مجله شیلات
سال دوم، شماره سوم، پاییز ۸۷

# تاثیر چندین روش تزریق هورمون GnRHa در تحریک و همزمانی اوولاسیون قزل آلای رنگین کمان *(Oncorhynchus mykiss)*

***آریا وزیرزاده[۱]، عبدالمجید حاجی مرادلو[۱]، احمد ایمانی[۲]، کامران رضایی توابع[۲] و اشکان اژدهاکش پور[۳]**

[۱]به‌ترتیب دانش آموخته کارشناسی‌ارشد و دانشیار دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران،
[۲]گروه شیلات و محیط‌زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران، [۳]بخش آبزی پروری، مرکز تحقیقات شیلاتی آبهای دور، چابهار، ایران
*Email:vazir@ut.ac.ir*

## چکیده

در این مطالعه اثرات آنالوگ هورمون آزاد کننده گنادوتروپین (GnRHa) به‌شکل امولسیون آب در روغن(w/o) و خالص در تحریک و همزمانی اوولاسیون قزل‌آلای رنگین کمان بررسی شد. آنالوگ هورمون GnRH در محلول نمکی ۰/۹ درصد و یا گلیکول پروپلین حل شد و با حجم برابری از آدجوانت ناقص فروند (GnRHa-FIA) ترکیب گردید. در ماهیان تیمارهای مختلف ۰/۵ میلی لیتر از ترکیب مذکور تزریق شد. میزان هورمون در همه تیمارها به جز تیمار شاهد-که محلول نمکی ۰/۹ درصد دریافت نمود- ۲۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن بود. همه ماهیانی که هورمون GnRHa حل شده در محلول نمکی ۰/۹ درصد را همراه با آدجوانت یا در دو مرحله تزریق دریافت نمودند به‌ترتیب ۱۰ و ۱۱ روز بعد از تزریق تخمریزی کردند، در حالی که درصد تجمعی اوولاسیون در گروه شاهد و ماهیانی که هورمون GnRHa را به شکل خالص و در یک مرحله تزریق دریافت نمودند تا ۳۶ روز بعد از تزریق به‌ترتیب ۷۵ و ۶۰ درصد بود، ولیکن ۸۷ درصد ماهیانی که هورمون GnRHa محلول در گلیکول پروپلین را همراه با آدجوانت دریافت کردند تا ۳۶ روز بعد از تزریق تخم‌ریزی نمودند و همه ماهیانی که هورمون یاد شده را در دو مرحله دریافت نمودند ۱۳ روز بعد از تزریق تخم‌ریزی کردند. درصد لقاح، چشم‌زدگی و تفریخ در همه تیمارها مناسب بود و بین تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). مرگ و میر قبل و بعد از تخم‌ریزی در مولدین مورد آزمایش مشاهده نشد. نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق ترکیب هورمون حل شده در محلول نمکی و آدجوانت ناقص فروند (GnRHa-FIA) سبب پیشرس کردن، همزمانی و کوتاه شدن دوره تخم‌ریزی در مولدین قزل‌آلای رنگین کمان در مقایسه با گروه شاهد و گروه دریافت‌کننده هورمون GnRHa به‌شکل خالص و در یک مرحله گردید. تزریق GnRHa-FIA تأثیر منفی بر کیفیت تخم‌های استحصالی نداشته و مرگ و میری در مولدین مشاهده نشد.

***واژه‌های کلیدی***: آدجوانت ناقص فروند، القا تخم‌ریزی، کیفیت تخم، قزل‌آلای رنگین کمان، GnRHa

## مقدمه

متأسفانه بسیاری از ماهیان هنگامی که در شرایط آبزی‌پروری نگهداری می‌شوند اختلالاتی در سیستم تولیدمثل آنها بروز می‌نماید. در ماهیان ماده اغلب تخمک‌ها به‌مراحل نهایی رسیدگی جنسی نرسیده و اوولاسیون و تخم‌ریزی در آنها صورت نمی‌گیرد (۱۱)، در حالی که در ماهیان نر حجم و کیفیت اسپرم تولیدی کاهش می‌یابد (۳).

در چند دهه اخیر توجه زیادی بـه کنتـرل تولیـد مثـل ماهیان به ویژه آزاد ماهیان با استفاه از هورمون GnRHa شده است (۲). به‌دلیل تجزیه سریع این هورمون دکاپپتیـد در بدن از روش‌های رسانش پایدار[1] برای افزایش کارآیی استفاده می‌گردد. با اسـتفاده از ایـن تکنیـک‌هـا مـی‌تـوان هورمون‌های مورد نظر را به‌مدت طولانی‌تـری (چنـد روز تا چند هفته) در اختیار ماهی قرار داد (۱۲). اما استفاده از روش‌های رسانش پایـدار هورمـون GnRHa در ماهیـان اغلب پر هزینه بوده و برای همه پرورش‌دهنـدگان مـاهی دسترسی با این مواد مقدور نمی‌باشـد. در برخـی از ایـن روش‌ها نیز نیاز به دستگاه‌های پیشرفته و نیروی کار ماهر وجـود دارد کـه سـبب محـدودیت اسـتفاده از آنهـا در کارگاه‌های تکثیر می‌شود. از سوی دیگر در کشور ما نیـز دسترسی به این مواد و روش‌ها در حال حاضر مشـکل و تا حدودی ناممکن است و باید از خـارج از کشـور تهیـه شود که سـبب افـزایش بـیش از پـیش قیمـت ایـن مـواد می‌گردد. لذا نیاز به روش‌های کارا و ارزان قیمت به‌شدت احساس می‌گردد. یکی از روش‌های موثر و کاربردی کـه در چند سال اخیر برای رسانش پایدار هورمون GnRHa استفاده شده است، اسـتفاده از مـاده‌ای بـه نـام آدجوانـت ناقص فروند می‌باشد. آدجوانت‌ها یا مواد کمکی، مـوادی هستند که در اصل برای تقویت ایمنی استفاده مـی‌گردنـد. یکی از آدجوانت‌هـای بسـیار معمـول آدجوانـت فرونـد[2] می‌باشد. آدجوانت فروند به شکل امولسیون آب در روغن بوده و به دو نوع کامل[3] (به اختصار FCA) و ناقص[4] (به اختصار FIA) تقسیم می‌شود. نـوع کامـل آن عـلاوه بـر روغن‌های معدنی حاوی مایکو باکتر سل کشته شـده نیـز می‌باشد (۱۰).

Arabachi در سـال ۲۰۰۰ بـرای اولـین بـار از آدجوانت ناقص فروند برای تزریق هورمون GnRHa در ماهی شانک اروپایی (*Sparus aurata*) اسـتفاده کـرد. همین محقق و همکاران در سال ۲۰۰٤ از ترکیب یاد شده در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان استفاده نمودند. در هـر دو مطالعه ذکر شده استفاده از آدجوانت ناقص فرونـد سـبب افزایش کارآیی هورمون GnRHa در القا اوولاسیون شد.

نتایج اولیه به دست آمده از کـاربرد آدجوانـت نـاقص فرونـد در رسـانش پایـدار هورمـون GnRHa بسـیار امیدبخش بوده و در مقایسـه بـا سـایر روش‌هـا در عـین کارآیی مناسب بسیار ارزانتر است و کاربرد آن نیـز آسـان می‌باشد ولیکن این روش بسیار جدید بوده و برای اظهـار نظر دقیق در رابطه با کارآیی آن نیاز بـه مطالعـات بیشـتر می‌باشد. لذا در این تحقیق برای اولین بار در کشور از این روش استفاده شـد و بخشـی از جنبـه‌هـای ایـن مـاده در رسانش پایدار هورمون GnRHa بررسی گردید. در ایـن تحقیق اهداف ذیل مد نظر بود.

۱- مطالعه قابلیت آدجوانت ناقص فروند بـه عنـوان منبـع امولسیون کننده هورمون GnRHa .

۲- مقایسه اثرات چند روش تزریق GnRHa در تحریک و همزمانی اوولاسیون ماهی قزل آلای رنگین کمان.

۳- بررسی اثرات مـواد و روش هـای بـه کـار رفتـه بـر کیفیت تخم‌های استحصالی و مرگ و میـر قبـل و بعـد از تخم‌ریزی مولدین.

٤- ارتقاء مدیریت تکثیر ماهیان قزل آلا

## مواد و روش‌ها

**زمان و مکان تحقیق:** این تحقیق در اوایـل مهرمـاه سـال ۱۳۸٤ در مرکز تکثیر قزل آلای شرکت تعاونی ۲۲ بهمـن در شهرستان سپیدان استان فارس انجام گرفت. تعـداد ٤۰ قطعه ماهی ماده قزل‌آلا با میانگین وزنی ۱۷۰ ±۲۰۰۰ گرم انتخاب گردید و در ٦ تیمار مختلـف مـورد تزریـق قـرار گرفتند.

**نحوه تهیه و آماده سازی هورمون و آدجوانت:** هورمـون GnRHa ([D-Ala$^6$,des Gly$^{10}$]m GnRHa) مـورد استفاده در ایـن تحقیـق سـاخت شـرکت ثـامن مشـهد و شرکت سان شنگ چین بود. هورمون شرکت ثامن مشـهد

1- Sustained releasing delivery systems
2- Freund,s adjuvant
3- Freund's Complete Adjuvant
4- Freund's Incomplete Adjuvant

بـه‌صـورت محلـول در گلیکـول پـروپیلن اسـتفاده شـد. هورمون چینی به شکل لیوفیلیزه اسـتفاده شـد. آدجوانـت ناقص فرونـد مـورد اسـتفاده در ایـن تحقیـق از مؤسسـه تحقیقات واکسن و سرم‌سـازی رازی در حصـارک کـرج تهیه گردید.

برای تهیه امولسـیون آدجوانـت و هورمـون، هورمـون محاسبه شده برای هر مـاهی در ۰/۲۵ میلـی‌لیتـر محلـول نمکی ۰/۹ درصد و یا گلیکول پروپیلن حل شد و با حجم برابری از آدجوانت ناقص فروند بـه روش دابـل سـرنگ ترکیب شدند (٦). بـه ایـن ترتیـب هـر مـاهی مولـد ۰/۵ میلی‌لیتر محلول تزریقی دریافت نمود. کلیه تزریـق‌هـا بـه شکل داخل صفاقی بود.

**میزان هورمون و مشخصات تیمارهای مـورد آزمـایش:** میزان هورمون در همه تیمارها ۲۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن بود. ماهیان تیمار ۱ هورمون GnRHa محلـول در حلال نمکی را همراه با آدجوانـت نـاقص فرونـد، در یک مرحله تزریق دریافت نمودند. ماهیان تیمـار ۲ همـان هورمون را به شـکل خـالص (بـدون آدجوانـت) و در دو مرحله تزریق با فاصله زمانی ٢٤ ساعت دریافت نمودنـد. ماهیان تیمار ۳ هورمون محلول در گلیکول پروپیلن را بـه شکل ترکیب با آدجوانت و ماهیان تیمار ٤ همان هورمون را به شکل خالص و در دو مرحله دریافت نمودند. ماهیان تیمار ۵ هورمون محلول در گلیکول پروپیلن را بـه شـکل خالص و در یک مرحله دریافـت نمودنـد. ماهیـان گـروه شاهد ۰/۵ میلی‌لیتر محلول نمکی دریافت نمودند (جدول ۱).

**جدول ۱- میزان هورمون تزریقی، نوع ماده ترکیبی، تعداد تکرار و تعداد تزریق در تیمارهای مورد آزمایش**

| شماره تیمار | تیمار | میزان هورمون µg/kg | ماده ترکیبی | تعداد تکرار (تعداد ماهی) | تعداد تزریق |
|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | GnRHa-FIA (China) | ۲۵ | آدجوانت | ۷ | ۱ |
| ۲ | GnRHa (2 Steps) | ۲۵ | خالص | ٦ | ۲ |
| ۳ | GnRHa-FIA (Iran) | ۲۵ | آدجوانت | ۸ | ۱ |
| ٤ | GnRHa (2 Steps) | ۲۵ | خالص | ٦ | ۲ |
| ۵ | GnRHa (Acute) | ۲۵ | خالص | ۵ | ۱ |
| ٦ | محلول نمکی | - | - | ۸ | ۱ |

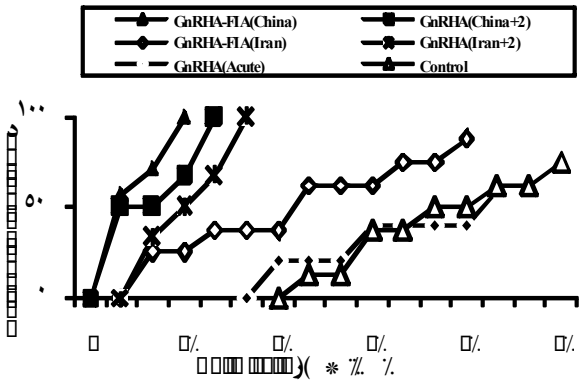
**تکثیر ماهیان و بررسی کیفیـت تخـم‌هـای استحصـالی:** ماهیان هر هفته ۲ بار مورد معاینـه قـرار گرفتـه و از نظـر رسیدگی تخمک‌ها به شکل ظاهری بررسی شدند. پس از اولـین تخمریـزی ماهیـان ۵ بـار در هفتـه معاینـه شـدند. تخمک‌های استحصالی از هر ماهی ماده با اسپرم سه ماهی نر لقاح داده شد. ۲۵۰ عدد تخم از هر ماهی بـه صـورت جداگانه در داخل سبدهای مخصوص جهت انکوباسـیون نگهداری شدند و پس از چشم زدگی، کلیه تخم‌های تلف شده جمـع‌آوری گردیـد و بـا شـفاف‌سـازی در محلـول استوکارد مرکب از فرمالین، اسیداستیک، گلیسـرین و آب با نسبت حجمی ۸۵:٦:٤:۵ تعداد تخم های لقاح نیافتـه و لقاح یافته تلف شده شمارش گردیـد (۹). بـدین ترتیـب درصد لقاح، درصد چشم زدگی و درصـد تفـریخ در هـر ماهی محاسبه گردید.

**بررسی آماری داده‌های بدست آمده:** داده هـای بدسـت آمده از این مطالعـه بـا اسـتفاده از نـرم افـزار SPSS10 بررسی و ارزیابی گردیـد. بـرای تعیـین اثـر هورمـون بـر میانگین زمان اوولاسیون از آزمـون کروسـکال-والـیس و برای تعیین اثرات هورمون بر کیفیت تخم های استحصالی از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون چند دامنـه‌ای دانکـن

استفاده شد. برای مقایسه داده‌های درصدی از آرکسین آنها استفاده شد. نمودارها در محیط Excel و SPSS ترسیم گردید. سطح مورد قبول ($P\leq$ ۰/۰۵) بود.

## نتایج

**تاثیرات تزریق GnRHa در روش‌های مختلف بر همزمانی اوولاسیون مولدین:** تخم‌ریزی در گروه‌هایی که هورمون محلول در سرم فیزیولوژی را به شکل امولسینه یا به شکل خالص و در دو نوبت دریافت کرده بودند، ۸ روز پس از شروع آزمایش آغاز شد و ۱۱ روز پس از شروع آزمایش همه مولدین در این دو گروه تخم‌ریزی نمودند. در گروه‌هایی که هورمون محلول در گلیکول پروپیلن را به شکل امولسینه یا به شکل خالص در دو نوبت دریافت کردند، تخم‌ریزی به‌ترتیب از روزهای نهم و هشتم بعد از شروع آزمایش آغاز شد، ولیکن فقط در تیمار چهار که هورمون را در دو نوبت دریافت نمودند همه مولدین تا سیزده روز بعد از شروع آزمایش تخم‌ریزی کردند. تخم‌ریزی در گروه دریافت کننده هورمون به شکل خالص در یک مرحله و گروه شاهد به‌ترتیب از روزهای چهاردهم و پانزدهم بعد از تزریق شروع شد ولیکن تا پایان آزمایش تکمیل نگردید (شکل ۱). برخی از پارامترهای ثبت شده در جدول ۲ ارائه شده است.




**شکل ۱- درصد تجمعی تخم‌ریزی در تیمارهای مورد آزمایش**

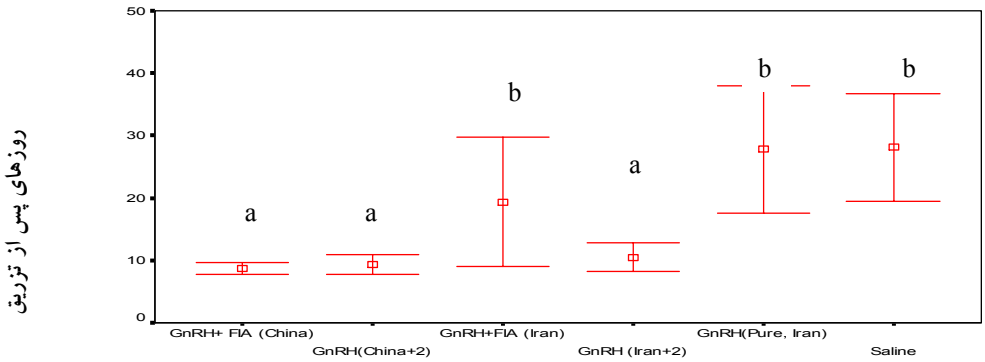
**جدول ۲- تعداد مولدین در هر تیمار، تعداد تکثیر شده، زمان اولین و آخرین تکثیر و درصد موادین تکثیر شده در هر تیمار**

| تیمار | تعداد مولدین | تعداد تکثیر شده | زمان اولین تکثیر بعد از تزریق (روز) | زمان آخرین تکثیر بعد از تزریق (روز) | درصد مولدین تکثیر شده |
|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | ۷ | ۷ | ۸ | ۱۰ | ۱۰۰ |
| ۲ | ٦ | ٦ | ۸ | ۱۱ | ۱۰۰ |
| ۳ | ۸ | ۷ | ۹ | ۲۲ | ۸۷ |
| ٤ | ٦ | ٦ | ۸ | ۱۳ | ۱۰۰ |
| ٥ | ٥ | ۳ | ۱٤ | ۳۲ | ٦۰ |
| ٦ | ۸ | ٦ | ۱٥ | ۳٦ | ۷٥ |

تاثیرات تزریق GnRHa در روش‌های مختلف بر میانگین زمان اوولاسیون مولدین، کیفیت تخم‌های استحصالی و مرگ و میر ماهیان در این آزمایش تزریق امولسیون GnRHa-FIA با استفاده از لال نمکی به طور معنی داری زمان تخم‌ریزی ماهیان مولد را در مقایسه با تیمار دریافت‌کننده ترکیب GnRHa-FIA با استفاده از حلال گلیکول پروپیلن و گروه دریافت کننده هورمون GnRHa در یک مرحله کاهش داد ($P>$ ۰/۰۵). اما در

ماهیانی که هورمون محلول در سرم فیزیولوژی یا گلیکول پروپیلن را در دو مرحله تزریق دریافت نمودند (تیمارهای یک و دو) تفاوت آماری معنی‌داری با مولدین تیمار یک که هورمون محلول در سرم فیزیولوژی و آدجوانت را دریافت نموده بودند مشاهده نگردید ($P>۰/۰۵$).

تیمار ۱ دارای کوتاهترین میانگین زمان اوولاسیون (۸/۷۱ روز) و تیمار ٦ دارای طولانی‌ترین میانگین زمان اوولاسیون (۲۸/۱۳روز) بود. میانگین زمان اوولاسیون برای تیمارهای ۲، ۳، ٤ و ٥ به‌ترتیب ۹/۳۳، ۱۰/٥، ۱۹/۳۳ و ۲۷/۸ روز بدست آمد (شکل ۲). ماهیان تیمارهای ۱، ۲ و ٤ حدود سه هفته زودتر از سایر ماهیان گروه شاهد و ماهیان تزریق شده با هورمون GnRHa خالص و در یک مرحله تخم‌ریزی کردند.




**شکل ۲- میانگین زمان اوولاسیون (±انحراف معیار) تیمارهای مورد آزمایش. تیمارهای با حروف یکسان لاتین فاقد تفاوت معنی‌دار می‌باشند ($P>۰/۰۵$)**

درصد لقاح، چشم زدگی و تفریخ در کلیه تیمارها نرمال بود (جدول ۳) و تفاوت آماری معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ($P>۰/۰۵$) و در هیچکدام از تیمارها مرگ و میر قبل یا بعد از تخم‌ریزی مشاهده نگردید.

**جدول ۳- درصد لقاح، چشم زدگی و تفریخ تخم‌های بدست آمده از مولدین تیمارهای مورد آزمایش، تفاوت معنی‌داری در بین تیمارهای مختلف در صفات اندازه‌گیری شده مشاهده نگردید ($P>۰/۰۵$).**

| تیمارها | درصد لقاح | درصد چشم زدگی | درصد تفریخ |
|---|---|---|---|
| ۱ | ۷٥/۱٥ ± ۲/۰٥ | ۹۰/۰۰ ± ۱/۸۲ | ۹۳/۲۹ ± ۰/٤۳ |
| ۲ | ۷٦/٤۰ ± ۲/۱٤ | ۹۰/۰٥ ± ۱/٤۷ | ۹۳/۲۹ ± ۱/۲۲ |
| ۳ | ۷۸/۸۰ ± ۳/٥۲ | ۹۱/۷۷ ± ۱/٥۸ | ۹۳/۸۸ ±./۱۷٥ |
| ٤ | ۷۷/٦۸ ± ۲/۲ | ۹۰/۳۲ ± ./٦٦ | ۹۳/٦۸ ± ۱/۱ |
| ٥ | ۷۸/٤۰ ± ۲/۲۸ | ۹۱/٦٤ ± ۱/۸۲ | ۹۳/۷۰ ± ۱/٥٤ |
| ٦ | ۷۸/۸۲ ± ۲/۹٥ | ۹۲/۱۰ ± ۱/٦۳ | ۹٤/٥۰ ± ۰/۷۹ |

## بحث و نتیجه‌گیری

آزاد ماهیان از جمله ماهیانی هستند که تاکنون مطالعات بسیاری در رابطه با روند تاثیر هورمون‌های تولیدمثلی در تحریک و تسریع اوولاسیون در آنها صورت گرفته است و بخش عظیمی از دانش اکوفیزیولوژی تولید مثل ماهیان با مطالعه بر روی این خانواده از ماهیان به دست آمده است.

تاکنون هورمون های مختلفی با موفقیت در تحریک تولید مثل ماهیان استفاده شده است. این عمل با استفاده از هیپوفیز از سال ۱۹۳۰ شروع شده و تا به امروز که آنالوگ‌های فوق‌العاده مؤثری ازهورمون GnRH به‌طورمصنوعی ساخته شده و تکنیک‌های بسیار موثری جهت رسانش این هورمون ابداع شده، توسعه فراوانی یافته است.

در آزاد ماهیان طول دوره گامتوژنزیز تحت کنترل گنادوتروپین‌ها قرار دارد (٤). پس می‌توان گفت که برای پیشرس‌کردن و همزمان نمودن اوولاسیون در ماهی قزل‌آلا نیاز به تحریک دراز مدت و کنترل شده ترشح GtH می‌باشد. به‌عبارت دیگر اوولاسیون القایی در آزادماهیان نیازمند تزریقات مکرر هورمون GnRH می‌باشد که در شرایط کارگاهی چندان مقدور نیست. از طرف دیگر تزریق چند باره هورمون GnRH باعث مصرف زیاد هورمون و ایجاد استرس در ماهیان می‌گردد که استرس خود عامل مهمی در کاهش کیفیت گامت ماهیان و حتی بازدارنده رشد گناد آنان می‌باشد. بنابراین با توجه به نتایج تحقیقات صورت گرفته در پزشکی، استفاده از روش‌های رسانش پایدار هورمون در ماهی نیز رواج پیدا کرد.

برای افزایش کارآیی و در دسترس بودن زیستی هورمون GnRHa چندین روش رسانش پایدار تا کنون با موفقیت در بسیاری از گونه‌های ماهیان استفاده شده است. این روش‌ها شامل پمپ‌های اسمزی، پلت‌های کلسترولی، پلت‌های کلسترولی- سلولزی، استات اتیلن- ونیل، ترکیب پلی‌لاکتیک-گلیکولاکتیک و میکروسفرهای اسید چرب و GnRHa-FIA می‌باشد (۲، ٤، ٦ و ۱۲).

نتایج این تحقیق نیز نشان داد که آدجوانت ناقص فروند در امولسیون نمودن هورمون GnRHa کارآیی لازم را داشته و تزریق ترکیب GnRHa-FIA همانند روش معمول استفاده از این هورمون در کارگاه‌های تکثیر قزل آلا (پروتکل تزریق دو مرحله‌ای) در تحریک و همزمانی اولاسیون مولدین قزل آلا موثر می‌باشد. لذا با یک بار تزریق GnRHA-FIA علاوه بر تحریک مناسب اوولاسیون ماهیان از تزریقات مکرر و ایجاد استرس جلوگیری می‌شود. Arabachi (۲۰۰۰) و Arabachi و همکاران (۲۰۰٤) نیز از این روش در ماهی شانک اروپایی و قزل‌آلای رنگین کمان استفاده و القا اوولاسیون مناسبی را گزارش نمودند. به نظر می‌رسد با استفاده از امولسیون هورمون و آدجوانت، GnRHa به‌تدریج در بدن آزاد می‌گردد که در تحریک مناسب هیپوفیز و آزادسازی هورمون GtH و در نهایت بلوغ نهایی تخمک‌ها موثر می‌باشد. اما در این تحقیق هنگامی که هورمون GnRHa به‌شکل خالص و در یک مرحله با میزان مشابه استفاده گردید در همزمانی اوولاسون مولدین بی‌تأثیر بود. محققان دیگر نیز نتایج مشابهی را گزارش نمودند که از دلایل آن می‌توان به تجزیه و در نتیجه دفع سریع GnRHa از بدن ماهی اشاره نمود که فقط در ماهیانی موثر خواهد بود که در مراحل نهایی بلوغ اووسیت بوده و در سایر ماهیان تاثیر مناسبی ندارد (٤، ۹ و ۱۲).

از طرف دیگر تزریق هورمون محلول در گلیکول پروپیلن همراه با آدجوانت ناقص فروند در همزمانی اوولاسیون مولدین تأثیری نداشت. از دلایل احتمالی این موضوع می توان به ماهیت حلال هورمون (گلیکول پروپیلن) اشاره نمود. چرا که گلیکول پروپیلن یک نوع حلال روغنی است و به نظر می‌رسد به‌طور مناسب با آدجوانت ناقص فروند ترکیب نگشته است. به‌عبارت دیگر در تیمار یک، هورمون در محلول نمکی حل شد و با آدجوانت ترکیب و امولسیون ایجاد گردید، اما در تیمار ۳ بخش آبی که برای تشکیل امولسیون ضروری است

وجود نداشت و ترکیب آدجوانت و گلیکول پروپیلن که هر دو ترکیبی روغنی می‌باشند سریعاً از هم جدا شده و تأثیر مناسبی بر روند غدد درون‌ریز ماهیان نداشتند.

مورد قابل توجه دیگر در این تحقیق در مقایسه با تحقیق Arabachi و همکاران (۲۰۰٤) در ماهی قزل‌آلا، عدم وجود مرگ و میر، قبل یا بعد از تخم‌ریزی مولدین در این تحقیق بود. اما Arabachi و همکاران حدود ۵۰ درصد مرگ و میر بعد از تخم‌ریزی را در مولدین ماده قزل‌آلا پس از تزریق ترکیب GnRHA-FIA گزارش نمودند ولیکن در تحقیق Arabachi در سال ۲۰۰۰ در ماهی شانک اروپایی مرگ و میری مشاهده نشد. تحقیق Arabachi و همکاران (۲۰۰٤) تنها گزارش بی‌سابقه ای است چنین درصد بالایی از مرگ و میر را در هنگام استفاده از روش‌های رسانش پایدار گزارش می‌نماید (۲). از دلایل احتمالی این تفاوت می‌توان به‌میزان آدجوانت مصرفی در دو تحقیق اشاره کرد. Arabachi و همکاران برای هر کیلوگرم وزن بدن مولدین ۰/۵ میلی‌لیتر آدجوانت استفاده نمودند ولی در تحقیق حاضر برای هر مولد (نه هر کیلوگرم وزن بدن) ۰/۲۵ میلی لیتر آدجوانت استفاده شد که حدود یک چهارم آدجوانت مصرفی توسط Arabachi و همکاران بود. از آنجا که اثرات جانبی آدجوانت فروند وابسته به میزان می‌باشد (۷ و ۸)، شاید از دلایل مرگ و میر زیاد تحقیق یاد شده بتوان به میزان بالای آدجوانت اشاره نمود.

با توجه به مطالب ذکر شده می‌توان استفاده از آدجوانت ناقص فروند را برای امولسینه نمودن هورمون GnRHa و در نتیجه رسانش پایدار آن در ماهی قزل‌آلا پیشنهاد نمود. توصیه می‌شود به جای تزریقات متعدد و چند باره هورمون GnRHa از این روش استفاده گردد که علاوه بر کاهش استرس مولدین در کاهش هزینه‌های کارگری در کارگاه‌های تکثیر نیز مؤثر خواهد بود.

## سپاسگزاری

از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان برای تامین بخشی از هزینه‌های این تحقیق سپاسگزاری می‌گردد. از همت بلند و همکاری بسیار صمیمانه مهندس نیکوکار و مهندس قاسمپور و کلیه کارکنان کارگاه تکثیر ۲۲ بهمن سپیدان که ماهیان مورد نیاز را تأمین نمودند، صمیمانه تشکر می‌گردد.

## منابع

1.Arabaci, M., 2000. Induction and synchronization of spawning in sea bass and sea bream broodstocks by using long-acting LH-RHa preparation. Ege University, Thesis of Ph.D., 87 pp., Izmir, Turky. In Turkish (Abstract in English).

2.Arabaci, M., Diler, I., and Sari, M., 2004. Induction and synchronization of ovulation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by administration of emulsified buserelin (GnRHa) and its effects on egg quality. Aquaculture, 237: 475-484.

3.Billard, R., Reinand, P., Hollebecq, M., and Breton, B., 1984. Advancment and synchronization of spawning in *Salmo gairdneri* and *S.trutta* following administration of LRH-a combined or not with pimozide. Aquaculture, 43: 57-66.

4.Breton, B., Weil, C., Sambroni, E., and Zohar, Y., 1990. Effects of acute versus sustained administration of GnRHa on GtH release and ovulation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture, 91: 371-383.

5.Crim, L.W., and Glebe, B.D., 1984. Advancement and synchrony of ovulation in Atlantic salmon with pelleted LHRH analog. Aquaculture, 43: 47-56.

6.Flies, D.B., and Chen, L., 2003. A simple and vortex method for preparing antigen/adjuvant emulsions for immunization. J. Immunology Methods, 276: 239-242.

7.Melingen, G.O., and Wergeland, H.I., 2002. Physiological effects of an oil-adjuvanted vaccine on out-of-season Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolt. Aquaculture, 214: 397-409.

8.Midtlyng, P.J., Reitan, L.J., and Spielberg, L., 1996. Experimental studies on the efficacy and side effects of intrapritoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar*) against frunculosis. Fish & Shellfish Immunology, 6: 335-350.
9.Mylonas, C.C., Hinshaw, M.J., and Sulivan, V.C., 1992. GnRHa-induced ovulation of brown trout (*Salmo trutta*) and its effects on egg quality. Aquaculure, 106: 379-392.
10.Stills, J.R., and Bailey, M.Q., 1991. The use of Freund's complete adjuvant. Lab Animal, 20: 25-30.
11.Zohar, Y., 1988. Gonadotropin releasing hormone in spawning induction in teleost: basic and applied consideration. In: Zohar, Y., Breton, B. (Eds). Reproduction in fish: Basic and Applied Aspects in Endocrinology and Genetics. INRA press, Paris, pp: 47-62.
12.Zohar, Y., and and Mylonas, C.C., 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. Aquaculture, 197: 99-136.
13.Zohar, Y., Goren, A., Fridkin, M., Elhanati, E., and Koch, T., 1990. Degradation of gonadotropin releasing hormone in the gilthead seabream *Sparus aurata*: II. Cleavage of native salmon GnRHa, Mammalian LHRH and their analogs in the pituitary, kidney and liver. Gen. Comp. Endocrinol, 79: 306-331.

# Effects of several methods of GnRHa administration on induction and synchronization of ovulation in rainbow rout, *Oncorhynchus mykis*

***A. Vazirzadeh[1], A.M. Hajimoradloo[1], A. Imani[2], K. Rezaei[2] and A. Azhdehakosh pour[3]**

[1]Dept. of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, [2]Dept. of Fisheries and Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karadj, Iran, [3]Dept. of Aquaculture, Off Shore Fisheries Research Institute, Chabahar, Iran

*E-mail: vazir@ut.ac.ir*

**Abstract**

In this study likely effects of water in oil (w/o) emulsion versus acute administration of gonadotropin releasing hormone agonist (GnRHa) on induction and synchronization of ovulation in rainbow trout were examined. GnRHa was diluted in physiological saline (PS) or propylene glycol (PG) and mixed with equal volume of Freund's incomplete adjuvant (GnRHa-FIA). All fish received 0.5 ml intraperitoneal injections. Dose of hormone in all groups was 25 $\mu g/kg^{-1}$ except control fish which received physiological saline. All fish injected with PS diluted GnRHa, combined with adjuvant or in two injections protocol ovulated 10 and 11 days after injection respectively. In contrast only 75% in control fish and 60% of fish with an acute injection of pure GnRHa ovulated up to 36 days after injection. In fish injected with PG diluted GnRHa combined with adjuvant ovulation percentage reached to 87% until the end of experiment compared to 100 % ovulation for fish injected twice with PG diluted GnRHa. Fertilization, eyeing and hatching percentages were normal in all treatment groups and did not differ significantly among groups ($P>0.05$). None of treatments caused any pre or post-spawning mortality. In conclusion, combination of physiological diluted GnRHa with Freund's incomplete adjuvant (GnRHa-FIA) was effective in advancing the onset of ovulation, synchronizing the ovulation of treated fish and shortening the reproductive period, relative to control or acute GnRHa injected group ($P<0.05$). GnRHa-FIA did not affect egg quality or cause any mortality in the treated broodstock.

***Keywords**:* Freund's incomplete adjuvant; Induced spawning; Egg quality; Rainbow trout; GnRHa