نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد دوم، شماره اول، بهار ۱۳۹۲
http://japu.gau.ac.ir

مقایسه تأثیر LHRH-A_2 و پیموزاید هر یک به تنهایی و در ترکیب با یکدیگر روی تخم‌ریزی و شاخص‌های کیفیت تکثیر مولدین ماده ماهی سفید *Rutilus frisii kutum*

***محدثه احمدنژاد[۱]، شهربانو عریان[۲]، همایون حسین‌زاده‌صحافی[۳] و حسین خارا[۴]**

[۱]دانش‌آموخته دکتری، پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی کشور، بندرانزلی، [۲]استاد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم دانشگاه خوارزمی، تهران، [۳]دانشیار موسسه تحقیقات شیلات ایران، [۴]استادیار گروه شیلات دانشگاه آزاداسلامی واحد لاهیجان

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۱۵ ؛ تاریخ پذیرش:۹۱/۶/۱۹

چکیده

این پژوهش با هدف بررسی اثرات استفاده از هورمون LHRH-A_2 (Luteinizing Hormone Releasing Hormone Analogue) و پیموزاید (آنتاگونیست دوپامین)، بر تخم‌ریزی و شاخص‌های کیفیت تکثیر، روی ۶۳ مولد ماده ماهی سفید انجام شد. تیمارها شامل: ۱- LHRH-A_2 ($\mu g\ kg^{-1}$ bw) ۱)، ۲- پیموزاید (۵ $mg\ kg^{-1}$ bw)، ۳- ترکیب پیموزاید و LHRH-A_2 (μg bw+۵ $mg\ kg^{-1}$ bw) ۱)، ۴- عصاره هیپوفیز (شاهد مثبت) (kg^{-1} ۱ $mg\ kg^{-1}$ bw)، ۵- نرمال سالین ۷ درصد به میزان ۱ سی‌سی به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن ماهی (شاهد منفی) و ۶- گروه ماهیان بدون تزریق، بودند. تزریق به روش داخل عضلانی صورت گرفت و درصد جواب‌دهی، فاصله زمانی از تزریق تا تخم‌ریزی، شاخص اوولاسیون، هماوری کاری، درصد لقاح تخم، درصد وزن تخمک نسبت به وزن بدن و درصد تخمه‌گشایی و نیز بافت تخمدان مولدین به روش بافت‌شناسی کلاسیک مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس نتایج، بیش‌ترین درصد جواب‌دهی (۷۷/۷۸ درصد)، کم‌ترین زمان سپری شده از تزریق تا تخم‌ریزی (۳۴/۲±۴/۷)، بیش‌ترین میانگین درصد وزن تخمک استحصالی نسبت به وزن بدن (۱۴/۲±۱/۳) و بیش‌ترین درصد لقاح (۹۵/۹±۰/۸) و درصد تخمه‌گشایی (۴۴/۲±۱۰/۴) به تیمار ۳

*مسئول مکاتبه: m_ahmadnezhad@yahoo.com

(ترکیب پیموزاید و LHRH-A_2) تعلق داشت. در بررسی بافت‌شناسی مشخص شد تخمدان اغلب ماهیانی که به تزریق پاسخ نداده بودند در اواخر مرحله چهار رسیدگی جنسی و تخمدان ماهیان پاسخ داده به تزریق در مرحله شش قرار داشت. به‌نظر می‌رسد تزریق ترکیب پیموزاید و LHRH-A_2 (bw $^{-1}$ ۱ µg kg $^{-1}$ bw+۵ mg kg) به‌دلیل وجود بیشترین درصد جواب‌دهی، کمترین تأثیر منفی بر تکثیر و به صرفه بودن از نظر اقتصادی نسبت به عصاره هیپوفیز، می‌تواند به‌عنوان یک روش مفید در زمینه توسعه روش‌های تکثیر مصنوعی ماهی سفید در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: ماهی سفید، *Rutilus frisii kutum*، LHRH-A_2، پیموزاید، شاخص‌های کیفیت تکثیر

مقدمه

کنترل فعالیت تولیدمثلی از طریق القای هورمونی از روش‌های جدیدی است که در تکثیر آبزیان مورد استفاده قرار می‌گیرد. با دستکاری در شرایط محیطی مثل فتوپریود و یا درجه حرارت آب می‌توان تولید مثل ماهیان را در شرایط اسارت کنترل نمود. اما از آن‌جا که اکوبیولوژی برخی از ماهیان به‌خوبی شناخته نشده است یا تحریک هریک از شرایط محیطی موردنیاز برای تولید مثل طبیعی (مثل مهاجرت برای تخم‌ریزی، عمق آب و نیروهای محرکه هیدرولیکی رودخانه‌ای و ...)، غیر عملی یا حتی غیر ممکن است، بنابراین استفاده از هورمون‌های اگزوژن یک روش مؤثر برای القای رسیدگی تولید مثلی و تولید تخم‌های لقاح یافته می‌باشد. اما نوع هورمون، دستورالعمل‌های اجرایی و روش‌های به‌دست آوردن تخمک و اسپرم بسته به بیولوژی تولید مثل هر ماهی فرق می‌کند. بنابراین به‌دست آوردن دانش فنی کنترل اندوکرین گامتوژنز، رسیدگی نهایی و تخم‌ریزی برای مدیریت مناسب این گونه‌ها موردنیاز است (میلوناس و همکاران، ۲۰۱۰). ماهی سفید *Rutilus frisii kutum*، از خانواده کپور ماهیان (نلسون، ۱۹۷۶) یکی از گونه‌های مهم ماهیان استخوانی دریای خزر می‌باشد که تکثیر مصنوعی مولدین آن با استفاده از تزریق عصاره هیپوفیز کپور (CPE) انجام می‌شود. CPE باید دارای مقدار کافی از هورمون‌های گنادوتروپین به‌ویژه LH باشد تا بتواند به‌خوبی تخم‌ریزی را القا نماید.

با کشف و ساخت تجاری آگونیست‌های مختلف GnRH (GnRHa: gonadotropin-releasing hormone agonists) برای استفاده در پزشکی (یولا-اگور و تیموسی، ۲۰۰۰)، استفاده از آن‌ها برای القای تخم‌ریزی در ماهی‌ها به‌علت مزیت‌های مهم آن‌ها بر استفاده از LH، به سرعت

افزایش یافت. GnRH ۱- به‌دلیل شباهت زیاد ساختمانی که در میان ماهی‌ها دارد (لیتیمونیر و همکاران، ۲۰۰۴) به اندازه LH اختصاصی نیست، ۲- به‌دلیل دارا بودن ماهیت سنتتیک، به‌عنوان یک تهدید برای انتقال بیماری، همان‌طور که CPE می‌باشد، محسوب نمی‌شود، ۳- در سطحی بالاتر از محور مغز-هیپوفیز-گناد عمل نموده و رهاسازی گنادوتروپین‌های اندوژن (درون ساز) (LH و FSH) همچنین دیگر هورمون‌های هیپوفیز که ممکن است برای عملکردهای تولیدمثلی مهم باشند را تحریک می‌نماید (کایر و ایلش، ۱۹۹۶؛ لی‌گاک و همکاران، ۱۹۹۳؛ نیگاتو و همکاران، ۱۹۹۸؛ وبر و همکاران، ۱۹۹۵). بنابراین یکپارچگی بهتری را در مراحل تولیدمثلی فراهم می‌کند. در برخی از ماهی‌ها ممانعت قوی از رهاسازی پایه‌ای و تحریک شده از سوی GnRH در آزادسازی LH توسط دوپامین وجود دارد. بنابراین استفاده از آنتاگونیست‌های دوپامین (مانند دومپریدون، پیموزاید، ریسرپین یا متوکلوپرامید) ممانعت را از روی گنادوتروپین‌ها بر می‌دارد و اثر تحریک‌کنندگی GnRHa را روی رهاسازی LH افزایش می‌دهد. تأثیر GnRHa و آنتاگونیست‌های دوپامین بر اوولاسیون به نوع ماده و غلظت آن به محیط و گونه ماهی بستگی دارد (زوهار و میلوناس، ۲۰۰۱). به همین دلیل لازم است برای هر گونه‌ای در شرایط بومی، پاسخ به ترکیب GnRH و آنتاگونیست دوپامینی مورد آزمایش قرار گیرد. اخیرا دستکاری‌های هورمونی در تولیدمثل با استفاده از ترکیب GnRHa با آنتاگونیست دوپامین اغلب در کپورماهیان (کامینیسکی و همکاران، ۲۰۰۴؛ میکولازیک و همکاران، ۲۰۰۳، ۲۰۰۴؛ یارون، ۱۹۹۵)، گربه ماهی‌ها (برزوسکا، ۲۰۰۱؛ سیلورستین و همکاران، ۱۹۹۹؛ ون و لی، ۲۰۰۴)، کفال ماهیان (ایزن و همکاران، ۲۰۰۵؛ عربکی و ساری، ۲۰۰۴؛ گلوبوکو و همکاران، ۱۹۹۴)، استفاده شده است. در ایران نیز مطالعه اثر GnRH به تنهایی و یا در ترکیب با آنتاگونیست‌های دوپامین روی قزل‌آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss*، (دورافشان و همکاران، ۲۰۰۳؛ پایکان حیرتی و همکاران، ۲۰۰۱) کپور معمولی *C. carpio* (قبادی، ۲۰۰۵؛ دورافشان و همکاران، ۲۰۰۳؛ راسخی، ۱۹۹۹) و فیتوفاگ *Hypophthalmichthys molitrix* (کاشانی‌ثابت و همکاران، ۲۰۰۵) انجام شده است. بررسی هورمون تراپی روی مولدین ماهی سفید توسط درافشان و حیرتی (۲۰۰۶) انجام شد به‌طوری‌که ترکیب GnRHa با متوکلوپرامید (۲۰ mg kg^{-1} bw + ۱۰ mg kg^{-1} bw) به‌عنوان روش مؤثر بر القای اوولاسیون در این مولدین ذکر گردید (دورافشان و حیرتی، ۲۰۰۶). در این پژوهش از هورمون LHRH-A_2 که یک آنالوگ فوق فعال GnRH است و پیموزاید به‌عنوان آنتاگونیست گیرنده دوپامینی، استفاده شده است. در این پژوهش با هدف مقایسه اثرات ناشی از تزریق LHRH-A_2 و

پیموزاید و ترکیب آن دو با یکدیگر بر تخم‌ریزی مولدین ماده ماهی سفید در شرایط کارگاهی و سنجش هریک از شاخص‌های کیفیت تکثیر جهت مشخص نمودن کارایی هورمون تراپی انجام شده، در مراحل رشد و نمو ماهی از تخم تا لارو صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

آزمایش روی ۶۳ مولد ماده ماهی سفید (وزن ۱۲۰۰-۵۰۰ گرم) صید شده از دهانه رودخانه سفید رود در زمان مهاجرت (فروردین- اردیبهشت ۱۳۸۶) که به مرکز تکثیر، پرورش و بازسازی ذخایر آبزیان شهید انصاری رشت جهت تکثیر انتقال یافته بودند، انجام گرفت. نخست به‌منظور کاهش اثرات ناشی از دستکاری، مولدین مورد آزمون در محلول بیهوشی گل میخک با غلظت ۱ گرم در لیتر بیهوش شدند (برای کاهش اثرات جانبی ناشی از کاربرد ماده بیهوشی این فرایند در حداقل زمان ممکن انجام شد). مولدین پس از توزین، بر اساس وزن بدن مورد تزریق و نشانه‌گذاری قرار گرفتند، آنگاه درون وان فایبرگلاس دارای آب ورودی مرکز تکثیر (با درجه حرارت حدود ۱۳-۱۰ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شدند.

آزمایش‌ها در دو فاز انجام گردید: الف) فاز آزمایشی جهت تعیین دوز بهینه هورمون $LHRH-A_2$، ب) فازاصلی. در فاز آزمایشی به ۹ مولد ماده ماهی سفید در ۳ گروه آزمایشی (با احتساب ۳ مولد در هر گروه)، به‌ترتیب به میزان ۰/۵، ۱ و ۲ میکروگرم به ازای هرکیلوگرم وزن بدن از هورمون $LHRH-A_2$ تزریق گردید. بر اساس درصد جواب‌دهی مولدین به $LHRH-A_2$ در فازآزمایشی، دوز $1\ \mu g\ kg^{-1}\ bw$ مورد استفاده قرار گرفت. دوز پیموزاید (به‌صورت قرص برای مصرف انسانی با نام تجاری Orap) نیز با توجه به منابع (گیلت و همکاران، ۱۹۹۶؛ میکولازیک و همکاران، ۲۰۰۴؛ برزوسکا و ادامک، ۱۹۹۹) (تاراکان و جوی، ۱۹۹۶) به میزان $5\ mg\ kg^{-1}\ bw$ انتخاب گردید. در فاز اصلی آزمایش، ۵۴ مولد در ۶ گروه تیماری مختلف (با احتساب ۹ مولد در هر تیمار) به‌این ترتیب مورد تزریق قرار گرفتند: ۱- $LHRH-A_2$ ($1\mu g\ kg^{-1}\ bw$)، ۲- پیموزاید $5\ mg\ kg^{-1}\ bw$، ۳- پیموزاید+LHRH-A2 ($mg\ bw$) $1\ \mu g\ kg^{-1}\ bw + 5\ kg^{-1}$)، ۴- تزریق عصاره هیپوفیز (شاهد مثبت) ($1\ mg\ kg^{-1}\ bw$)، ۵- محلول نرمال سالین ۰/۷ درصد به میزان ۱ سی‌سی به ازای هرکیلوگرم وزن بدن ماهی (گروه شاهد منفی) و ۶- گروه ماهی بدون تزریق.

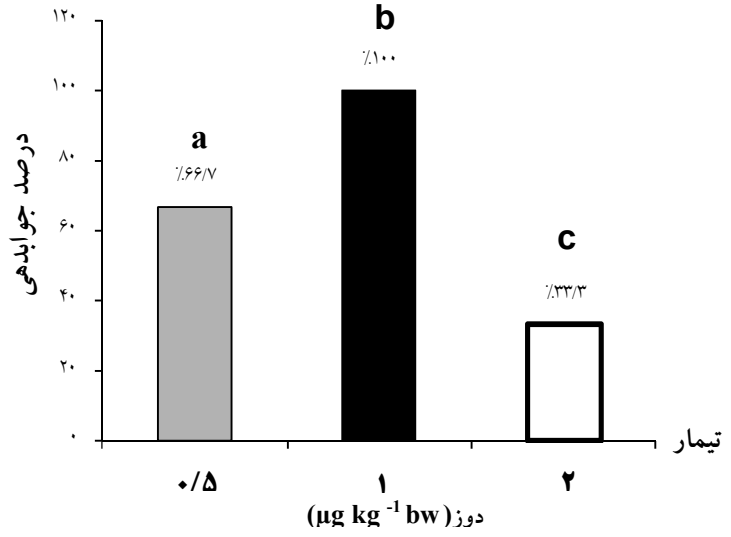
عملیات تزریق در یک مرحله و با توجه به وزن بدن (کیلوگرم) به عضله زیر باله سینه‌ای هر مولد انجام شد. استفاده از حجم حداکثر ۱ سی‌سی (میلی‌متر) محلول تزریقی به مولدین در نظر گرفته شد. مولدین تزریق شده، ابتدا بعد از ۲۴ ساعت و سپس هر ده ساعت یک‌بار مورد بازدید قرار گرفتند. در هر بازدید بر اساس شل شدن شکم از مولدین آماده تخم‌ریزی، تخم‌کشی به عمل آمد. تخمک حاصل پس از توزین، با مخلوط اسپرم حاصل از سه مولد نر لقاح داده شد. به جهت یکسان شدن شرایط تکثیر برای تمام تیمارها، اسپرم استحصالی از مولدین نر هم سن (سه ساله) با هم مخلوط شدند. تخم‌ها پس از آبکشی و از بین رفتن چسبندگی به داخل ویس‌ها منتقل و روی هر ویس مشخصات مولد و تیمار مربوطه ثبت گردید. در فاز اصلی آزمایش پارامترهای زیر مورد بررسی قرار گرفتند: درصد جواب‌دهی (تعداد ماده‌های تخم‌کشی شده تقسیم بر تعداد ماهیان تزریق شده ضربدر ۱۰۰)، فاصله زمانی بین تزریق و اوولاسیون[1] (میانگین زمان بین تزریق و اوولاسیون بر طبق ساعت) (دروری و همکاران، ۱۹۹۴)، شاخص اوولاسیون (OI%)[2] (وزن تخم استحصالی برحسب گرم تقسیم بر مجموع وزن باقی‌مانده تخمدان و وزن تخم استحصالی برحسب گرم ضربدر ۱۰۰) (سزابو و همکاران، ۲۰۰۲)، هماوری کاری[3] (تعداد تخم‌های به‌دست آمده از هر مولد تقسیم بر وزن بدن براساس کیلوگرم) (بیلارد، ۱۹۹۰)، درصد وزن تخمک استحصالی نسبت به وزن بدن (وزن تخمک استحصالی هر مولد براساس گرم تقسیم بر وزن بدن مولد به گرم)، درصد لقاح (میزان تخم‌های لقاح یافته در مرحله گاسترولاسیون تقسیم بر کل تخم‌های نمونه‌برداری ضرب‌در ۱۰۰)، (رضوی‌صیاد، ۱۹۹۶)، درصد تخمه‌گشایی (تعداد لارو دارای کیسه زرده تقسیم بر تعداد کل تخم‌های لقاح یافته ضرب‌در ۱۰۰). از تخمدان مولدین پاسخ داده و پاسخ نداده به تزریق، جهت بررسی بافت‌شناسی نمونه‌برداری شد. جهت بررسی میکروسکوپی رسیدگی تخمدان از کلید شناسایی شش مرحله‌ای استفاده شد (NACA, 1989) بافت تخمدان نمونه‌برداری شده پس از تثبیت در محلول بوئن از مراحل آبگیری، شفاف‌سازی، پارافینه شدن، قالب‌گیری، برش، رنگ‌آمیزی (هماتوکسیلین و ائوزین) و مونته کردن عبور داده شدند (کاظمی و بهمنی، ۱۹۹۹؛ پوستی و مرودستی، ۲۰۰۰). نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده به‌وسیله میکروسکوپ نوری دوربین‌دار نیکون (مدل Nikon Eclipse 50i) مورد مشاهده و تصویربرداری

1- Latency Period
2- Ovulation Index
3- Working Fecundity

قرار گرفتند. به‌منظور تجزیه و تحلیل آماری کلیه اطلاعات گردآوری شده از بررسی‌های کارگاهی و آزمایشگاهی، از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون مقایسه میانگین توکی با درصد اطمینان ۹۵ درصد (P<۰/۰۵) استفاده شد. برای آنالیز در صد جواب‌دهی مولدین از آزمون تطابق توزیع مربع کای (Chi-square test) در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده گردید (سزابو و همکاران، ۲۰۰۲). کارهای آماری به‌وسیله نرم‌افزار Spss نسخه ۱۳ و رسم نمودار توسط نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج

الف) نتایج آزمون اولیه برای تعیین دوز بهینه $LHRH\text{-}A_2$ با استفاده از آزمون تطابق توزیع مربع کای (Chi-square test) در سطح اطمینان ۹۵ درصد مشخص شد که از سه گروه آزمایشی با دوزهای مختلف $LHRH\text{-}A_2$، مقدار جواب‌دهی گروه تیماری $LHRH\text{-}A_2$ (۱ $\mu g\ kg^{-1}\ bw$) با درصد جواب‌دهی ۱۰۰ درصد، از اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها برخوردار بود (P<۰/۰۵) (نمودار ۱). بنابراین دوز ۱ $\mu g\ kg^{-1}\ bw$ برای $LHRH\text{-}A_2$ انتخاب گردید.



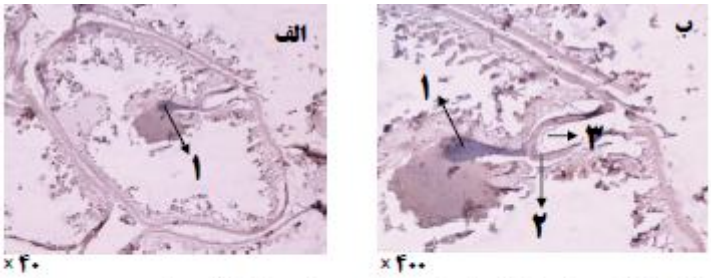
نمودار ۱- مقایسه درصد جواب‌دهی مولدین درسه گروه تیماری مختلف جهت تعیین دوز بهینه $LHRH\text{-}A_2$. حروف انگلیسی متفاوت در شکل بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۵ درصد می‌باشد

ب) نتایج تیمارهای آزمون اصلی

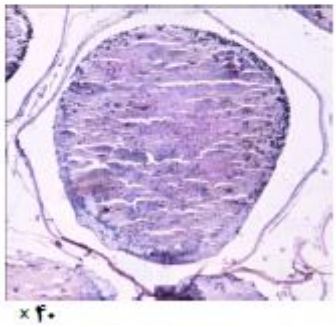
در هیچ یک از ماهیان گروه شاهد منفی (نرمال سالین ۷ درصد) و همچنین گروه مولدین بدون تزریق، اوولاسیون صورت نگرفت. در گروه شاهد مثبت (عصاره هیپوفیز) ۷۷/۸ درصد مولدین به تزریق جواب دادند. بیشترین درصد جواب‌دهی مولدین ماده، به تیمار ۳ (۷۷/۸ درصد) و کمترین درصد جواب‌دهی به تیمار ۲ (۴۴/۴ درصد) تعلق داشت که نسبت به سایر تیمارها از اختلاف معنی‌دار آماری برخوردار بود ($P<۰/۰۵$). همچنین گروه $LHRH-A_2$ دارای درصد جواب‌دهی ۶۶/۷ درصد بود که نسبت به تیمار ۳ و شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت ($P>۰/۰۵$). کمترین زمان سپری شده از تزریق تا تخم‌ریزی (۴/۷±۳۴/۲)، بیشترین میانگین درصد وزن تخمک استحصالی نسبت به وزن بدن (۱/۳±۱۴/۲) و بیشترین درصد لقاح (۰/۸±۹۵/۹) و درصد تخمه‌گشایی (۱۰/۴±۴۴/۲) به تیمار ۳ (ترکیب پیموزاید و $LHRH-A_2$) تعلق داشت. ضمن این که تیمارها از نظر تمامی فاکتورهای اندازه‌گیری شده جهت بررسی کیفیت لقاح فاقد هرگونه اختلاف معنی‌دار آماری بودند (جدول ۱). بررسی بافت‌شناسی بیانگر از آن بود که تخمدان تمام مولدینی که به تزریق پاسخ داده بودند، در مرحله VI (شش) رسیدگی جنسی قرار داشت. در این مرحله بعد از عمل اوولاسیون مقداری از غشاهای فولیکولی و تخمک‌های بالغ هنوز از تخمدان تخلیه نشده و در حال دژنره و جذب بودند. ساختمان بی‌نظمی از غشاهای فولیکولی حضور داشت. به‌علاوه مقداری از اووسیت‌های موجود در تخمدان در حال تکامل (مراحل I و II) مشاهده شدند (شکل ۳). تخمدان نمونه‌های متعلق به مولدین فاقد پاسخ به تزریق در تیمارهای ۳، شاهد منفی (نرمال سالین ۷ درصد) و مولدین طبیعی و بدون تزریق، در زیر مرحله سوم از مرحله IV (چهار) رسیدگی جنسی قرار داشتند. در این مرحله در غالب تخمک‌ها گرانول‌های زرده اغلب در تمام فضای بیرون هسته به‌جز قسمت کوچکی در اطراف هسته نزدیک غشاء تخمک پراکنده‌اند. لبه هسته شکل مواج داشته و تعدادی از هستک‌ها تجمع پیدا کرده و اغلب هستک‌ها به مرکز حرکت کرده بودند و هسته کامل در قطب جانوری قرار داشت (پدیده پلارایز)، که این مشخصات به زیر مرحله سوم از مرحله چهار رسیدگی مربوط می‌شود. (شکل ۱ (الف و ب)). تخمدان در تیمارهای ۱، ۲ و شاهد مثبت (عصاره هیپوفیز) در اوایل مرحله V (پنج) و کاملا رسیده و بالغ بود که در آن‌ها تخمک‌ها کاملا پر از زرده بوده، حباب‌های زرده‌ای در کناره تخمک فشردگی داشتند (شکل ۲).

جدول ۱: شاخص‌های کیفیت تکثیر در تیمارهای هورمونی

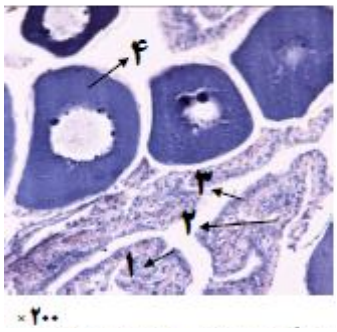
ردیف	تیمار	دوز تزریقی	درصد جوابدهی	میانگین فاصله زمانی از زمان تزریق تا زمان اوولاسیون (ساعت)	میانگین شاخص اوولاسیون درصد	هماوری کاری	میانگین درصد وزن تخمک نسبت به وزن بدن	درصد لقاح تخم	درصد تخمه گشایی
۱	$LHRH\text{-}A_2$	۱ µg kg -1 bw	٦٦/٧	۳۹/٦±۹/٦[a]	۷٤/٦±۸/٥[a]	٤۰۷٤۸/۸±٥۳٦٤/۷ [a]	۱۲/٥±۱/٤[a]	۷۸/۸±۱٥/۹[a]	۳٦/٥±۱۱/۹ [a]
۲	پیموزاید	٥ mg kg^{-1} bw	٤٤/٤*	٤۲/۸±۱۰/۷[a]	۸۰/٤±٤/۹٥[a]	۳۷۸۰۸/٦±۳٤۱۳/۳ [a]	۱۳/۸±۱/۸[a]	۹٥/٥±۱/۱[a]	۲۱/۲±۷/۳ [a]
۳	$LHRH\text{-}A_2$+پیموزاید	۱ µg kg^{-1} bw+٥ mg kg^{-1} bw	۷۷/۸	۳٤/۲±٤/۷[a]	۸۰/۲±۳/۳[a]	٤٦۲۷۸/۲±٤۱۱٦/۷ [a]	۱٤/۲±۱/۳[a]	۹٥/۹±۰/۸[a]	٤٤/۲±۱۰/٤ [a]
٤	عصاره هیپوفیز (شاهدمثبت)	۱ mg kg^{-1} bw	۷۷/۸	۳٤/۹±٤/۷[a]	۸۱/۱±۲/۹[a]	٤٦٤۷٤/۲±۱۹۹٤/۱ [a]	۱۳/٤±۲/۳[a]	۸٤/٦±۸/۹[a]	۳٥/۸±۹/٤ [a]
٥	نرمال سالین ۷٪	۱ سی سی به ازای هرکیلوگرم وزن بدن ماهی	۰	–	–	–	–	–	–
٦	مولدین بدون تزریق	–	۰	–	–	–	–	–	–



شکل ۱(الف وب): تحمک‌ها در زیر مرحله سوم IV رسیدگی جنسی، حرکت وزیکول زایشی به قطب جانوری و نزدیک شدن به غشاء تحمک. لبه‌های هسته مضرس و هستک‌ها در هسته پراکنده‌اند، ۱- وزیکول زایشی ۲- زونا پلوسیدا ۳- تکا



شکل ۲-تصویری از تخمک مرحله V در تیمار شاهد مثبت (عصاره هیپوفیز)



شکل ۳- بخشی از مقطع تخمدان مرحله VI در مولدی که تخم‌ریزی نموده است. ۱- بخشی از فولیکول پس از اوولاسیون، ۲-لومن، سلول گرانولوزا، ۳- لایه تکا، ۴- اووسیت مرحله II

بحث

عدم تخم‌ریزی در شاهد منفی و گروه مولدین طبیعی بدون تزریق، همچنین نتایج بافت‌شناسی تخمدان این تیمارها که بیانگر قرار داشتن این ماهیان در زیر مرحله سوم از مرحله IV رسیدگی جنسی بود، لزوم استفاده از هورمون تراپی برای القای تخم‌ریزی در مولدین ماده صید شده در زمان مهاجرت تولید مثلی را نشان داد. چرا که نتایج مذکور بیانگر این مطلب می‌باشد اگرچه ویتلوژنز آن‌ها در طبیعت طی شده است اما رسیدگی جنسی شان در مکان‌های صید در زمان مهاجرت تولید مثلی کامل نشده، بنابراین متداول‌ترین نقص تولید مثلی در این مولدین عدم رسیدگی تخمک‌ها و بلوغ

نهایی تخمک و در نتیجه نقص در اوولاسیون و تخم‌ریزی می‌باشد. بنابراین هورمون تراپی که به‌طور معمول مشکلات ناشی از عدم رسیدگی تخمک را در فصل تخم‌ریزی در ماهیان پرورشی می‌تواند برطرف نماید را می‌توان برای این مولدین نیز پیشنهاد نمود (میلوناس و همکاران، ۲۰۱۰).

بنابراین در گروه شاهد مثبت، از تزریق CPE با دوز ۱ میلی‌گرم در هر کیلوگرم از وزن بدن مولد ماده، استفاده شد که تخم‌ریزی را القا نمود. تاکنون CPE با دوز مذکور، ماده‌ای متداول جهت القای تخم‌ریزی در کارگاه‌های تکثیر این مولدین بوده است. CPE به‌دلیل دارا بودن گنادوتروپین‌های نوع یک و دو (FSH و LH) یکی از فاکتورهای محور مغز- هیپوفیز- گناد جهت تنظیم گامتوژنز و رسیدگی نهایی گامت‌ها (رسیدگی نهایی تخمک در ماده) می‌باشد. تحریک ترشح گنادوتروپین‌ها از سوی GnRH صورت می‌گیرد که نوروپپتید اولیهء تنظیم تولید مثل است (پتر و یو، ۱۹۹۷؛ یو و همکاران، ۱۹۹۷). گنادوتروپین به‌ویژه نوع دوم آن، رسیدگی کامل اووسیت‌ها را از طریق سنتز و رهاسازی استروئید القاکنندهء رسیدگی (MIS: maturation-inducing steroid) در گنادها فعال می‌نماید (پارک و همکاران، ۲۰۰۷).

در این پژوهش تزریق $LHRH\text{-}A_2$ به تنهایی و ترکیب آن با پیموزاید نیز اوولاسیون را در ماهی سفید القا نمودند. درصد ماده‌های واجد اوولاسیون در تیمار $LHRH\text{-}A_2$ (۶۶/۷ درصد) از ماهیان تیمار شده با CPE (۷۷/۸ درصد) و گروه تیماری پیموزاید+ $LHRH\text{-}A_2$ (۷۷/۸ درصد)، کمتر بود ولی با مقادیر آن‌ها اختلاف معنی‌دار آماری نداشت. به‌نظر می‌رسد که $LHRH\text{-}A_2$ ترکیبی فعال و مؤثر جهت القای رسیدگی نهایی در مولدین ماده ماهی سفید بوده، و تزریق این هورمون در مراحل نهایی رسیدگی جنسی، منجر به تسریع فرآیند تکمیل مهاجرت وزیکول زایشی و گسیختگی آن (GVBD) شده و مولدین را سریع‌تر به مرحله تخم‌دهی می‌رساند. ثابت شده است که به‌کارگیری آنالوگ‌های GnRH در القای رسیدگی جنسی و تخم‌ریزی در بسیاری از گونه‌های ماهیان دریایی مؤثر می‌باشد (پارک و همکاران، ۲۰۰۷). گزارش‌های فراوانی از تأثیر GnRH-Aهای مختلف بر رسیدگی اووسیت، اوولاسیون و تخم‌ریزی ماهیانی همچون *Oncorhynchus kisutch* (برتون و همکاران، ۱۹۹۰)، *Aristichthys noblis* (فرمین، ۱۹۹۱)، *Abramis brama* (گلوبوکو و همکاران، ۱۹۹۱)، *Tinca tinca* (کوریل و همکاران، ۱۹۸۶)، *Chanos chanos* (لی و همکاران، ۱۹۸۶)، *Paramisguruns dadryanus* (لی و همکاران، ۱۹۸۶)، *Cyprinus carpio* (ناندیشا و همکاران، ۱۹۸۶) و *Carrassius auratus* (پیتر و همکاران، ۱۹۸۵) وجود دارد.

از سوی دیگر در ۴۴/۴ درصد از مولدین تیمار پیموزاید (۵ mg kg $^{-1}$ bw)، اوولاسیون صورت گرفت. هرچند پاسخ‌دهی در این تیمار نسبت به تیمارهای شاهد منفی و مولدین بدون تزریق بالاتر بود اما به‌طور معنی‌داری کمتر از سایر تیمارها قرار داشت. درصد جواب‌دهی تیمار ترکیب پیموزاید و LHRH-A_2 (۷۷/۸ درصد) از تمامی تیمارها به‌جز شاهد مثبت به‌طور معنی‌داری بالاتر بود اما بالاتر بودن میزان پاسخ در مولدین تیمار مذکور نسبت به تیمار LHRH-A_2 معنی‌دار نبوده است (جدول ۱)، بنابراین به‌نظر می‌رسد که در ماهی سفید دوپامین در مسیر بازدارندگی خود از ترشح GTH دخالت داشته، اما این تأثیر قابل توجه نبوده است. مطالعات نشان داده‌اند که در برخی از ماهیان دوپامین بر اعمال GnRH روی گنادوتروپ‌های هیپوفیزی اثری منفی می‌گذارد (چانگ و جابین، ۱۹۹۴). در حالی‌که میزان این تأثیرگذاری در میان گونه‌های مختلف ماهیان فرق می‌کند به‌طوری‌که ممانعت دوپامین بر آزادسازی GTH در بسیاری از ماهیان خانواده کپور ماهیان و گربه ماهی آفریقایی *Clarias gariepinus* (میلوناس و زهار، ۲۰۰۱) ثابت شده است اما در بیشتر آزاد ماهیان نظیر کوهو سالمون (Coho Salmon) *Oncorhynchus kisutch* (وان‌درکرک و همکاران، ۱۹۸۶) و ماهیان دریایی دارای ارزش اقتصادی (میلوناس و زهار، ۲۰۰۱)، این ممانعت یا وجود ندارد یا این‌که ضعیف است. پیموزاید داروی ضد دوپامینرژیکی است که اثر فراوان و قابل توجه آن در تحریک فرایند تخم‌ریزی ماهی‌ها مخصوصا کپورماهیان و گربه ماهی‌ها گزارش شده است (بیلارد و همکاران، ۱۹۸۴، تن-فرمین و همکاران، ۱۹۹۷) (پیتر و همکاران، ۱۹۸۸) در نتیجه مطالعات خود بر روی کپورسیاه *Mylopharyngodon piceus* و ماهی طلایی *Carrassius auratus* اگرچه پیموزاید را بهترین داروی آنتاگونیست معرفی کرده‌اند اما متذکر شده‌اند که تزریق آن به تنهایی برای القای رسیدگی جنسی کافی نیست (پیتر و همکاران، ۱۹۸۶-۱۹۸۸). (درافشان و حیرتی، ۲۰۰۶) بیان نمودند که از دیدگاه اثر دوپامین در ممانعت از آزادسازی گنادوتروپین، ماهی سفید را می‌توان در گروه ماهیان سیم *Parabaramis pekinensi* (لین و همکاران، ۱۹۸۶)، لوچ‌چینی *Paramisgurnus dabryanus* (لین و همکاران، ۱۹۸۸) و هیبریدهای تیلاپیا Tilapia nilotica ×Tilapia undulates (گیسی و همکاران، ۱۹۹۱)، طبقه‌بندی نمود. در این گونه‌ها دوپامین اثر غالب و مهمی در ممانعت از آزادسازی GTHندارد و GnRH به تنهایی نیز می‌تواند باعث اوولاسیون شود (درافشان و حیرتی، ۲۰۰۶).

میانگین شاخص اوولاسیون مربوط به تیمار LHRH-A_2 کمتر از سایر تیمارها بود این نتیجه مشابه نتیجه به‌دست آمده در مطالعه (وانگ و همکاران، ۲۰۰۹) روی لوچ می‌باشد. در مطالعه آن‌ها شاخص

اوولاسیون در تیمار GnRH نسبت به تیمارهای ترکیبی GnRH با دومپریدون کمتر بود. آن‌ها بیان کردند که GnRH به تنهایی برای ایجاد تخم‌ریزی با حجم زیاد در لوچ کافی نبود و نیاز بود تا از ترکیب GnRH با دومپریدون (آنتاگونیست دوپامین) استفاده شود. در این پژوهش نیز تیمار ترکیب پیموزاید و $LHRH\text{-}A_2$ شاخص اوولاسیون بالاتری نسبت به تیمار $LHRH\text{-}A_2$ داشت (جدول ۱).

در مورد فاصله زمانی از زمان تزریق تا تخم‌ریزی در بین تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. اما کمترین فاصله زمانی از تزریق تا تخم‌ریزی (۴/۷±۳۴/۲) به تیمار ترکیبی پیموزاید و $LHRH\text{-}A_2$ تعلق داشت. در پژوهشی که (آیزن و همکاران، ۲۰۰۵) روی کفال خاکستری *Mugil cephalus* انجام دادند مشخص شد که فاصله زمانی تزریق تا تخم‌ریزی در تیمارهای ترکیب GnRHa با آنتاگونیست‌های دوپامین نسبت به تیمار GnRHa کمتر بود که مشابه نتیجه این پژوهش می‌باشد. در گونه‌هایی که بعد از اوولاسیون در شرایط اسارت تخم‌ریزی نمی‌کنند و بعد از تخم‌کشی لقاح به‌طور مصنوعی انجام می‌شود، نشان داده شد که فاصله زمانی از زمان تزریق تا اوولاسیون، یعنی زمانی‌که تخمک‌ها بعد از اوولاسیون و قبل از تخم‌کشی در تخمدان یا محوطه شکم باقی می‌مانند، به‌طور مستقیم به از دست رفتن کیفیت تخم ربط دارد (بروماک و همکاران، ۱۹۹۴). نتایج فاصله زمانی از تزریق تا اوولاسیون در ماهی سفید در این پژوهش نشان داد که این شاخص نسبت به دوره زمانی تزریق تا اوولاسیون در گربه ماهی *Heteropneustes fossilis*، (آلوک و همکاران، ۱۹۹۳). کفال خاکستری *Mugil cephalus*، پور معمولی *C.carpio* (یارون، ۱۹۹۵، درافشان و همکاران، ۲۰۰۳؛ عربکی و همکاران، ۲۰۰۴)، فیتوفاگ *Hypophtalmichthys molitrix* (کاشانی سابت و همکاران، ۲۰۰۵) و سایر کپورماهیان مهم پرورشی (بیلارد، ۱۹۹۰) و لوچ (وانگ و همکاران، ۲۰۰۹)، بیشتر بود اما به نظر می‌رسد این موضوع به‌دلیل پایین بودن دمای فصل تولید مثل ماهی سفید حدود ۷ تا ۱۵ درجه سانتی‌گراد) باشد. (وانگ و همکاران، ۲۰۰۹) نشان دادند فاصله زمانی تزریق تا اوولاسیون در لوچ نسبت به سایر گونه‌ها همچون کپور معمولی و سایر کپورماهیان کمتر بوده و بالا بودن درجه حرارت فصل تولید مثلی در لوچ را دلیل این امر شمردند. آن‌ها همچنین بیان کردند که این تفاوت‌های زمانی در فاصله زمانی از زمان تزریق تا اوولاسیون، می‌تواند ویژه گونه‌ای باشد (وانگ و همکاران، ۲۰۰۹).

دو فاکتوری که براساس تعداد و وزن تخمک برای مولدین به‌دست آمد هماوری کاری و درصد وزن تخمک نسبت به وزن بدن بود که در هر دو مورد در تیمارهای مختلف تغییر محسوسی مشاهده

نشد. با توجه به این‌که تزریق هورمون تنها در مراحل نهایی رسیدگی جنسی در مولدین مورد استفاده قرار گرفته، در نتیجه نمی‌تواند تأثیری بر تعداد تخمک‌های تولیدی هر ماهی مولد داشته باشد زیرا این مقدار تخمک تولیدی در هر مولد در هر دوره جنسی طی یک فرایند طولانی مدت تثبیت می‌گردد و با عوامل ژنتیکی، هورمونی، محیطی و تغذیه‌ای کنترل می‌شود (زوهار، ۱۹۸۹). (هارالدسون و همکاران، ۱۹۹۳) نیز با پژوهشی که بر گونه چار قطبی *Salvelinus alpinus* انجام دادند بیان کردند که پس از القای تخم‌ریزی در این ماهیان، تفاوت معنی‌داری بین وزن تخم‌های استحصالی و همچنین میزان تخم باقی مانده در حفره شکمی در ماهیان تیمار شده با گروه کنترل وجود نداشت (هارالدسون و همکاران، ۱۹۹۳). نتایج مشابهی نیز در گونه *Cynoscion nebulosus* توسط گروه‌های دیگر گزارش شده است (ارداهل و کلین، ۱۹۹۷؛ پتر و یو، ۱۹۹۷). هر چند از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری در مورد درصد لقاح و درصد تخمه‌گشایی در بین تیمارها مشاهده نشد. فقدان اختلاف معنی‌دار در مورد درصد لقاح و درصد تخمه‌گشایی در مطالعات هورمون تراپی روی کپور معمولی (کولیکووسکای، ۱۹۹۶؛ دروری و همکاران، ۱۹۹۴) و Pear mullet *C. Tarichi* " (عربکی و ساری، ۲۰۰۴) و لوچ (وانگ و همکاران، ۲۰۰۹) نیز مشاهده شد. به‌هر حال کمترین میزان درصد تخمه‌گشایی به تیمار پیموزاید و بیشترین میزان آن به تیمار ترکیب پیموزاید و $LHRH\text{-}A_2$ تعلق داشت به‌طوری که این مقدار در مقایسه با تیمار شاهد مثبت (عصاره هیپوفیز) که روش متداول تکثیر مصنوعی در کارگاه‌های تکثیر ماهی سفید است، نیز بیشتر بود بنابراین به نظر می‌رسد در تیمار مذکور در مقایسه با سایر تیمارها، نتیجه بهتری در تکثیر حاصل شده است در مجموع بیشترین درصد جواب‌دهی (۷۷/۷۸ درصد)، کمترین زمان صرف شده از تزریق تا تخم‌ریزی (۴/۷±۳۴/۲)، بیشترین میانگین درصد وزن تخمک استحصالی نسبت به وزن بدن (۱/۳±۱۴/۲) و بیشترین درصد لقاح (۰/۸±۹۵/۹) و درصد تخمه‌گشایی (۱۰/۴±۴۴/۲) به تیمار ۳ (ترکیب پیموزاید و $LHRH\text{-}A_2$) تعلق داشت. هر چند مطالعات آینده برای کسب دوز بهینه این دو ترکیب هنوز موردنیاز است با این حال به‌نظر می‌رسد تزریق ترکیب پیموزاید و $LHRH\text{-}A_2$ (۱ $\mu g\ kg^{-1}$ bw+۵ $mg\ kg^{-1}$ bw) به‌دلیل وجود بیشترین درصد جواب‌دهی، کمترین تأثیر منفی بر تکثیر و به صرفه بودن از نظر اقتصادی نسبت به عصاره هیپوفیز، می‌تواند روش مفیدی برای القای اوولاسیون در مولدین ماهی سفید باشد.

سپاسگزاری

از همکاری سازمان شیلات ایران به‌ویژه از ریاست و کارکنان محترم مرکز تکثیر، پرورش و بازسازی ذخایر آبزیان شهید انصاری رشت و همیاری ریاست و کارکنان محترم پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی ایران (بندرانزلی) کمال قدردانی را داریم.

منابع

1. Aizen, 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. General and Comparative Endocrinology, 142: 212–221.
2. Alok, D., Krishnan, T., Talwar, G.P. and Gary, L.C. 1993. Induced spawning of catfish, *Heteropneustes fossilis,* Using D-Lys^{6}, Salmon gonadotropin – releasing hormone analog. Aquaculture, 115: 159 – 167.
3. Arbaci, M., Cegirgan, H. and Sari, M. 2004. Induction of ovulation in ornamental common carp (*Cyprinus carpio*) using LHRHa ([D-Ser9 (tBu6), Pro9-Net]-LHRH) combined with haloperidol and carp pituitary extract. Aquaculture Research, 35: 10-14.
4. Arabaci, M. and Sari, M. 2004. Induction of ovulation in endemic pearl mullet (*Chalcalburnus tarichi*), living in the highly alkaline Lake Van, using GnRHa ([D-Ser (tBu) 6, Pro9-Net]-GnRH) combined with haloperidol. Aquaculture, 238: 529-535.
5. Billard, R., Reinaud, P., Hollebecq, M.G. and Breton, B. 1984. Advancement and synchronisation of spawning in *Salmo gairdneri* and *S. trutta* following administration of LRH-A combined or not with pimozide. Aquaculture, 43: 57–66.
6. Billard, R. 1990. The major carps and other cyprinids. In: Production of Aquatic Animals (Fishes). P21-55, In: C.E. Nash (ed), Elsevier science publication, Amsterdam, the Netherlands Biswas, S.P. 1993. Manual of methods in fish biology. South Asian publisher, New Dehli.
7. Breton, B., Weil, C., Sambron, E. and Zohar, Y. 1990. Effects of acute versus sustained administration of GnRH-a on GTH release and Ovulation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture, 91: 373-383.
8. Bromage, N., Bruce, M., Basavaraja, N., Rana, K., Shields, R., Young, C., Dye, J., Smith, P., Gillespie, M. and Gamble, J. 1994. Egg quality determinants in finfish: the role of over ripening with special reference to the timing of stripping in the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. Journal of the World Aquaculture Society, 25: 13–21.

9. Brzuska, E. and Adamek, J. 1999. Artificial spawning of European catfish, *Silurus glanis*: stimulation of ovulation using LHRH-a, Ovaprim and carp pituitary extract. Aquaculture Research, 30: 59-64.
10. Brzuska, E. 2001. Artificial spawning of European catfish Silurus glanis L.: differences between propagation results after stimulation of ovulation with carp pituitary and Ovopel. Aquaculture International 32: 11–19.
11. Chang, J.P. and Jobin, R.M. 1994. Regulation of gonadotropin release in vertebrates: a comparison of GnRH mechanisms of action. P41–51, In: Davey, K.G, R.E. Peter, S.S and Tobe (eds.), Perspectives in Comparative Endocrinology. National Research ouncil of Canada, Ottawa.
12. Cyr, D.G. and Eales, J.G. 1996. Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 6: 165–200.
13. Dorafshan, S., Mostafavi, H. and Mojazi Amiri, B. 2003. Induction of spawning in common carp (*Cyprinus carpio*), using pituitary extract and GnRH analogue in combination with domperidone. Iranian Journal of Biotechnology, 1: 213-217.
14. Dorafshan, S., Mojazi Amiri, B., Hajizadeh, A., Mostafavi, H., and Peykan Heyrati, F.2003. Inducing ovulation of female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, using GnRHa hormone. Iranian fisheries scientific magazine, 3: 23-38.
15. Dorafshan, S. and Heyrati, F.P. 2006. Spawning induction in kutum *Rutilus frisii kutum* using carp pituitary extract or GnRH analogue combined with metoclopramide. Aquaculture Research, 37: 751–755.
16. Drori, S., Ofir, M., Sivan, B.L. and Yaron, Z. 1994. Spawning induction in common carp (*Cyprinus carpio*) using pituitary extract or GnRH super active analogue combined with methoclopramide: analysis of hormone profile, progress of oocyte maturation and dependence on temperature. Aquaculture, 119: 393-407.
17. Erdahl, D.J. and McClain, J. 1987. Effect of LHRH analogue treatment on egg maturation (Ovulation) in lake trout brook stock. Progressive fish-culturist 49: 276-279
18. Fermin, C.A. 1991. LHRH-a and domperidon–induced oocyte maturation and ovulation in bighead carp, *Aristichthys nobilis.* Aquaculture, 93: 87-94.
19. Ghobadi, SH. 2005. Comparative evaluation the effects of LHRH and dopamine antagonist (Pimozide) in ovulation of common carp (*Cyprinus carpio*), MSc thesis. Islamic Azad University, Lahijan Branch, Pp: 60.
20. Gillet, C., Breton, B. and Mikolajczyk, T. 1996. Effect of GnRHa and pimozide treatments on the timing of ovulation and on egg quality in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) at 5 and 10°C. Aquatic Living Resources, 9: 257-263.
21. Gissis, A., Levavi-sivan, B., Rubinp-kedem, H., Ofir, M., and Yaron, Z. 1991. The effect of gonadoropin releasing hormone superlative analogue and

dopamine antagonists on gonadotropin level and ovulation in tilapia hybrids. The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh, 43: 123-136.
22. Glubokov, A.I., Motloch, N.N., and Sedova, M.A. 1991. Effect of synthetic LHRH analogue and dopamine antagonists on the maturation of bream, *Abramis brama*. Aquaculture, 95: 373-377.
23. Glubokov, A.I., Kouril, J., Mikodina, E.V. and Barth, T. 1994. Effects of synthetic GnRH analogues and dopamine antagonists on the maturation of Pacific mullet, Mugil so-iuy Bas. Aquaculture and Fisheries Management, 25: 419–425.
24. Haraldson, H., Sveinsson, T. and Skulason, S. 1993. Effects of LHRH-a treatments upon the timing of ovulation and upon egg and offspring quality in arctic charr, *Salvelinus alpinus*. Aquaculture and Fisheries Management, 24: 145-150.
25. Kaminski, R., Kusznierz, J., Myszkowski, L. and Wolnicki, J. 2004. The first attempt to artificially reproduce the endangered cyprinid lake minnow *Eupallasella perenurus*. Aquaculture International, 12: 3–10.
26. Kashani Sabet, A.R., Oryan, S.H. and Bahmani, M. 2005. Inducing ovulation in silver carp *Hypophtalmichthys molitrix,* using LHRH-A hormone and combined with dopamine antagonist (metocelopramide and dompridon). Iranian Fisheries Scientific Magazine, 3: 129-144.
27. Kazemi, R.V. and Bahmani, M. 1999. Protocol of staining in tissues for histology studies. International Sturgeon Research Institute. Rasht, Iran. Pp 16.
28. Kouril, J., Barth, T., Hamackova, J. and Flegel, M. 1986. Induced ovulation in tench, Tinca various LHRH synthetic analogues: Effect of site of administration and temperature. Aquaculture, 54: 37-44.
29. Kulikovsky, Z., Martin, F.J.B. and Yaron, Z. 1996. A comparison of two spawning inducing agent for common carp. The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh, 48: 108-111.
30. Le Gac, F., Blaise, O., Fostier, A., Le Bail, P.Y., Loir, M., Mourot, B. and Weil, C. 1993. Growth hormone (GH) and reproduction: a review. Fish Physiology and Biochemistry, 11: 219–232.
31. Lee, C.S., Tamaru, C.S., Kelley, C.S. and Banno, J.E. 1986. Induced spawning of milkfish, *Chanos chanos*, by a single application of LHRH– analogue. Aquaculture, 58: 87-98.
32. Lethimonier, C., Madigou, T., Munoz-Cueto, J.A., Lareyre, J.J. and Kah, O. 2004. Evolutionary aspects of GnRHa, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish. General and Comparative Endocrinology, 135: 1–16.
33. Lin, H.R., Chun, P., Van Der Kraak, G., Peter, R.E. and Breton, B. 1986. Effects of [D-Ala^6,Pro^9-Net]–LHRH and catecholaminergic drugs on gonadotropin secretion and ovulation in the Chinese loach, *Paramisgurnus dabryanus*, General Comparative Endocrinology, 64: 389-395.

34. Lin, H.R., Van Der Kraak, G., Zho, X-J., Liang, J.Y., Peter, R.E., Rivier, J.E. and Vale, W.W. 1988. Effects of [D-Arg6 Trp7 Leu8 Pro9 Net]-luteinizing hormone-releasing hormone (sGnRH-A), and [D-Ala6 Pro9 NEt]-luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH-A), in combination with pimozide or domperidone, on gonadotropin release and ovulation in the Chinese loach and common carp. General Comparative Endocrinology, 69: 31-40.
35. Mikolajczyk, T., Chyb, J., Sokolowska-Mikolajczyk, M., Enright, W.J., Epler, P., Filipiak, M. and Breton, B. 2003. Attempts to induce an LH surge and ovulation in common carp (*Cyprinus carpio*) by differential application of a potent GnRH analogue, azagly-nafarelin, under laboratory, commercial hatchery, and natural conditions. Aquaculture, 223: 141–157.
36. Mikolajczyk, T., Chyb, J., Szczerbik, P., Sokolowska-Mikolajczyk, M., Epler, P., Enright, W.J., Filipiak, M., and Breton, B. 2004. Evaluation of the potency of Azagly-nafarelin (GnRH analogue), administered in combination with different formulations of pimozide, on L.H. secretion, ovulation and egg quality in common carp (*Cyprinus carpio*) under laboratory, commercial hatchery and natural conditions. Aquaculture, 234: 447-460.
37. Mylonas, C.C. and Zohar, Y. 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 10: 463-491.
38. Mylonas, C.C., Fostier, A. and Zanuy, S. 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. General and Comparative Endocrinology, 165: 516–534.
39. NACA. 1989. Integrated Fish Farming in China. NACA Technical Manual 7. A World Food Day Publication of the Network of Aquaculture Centres in Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand, 278 pp.
40. Nandeesha, M.C., Das, S.K., Nathaniel, E., Verghese, T.J. and shetty, H.P.C. 1989. Ovaprim a new drug for induced breeding of carps. Fishing chimes, 13-15.
41. Negatu, Z., Hsiao, S.M. and Wallace, R.A. 1998. Effects of insulin-like growth factor-I on final oocyte maturation and steroid production in Fundulus heteroclitus. Fish Physiology and Biochemistry, 19: 13–21.
42. Nelson, J.S. 1976. Fishes of the world. New York, John wiley and Sons. 416pp.
43. Paykan Heyrati, F., Mostafavi, H., Mojazi Amiri, B., Hajizadeh, A. and Dorafshan, S. 2001. Induced spermiation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using aGnRH analogue. Iranian Journal of Fisheries Science, 3: 95-108.
44. Park, W., Lee, C.H., Lee, C.S., Kim, D.J., Kim, J.H., Tamaru, C.S. and Sohn, Y.C. 2007. Effects of a gonadotropin-releasing hormone analog combined with pimozide on plasma sex steroid hormones, ovulation and egg quality in freshwater-exposed female chum salmon (*Oncorhynchus keta*). Aquaculture, 271: 488–497.

45. Peter, R.E., Nahorniak, C.S., Sokolowsha, M., Chang, J.P., Rivier, J.E, Vale, W.W., King, J.A. and Millar, R.P. 1985. Structure–activity relationship of mammalian, chicken and Salmon gonadotropin releasing hormone in vivo in goldfish. General and Comparative Endocrinology, 58: 231-242.
46. Peter, R.E., Chang, J.P., Nahorniak, C.S., Ome Ljaniuk, R.J. Sokolowka, M., Shin S.H. and Billard, R. 1986. Interactions of Catecolamines and GnRH in regulation of gonadotropin Secretion in teleost fish. Recent progress in Hormone Research, 42: 513-548.
47. Peter, R.E., Lin, H.R. and VanDer Kraak, G. 1988. Induced ovulation and spawning of cultured fresh water fish in china: advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonists. Aquaculture, 74: 1-10.
48. Peter, R.E. and Yu, K.L. 1997. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 7: 173-197.
49. Poosti, AA. and Marvdasti, S. 2000. Guidelines of histology of fish (natural forms and histopathological). Tehran university press, Pp 328.
50. Rasekhi, KH. 1999. Assessment of effects of using Baklohhone (Antagonist receptor B- GABA) as single, combined with LHRH -A and metocelopramide on releasing GTH- I in common carp (*Cyprinus carpio*). MSc thesis. Tarbiat Moalem University, Pp 120.
51. Razavi Sayad, B., 1996. *Rutilus frisii kutum*. Iranian fisheries researches institute, Pp 164.
52. Szabo, T., Medgyasszay, C. and Horvath, L. 2002. Ovulation induction in nase (*Chondrosmoma nasus*) using pituitary extract or GnRH analogue combined with domperidone. Aquaculture, 203: 389-395.
53. Tan-Fermin, J.D., Pagador, R.R. and Chavez, R.C. 1997. LHRHa and pimozide-induced spawning of Asian catfish *Clarias macrocephalus* at different times during an annual reproductive cycle. Aquaculture, 148: 323–331.
54. Tharakan, B. and Joy, KP. 1996. Effects of mammalian gonadotropin-releasing hormone analogue, pimozide, and the combination on plasma gonadotropin levels in different seasons and induction of ovulation in female catfish. Journal of Fish Biology, 48: 623-632.
55. Ulloa-Aguirre, A. and Timossi, C. 2000. Biochemical and functional aspects of gonadotrophin-releasing hormone and gonadotrpophins. Reproductive Biomedicine Online, 1: 48–62.
56. Van Der Kraak G., Donaldson E.M. and Chang J.P. 1986. Dopamine involvement in the regulation of gonadotropin secretion in Coho Salmon. Canadian Journal of Zoology, 64: 1245-1248.
57. Wang, Y., Hu, M., Wang, W., Liu, X., Cheung, S.G., Shin, P.K.S. and Song, L. 2009. Effects of GnRHa (D-Ala6, Pro9-NEt) combined with domperidone on

ovulation induction in wild loach *Misgurnus anguillicaudatus*. Aquaculture, 291: 136–139

58. Weber, G.M., Borski, R.J., Powell, J.F.F., Sherwood, N.M. and Grau, E.G. 1995. In vivo and in vitro effects of gonadotropin-releasing hormone on prolactin in the tilapia *Oreochromis mossambicus*. American Zoologist. (Abstract.) 34: 121A.
59. Wen, H.S. and Lin, H.R. 2004. Effects of exogenous neurohormone, gonadotropin (GtH) and dopaminergic drugs on the serum GtH content and ovulatory responsiveness of wild catfish, *Silurus asorus*. Aquaculture Research, 35: 204–212.
60. Yaron, Z. 1995. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. Aquaculture, 129: 49-73.
61. Yu, K.L., Lin, X.W., da Cunha Bastos, J. and Peter, R.E. 1997. Neural regulation of GnRH in teleost fishes. p277–312, In: Parhar, I.S, Y.Sakuma (eds.), GnRH Neurons: Gene to Behavior. Brain Shuppan, Tokyo.
62. Zohar, Y. 1989. Fish reproduction, its physiology and artificial manipulation. In: Fish Culture in Warm Water Systems, Problems and Trends. P65-119, In: Shilo, M.C. and S.H. Sargi (eds), CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
63. Zohar, Y. and Mylonas, C.C. 2001. Endocrine manipulation of spawning induction in cultured fish from hormone to gene. Aquaculture, 197: 99-139.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

J. of Utilization and Cultivation of Aquatics, Vol. 2(1), 2013
http://japu.gau.ac.ir

Comparison of the effects of LHRAH-A_2 alone and in combination with pimozide (a dopamine antagonist) on spawning and reproduction quality indicators in *Rutilus frisii kuttum* broodstocks

***M. Ahmadnezhad[1], Sh. Oryan[2], H. Hosseinzadeh Sahafi[3] and H. Khara[4]**

[1]Ph.D. Graduated, Inland Water Aquaculture Research Center, Bandar Anzali, [2]Prof., Dept., of Biology, Science Faculty, kharazmi University, Tehran, [3]Associuted Research Prof. Iranian Fisheries Research Organization, Tehran, [4]Assistant Prof. Department of Fishery and Aquaculture, Islamic Azad university- Lahijan Branch

Received: 09/09/2012 ; Accepted: 03/05/2012

Abstract

The objective of this research was to evaluate the effects of LHRAH-A_2 alone and in combination with pimozide (dopamine antagonist) on percentage of ovulated females, latency period, ovulation index, work fecundity, egg weight to body weight ratio, fertilization success and Hatching rate of kuttum. 63 fish were treated and hormone treatments included: 1- LHRAH-A_2 (1µg kg^{-1} bw), 2- pimozide (5 mg kg^{-1} bw), 3- combination pimozide and LHRAH-A_2 (5 mg kg^{-1} bw + 1µg kg^{-1} bw), 4- carp pitatury extract (positive control), 5- saline solution 0.7% (negative control) 6- untreated group (without injection). The injection was performed intramuscularly. fish ovary in each treatment were analyzed using classical histology. The highest percentage of ovulated females (77.8 %), lowest latency period (34.2 ± 4.7), highest egg weight to body weight ratio (14.2 ± 1.3), fertilization success (95.9 ± 0.8) and hatching rate (44.2 ± 10.4) were observed in treatment 3. In ovulated fish, histological analysis revealed six stages in ovaries, while ovaries in non-ovulated ones were developed only in fourth stage. It seems that Because of ovulation can be induced successfully in kutum broodstocks with 1µg kg^{-1} bw LHRAH-A_2+ 5 mg kg^{-1} bw pimozide treatment in a single injection with high percentage of ovulated females, lowest negative effect on propagation quality and its more cost-effectiveness than CPE, so Application of this combination could be beneficial for the development of artificial propagation methods in kutum brood stocks.

Keywords: *Rutilus frisii kuttum*, LHRAH-A_2, Pimozide, Propagation quality indicators

*Corresponding author; m_ahmadnezhad@yahoo.com