گرفته است. علاوه بر آن سعی شده است تا با بررسی نوسانات استروئیدهای جنسی ۱۷ بتا- استرادیول، تستوسترون و ۱۷ آلفا- هیدروکسی پروژسترون، اطلاعات پایه‌ای از فیزیولوژی تکثیر این ماهی بدست آورد تا علاوه بر ارائه روشی جهت مطالعه فیزیولوژی تولید مثل، گامی در جهت تکثیر این ماهی با ارزش برداشته شود.

مواد و روش کار

از مرداد ماه (همزمان با شروع رشد تخمدان) تا دی ماه سال ۱۳۸۰، نمونه‌برداری از تخمدان ماهیان کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) انجام شد. به این صورت که یکی از استخرهای نگهداری مولدین که شرایط تغذیه‌ای مناسب داشت، انتخاب شده و در نیمه اول ودوم هر ماه، ده عدد ماهی ماده کفال خاکستری (در مجموع ۱۲۰ نمونه) به‌طور تصادفی انتخاب و بوسیله کانولا قطعه‌ای از تخمدان آن بدون آسیب دیدن ماهی جدا و در مایع فیکساتیو، ثابت گردید. شوری آب استخر پرورشی در مرداد ۲۲ گرم در لیتر بود که به‌تدریج تا آبان به ۳۰ گرم درهزار رسانده شد. در ماه‌های بعد شوری تقریباً ثابت بود. میانگین دما در مرداد ۳۰ درجه سانتی‌گراد، در شهریور ۲۸ درجه سانتی‌گراد، در مهر ۲۰ درجه سانتی‌گراد، در آبان ۱۶ درجه سانتی‌گراد، در آذر ۱۲ درجه سانتی‌گراد و در دی ماه ۱۰ درجه سانتی‌گراد بود. مقدار pH در طول مدت نمونه‌برداری بین ۸/۶-۷/۸ در نوسان بود.

پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه آبگیری از آنها صورت گرفت. سپس آنها را در متیل بنزوئیت و یا گزیلول شفاف نموده و در پارافین جامد بلوک‌گیری شد. مقاطعی با ضخامت ۸-۵ میکرون بوسیله میکروتوم برداشته و نمونه‌ها بوسیله هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند (۱۰).

مراحل مختلف رسیدگی تخمدان با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق از تقسیم بندی ٦ مرحله‌ای که توسط سلوکانما و همکارانش در سال ۱۹۸۱ برای ماهی کفال خاکستری در نظر گرفته شد، استفاده گردید (۳۱). قطر تخمک بوسیله میکرومتر چشمی اندازه‌گیری شد. برای این منظور ٦۰ عدد تخمک بصورت تصادفی در هر مرحله رشد تخمک جدا و قطر آنها اندازه‌گیری گردید. به‌دلیل اینکه رشد تخمدان ماهی کفال خاکستری در شرایط پرورشی در مرحله‌ای متوقف می‌شود از روش القاء هورمونی جهت تکمیل روند رشد تخمدان استفاده می‌گردد.

جهت بررسی نوسانات استروئیدهای جنسی ۱۷ بتا- استرادیول، تستوسترون و ۱۷ آلفا- هیدروکسی پروژسترون پانزده عدد ماهی ماده کفال خاکستری که تخمک‌های آنها در مرحله چهار رسیدگی جنسی (مرحله دانه‌های زرده) بودند، از یک استخر نگهداری مولدین واقع در مرکز تکثیر و پرورش گمیشان به صورت تصادفی انتخاب شدند. به دوازده ماهی دو تزریق هورمونی به فاصله ٢٤ ساعت با ترکیبی از هورمون‌های هیپوفیز کپور به مقدار ۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در مرحله اول و ترکیبی از hCG به میزان ۲۰ واحد بین‌المللی به ازای ۱۰۰ گرم وزن بدن و هیپوفیز کپور به مقدار ۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در مرحله دوم صورت گرفت (۱۳ و ۱۸). به سه کفال دیگر که به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد، به‌منظور ایجاد شرایط یکسان، فقط سرم فیزیولوژی تزریق شد. برای این منظور هر بار، دو ماهی به حوضچه‌های ٤-۳ متر مکعبی، منتقل گردید. چون حوضچه‌ها مجهز به سیستم هوادهی بودند، اکسیژن در حد اشباع و pH آب در حد ۷/۹-٦/۸ بود.

دمای آب حوضچه‌ها در طول مدت آزمایش، بین ۱۹-۱۶ درجه سانتی‌گراد و شوری آب بوسیله مخزن ذخیره آب شور در ۳۲ گرم در لیتر تنظیم گردید. نمونه‌برداری از خون و تخمدان در ساعات صفر، بیست و چهار، سی و چهل و هشت پس از تزریق اول صورت گرفت. به‌طوری‌که ۲ سانتی‌متر مکعب خون از سیاهرگ‌دمی، برداشته شد. نمونه‌های خون به لوله‌های آزمایش دربدار استریل منتقل و سپس با استفاده از دستگاه سانتریفوژ به مدت ٤ دقیقه در ۳۰۰۰ rpm، سرم از سلول‌های خونی جدا گردید. سرم‌های جدا شده به ظروف مخصوص نگهداری (اپندروف) منتقل و شماره‌گذاری شد. نمونه‌های سرم تا زمان اندازه‌گیری استروئیدهای جنسی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. جهت اندازه‌گیری مقادیر استروئیدهای جنسی از روش RIA (RadioImmuno Assay) استفاده شد. دستگاه گاماکانتر مورد استفاده، LKB تمام اتوماتیک، ساخت کشور فنلاند بود.

تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به مقادیر استروئیدهای جنسی ماهیان تخم‌ریزی کرده، تخم‌ریزی نکرده و شاهد و زمان‌های مختلف نمونه‌برداری با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه و مقایسه میانگین‌ها از طریق آزمون دانکن انجام شد. نرم‌افزارهای Excel و SPSS جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

ویژگی‌های بافت‌شناسی نمونه‌های تخمک برداشته شده از ماهیان کفال خاکستری *(M.cephalus)* به‌شرح زیر بود: مرحله اول (مرحله هستک های کروماتینی):

میانگین قطر تخمک‌ها در این مرحله ٦/٣٧ ± ٢٠/١٧ میکرون بود. از مشخصات این مرحله، وجود هسته بزرگ در مرکز تخمک و مقدار اندک اووپلاسم بود. در این مرحله هسته دارای چند هستک کوچک و رشته‌های کروماتینی مرتبط با هستک بود. سیتوپلاسم به‌شدت قلیادوست بوده و با هماتوکسیلین به رنگ آبی درآمد (شکل ۱- الف). بعضی از نمونه‌های برداشته شده در مرداد در این مرحله بودند.

مرحله دوم (مرحله هستک‌های کناری): در این مرحله پروتوپلاسم تخمک در حال رشد بود. میانگین قطر تخمک ٩/١٤ ± ٨٨/٧٩ میکرون بود. مواد کروماتینی در قسمت میانی هستک‌ها قابل مشاهده شد. هستک‌ها به تعداد زیاد و به اندازه کوچک در مجاورت دیواره داخلی غشاء هسته قرار گرفته بودند. همچنین در این مرحله واکوئل‌هایی بدور هسته تشکیل گردید. از اختصاصات دیگر تشکیل لایه نازک فولیکولی به دور تخمک بود. در این مرحله از شدت قلیادوستی تخمک‌ها کاسته شده و در نتیجه حساسیت آنها نسبت به هماتوکسیلین کمتر شد (شکل ۱- ب). بیشتر نمونه‌های برداشت شده در مرداد و اوایل شهریور در این مرحله قرار داشتند.

مرحله سوم (وزیکول‌های زرده): در این مرحله اندازه تخمک افزایش یافت. میانگین قطر تخمک‌ها در این مرحله به ٢١/٣٣ ± ١٨٠/٦٢ میکرون رسید. در اطراف هسته چند ردیف واکوئل قابل مشاهده گردید. واکوئل‌ها در اطراف هسته وزیکول‌های زرده را تشکیل دادند. هستک‌ها به تعداد زیاد در مجاورت غشای داخلی هسته قرار داشتند (شکل ۱- ج). از ویژگی‌های دیگر مرحله سوم افزایش ضخامت سلول‌های فولیکولی و تشکیل لایه شعاعی[1] بود (شکل ۱- د). میزان اسید دوستی اووپلاسم افزایش یافت. نمونه‌های تخمک برداشته شده در شهریور، چنین ویژگی‌هایی داشتند.

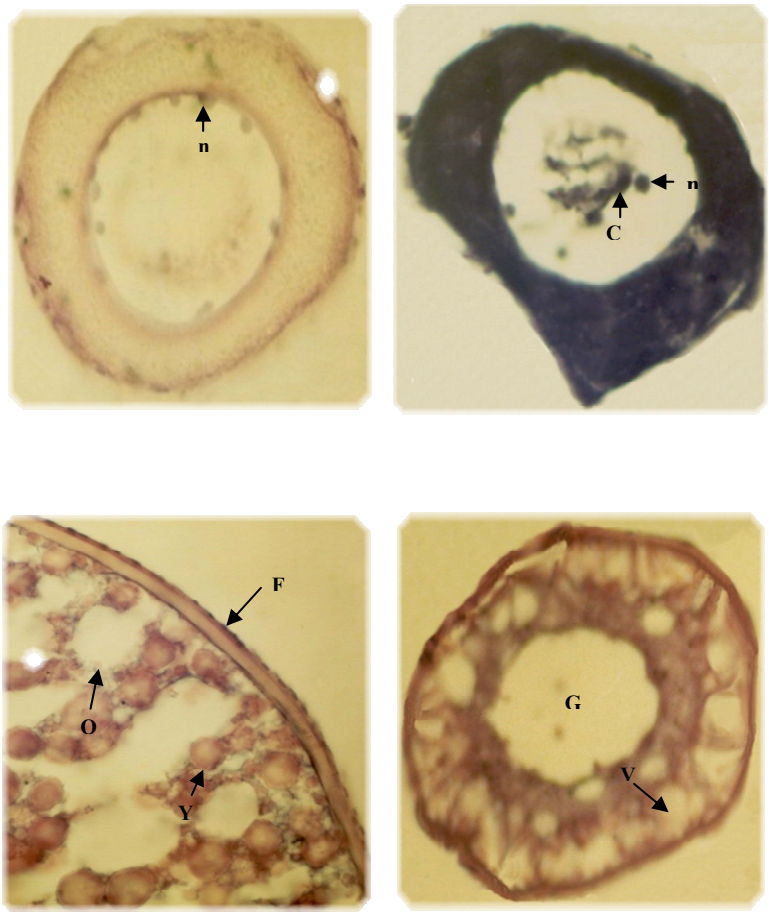
مرحله چهارم (مرحله دانه‌های زرده): اندازه قطر تخمک در این مرحله ٦٥٠-١٨٠ میکرون بود. هستک‌ها در این مرحله در نواحی مختلف هسته پراکنده و تعداد آنها کاهش یافت. در مرحله چهارم واکوئل‌سازی به اتمام رسید. این واکوئل‌ها و اجسام زرده باعث فشار بر روی هسته و تغییر شکل غشای آن گردید. ضخامت لایه فولیکولی افزایش یافته و دو لایه سلولی آن (لایه‌های سلولی گرانولوزا[2] و تکا[3]) و همچنین لایه شعاعی مشخص تر شد. تخمک‌ها کاملاً اسید دوست بوده و در نتیجه گرایش آنها به ائوزین افزایش یافت. (شکل ۲- الف و ب). به علت طولانی بودن این مرحله نمونه‌های تخمک

1- Zona radiata
2- Granulosa cells
3- Theca cells

برداشته شده در مهر و آبان در این مرحله قرار داشتند و تخمکهایی که این مرحله را تکمیل کردند، در آبان ماه مشاهده شد.

مرحله پنجم (مرحله بلوغ): در این مرحله تخمک‌ها باز هم رشد نموده و حداکثر قطر آنها به ۹۳۰ میکرون رسید. اجسام زرده تجمع یافته، واکوئول‌ها نیز با هم ادغام شده و یک واکوئل بزرگ را تشکیل دادند. در این مرحله تخمک‌ها آبگیری نمودند. از اختصاصات بارز این مرحله، مهاجرت هسته به قطب حیوانی، کوچک شدن و در نهایت ناپدید شدن آن بود. لایه فولیکولی در اطراف تخمک توسعه یافته و به‌همین دلیل بصورت چین خورده مشاهده گردید. مدت زمان این مرحله کوتاه بود. در پایان این مرحله تخمک‌ها از فولیکول آزاد شده و اوول شدند (شکل ۲- ج و د). تخمک‌ها فقط پس از القاء هورمونی به این مرحله رسیدند.

مرحله ششم (مرحله تخم ریخته): در این مرحله ماهی تخمک‌های خود را ریخته و در نتیجه در درون تخمدان مقدار زیادی فولیکول خالی و همچنین تخمک‌های غیر عادی مشاهده گردید. همچنین تخم‌های نابالغ در این مرحله قابل مشاهده شدند.



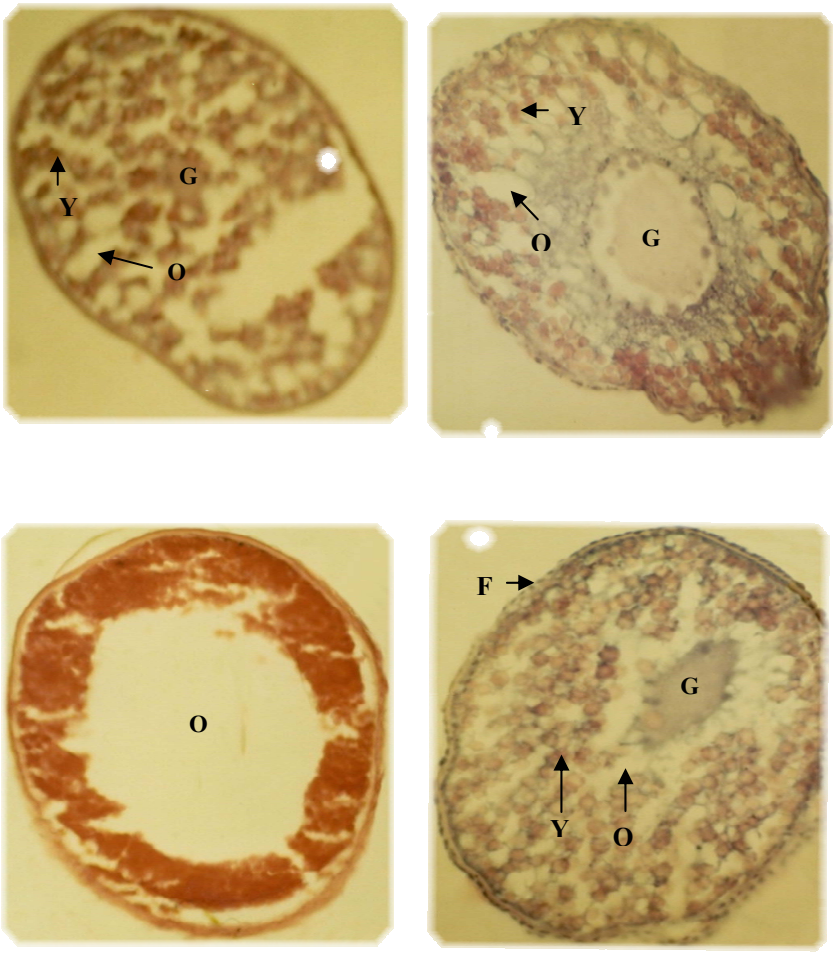
شکل ۱ – مراحل مختلف تکامل تخمک‌های کفال خاکستری در استخرهای پرورشی در گمیشان

الف- مرحله هستک‌های کروماتینی، شبکه کروماتینی (C)، هستک‌های کروماتینی(n)، (H&E ; X۲۵۰۰)

ب- مرحله هستک‌های کناری، هستک‌های کناری (n)، (H&E ; X۶۰۰)

ج- مرحله وزیکول‌های زرده، وزیکول زاینده (G)، وزیکول‌های زرده(V)، (H&E ; X۵۰۰)

د- قسمتی از یک تخمک، لایه فولیکول (F)، دانه‌های زرده (Y)، قطرات چربی (O) (H&E)



شکل ۲- مراحل مختلف تکامل تخمکهای کل خاکستری در استخرهای پرورشی گمیشان

الف- اواسط مرحله دانه های زرده، وزیکول زاینده (G)، قطره چربی (O)، دانه زرده (Y)، (H&E ; X۲۰۰)

ب – انتهای مرحله دانه های زرده، وزیکول زاینده (G)، قطره چربی (O)، دانه زرده (Y)، (H&E ; X۱۰۰)

ج- مرحله بلوغ، وزیکول زاینده در حال مهاجرت (I)، قطره چربی (O)، دانه زرده (Y)، لایه فولیکول (F)، (H&E ; X۱۰۰)

د- مرحله بلوغ، یک قطره چربی در وسط تخمک (O)، (H&E ; X٦۰)

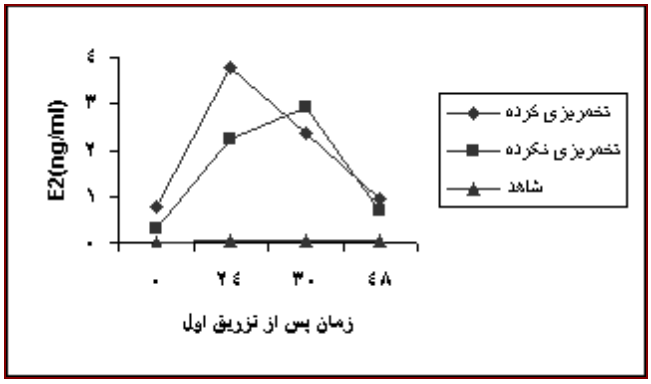
هشت قطعه از دوازده ماهی که به آنها هورمون تزریق شده بود، تخمریزی کردند. جهت بررسی بهتر نقش استروئیدهای جنسی، ماهیان مورد آزمایش را به سه گروه تخمریزی کرده، تخمریزی نکرده و شاهد تقسیم بندی و نتایج مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. بررسی میانگین مقادیر استروئیدهای جنسی در هر یک از زمانهای نمونه برداری به شرح زیر بود:

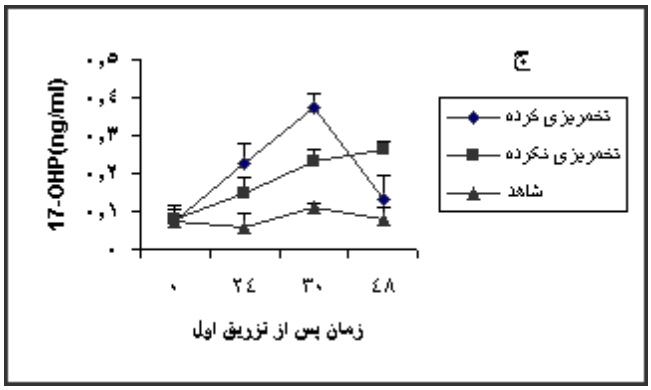
الف- تستوسترون (T): در زمان تزریق اول کمترین مقدار تستوسترون در گروه شاهد و بیشترین مقدار آن در ماهیان تخمریزی کرده مشاهده گردید، ولی اختلاف بین میانگین مقادیر اندازه‌گیری شده در سه گروه معنی‌دار نبود. در زمان تزریق دوم مشاهده شد که کمترین مقدار در گروه شاهد و بیشترین مقدار در ماهیان تخمریزی کرده بود. میانگین مقادیر اندازه‌گیری شده در ماهیان تخمریزی کرده و تخمریزی نکرده معنی‌دار نبود، ولی میانگین مقادیر آن در دو گروه اخیر با ماهیان گروه شاهد اختلاف معنی‌دار داشت ($P<۰/۰۵$). در سومین زمان نمونه‌برداری، کمترین مقدار مربوط به گروه شاهد و بیشترین مقدار

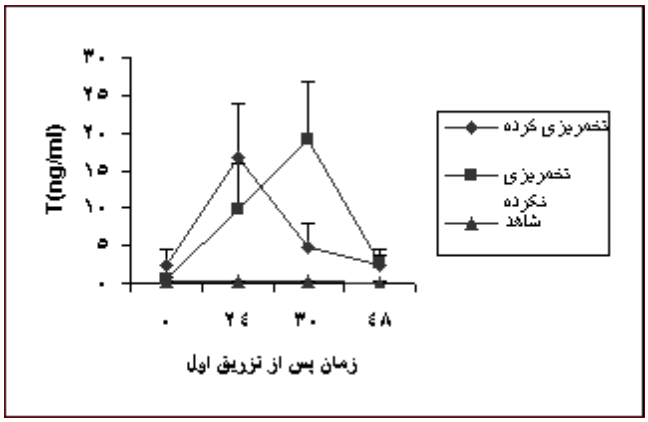
مربوط به ماهیان تخم‌ریزی نکرده بود، بطوریکه بین میانگین مقادیر این استروئید در ماهیان تخم‌ریزی کرده و شاهد اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. کمترین مقدار تستوسترون در نمونه‌برداری آخر در گروه شاهد و بیشترین مقدار در ماهیان تخم‌ریزی نکرده مشاهده گردید، ولی اختلاف بین میانگین مقادیر این استروئید در سه گروه معنی‌دار نبود (شکل۳– الف).

ب– ۱۷بتا– استرادیول (E_2): بررسی میانگین مقادیر ۱۷ بتا– استرادیول در زمان اول نمونه‌برداری حاکی از آن است که کمترین مقدار آن در گروه شاهد و بیشترین مقدار آن در ماهیان تخمریزی کرده بود، ولی اختلاف بین میانگین مقادیر اندازه‌گیری شده در سه گروه معنی‌دار نبود. در زمان تزریق دوم مشاهده شد که کمترین مقدار در گروه شاهد و بیشترین مقدار در ماهیان تخم‌ریزی کرده بود. میانگین مقادیر اندازه‌گیری شده در ماهیان تخم‌ریزی کرده و تخم‌ریزی نکرده معنی‌دار نبود، ولی میانگین مقادیر آن در دو گروه اخیر با ماهیان گروه شاهد اختلاف معنی‌دار داشت ($P<۰/۰۵$). در سومین زمان نمونه‌برداری، کمترین مقدار مربوط به گروه شاهد و بیشترین مقدار مربوط به ماهیان تخم‌ریزی نکرده بود، اختلاف بین میانگین مقادیر این استروئید در ماهیان تخم‌ریزی کرده و تخم‌ریزی نکرده معنی‌دار نبود. در آخرین نمونه‌برداری، کمترین مقدار آن در گروه شاهد و بیشترین مقدار در ماهیان تخم‌ریزی کرده بود، اختلاف بین میانگین مقادیر این استروئید در ماهیان تخم‌ریزی کرده و تخم‌ریزی نکرده و همچنین ماهیان تخم‌ریزی نکرده و شاهد معنی‌دار نبود، در حالی که اختلاف بین میانگین مقادیر آن در ماهیان تخم‌ریزی کرده و شاهد معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$) (شکل ۳– ب).

ج– ۱۷ آلفا– هیدروکسی پروژسترون (17-OHP): در بررسی میانگین مقادیر ۱۷ آلفا– هیدروکسی پروژسترون در زمان تزریق اول مشاهده شد که کمترین مقدار آن در گروه شاهد و بیشترین مقدار آن در ماهیان تخم‌ریزی نکرده بود، ولی اختلاف بین میانگین مقادیر اندازه‌گیری شده در سه گروه معنی‌دار نبود. در زمان تزریق دوم کمترین مقدار در ماهیان گروه شاهد و بیشترین مقدار در ماهیان تخم‌ریزی کرده بود. اختلاف بین میانگین مقادیر اندازه‌گیری شده در این زمان در هر سه گروه با یکدیگر معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). بررسی میانگین مقادیر ۱۷ آلفا– هیدروکسی پروژسترون در نمونه‌برداری چهارم حاکی از آنست که کمترین مقدار مربوط به گروه شاهد و بیشترین مقدار مربوط به ماهیان تخم‌ریزی نکرده بود، بطوری‌که اختلاف بین میانگین مقادیر این استروئید در این زمان در ماهیان تخم‌ریزی کرده و شاهد معنی‌دار نبود، ولی میانگین مقادیر آن در هر دو گروه اخیر با ماهیان تخم‌ریزی نکرده معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$) (شکل ۳ – ج).







شکل ۳- تغییرات استروئیدهای جنسی در چهار زمان مختلف در ماهیان تخمریزی کرده، تخمریزی نکرده و شاهد
الف- نوسانات تستوسترون در چهار زمان مختلف در ماهیان تخمریزی کرده، تخمریزی نکرده و شاهد
ب- نوسانات ۱۷ بتا- استرادیول در چهار زمان مختلف در ماهیان تخمریزی کرده، تخمریزی نکرده و شاهد
ج- نوسانات ۱۷ آلفا- هیدروکسی پروژسترون در چهار زمان مختلف در ماهیان تخمریزی کرده، تخمریزی نکرده و شاهد

بحث

در این تحقیق برخی از جنبه‌های عملی و فیزیولوژیکی القاء به در ماهیان ماده کفال خاکستری (*M. cephalus*) تحت شرایط پرورشی مورد بررسی قرار گرفته است. الگوی کلی تکامل تخمک‌ها در کفال خاکستری مشابه سایر ماهیان دیگر است. روند تخمک‌زایی بر طبق اندازه و محتویات تخمک‌ها به مراحل مختلف تقسیم می‌شود. تقسیم بندی مراحل تکامل تخمک‌ها فقط جهت تسهیل مطالعه است. برای مثال تکامل تخمک‌ها در قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به هشت مرحله، در سوزن ماهی (*Syngnathus scovelli*) و ماهی لجنی (*Labeo capesis*) به شش مرحله، در گارا (*Garra rufa*) به پنج مرحله (۵)، در هیبرید تاس ماهی (بستر) به پنج مرحله (۲۲) و در کفال قرمز (*Mullus surmuletus*) به شش مرحله (۲۷) تقسیم شده است.

کفال خاکستری بطور طبیعی در شرایط پرورش آب شیرین و شور ممکن است مراحل زرده‌زایی را کامل کنند، اما مرحله پایان بلوغ تخمک‌ها صورت نمی‌گیرد (۱۹ و ۲۶). عقیده بر این است که غلظت کم و یا عدم وجود گونادوتروپین هیپوفیز باعث ناتوانی تولیدمثل در کفال و سایر ماهیان می شود (۲۴). زیرا زرده‌زایی و بلوغ نهایی تخمک بوسیلهٔ گونادوتروپین‌ها و از طریق استروئیدهای جنسی که توسط سلول‌های فولیکول ترشح می‌شود، تنظیم می‌گردد (۱۶). عدم تخمریزی ماهیان در شرایط پرورشی اختلال در یک یا چند مسیر در محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - گناد نسبت داده شده است (۳۷). برای برطرف کردن این اختلال در مسیر ترشح داخلی کنترل کننده‌های

رشد تخمدان، از روش القـاء هورمـونی جهـت رسـیدگی کامل تخمدان استفاده می‌شود.

نتایج حاصل از این تحقیق نـشان داد کـه مرحلـه دوم رشد تخمدان در مرداد و اوایل شهریور، مرحله سـوم در شهریور، مرحله چهارم در مهر و آبان ماه صورت می‌گیرد. درصد تخمک‌های آترزی در مولدینی که تحت عمل القاء تخم‌ریزی قرار نگرفتند، بعد از آبان ماه به‌تـدریج افـزایش یافت. بنابراین از ماه آبان، ماهیان جهـت رسـیدگی کامـل تحت عمل القاء هورمونی قرار گرفتند.

با توجه به نتایج حاصـل، در مـاهی کفـال خاکـستری مورد مطالعه شروع زردەزایی همزمان با کوتاه شـدن دوره نوری و کـاهش دمـای آب صـورت مـی‌گیـرد و تفـاوت چندانی از این نظر بـا کفـال‌هـای خاکـستری موجـود در نواحی دیگر ندارد (١٤ و ٣٠). همچنین نتـایج حاصـل از تحقیق در مـورد کفـال طلایـی ***(Liza auratus)*** نـشان می‌دهد که در جنوب دریای خزر مراحل یـک، دو و سـه تا مرداد ماه، مرحله چهار در شـهریور و مرحلـه پـنجم در مهر و اوایل آبان مشاهده شده و نمونـه هـای تخـم‌ریـزی کرده در ماه‌های مهر تا اواخر آبان بـه ثبـت رسـیده اسـت (١). در مقایسه با تحقیق حاضر در زمان رسیدگی جنـسی کفال طلایی دریای خزر و کفال خاکستری مـورد مطالعـه، همزمانی نزدیکی وجود دارد.

جهت القاء بلوغ نهـایی در کفـال خاکـستری از انـواع ترکیب‌های پروتئینی استفاده می شود. به‌طوری‌کـه Lee و همکـــاران (١٩٨٧ و ١٩٨٨) از هیپـــوفیز کپـــور و هورمون‌های hCG و LRH-A2 جهت القاء بلوغ نهایی به صورت تزریق دو مرحله‌ای استفاده نمودند. بر طبق نظر آنهـا ترکیـب هورمـونی هیپـوفیز کپـور در تزریـق اول و LHRH-a در تزریـق دوم بهتـرین ترکیـب هورمـونی جهت ا لقاء بلوغ نهایی در کفال خاکستری است، هر چند سایر ترکیب‌های هورمونی نیز باعث تحریک تخـم‌ریـزی در این ماهی شده بود. در تحقیق آنها عواملی نظیر نتیجـه تزریـق و هزینـه هورمـون‌هـا در نظـر گرفتـه شـده بـود. LHRH-a رهاسازی گنادوتروپین را از هیپوفیز تحریـک می‌کند، در حالی که عصاره هیپوفیز کپور و hCG دارای گنادوتروپین بوده و بر گناد تأثیر می‌گذارند (٨).

یافته‌های این تحقیق نیز نشان داد که ترکیب هورمونی هیپوفیز کپور و hCG باعث القاء بلوغ نهایی ماهیانی شد که تخمک‌های آنها در انتهای مرحله دانه‌های زرده بودنـد. عدم تخم‌ریزی برخی از ماهیـان بـه ایـن علـت بـود کـه تخمک‌های آنها مرحله دانـه‌هـای زرده را تکمیـل نکـرده بودند، ولی تزریق هورمون باعث تسریع در تکمیل مرحله زرده‌سازی گردید.

اگر چـه اطلاعـات زیـادی در مـورد نقـش احتمـالی تستوسترون در تولید مثل ماهیان ماده وجـود نـدارد، ولـی مطالعـات اخیـر نـشان داده اسـت کـه تـستوسترون در پلاسـمای ماهیـان اسـتخوانی جـنس مـاده، پـیش سـاز ١٧ بتا- استرادیول می‌باشد (١١ و ١٢). در تحقیق حاضـر نیز تغییرات تستوسترون دارای الگوی مشابهی با تغییـرات ١٧ بتا- استرادیول بـود. بطـوری‌کـه مقـدار آن در ماهیـان تخم‌ریزی کرده، در زمان تزریق دوم به حداکثر مقدار خود رسید و پس از آن کاهش یافت. Tamaru و همکاران در سال ١٩٩١ نیز چنین تغییراتی را در مقادیر تستوسترون در ماهیان ماده کفال خاکستری گزارش کرده‌اند (٣٢).

همچنـین بررسـی نتـایج حاصـله در ماهیـانی کـه تخم‌ریزی نکرده اند، نشان مـی‌دهـد کـه بیـشترین مقـدار تـستوسترون، سـی سـاعت پـس از تزریـق اول مـشاهده می‌گردد. تأخیر در به حداکثر رسیدن مقـدار تـستوسترون نسبت به ماهیان تخم‌ریزی کرده، احتمـالاً بـه‌دلیـل وجـود درصد بیشتری از تخمک‌هـایی اسـت کـه هنـوز مرحلـه زرده‌سازی را تکمیل نکرده اند و احتمـالاً بـا تزریـق‌هـای بعدی به‌طور کامل مرحلـه زردەزایـی را طـی کـرده و بـه مرحله بلوغ نهایی می‌رسیدند.

بررســی تغییــرات ١٧ بتــا- اســترادیول در ماهیــان تخم‌ریزی کرده در مقایسه با ماهیان گروه شاهد حـاکی از آن است که مقدار ایـن اسـتروئید در زمـان تزریـق دوم، سی ساعت و چهل و هشت سـاعت پـس از تزریـق اول اخـتلاف معنـی‌دار دارد ($P<٠/٠٥$). بـه‌هرحـال بیـشترین

مقدار این استروئید، در زمان تزریق دوم مشاهده گردید. Tamaru و همکاران در سال ۱۹۹۱ گزارش نمودند که مقدار ۱۷ بتا- استرادیول در مولدین ماده کفال خاکستری، هشت ساعت پس از تزریق اول به حداکثر مقدار خود رسید و بعد از آن تا زمان تزریق دوم تغییر چندانی نداشت (۳۲). به علت اینکه در تحقیق حاضر نمونه‌برداری بین زمان‌های تزریق اول و دوم صورت نگرفت، با توجه به تحقیقات Tamaru و همکاران در سال ۱۹۹۱ (۳۲) می‌توان حدس زد که حداکثر مقدار ۱۷بتا- استرادیول در مولدین ماده کفال خاکستری گمیشان نیز قبل از تزریق دوم و قبل از زمان به حداکثر رسیدن تستوسترون محتمل است.

در ماهیانی که تخم‌ریزی نکردند، حداکثر مقدار ۱۷ بتا- استرادیول در زمان سوم نمونه‌برداری مشاهده شد. در مقایسه با ماهیان تخم‌ریزی کرده، در زمان به حداکثر رسیدن ۱۷ بتا- استرادیول در این ماهیان تاخیر وجود داشت. با توجه به اینکه مرحله زرده‌سازی تخمک‌ها طولانی می‌باشد و تخمک‌های ماهیان مختلف ممکن است در دوره‌های مختلف زرده‌سازی باشند، می‌توان بیان نمود که احتمالاً تخمک‌های مولدینی که تخم‌ریزی نکردند، در مراحل ابتدایی‌تر زرده‌سازی بوده و تزریق هورمون باعث تسریع در روند زرده‌سازی تخمک‌ها شده است. مطالعات بافت‌شناسی این مطلب را تأیید نمود. Tamaru و همکاران در سال ۱۹۹۱ نیز در تحقیق خود به چنین نتیجه‌ای رسیده‌اند (۳۲).

افزایش ۱۷ بتا- استرادیول پس از تزریق اول احتمالاً به این دلیل است که فولیکول‌های تخمک‌هایی که هنوز مرحله زرده‌زایی را تکمیل نکرده‌اند، در پاسخ به هورمون‌های تزریق شده، این استروئید را تولید می‌نماید. چنین حالتی در مورد گونه‌های دیگر نیز گزارش شده است (۱۱ و ۱۲ و ۲۹). همچنین بعد از تزریق هورمون، فعالیت آروماتیزی تخمدان و به تبع آن مقادیر ۱۷ بتا- استرادیول در پلاسمای خون افزایش می‌یابد (۲۸).

با توجه به نتایج حاصل از بررسی نوسانات ۱۷ آلفا- هیدروکسی پروژسترون در ماهیانی که تخم‌ریزی کرده‌اند، بین میانگین مقادیر این استروئید در زمان تزریق دوم و سی ساعت پس از تزریق اول و میانگین مقادیر آن در مولدین شاهد اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید ($P<۰/۰۵$)، بطوری‌که حداکثر مقدار آن در این مولدین سی ساعت پس از تزریق اول مشاهده شد. در ماهیانی که تخم‌ریزی نکردند، میانگین مقدار ۱۷ آلفا- هیدروکسی پروژسترون در زمان تزریق دوم، سی ساعت و چهل و هشت ساعت پس از تزریق اول با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار داشت ($P<۰/۰۵$).

همچنین با توجه به نتایج حاصل، مشاهده شد که بیشترین میزان ۱۷ آلفا- هیدروکسی پروژسترون در ماهیان تخم‌ریزی نکرده در آخرین زمان نمونه‌برداری بود که در مقایسه با ماهیان تخم‌ریزی کرده، در زمان به حداکثر رسیدن ۱۷ آلفا- هیدروکسی پروژسترون تاخیر وجود داشت، بطوریکه اختلاف بین میانگین مقادیر این استروئید در آخرین نمونه‌برداری در ماهیان تخم‌ریزی کرده و تخم‌ریزی نکرده، معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). با توجه به تاخیر مشابهی در نوسانات استروئیدهای تستوسترون و ۱۷ بتا – استرادیول می توان بیان نمود که احتمالا تزریق های بعدی باعث عمل تجزیه وزیکول زاینده و اوولاسیون خواهد شد .

Young همکاران در سال ۱۹۸٤ بیان داشتند که ۱۷ آلفا- هیدروکسی پروژسترون که بوسیله سلول‌های تکا تولید می‌شود، در سلول‌های گرانولوزا بوسیله آنزیم ۲۰ بتا- هیدروکسی استروئید دهیدروژناز (20β-HSDH) به ۱۷ آلفا- ۲۰ بتا- دی هیدروکسی پروژسترون تبدیل می‌شود (۳٦).

Naghama در سال ۱۹۹٤ نیز گزارش نمود که سلول‌های تکا در پاسخ به گنادوتروپین‌ها درمرحله قبل از بلوغ نهایی تخمک‌ها قادر به تولید ۱۷ آلفا- هیدروکسی پروژسترون می‌باشند (۲۵). بنابر این می‌توان بیان داشت که افزایش استروئید اخیر در هنگام تجزیه وزیکول زاینده

(GVBD) در تحقیق حاضر به این دلیل است که این استروئید در سلول‌های تکای فولیکول‌های تخمک تولید می‌شود و به ۱۷ آلفا- ۲۰ بتا- دی هیدروکسی پروژسترون در سلول‌های گرانولوزا تبدیل می‌شود که استروئید اخیر یا وابسته‌های آن نقش اساسی را در تجزیه وزیکول زاینده ایفا می‌نمایند.

با توجه به اینکه پروژستین‌ها در مسیر بیوسنتز قبل از آندروژن‌ها قرار گرفته‌اند (۲)، افزایش مقادیر ۱۷ آلفا- هیدروکسی پروژسترون قبل از اوولاسیون احتمالا به‌دلیل بلوکه شدن سنتز آندروژن‌های تخمدانی در فولیکول‌ها می‌باشد. زیرا فولیکول‌ها در این زمان جهت تولید استروئیدهای القاء کننده بلوغ نهایی آماده می‌شوند. نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد که ۱۷ آلفا- هیدروکسی پروژسترون با کاهش چشمگیر مقادیر تستوسترون همراه بود.

با توجه به مطالب ذکر شده می توان نتیجه گرفت که کاهش ۱۷ بتا- استرادیول بعد از تزریق دوم، فیدبک منفی آن را روی تولید گنادوتروپین II از بین می‌برد و در نتیجه مقدار گنادوتروپین II در این زمان افزایش ناگهانی می‌یابد. افزایش ناگهانی گنادوتروپین باعث تحریک فولیکول‌ها جهت سنتز استروئیدهای القاءکننده بلوغ نهایی و اوولاسیون می‌گردد.

با توجه به اینکه عدم تخمریزی گونه‌هایی مانند کفال خاکستری به‌دلیل اختلال در مسیرهای کنترل کننده تولید مثل می‌باشد (۲۳)، می‌توان با بررسی فیزیولوژیک تولید مثل، اطلاعات پایه‌ای جهت تکثیر این ماهی و یا گونه‌های جدیدی که برای اولین بار اقدام به تکثیر آن می‌شود، بدست آورد تا نحوه کارکرد هورمون‌های تزریقی مشخص و از هورمون‌هایی استفاده شود که اختلال در مسیر فیزیولوژیکی تولید مثل را برطرف نمایند.

منابع

۱- شعبانی‌پور، ن. ۱۳۷٤. بررسی شکل و بافت شناسی تخمدان در ماهی کفال دریای خزر *(Liza auratus)*. مجله علمی شیلات ایران، شماره ۲. سال چهارم. صفحه ٦۲-٤۷.

۲- عریان، ش. ۱۳۷۳. تولید مثل از دیدگاه‌های پزشکی و بیولوژی. مؤسسه انتشارات جهاد دانشگاهی. صفحه ۵۰- ۳۹.

۳- قلیچی، الف. ۱۳۷۹. بیولوژی و روش‌های تکثیر ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*). سمینار دکتری دوره عالی تحقیقات و تحصیلات تکمیلی دانشگاه آزاد اسلامی تهران. ٦۸ ص.

4.Aizan, J., Meiri, I., Tzchori, I., Levavi-Sivan, B., and Rosenfeld, H. 2005. Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. J. Gen. Com. Endocrinol., 142: 212-221.

5.Bardacki, F., Ozansoy, U. and Koptagel, E. 2002. A comparision of oogenesis under constsnt and fiuctuating temmprature in Doctor fish, *Garra rufa* Heckel, 1843 (Teleostei: Cyprinidae). Aquaculture,1:1-8.

6.Cardona, L., Torras, X., Gisbert, E., and Castell, F. 1996. The effect of striped grey mullet (*Mugil cephalus*) on freshwater ecosystems. The Israeli J. Aquaculture .Bamidgeh, 48(4): 179–185.

7.Deniel, C., Le Blanc, C., and Rodriguez, A. 1989. Comparative study of sexual cycles, oogenesis and spawning of two Soleidae *Sola lascaris* and *S. impar* on Western coast of Brittany. J. Fish Biol., 35: 49-58.

8.Haddy, A., and Pankhurst, N.W. 2000. The efficacy of exogenous hormones in stimulating changes in plasma steroids and ovulation in wild blach bream (*Acanthopagrus butcheri*) is improved by treatment at capture. Aquaculture, 191: 351-366.

9.Htun-Han, M. 1978. The reproductive biology of the dab *Limanda limanda* L. in the North Sea: gonadosomatic index, hepatosomatic index and condition factor. J. Fish Biol.,13:369-378.

10.Humason, G.L. 1979. Animal Tissue Techniques, 4th edition. Freeman and Company, San Francisco, CA., 577pp.

11.Kagawa, H., Young, G., and Naghama, Y. 1984. In vitro estradiol –17β and testosterone producion by ovarian follicls of the gold fish (*Carassius carassius*). J. Gen. Comp. Endocrinol., 54:139-143.

12.Kagawa, H.,Young, G., Adachi, S., and Naghama, Y. 1982. Estradiol –17B production in amogo salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) ovarian follicle: role of the thecal and granulosa cells. J.Gen. Comp. Endocrinol., 47:440-448.

13. Kuo, C-M. 1995. Manipulation of ovarian development and spawning in grey mullet (*Mugil cephalus* L). Israeli J. Aquaculture. Bamidgeh, 47(2): 43-58.
14. Kuo, C.M., Nash, C.E., and Shehadeh. Z.H. 1974. A procedural guide to induce spawning in grey mullet (*Mugil cephalus* L.). Aquaculture, 3:1-14.
15. Kuo, C.M., Nash, C.E., and Shehadeh, Z.H. 1973. Induced spawning of captive grey mullet (*Mugil cephalus* L) females by injection of human chorioinic gonadotropin. Aquaculture, 1: 429-432.
16. Lee, W.-K. and Yang, S.-W. 2002. Relationship between ovarian development and serum levels of gonadal steroid hormones, and induction of oocyte maturation and ovulation in the cultured female KOREAN SPOTTED SEA BASS *Lateolabrax maculates*. Aquaculture, 207:169-183.
17. Lee, C.S., Tamaru, C.S., and Kelley, C.D. 1988. The cost and effectivenes of CPH, hCG and LHRH –a on the induced spawning of grey of grey mullet (*Mugil cephaluc* L). Aquaculture, 73: 341-347.
18. Lee, C.S., Tamaru, C.S., Myamoto, G.T., and Kelley, C.D. 1987. Induced spawning of grey mullet (*Mugil cephalus* L.) by LHRH – a. Aquaculture, 62: 327-336.
19. Liao, I-C., 1981. Cultivation methods. In: O.H. Oven (Editor), Aqnaculture of Grey Mullets. Cambridge University Press, London, Pp: 361-389.
20. Lin, Y-W., Lamarca, M.J., and Wallace, R.A. 1987. Fundulus heteroclitus gonadotropin (s). I. Homologous bioassay using oocyte maturatoon and steroid production by isolated ovarian follicles. J. Gen. Com. Endocrinol., 67:126-141.
21. Lupatsch, I., Katz, T., and Angel, D.L. 2003. Assessment of the removal efficiency of fish farm effluents by grey mullet: A nutritional approach. Aquacult. Res., 34:1367-1377.
22. Mojazi Amiri, B., Maebayashi, M., Hara, A., Adachi, S., and Yamauchi, K. 1996. Ovarion development and serum sex steroid and vitellgenin profiles in the female cultured sturgeon hybrid, the bester. J.Fish Biol., 48: 1164-1178.
23. Monbrison, D., Tzchori, I., Holland, M.C., Zohar, Y., Yaron, Z., and Elizur, A. 1997. Acceleration of gonadal development and spawning induced in the Miditerranean grey mullet (*Mugil cephalus* L): Preliminary. J. Aquclt. Bamidgih., 4: 214-221.
24. Mylonas, C.C., and Zohar, Y. 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. Rev. Fish Biol. Fisher., 10:463-491.
25. Naghama,Y., 1994. Endocrin regulation of gametogenesis in fish. Int. J. Dev. Biol. 38: 217-229.
26. Nash, C.E., and Koningsberger, R.M. 1981. Artificial propagation O.H. Oren (Editor), O.H. Oren(Editor), Aquaculture of Grey Mullets. Cambridge University Press, London, Pp: 265-312.
27. N'da, K., and Deniel, C. 1993. Sexual cycle and seasonal changes in the ovary of the red mullet, *Mullus surmuletus*, from the sothern coast of Brittany. J. Fish Biol., 43: 229-244.
28. Part, F., Zanuy, S., and Carrillo, M. 2001. Effect of gonadortopin–relesing hormone analigue (GnRHa) and pimozide on plasma levels of sex steroids and ovarian development in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L). Aquaclture, 198: 325-338.
29. Part, F., Carrillo, M., Zanuy, S., and Bromage, N.R. 1999. Effects of constant short and long photoperiod regimes on the spawning pertormance and sex stetoid levels of female and male aea bess (*Dicentrarchus labrax* L). J. Fish Biol., 4: 125-137.
30. Shehadeh, Z.H., and Ellis, J.N. 1970. Induced spawning of rhe striped mullet (*Mugil cephalus* L.). J. Fish Biol., 2: 355-360.
31. Sulochanamma, G.P., Reddy, S., and Natarajan, R. 1981. Maturity and spawning of *Mugil cephalus* L. in Porto Novo waters. J. mar Biol. Ass. India, 23 (1-2): 55-61.
32. Tamaru, C.S., Kelley, C.D., Lee, C.S., Aida, K., Hanyu, l., and Goets, F. 1991. Steroid profiles during maturation and spawning of the striped mullet (*Mugil cephalus* L.) Aquacultute, 95:149-168.
33. Tang ,Y.A., 1964. Induced spawning of striped mulletby hormone injection. Jap. J. Ichthyol., 12: 23-28.
34. Wallace, R.A., and Selman, K. 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts, J. American Zoologist.
35. Yashouv, A. 1989. Priliminary report on induced spawning of *Mugil cephalus* L. reared in captivity in freshwater ponds. Bamidgeh, 21: 19-24.
36. Young, G., Kagava, H., and Naghama, Y. 1984. Role of the thecal and granulose cells in the production of mathuration- inducing steroid by ovarian follicles of salmonid fishes. J. Gen Comp. Endocrinol., 53: 455-465.
37. Zohar, Y. 1989. Fish reproduction: its Physiology and artificial manipulation. pp. Gs-119. in M. Shilo and Sarig (eds). Fish culture in warm water systems: problems and trends. CRG. Press. Florida.

A study on reproduction physiology of grey mullet (*Mugil cephalus*) by sex steroids profiles and histological study

[*]A.Ghelichi[1], Sh. Oryan[2], M.R. Ahmadi[3], A.M. Hajimoradlou[4] and S. Jorjani[5]

[1]Assistant Prof., Dept. of Fisheries of Islamic Azad University, Azadshahr Branch, [2]Full Prof. of Tarbiat modarres University, [3]Associate Prof. of Tehran University, [4]Associate Prof., Dept. of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [5]Instructor of Islamic Azad University, Azadshahr Branch

[*]*E-mail: afshin_ghelichi@yahoo.com*

Abstract

During a six-month study (from August to January, 2002) ovarian development stages of grey mullete (*Mugil cephalus*) were histologically studied in the rearing ponds of South Caspian Sea (Gomishan). Different stages of oocyte development (nucleus changes, oocyte diameter and forming of yolk vesicle, yolk granules and lipid droplets) was surveyed. Hormonal treatment was accomplished to induc final maturation and spawning in captive females. In this study, 12 females were injected with a priming injection of carp pituitary hormone (CPH) at a dosage of 20 mg/kg body weight followed 24 h later with a resolving injection of HCG at a dosage of 20 Iu/100gr body weight and CPH at a dosage of 20 mg/kg body weight. Another three fish received saline injections as controls. During hormonally induced spawning, 8 mullet spawned. All fish were bled and checked for ovulation 0, 24, 30 and 48 hours post injection. Plasma level of estradiol-17β (E2), testosterone (T) and 17α-hydroxyprogestrone (17-OHP) were determined by radioimmunoassay. Steroid profiles of spawned fishes were similar. Plasma E2 and then T levels dramatically increased for 30h after first injection. A surge of 17-OHP was observed when E2 and T level decreased. These dramatic changes were coincident with oocyte undergoing hydration, germinal vesicle breakdown and ovulation. The oocyte of spawned mullets in the onset of experiment, were completed vitellogenesis. The fluxes of sex steroids of unspawned females had a delay comparing with spawned mullets. The oocyte of these fishes at the first injection had not completed the vitellogenesis. None of the three females in the control group had significant changes in maturing stages of oocyte and levels of sex steroids. According to the results, stage I, II, III and IV of ovary maturation of grey mullet occurred in July, August, September and October, respectively. The results indicated fishes were ready for hormonal induction from November. Morover, E2, T, and 17-OHP were introduced as important steroids in developing and final maturation of grey mullet oocyte under the influence of gondotropin.

***Keywords**:* Sex steroids; Spawning induction; Ovarian maturation; *Mugil cephalus*