Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics

Print ISSN: 2345-427X
Online ISSN: 2345-4288

Ontogeny of the *thrβ* in the eggs of Caspian trout (*Salmo caspius*)

Salman Malakpour Kolbadinezhad[*1], Sajjad Nazari[2], Abdol Azim Fazel[3], Mahdi Golshan[4], Shirin Jamshidi[5], Saltanat Najjar Lashgari[6], Mohammad Taghi Azhir[7]

1. Corresponding Author, Research Assistant Prof., Coldwater Fisheries Research Center (CFRC), Tonekabon, Iran. E-mail: s.malakpoor@gmail.com
2. Research Assistant Prof., Cold-Water Fishes Genetic and Breeding Research Center, Yasouj, Iran. E-mail: sajadnazari13@gmail.com
3. Assistant Prof., Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Inland Waters Aquatics Resources Research Center, Golestan Province, Gorgan, Iran. E-mail: a.fazel58@gmail.com
4. Research Assistant Prof., Iranian Fisheries Research Institute, Tehran, Iran. E-mail: mahdigolshan@yahoo.com
5. Research Assistant Prof., International Research Institute of Sturgeon fish, Rasht, Iran. E-mail: jamshidi99@yahoo.com
6. Research Assistant Prof., Coldwater Fisheries Research Center (CFRC), Tonekabon, Iran. E-mail: se_lashgari@yahoo.com
7. M.Sc., Coldwater Fisheries Research Center (CFRC), Tonekabon, Iran. E-mail: azhir3@yahoo.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 11.21.2023
Revised: 12.30.2023
Accepted: 01.02.2024

Keywords:
Caspian trout egg,
Fertilization,
thrβ

ABSTRACT

Caspian trout, *Salmo caspius,* Kessler 1877 is an anadromous form of brown trout. In vertebrates, the functional receptors of THs, include thyroid hormone receptors (TRs) (*thrα*, *thrβ*). In developing fish eggs, the expression of THRs has been reported in different time periods. The ontogeny of the *thrβ* in the eggs of Caspian trout (*Salmo caspius*) has been investigated in the present study. The sampling of ova was done before and post fertilization, 24 and 48 h post fertilization, eyeing stage, hatching and CYA while being exposed for 1 h to various thyroxin hormone concentrations including 0 (control, without hormone), 0.25, 0.5 and 0.75 mgL^{-1}. The statistical analysis showed increased gene expression of *thrβ* during the development period. An inverse relationship between hormone concentration with eyeing and hatching percentage were detected in the eggs. In summary using thyroxin hormone by applying doses to achieve better fertilization efficiency not recommended.

Cite this article: Malakpour Kolbadinezhad, Salman, Nazari, Sajjad, Fazel, Abdol Azim, Golshan, Mahdi, Jamshidi, Shirin, Najjar Lashgari, Saltanat, Azhir, Mohammad Taghi. 2025. Ontogeny of the *thrβ* in the eggs of Caspian trout (*Salmo caspius*). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 13 (4), 165-183.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/japu.2024.21938.1831
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان

شاپا چاپی: ۲۳٤٥-٤۲۷X
شاپا آنلاین: ۲۳٤٥-٤۲۸۸

انتوژنی ژن *thrβ* در تخم ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*)

سلمان ملک‌پور کلبادی‌نژاد*[۱]، سجاد نظری[۲]، عبدالعظیم فاضل[۳]، مهدی گلشن[٤]، شیرین جمشیدی[٥]، سلطنت نجارلشگری[٦]، محمدتقی آژیر[۷]

۱. نویسنده مسئول، استادیار پژوهشی مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی کشور، تنکابن، ایران. رایانامه: s.malakpoor@gmail.com
۲. استادیار پژوهشی مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی، یاسوج، ایران. رایانامه: sajadnazari13@gmail.com
۳. استادیار مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی، مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آب‌های داخلی، استان گلستان، گرگان، ایران. رایانامه: a.fazel58@gmail.com
٤. استادیار پژوهشی مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، تهران، ایران. رایانامه: mahdigolshan@yahoo.com
٥. استادیار پژوهشی انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، رشت، ایران. رایانامه: jamshidi99@yahoo.com
٦. استادیار پژوهشی مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی کشور، تنکابن، ایران. رایانامه: se_lashgari@yahoo.com
۷. کارشناس‌ارشد مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی کشور، تنکابن، ایران. رایانامه: azhir3@yahoo.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۲/۰۸/۳۰
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۲/۱۰/۰۹
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۲/۱۰/۱۲

واژه‌های کلیدی:
تخم ماهی آزاد دریای خزر،
گیرنده‌های هورمون تیروئید (*thrβ* و *thrα*)،
لقاح

چکیده

ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*، Kessler ۱۸۷۷) گونه مهاجر رودرو از ماهی قزل‌آلای قهوه‌ای است. در مهره‌داران انتقال هورمون‌های تیروئیدی (T4 و T3) از طریق اتصال به گیرنده‌های تیروئیدی (*thrα* و *thrβ*) انجام می‌شود. در تخم‌های در حال تکامل بیان گیرنده‌های هورمون تیروئیدی در بازه‌های زمانی مختلف گزارش شده است. در این مطالعه انتوژنی بیان ژن *thrβ* در تخم ماهی آزاد دریای خزر مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌برداری از تخمک‌ها قبل از لقاح، تخم‌ها بلافاصله بعد از لقاح، ۲٤ و ٤۸ ساعت بعد از لقاح، مرحله چشم‌زدگی، زمان تفریخ و جذب کامل کیسه زرده انجام شد در حالی‌که در معرض غلظت‌های مختلف هورمون تیروکسین (۰ (بدون افزودن هورمون، شاهد)، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر) نیز قرار گرفته بودند. نتیجه تجزیه و تحلیل‌های آماری روند افزایشی در بیان ژن *thrb* را در طول زمان نشان دادند. ارتباط معکوسی بین افزایش غلظت‌های مختلف هورمون تیروکسین با درصد چشم‌زدگی و تفریخ تخم‌های ماهی آزاد دریای خزر مشاهده شد. به شکل خلاصه با توجه به مشاهده عدم اثرگذاری مثبت استفاده از حمام هورمون تیروکسین با غلظت‌های به‌کار رفته در این مطالعه به منظور افزایش کارایی تکثیر، کاربرد آن در غلظت‌های به‌کار رفته توصیه نمی‌شود.

استناد: ملک‌پور کلبادی‌نژاد، سلمان، نظری، سجاد، فاضل، عبدالعظیم، گلشن، مهدی، جمشیدی، شیرین، نجارلشگری، سلطنت، آژیر، محمدتقی (۱۴۰۳). انتوژنی ژن *thrβ* در تخم ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*). *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ۱۳ (۴)، ۱۸۳-۱۶۵.
DOI: 10.22069/japu.2024.21938.1831

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

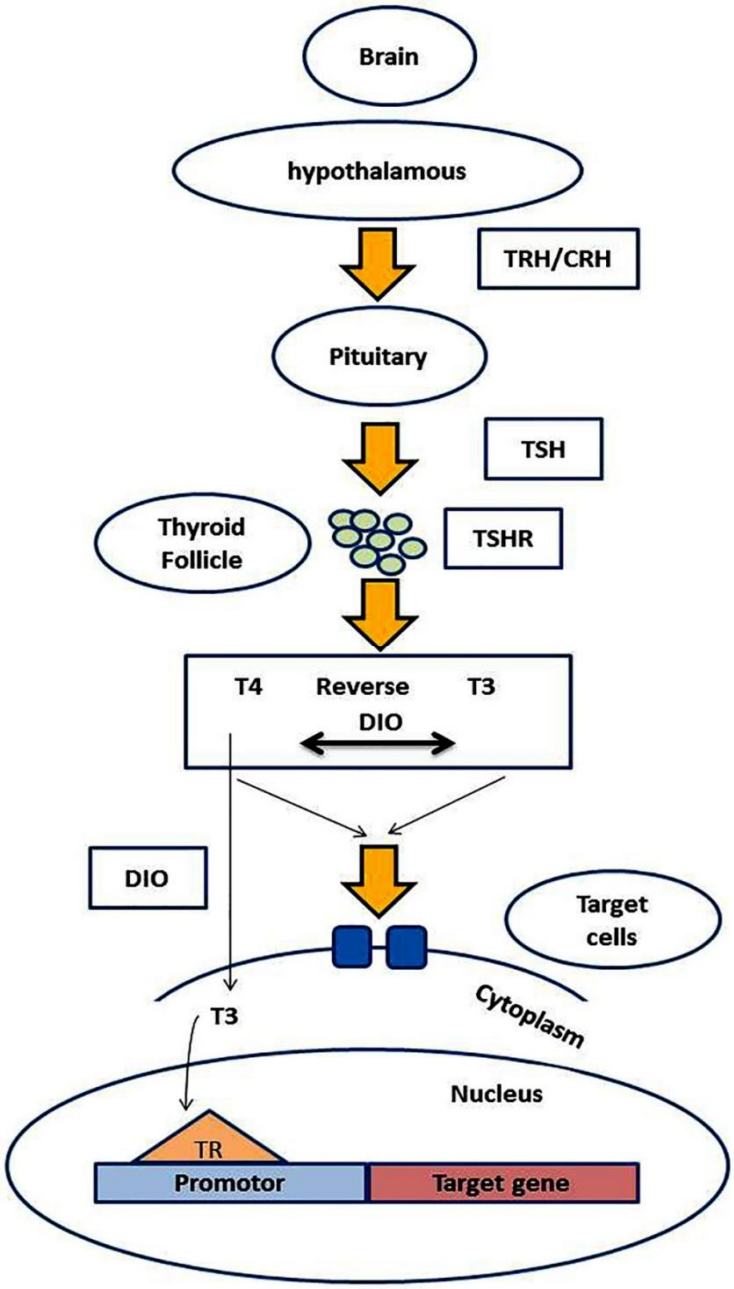
مقدمه

ماهی آزاد دریای خزر *Salmo caspius*، گونه مهاجر بالارونده (آنادروموس) از ماهی قزل‌آلای قهوه‌ای است که در بخش‌های غربی و جنوبی دریای خزر زندگی می‌کند و در اوایل پاییز جهت تخم‌ریزی به رودخانه‌ها مهاجرت کرده و بچه‌ماهیان پس از اسمولتیفیکیشن[1] (تبدیل شدن پار به اسمولت) به‌سمت دریای خزر مهاجرت می کنند. این گونه براساس گزارش‌های واحد بین‌المللی حفاظت از طبیعت (IUCN[2]) در لیست گونه‌های در خطر انقراض قرار گرفته است (۱، ۲، ۳). در دو دهه اخیر کاهش چشم‌گیری در جمعیت‌های طبیعی این گونه به دلایل مختلف اتفاق افتاده است که از آن جمله می‌توان به آلودگی آب، برداشت و تخریب بستر رودخانه‌ها و هم‌چنین صید بی‌رویه اشاره کرد (٤، ٥، ٦). ارزش اقتصادی (۳) به‌منظور پرورش در محیط دریا، کیفیت بالای گوشت (۷) و کاهش چشمگیر جمعیت‌های طبیعی بیانگر اهمیت مطالعه بر روی این گونه هستند.

افزایش تشخیص اهمیت هورمون‌ها برای رشد و تمایز جنین‌ها به عنوان یک روند متمرکز، با نام ایندوکراینولوژی[3] شناخته شده است (۸). هورمون‌های درون‌ریز نقش کلیدی در بسیاری از عملکردهای فیزیولوژی ماهیان در مواجه با شرایط متغیر محیطی و حفظ تعادل بدن بازی می‌کنند. تکامل جنینی در ماهیان استخوانی به مواد غذایی، هورمون‌ها و mRNAهای مولد ماده (مادری) که در طول بلوغ تخم در آن‌ها ذخیره می شوند وابسته هستند (۹). در ماهیان استخوانی تولید Thyroid hormones (THs) توسط محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-تیروئید (HPT[4]) مشابه سایر مهره‌داران است (شکل ۱). ترکیب و عملکرد محور HPT نقش حیاتی در متابولیسم، هموستازی، رشد سوماتیک و تکامل ماهیان استخوانی ایفا می‌کند (۱۰). در اغلب ماهیان استخوانی فولیکول‌ها تیروئیدی شکل و اندازه‌ای متفاوت دارند و در ناحیه حلقی[5] قرار گرفته و در طول شریان آوران گسترش پیدا کرده‌اند (۱۱) و در بسیاری از فرآیندهای بیولوژیک مانند رشد، ریخت‌شناسی، تنظیم اسمزی، رنگ‌دانه‌ای شدن پوست و تولیدمثل مشارکت دارند (۱۲). هورمون‌های تیروئیدی تولیدشده در غده تیروئید شامل پیش‌هورمون تیروکسین (L-T4) و تریودوتیرونین (T3) شکل فعال زیستی هورمون (تولید شده به واسطه عملکرد دییودوناز[6]) (۱۳، ١٤، ١٥) هستند. از آن‌جایی‌که فولیکول‌های تیروئیدی در جنین‌ها وجود ندارند هورمون‌های T4 و T3 شناسایی شده در تخم‌ها منشأ مادری دارند. تخم ماهیان دارای مقادیر قابل‌توجهی از THs هستند که به شکل تدریجی در طول تکامل جنین کاهش پیدا می‌کنند (۱۳، ۹، ١٦) و پیشنهاد شده است که مکانیزم‌های انتقال پیام‌ها جهت تکامل جنین‌ها بسیار قبل‌تر از شروع توانایی تولید تیروئید انجام می‌شود (۱۷). قرار گرفتن در معرض هورمون‌های تیروئیدی (در دامنه طبیعی) مولد ماده به شکل مهمی بر روی ویژگی‌های رشد و بقای نسل بعدی تولید شده از ماهیان مؤثر است (۱۸). شروع متابولیسم، تسریع در عملکردهای هورمون‌های دیگر، تحریک بلوغ اووسیت‌ها، لقاح، تولیدمثل و مراحل تکامل در ماهیان می‌تواند توسط تیروکسین انجام شود (۱۳). حساسیت تخم‌های تازه تفریخ شده به هورمون‌های تیروئیدی و اثرگذاری بر روی تسریع تکامل، تغییرات ریخت‌شناسی لاروها و افزایش نرخ بقا گزارش شده

1- Smoltification
2- International Union for Conservation of Nature
3- Endocrinology
4- Hypothalamic-Pituitary-Thyroid
5- Pharyngeal
6- Deiodinases

است (۱۷). البته باید به این نکته مهم اشاره شود که اثرات مثبت TH بر روی رشد اولیه را نمی‌توان به شکل عمومی برای تمام گونه‌های ماهیان در نظر گرفت (۱۹).



شکل ۱- خلاصه‌ای از محور مغز-هیپوفیز-تیروئید و عملکرد کلی هورمون‌های تیروئید (THs) در ماهی.

TRH، هورمون آزادکننده تیروتروپین؛ TSH، تیروتروپین: هورمون محرک تیروئید؛ TSHR، گیرنده تیروتروپین؛

CRH، هورمون آزادکننده کورتیکوتروپین؛ DIO، دیودیناز؛ TR، گیرنده تیروئید (ویرایش شده از ۱۰ و ۲۰).

Figure 1. Summary of the brain-pituitary-thyroid axis and the general function of thyroid hormones (THs) in fish. TRH: Thyrotropin-releasing hormone; TSH: Thyroid-stimulating hormone; TSHR: Thyroid-stimulating hormone receptor; CRH: Corticotropin-releasing hormone; DIO: Deiodinase; TR: Thyroid receptor (Adapted from [10] and [20]).

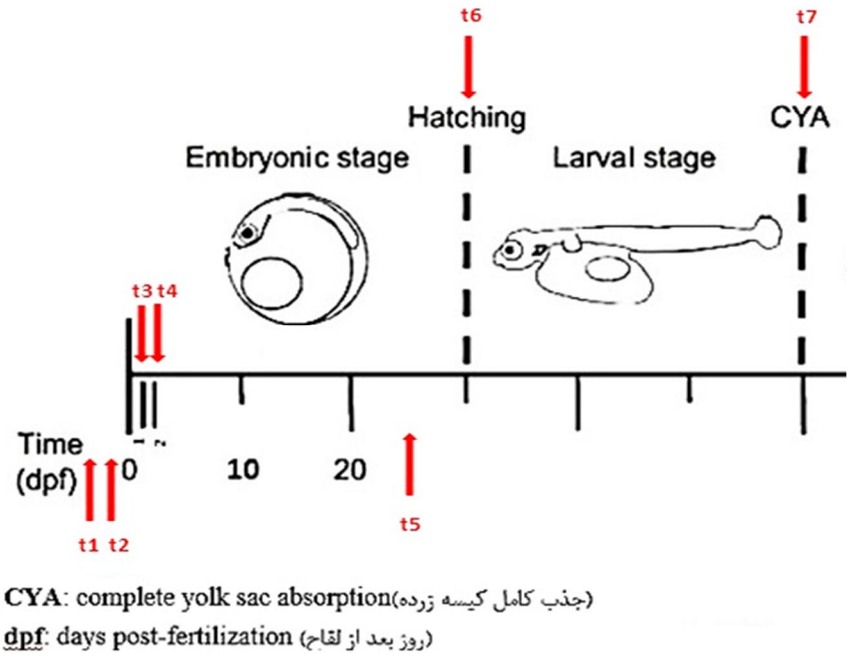
به طور کلی، در مهره‌داران گیرنده‌های عملکردی هورمون‌های تیروئیدی α و β توسط دو ژن مجزا (به‌ترتیب *thrα* و *thrβ*) کدگذاری می‌شوند. با این حال، در گونه‌های مختلف ماهیان استخوانی با توجه به قرار گرفتن تحت یک دور خاصی از دوبرابر شدن (تکرار) ژنی[1] (۲۱)، گونه‌های مختلف ماهیان استخوانی، ایزوفرم‌های گیرنده هورمون تیروئید را با ویژگی‌های ساختاری خاصی بیان می‌کنند که ویژگی‌های عملکردی منحصربه‌فردی را به این گیرنده‌ها می‌دهند (۲۲، ۲۳، ۲٤). در پلاسمای مهره‌داران انتقال هورمون‌های تیروئیدی از طریق اتصال به پروتئین‌های اتصالی هورمون شامل آلبومین[2]، ترانستیرتین[3] و گلوبولین[4] صورت گرفته و عملکرد آن‌ها به واسطه اتصال به گیرنده‌های هسته‌ای[5] (TRα و TRβ)، هورمون‌های تیروئیدی انجام می‌شود (۲۵). بیان گیرنده‌های هورمون تیروئیدی در بازه‌های زمانی مختلف قبل از تفریخ تخم‌های در حال تکامل، احتمالاً بیانگر عملکردهای متفاوت آن‌هاست (۱۳، ۲٦). به دنبال رونویسی جنین اولیه TR و mRNA ژن TR، تخم‌های لقاح‌نیافته گورخرماهی حاوی رونوشت‌هایی THR با منشأ مادری هستند (۲۷، ۲۸). از آن‌جایی‌که گیرنده‌های TR برای اولین بار در ماهی شبیه‌سازی شدند (۲۹)، سطوح mRNA ایزوفرم‌های TR در طی مراحل انتوژنتیکی گونه‌های مختلف مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت که می‌توان به کفشک‌ماهی ژاپنی (۳۰، ۳۱)، گورخرماهی (۳۲، ۳۳، ۲۸، ۳٤، ۳۵، ۳٦)، قزل‌آلای رنگین‌کمان (۳۷، ۳۸، ۳۹)، ماهی آزاد اقیانوس اطلس (٤۰)، کفشک (٤۱)، روغن ماهی اقیانوس اطلس (٤۲)، ماهی آزاد کوهو (٤۳)، ماهی تن آبی اقیانوس آرام (٤٤)، شانک ماهی دریایی (٤۵)، مارماهی ژاپنی (٤٦) و هامور خالدار نارنجی (٤۷) اشاره کرد. در این گونه‌ها، بیان TRα و TRβ به روش‌های مختلفی تنظیم می‌شود، بنابراین هیچ الگوی عمومی نظارتی شناسایی نشده است. با این‌حال مشارکت TR های ماهیان استخوانی در فرآیندهایی مانند رشد، تولیدمثل و هموستازی حرارتی گزارش شده است (۲٤). با توجه به این موضوع که در مورد بیان گیرنده‌های هورمون تیروئیدی در بازه‌های زمانی مختلف قبل از تفریخ تخم‌های ماهی آزاد دریای خزر اطلاعاتی در دسترس نبود در این مطالعه تغییرات بیان ژن *thrβ* از زمان لقاح تا جذب کامل کیسه زرده تخم‌های ماهی آزاد دریای خزر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در اجرای این طرح از مولدین وحشی موجود در مرکز بازسازی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت پس از اطمینان یافتن از رسیدگی جنسی، از آن‌ها تخم‌کشی انجام شد. سپس تخمک‌های به‌دست آمده با وزن تقریبی ۹۰ گرم (تعداد ۱۱/۱ عدد تخم در گرم) و به تعداد حدود ۱۰۰۰ عدد به روش نیمه خشک با استفاده از آب سالن تکثیر بارورشده و با وزن مشخص با روش غوطه‌وری هورمون تیروکسین که قبلاً در محلول اتانول ۹٦ درصد حل شده بود (٤۸، ٤۹) با غلظت‌های ۰ (بدون افزودن هورمون، شاهد)، (بدون افزودن هورمون، فقط حلال)، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر در مدت زمان ۱ ساعت برای تخم‌ها (۵۰) استفاده شد و سپس تخم‌ها به آرامی در تراکم تقریباً یکسان (حدود ۹۰ عدد) به‌ازای هر سینی تخم، در انکوباتورهای افقی با حجم آب یکسان، قرار گرفت. تعداد دوزهای هورمون به عنوان تیمارهای تیروکسین در نظر گرفته شدند. نمونه‌برداری از تخمک‌ها قبل

1- Gene duplication
2- Albumin
3- Transthyretin
4- Globulin
5- Thyroid hormone receptor beta

(t1)، تخم‌ها بعد از لقاح (t2)، لاروها تا جذب کیسه زرده در ٤٨ ساعت اول هر ٢٤ ساعت یکبار (t3، t4)، ٢٥ روز بعد از لقاح مرحله چشم‌زدگی (t5)، در زمان تفریخ (t6) و جذب کامل کیسه زرده (t7) انجام شد (شکل‌های ٢ و ٣).



شکل ٢- طرح شماتیک از مراحل تکامل لاروهای قزل‌آلای رنگین‌کمان در دمای ۱۰-۱۲ درجه سانتی‌گراد (٥١).

پیکان‌های قرمز بیانگر زمان‌های نمونه‌برداری از تخم‌های ماهی آزاد دریای خزر در این پروژه است (برای جزئیات به متن مراجعه شود).

Figure 2. Schematic diagram of the developmental stages of rainbow trout larvae at 10-12 °C [51].
Red arrows indicate the sampling times of Caspian Sea salmon eggs in this project (see text for details).

نمونه‌های تخم و لاروها در لوله فالکن ١٥ میلی‌لیتری حاوی حلول RNA (RNA later) جمع‌آوری و در دمای ٧٠- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در ضمن نمونه‌برداری از آب جهت اندازه‌گیری فاکتورهای فیزیکی شیمیایی، اندازه‌گیری دما، اکسیژن محلول و pH در مراحل مختلف روش کار صورت گرفت. دمای آب (با استفاده از دماسنج جیوه‌ای)، pH (با استفاده از Aqua pH meter, TPS, Australia) و شوری (با استفاده از water quality checher U-10) اندازه‌گیری شدند.

گام اول شناسایی بیان ژن‌های مرتبط با گیرنده‌ها هورمون تیروئید و میزان بیان آن‌ها با استفاده از روش‌های متداول مولکولی آزمایشگاهی شامل استخراج RNA، PCR، qPCR بر طبق دستورالعمل‌های تعیین شده توسط شرکت‌های تخصصی انجام پذیرفت (٥٢، ٣٩). برای انجام این کار تعدادی از نمونه‌های نگهداری شده در محلول RNAlater به بخش ژنتیک انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری جهت بررسی و شروع روش‌های ژنتیک مولکولی و تعدادی به مرکز CIIMAR وابسته به دانشگاه پورتو پرتغال ارسال شد. به طور خلاصه، RNA کل با استفاده از کیت (Aurum Total RNA mini kit) بر اساس دستورالعمل شرکت استخراج و در دمای ٨٠- درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس با استفاده از RT-PCR به cDNA تبدیل شد. واکنش‌های PCR با استفاده از Phusion Flash master mix (Thermo Scientific)

انجام شد. در این پژوهش طراحی پرایمرهای پیشرو و معکوس با توالی‌های ویژه برای ژن‌های موردنظر با استفاده از نرم‌افزار Primer3 (۵۳) و qPCR با استفاده از کیت SYBR green master mix (BioRad) و دستگاه iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System انجام شد.

محاسبات انجام شده در مورد اثرات غلظت‌های مختلف حمام تیروکسین: تخم‌های تلف‌شده با استفاده از پوآر جمع‌آوری‌شده و مورد شمارش قرار گرفتند. تخم‌های چشم زده به دقت شمارش و درصد لقاح تخم‌ها، چشم‌زدگی و تفریخ از طریق روابط ذیل محاسبه گردید.

$$\text{درصد لقاح} = \frac{\text{تعداد تخمک‌های لقاح یافته}}{\text{تعداد کل تخمک‌ها}} \times ۱۰۰$$

$$\text{درصد چشم‌زدگی} = \frac{\text{تعداد تخم‌های چشم زده}}{\text{تعداد تخمک‌های لقاح یافته}} \times ۱۰۰$$

$$\text{درصد تفریخ} = \frac{\text{تعداد لارو}}{\text{تعداد تخم‌های چشم زده}} \times ۱۰۰$$

شکل ۳- تیمارهای مختلف (دوزهای هورمون تیروکسین) و در ادامه قرار دادن تخم‌های تازه تکثیر شده ماهی آزاد دریای خزر در تراف‌های افقی واقع در سالن تکثیر مرکز بازسازی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت.

Figure 3. Different treatments (thyroxine hormone doses) followed by placing newly fertilized Caspian Sea salmon eggs in horizontal trays at the Shahid Bahonar Reproduction and Genetic Resource Conservation Center in Kelardasht.

جدول ۱- پرایمر طراحی شده با استفاده از مطالعات قبلی برای ژن‌های گیرنده‌های هورمون تیروئید (TRβ).

Table 1. Primers designed using previous studies for thyroid hormone receptor genes (TRβ).

ردیف	نام پرایمر	توالی پرایمر	ژن هدف	اندازه محصول	GenBank accession no
۱	SSB1 (5′)	TCACTGTCGGCATGGCAACA	Salmon *S. salar*	۲۹۰	AF302251.1
۲	SSB2 (3′)	TGACCAATGTCCTCAGGCAA			
۳	F*B*-actin	ACTGGGACGACATGGAGAAG		۲٦۰	EF406272
٤	R*B*-actin	CAGAGCGTAACCCTCGTAGAT			

با بررسی جزئیات مقالات مختلف و اطلاعات موجود در GenBank در مورد گونه‌هایی از آزادماهیان شامل قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) و ماهی آزاد اطلس (*S. salar*) و با تمرکز بر روی مطالعه (٤۰) و هم‌چنین (۳۹) در مجموع ۱۸ جفت پرایمر برای شناسایی ژن‌های گیرنده‌های هورمون تیروئید (TRα و TRβ) طراحی شد که در این بین فقط پرایمری که در جدول ۱ مشاهده می شود پاسخ مناسب به شناسایی ژن TRβ داد.

روش‌های آنالیز آماری: مجموعه تخمک‌های به‌دست آمده به‌طور تصادفی به گروه‌های مختلف دسته‌بندی شد. بررسی نرمال بودن داده‌ها به کمک آزمون کولموگراف اسمیرنف صورت پذیرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌های مربوط به تغییرات درصد لقاح، چشم‌زدگی و تفریخ تخم‌ها تا جذب کامل کیسه زرده در هر مدت زمان به کمک روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) انجام شد. به‌منظور تحلیل اثر غلظت و زمان بر بیان ژن از تحلیل واریانس دوطرفه (Two-way ANOVA) استفاده گردید. سطح معنی‌داری برای آزمون‌های آماری کم‌تر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. جهت بررسی آماری و ترسیم نمودارها نرم‌افزار SigmaPlot 11.0 Systat Software, Inc. استفاده شد. مقایسه میانگین‌های خصوصیات تخم و بررسی‌های بیان ژن با آزمون چنددامنه‌ای دانکن (Multiple Range Test Duncan) در سطح معنی‌دار ۵ درصد صورت می‌گیرد. جهت بررسی آماری و ترسیم نمودارها نرم‌افزار SigmaPlot 11.0 Systat Software, Inc. مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

بررسی درصد لقاح تخم‌های ماهی آزاد دریای خزر بعد از قرار گرفتن در معرض غلظت‌های مختلف هورمون تیروکسین (T4) نشان داد که تفاوت معنی‌داری در بین غلظت‌های مختلف وجود ندارد (P>۰/۰۵) (جدول ۲ الف). بیش‌ترین درصد چشم‌زدگی و تفریخ در تیمار شاهد و غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به سایر تیمارها مشاهده شد در حالی‌که کم‌ترین میزان چشم‌زدگی و تفریخ در تیمار غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد (جدول ۲ ب، ج). بین تیمار شاهد و غلظت‌های ۰/۵ (چشم‌زدگی) و ۰/۷۵ (چشم‌زدگی و تفریخ) میلی‌گرم بر لیتر تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۵) در مجموع نتایج نشان داد با افزایش میزان غلظت حمام هورمون تیروکسین درصد چشم‌زدگی و تفریخ تخم‌ها کاهش می‌یابد (جدول ۲ ب، ج).

جدول ۲- درصد لقاح (الف)، چشم‌زدگی (ب) و تفریخ (ج) تخم‌های ماهی آزاد دریای خزر بعد از قرار گرفتن در معرض غلظت‌های مختلف هورمون تیروکسین (T4).

Table 2. Fertilization rate (a), eyeing rate (b), and hatching rate (c) of Caspian Sea salmon eggs after exposure to different concentrations of thyroxine hormone (T4).

الف

غلظت (میلی‌گرم در لیتر)	۰	۰/۲۵	۰/۵	۰/۷۵
درصد لقاح	۹۸/۱ ±۲/۰۰	۹۶/۷ ±۱/۱۵	۹۶/۷ ±۱/۱۵	۹٤/۷ ±۱/۱۵

ب

غلظت (میلی‌گرم در لیتر)	۰	۰/۲۵	۰/۵	۰/۷۵
درصد چشم زدگی	۷۰/۰ ±۰/۸٦[a]	۷۰/۲ ±۰/٦۹[a]	٦۸/۱ ±۰/۷۰[bc]	٦۷/۸ ±۰/۷۱[c]

ج

غلظت (میلی‌گرم در لیتر)	۰	۰/۲۵	۰/۵	۰/۷۵
درصد تفریخ	۸٤/۱ ±۵/۳۰[a]	۸۳/۱ ±۲/٤۵[a]	۸۰/۱ ±۲/۳۸[ab]	۷۵/۳ ±۲/۲۳[b]

حروف انگلیسی غیرمشترک بیانگر اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌های تیمارهای مختلف در طول آزمایش می‌باشد (P<۰/۰۵)

حروف انگلیسی مشترک بیانگر معنی‌دار نبودن اختلاف بین تیمارهای مختلف در طول آزمایش می‌باشد (P<۰/۰۵)

داده‌ها به صورت میانگین ± خطای معیار ارائه شده‌اند

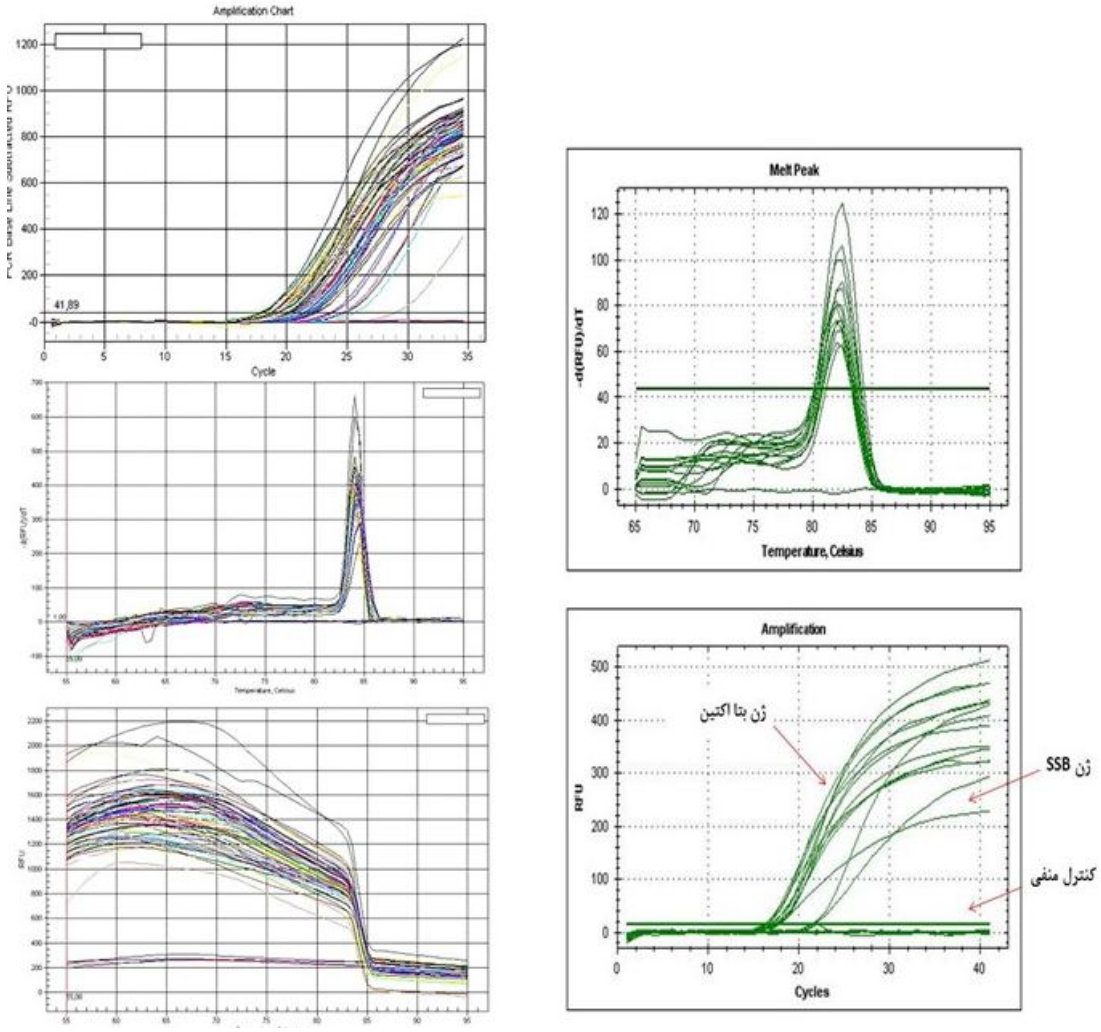
نتایج Quantitative Real-time PCR (qPCR):

نتایج استفاده از روش Quantitative Real-time PCR به منظور تعیین میزان بیان ژن گیرنده هورمون تیروئید (*thrb*) و استفاده از منحنی ذوب[1] و تکثیر ژن بتا اکتین[2]، ژن *SSB* بیانگر تولید فقط یک محصول در چرخه‌های دمایی و زمان‌های به‌کار رفته بود (شکل ٤).

نتایج استفاده از روش Quantitative Real-time PCR به‌منظور تعیین مقادیر بیان ژن گیرنده هورمون تیروئید (*thrb*) براساس غلظت در طول زمان‌های مختلف، براساس زمان در غلظت‌های مختلف دوره نمونه‌برداری نشان دادند که در همگی غلظت‌های به‌کار رفته با افزایش زمان روند افزایشی در بیان ژن گیرنده هورمون تیروئید (*thrb*) مشاهده شد (شکل ۵ A، B). در همگی غلظت‌های به‌کار رفته تا زمان t6 روند افزایشی در میزان بیان ژن گیرنده هورمون تیروئید (*thrb*) مشاهده شد در حالی‌که در زمان t7 به‌جز تیمار شاهد (t1) (خط‌چین مشکی) در سایر تیمارها روند نزولی مشاهده شد (شکل C۵). هم‌چنین در زمان t5 (۲۵ روز بعد از لقاح و چشم‌زدگی) در همگی غلظت‌های استفاده شده به‌جز ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر کاهش ناگهانی در میزان بیان ژن گیرنده هورمون تیروئید (*thrb*) مشاهده شد (شکل C۵).

نتایج استفاده از تجزیه و تحلیل آنالیز واریانس دوطرفه (Two-way interaction plot) برای تغییرات بیان ژن گیرنده هورمون تیروئید (*thrb*) براساس غلظت و زمان بیانگر معنی‌دار بودن (P<۰/۰۵) اثر متقابل غلظت و زمان در بیان ژن موردنظر بود. مقایسه گروه‌های مختلف (تست دانکن) وجود اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵) بین تمام زمان‌ها و غلظت‌ها در طول دوره نمونه‌برداری را نشان داد.

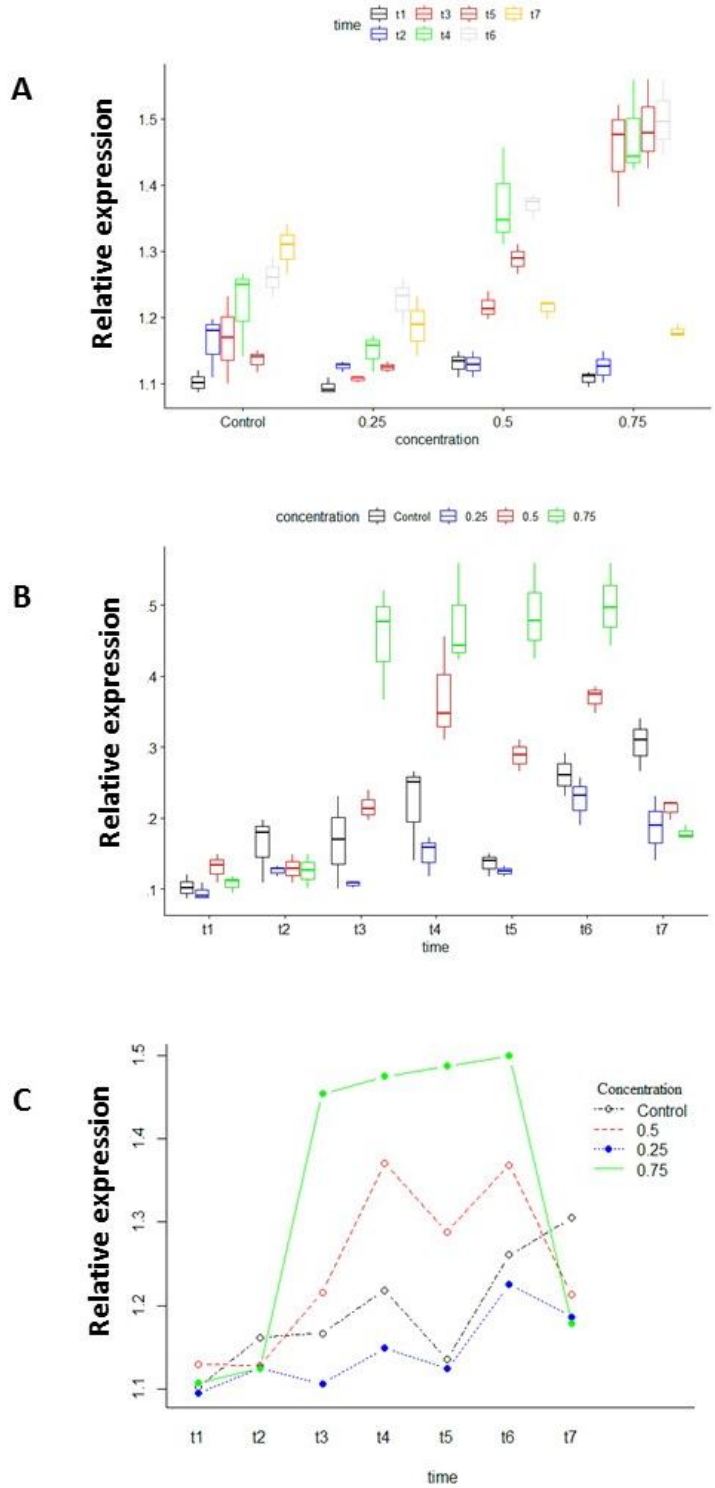
1- Melt curve
2- Beta actin



شکل ٤- منحنی ذوب[1] نمونه‌ای از تکثیر ژن بتا اکتین، ژن ***SSB*** در منحنی ذوب (بالا) و تکثیر ژن بتا اکتین، ژن ***SSB*** و کنترل منفی (پایین) در بخش ژنتیک انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری (راست) مرکز **CIIMAR** دانشگاه پورتو پرتغال (چپ).

Figure 4. Melting curve of a sample of beta-actin gene amplification, *SSB* gene in the melting curve (top), and amplification of beta-actin, *SSB* gene, and negative control (bottom) in the genetics section of the International Sturgeon Research Institute (right) and CIIMAR Center, University of Porto, Portugal (left).

1- Melt curve



شکل ۵- تغییرات مقادیر بیان ژن گیرنده هورمون تیروئید (***thrb***) براساس غلظت در زمان‌های مختلف (A)، زمان در غلظت‌های مختلف (B) و براساس غلظت و زمان (**Two-way interaction plot**) (C) در طول دوره نمونه‌برداری، T: زمان‌های نمونه‌برداری، **concentration** (غلظت): میلی‌گرم/لیتر.

Figure 5. Changes in the expression levels of the thyroid hormone receptor gene (*thrb*) based on concentration at different times (A), time at different concentrations (B), and based on concentration and time (Two-way interaction plot) (C) during the sampling period, T: Sampling times, Concentration: mg/L.

بحث

اثرات غلظت‌های مختلف حمام تیروکسین بر روی درصد لقاح، چشم‌زدگی و تفریخ: با توجه به بررسی منابع موجود پروژه حاضر اولین مطالعه صورت گرفته در زمینه بررسی اثرات غلظت‌های مختلف هورمون تیروکسین بر روی تخم‌های ماهی آزاد دریای خزر است. نتایج این مطالعه در مورد درصد لقاح تخم‌های ماهی آزاد دریای خزر بعد از قرار گرفتن در معرض غلظت‌های مختلف هورمون تیروکسین (T4) بیانگر عدم وجود تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها بود. نتایج Raise و همکاران (٥٤، ٥٥) بیانگر روند کاهشی معنی‌دار درصد لقاح تخم‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در هنگام استفاده از دوزهای مختلف T3 بود که با نتایج مطالعه اخیر تفاوت داشت. با این‌حال بررسی درصد چشم‌زدگی و تفریخ تخم‌های ماهی آزاد دریای خزر بیانگر وجود ارتباطی معکوس بین افزایش میزان غلظت هورمون تیروکسین با درصد چشم‌زدگی و تفریخ اشاره نمود که می‌تواند به دلیل افزایش میزان متابولیسم مواد درون کیسه زرده به‌واسطه قرارگیری در معرض هورمون تیروئید خارجی، مصرف سریع‌تر محتویات آن همراه با کاتابولیسم مواد پروتئینی موجود در کیسه زده و در نتیجه تولید مواد زائد آمونیاکی (٥١، ٥٦) و نیز کمبود مواد غذایی در دسترس برای رشد اشاره کرد. جمیلی و همکاران (٥٧) اثرات غلظت‌های مختلف هورمون تیروکسین را بر روی رشد و نمو و بقای تخم و لارو قزل‌آلای رنگین‌کمان، فیتوفاگ، آمور و سس ماهی مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج این بررسی نشان داد که در غلظت ۰/٥ ppm (میلی‌گرم بر لیتر) بیش‌ترین میزان تفریخ و بقای لاروهای ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان، فیتوفاگ و آمور نسبت به سایر تیمارهای مشاهده شد در حالی‌که سس ماهی چنین نتایجی را از خود نشان نداد. اکبری و همکاران (٥۰) که بررسی اثرات غلظت‌های مختلف هورمون لووتیروکسین بر روی مراحل اولیه رشد، نمو و بقای تخم و لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرداختند که بیش‌ترین درصد تفریخ و بقای لاروها بعد از جذب کیسه زرده در غلظت ۰/٥ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. هم‌چنین نتایج مطالعه مرادیان و همکاران (٥٨) و Lam و Sharma (٥٩) با بررسی تأثیر غوطه‌وری در غلظت‌های مختلف هورمون T4 (۰/۰۱، ۰/۱، ۰/٥ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) با افزایش درصد قابلیت تفریخ تخم‌ها در ماهی فیتوفاگ (*H. molitrix*) و کپور معمولی همراه بود. نتایج Alinezhad و همکاران (٤٩) نشان دادند که با استفاده از غلظت ۱ گرم در لیتر هورمون T4 به شکل غوطه‌وری بر روی تخم‌های ماهی خاوریاری استرلیاد *A. ruthenus* سبب افزایش رشد و نرخ تفریخ و بقا در لارو ماهی شدند. اثرات مثبت تیمارهای هورمون تیروکسین بر تکامل تخم‌ها، تغییرات ریخت‌شناسی لاروها و افزایش نرخ بقا در گونه‌های مختلفی مانند ماهی شیری (*C. chanos*)، کپور معمولی (*C. carpio*) ماهی آزاد چام (*O. keta*) گزارش شده است (٦۰، ٦١، ٦٢). هم‌چنین اثرات مثبت و تحریک‌کنندگی به‌کارگیری هورمون‌های تیروئیدی در افزایش جذب کیسه زرده، رشد بدن، تمایز باله‌ها و بقا در لاروهای برخی از گونه‌ها نیز گزارش شده است (٦٣، ٦٤، ٦٥، ٦٦).

اگرچه باید به این نکته مهم اشاره شود که اثرات مثبت TH بر روی رشد اولیه را نمی‌توان به شکل عمومی برای تمام گونه‌های ماهیان در نظر گرفت چرا که بی‌اثر بودن و یا اثرات منفی TH بر رشد جنینی- لاروی و مراحل تکاملی نیز در برخی از گونه‌ها مشاهده شده است. به عنوان مثال نتایج مطالعه Woodhead (٦٧) بر روی ماهی قزل‌آلای قهوه‌ای (*Salmo trutta*) نشان داد که علی‌رغم مشاهده اثرات مثبت استفاده از هورمون تیروکسین با

غلظت‌های ۱-۱۰ ppm (به شکل غوطه‌وری) بر روی تسریع جذب کیسه زده و میزان تفریخ لاروها، بدشکلی ریخت‌شناسی در مورد میزان رشد ناحیه سر لاروها و باله‌ها و کاهش طول لاروی مشاهده شد. هم‌چنین مطالعه بر روی گورخرماهی (۱۹) و یا کپور معمولی (۱۷) بی‌اثر بودن یا اثرات سمی بر روی لاروهایی که در معرض غلظت کم T4 قرار گرفته بودند را نشان دادند. لقاح تخمک‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان با دوزهای مختلف هورمون T3 منتج به افزایش نرخ مرگ ومیر جنین‌های تولیدشده، شده بود هر چند تأثیر معنی‌داری بر روی نرخ رشد جنین‌ها تا مرحله تفریخ از خود نشان نداد (٥٤). با توجه به‌دست آوردن نتایجی متضاد با نتایج سایر مطالعات در مورد اثرگذاری مثبت هورمون تیروکسین بر میزان بقای جنینی، نرخ تفریخ و بقای لاروی در گونه‌های مختلف می‌توان به دلایل زیر اشاره نمود: وجود تفاوت‌های گونه‌ای، میزان دوز هورمون مصرفی و زمان حمام به‌کار رفته، تفاوت در شرایط انجام آزمایش‌های کارگاهی مانند شرایط محیطی، متفاوت بودن احتمالی مکانیزم‌های مرتبط با میزان و دامنه اثرگذاری دوزهای استفاده شده هورمون های تیروئیدی (T4 و T3)، و هم‌چنین وجود عوامل تأثیرگذار دیگر مانند اثرات متقابل هورمون‌های درون‌ریز مؤثر در فرآیند رشد مانند هورمون رشد (GH[1]) و کورتیزول و نیز عوامل ناشناخته (که نیازمند بررسی‌های بیش‌تری هستند) از عوامل مؤثر بر نتایج به‌دست آمده بوده‌اند.

انتوژنی بیان ژن‌های گیرنده هورمون تیروئید (*thrβ*، *thrα*) در تخم‌های ماهی آزاد دریای خزر: مطالعه اخیر برای اولین بار با استفاده از روش RT-PCR به بررسی تغییرات بیان ژن‌های گیرنده هورمون تیروئید (*thrβ, thrα*) در تخم‌های ماهی آزاد دریای خزر در بازه زمانی معین، از لقاح تخم تا جذب کیسه زرده پرداخته است (شکل ٤). نتیجه تجزیه و تحلیل‌های آماری در مورد اثرات تغییرات غلظت در طول زمان و تغیر زمان در غلظت‌های مختلف بیانگر روند افزایشی و هم‌چنین اثرمتقابل غلظت و زمان در بیان ژن *thrb* بوده است در حالی‌که علی‌رغم استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده مختلف شناسایی بیان ژن *thrα* موفقیت‌آمیز نبوده که نیازمند صرف زمان و هزینه بیش‌تر به منظور طراحی پرایمرهای جدید و تلاش‌های مجدد در این زمینه است. بر طبق نتایج به‌دست آمده در همگی غلظت‌های مورد استفاده، چه تیمار شاهد و چه سایر تیمارها، روند افزایشی معنی‌دار در بیان ژن *thrb* تا زمان t6 مشاهده شده است در حالی‌که در زمان t7 در سایر تیمارها به‌جز تیمار شاهد روند نزولی مشاهده شد (شکل ٤ C). بیان گیرنده‌های هورمون تیروئیدی در بازه‌های زمانی مختلف قبل از تفریخ در تخم‌های در حال تکامل، احتمالاً بیانگر عملکردهای متفاوت آن‌هاست (۱۳، ۲٦). در طی مراحل انتوژنتیک گونه‌های مختلف سطوح mRNA ایزوفرم‌های THR و روش‌های مختلف تنظیمی بیان ژن‌های *TRα* و *TRβ* گزارش شده است مانند قزل‌آلای رنگین‌کمان (۳۷، ۳۹، ٥٥)، ماهی آزاد اقیانوس اطلس (٤٠)، گورخرماهی (۲۸، ۳۲، ۳۳، ۳٤، ۳٥، ۳٦)، کفشک‌ماهی (٤۱)، کفشک‌ماهی ژاپنی (۳۰، ۳۱)، ماهی آزاد کوهو (٤۳)، ماهی تن آبی اقیانوس آرام (٤٤)، روغن ماهی اقیانوس اطلس (٤۲)، ماهی قنات (*Pimephales promelas*) (٦٨)، هامور خالدار نارنجی (*Epinephelus coioides*) (٤٧)، شانک ماهی دریایی (٤٥) و مارماهی ژاپنی (٤٦) که در مجموع بیانگر عدم شناسایی الگوی یکسان تنظیمی در آن‌هاست (۲٤). نتایج مطالعه حاضر می‌تواند بیانگر فعال بودن محور تیروئیدی و نقش گیرندگی ژن *thrβ* در مراحل جنینی و لاروی (۱۳، ۳۷، ٥٥) و پاسخ‌گویی به هورمون T4 خارجی و حضور عناصر

1- Growth hormone

پاسخ هورمون تیروئیدی (TRE[1]) (۳۳) قبل از فعال شدن فولیکول‌های تیروئیدی در تخم‌های ماهی آزاد دریای خزر باشد. مورد اخیر می‌تواند بیان‌کننده اهمیت فیزیولوژیک گیرنده‌های هورمون‌های تیروئیدی و متعاقب آن سیگنال‌های درون‌ریز در مراحل اولیه تکاملی جنین‌ها باشد (۱۳، ۱۷). در ماهی سیم دریایی اوج رونویسی $TR\beta$ در زمان تفریخ بوده و سپس روند کاهشی مشاهده شد در حالی‌که افزایش بیان $TR\alpha$ تا زمان تفریخ و زمان بعد از آن در طول دوره آزمایش افزایش نشان داد (۱۳). در مراحل جنینی و اولیه رشد گورخرماهی متفاوت بودن زمان بروز و میزان $TR\alpha$ در سطوح بالاتری نسبت به $TR\beta$ گزارش شده است (۳۳). کاهش مشاهده شده بیان ژن $thr\beta$ در زمان t5 در همگی غلظت‌های به‌کار رفته به‌جز ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر (شکل ۵) می‌تواند با شروع توسعه، تکامل و تولید هورمون‌های تیروئیدی با منشأ درونی (۵۵، ٦۹) در طی مراحل رشد جنینی تخم ماهی آزاد دریای خزر در ارتباط باشد. هر چند مورد اخیر نیازمند بررسی و جزئیات بیش‌تری است. عدم مشاهده کاهش اشاره شده تیمار ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر در زمان t5 می‌تواند به دوز هورمونی استفاده شده، ویژگی گونه موردنظر و نوع متفاوت اثرگذاری این سطح از قرار گرفتن بر ظرفیت تنظیمی و توانایی جنین در حال رشد در حفظ هموستازی هورمون‌های تیروئیدی در نتیجه مشاهده نتایجی متفاوت مرتبط باشد (۲۷، ۵۵). نتایج مطالعه لیو و چان (۲۷) بر روی گورخرماهی و استفاده از تیمارهای T4 افزایش بیان ژن‌های $thrb$ و $thr\alpha$ بعد از تفریخ را نشان دادند. کاهش مشاهده شده در بیان ژن $thrb$ در t7 به‌جز تیمار شاهد را می‌توان با تغییرات احتمالی ایجاد شده ناشی از قرارگیری در معرض غلظت‌های هورمون تیروکسین خارجی (۱۷) و در نتیجه تغییر محتوای هورمون‌های تیروئیدی جنین و لاروها و در ادامه آزادسازی هورمون‌های تیروئیدی با منشأ درونی در طی مراحل تکاملی جنین به لاور مرتبط دانست (۵۵). در طی مراحل تکامل و رشد جنینی هورمون‌های تیروئیدی ذخیره شده در زرده، که منشأ آن‌ها انتقال از مولد ماده به تخمک در زمان زرده‌سازی[2] قبل از شروع ساخته‌شدن و رهاسازی هورمون‌های تیروئیدی با منشأ درونی است (۹)، هم‌زمان با مصرف شدن زرده ناپدید می‌شوند (۷۰) و بنابراین می‌تواند با کاهش مشاهده شده در میزان بیان ژن $thr\beta$ مرتبط باشد. به‌علاوه نتایج مشاهده شده می‌تواند با تغییرات بیان ژن $thr\alpha$ در مراحل مختلف رشد و تکامل جنینی و لاروی و نیز تغییر مقادیر هورمون‌های T3 و T4 (۱۳، ۱۷، ۵۵) در تخم و لاروهای ماهی آزاد دریای خزر در ارتباط باشد که در حال حاضر داده‌ای جهت بررسی و مقایسه در دسترس وجود ندارد. البته ذکر این نکته ضروری است با توجه به داده‌های به‌دست آمده مطالعه اخیر در مورد ماهی آزاد دریای خزر و هم تنوع و پراکندگی داده‌ها در سایر گونه‌های مطالعه شده، نیازمندی به جزئیات و داده‌های مولکولی بیش‌تر در طی مراحل تکاملی به منظور تفسیر دقیق‌تر نتایج اخیر را روشن ساخته و چالش‌برانگیز بودن نتایج حاضر را اجتناب‌ناپذیر می‌نماید.

جمع‌بندی

ارتباطی معکوس بین افزایش میزان غلظت هورمون تیروکسین با درصد چشم‌زدگی و تفریخ تخم‌های ماهی آزاد دریای خزر مشاهده شد در حالی‌که در غلظت‌های به‌کار رفته با اثرگذاری مثبت بر روی میزان بیان ژن $thr\beta$ گیرنده هورمون تیروئید همراه بود. هدف از مطالعه بررسی انتوژنی ژن $thr\beta$ در تخم ماهی آزاد دریای خزر و هم‌چنین بررسی امکان استفاده از این روش به‌منظور افزایش کارایی

1- Thyroid responsive elements

2- Vitellogenesis

تکثیر در ماهی آزاد دریای خزر بود. با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان این‌گونه بیان نمود که استفاده از حمام هورمون تیروکسین با غلظت‌های به‌کار رفته در این مطالعه به‌منظور افزایش کارایی تکثیر توصیه نمی‌شود. در نتیجه انجام پژوهش‌های بیش‌تر در مراحل مختلف رشد و تکاملی گونه مذکور در جهت دستیابی به تصویری روشن‌تر و تفسیری کاربردی‌تر را می‌توان در مطالعات بعدی مدنظر قرار داد. شایان ذکر است که در حال حاضر این روش در مراکز تکثیر ماهی دریای خزر استفاده نمی‌شود.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با حمایت صندوق حمایت از پژوهش‌گران و فناوران کشور در قالب گرنت شماره ۹۹۰۰۱۰۸۲ و نیز گرنت یک ماهه از برنامه تحقیقات و نوآوری افق اتحادیه اروپا "Association of European Marine Biological Laboratories expanded," (ASSEMBLE Plus) انجام شد. از همکاری صمیمانه جناب مهندس پاشازانوشی و مهندس تقوی ریاست محترم و کارشناس مسئول وقت تکثیر و پرورش مرکز بازسازی و حفاظت از ذخایرژنتیکی آزادماهیان شهید باهنر کلاردشت نیز سپاسگزاریم.

منابع

1. Jalali, M. A., & Mojazi Amiri, B. (2009). Threatened fishes of the world: *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877) (Salmoniforms: Salmonidae). *Environmental Biology and Fisheries*. 86 (3), 375-376.
2. Kalbassi, M. R., Dorafshan, S., Pourkazemi, M., & Amiri, B. M. (2009). Triploidy induction in the Caspian salmon *salmo trutta caspius* by heat shock. *Journal of Applied Ichthyology*. 25, 104-107.
3. Najafpour, B., Dorafshan, S., Paykan Heyrati, F., & Power, D. M. (2019). Embryonic development of the endangered Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877). *Journal of Applied Ichthyology*. 1-7.
4. Sayad Bourani, M., Abtahi, B., Bahmani, M., Kazemi, R., Djandian, S., Dakhir Rouhi, J., & Amiri, A. (2005). Effect of weight on osmotic regulation ability in Caspian trout fry (*Salmo trutta caspius*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences,* 14 (4), 81-96. [In Persian]
5. Bahramian, B. (2015). The final report of the project on "the procurement of the Caspian salmon *Salmo trutta caspius* from the rivers of Mazandaran province and their propagation and rearing the production of 100,000 fry until release to the Caspian Sea. Project approved number 89194-8917-12-14-12. *Iranian Fisheries Sciences Research Institute-Tonkabon Coldwater Fish Research Center*. p31. [In Persian]
6. Abdolmalaki, Sh. et al. (2015). The Caspian trout (*Salmo trutta caspius*) broodstocks supplying in the south western of the Caspian Sea (Guilan province). Project approved number: 8917-12-73-14-89193. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. p30 [In Persian]
7. Sarvi, K., Niksirat, H., Mojazi Amiri, B., Mirtorabi, S. M., Rafiee, G. R., & Bakhtiyari, M. (2006). Cryopreservation of semen from the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). *Aquaculture*. 256, 564-569.
8. Bern, H. A. (1992). The development of the role of hormones in development-A double remembrance. *Endocrinology*. 131, 2037-2038.
9. Campinho, M. A., Galay-Burgos, M., Sweeney, G. E., & Power, D. M. (2010). Coordination of deiodinase and thyroid hormone receptor expression during the larval to juvenile transition in sea bream (*Sparus aurata*, Linnaeus). *General Comparative Endocrinology*. 165 (2), 181-194.
10. Habibi, H. R., Nelson, E. R., & Allan, E. R. O. (2012). New insights into thyroid hormone function and modulation of reproduction in goldfish. *General Comparative Endocrinology*. 175, 19-26.

11. Shkil, F., Siomava, N., Voronezhskaya, E., & Diogo, R. (2019). Effects of hyperthyroidism in the development of the appendicular skeleton and muscles of zebrafish, with notes on evolutionary developmental pathology (Evo-Devo-Path). *Scientific Report*. 9, 5413.
12. Power, D. M., Llewellyn, L., Faustino, M., Nowell, M. A., Bjaornsson, B. T., Einarsdottir, I. E., Canario, A. V. M., & Sweeney, G. E. (2001). Thyroid hormones in growth and development of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 130 (4), 447-459.
13. Blanton, M. L., & Specker, J. L. (2007). The Hypothalamic-Pituitary-Thyroid (HPT) Axis in Fish and Its Role in Fish Development and Reproduction. *Critical Reviews in Toxicology*. 37, 97-115.
14. Campinho, M. A. (2019). Teleost Metamorphosis: The Role of Thyroid Hormone. *Frontier Endocrinology* (Lausanne). 14, 10: 383.
15. Abdollahpour, H., & Falahatkar, B. (2018). The role and application of thyroid hormones in fish physiology and aquaculture. *Advanced Aquaculture Sciences Journal*. 2, 19-38.
16. Chang, J., Wang, M., Gui, W., Zhao, Y., Yu, L., & Zhu, G. (2012). Changes in thyroid hormone levels during zebrafish development. *Zoological Science*. 29 (3), 181-184.
17. Brown, C. L., Urbinati, E. C., Zhang, W. M., Brown, S. B., & McComb-Kobza, M. (2014). Maternal Thyroid and Glucocorticoid Hormone Interactions in Larval Fish Development, and Their Applications in Aquaculture. *Review in Fisheries Science Aquaculture*. 22, 207-220.
18. Ruuskanen, S., & Hsu, B. Y. (2018). Maternal Thyroid Hormones: An Unexplored Mechanism Underlying Maternal Effects in an Ecological Framework. *Physiological and Biochemical Zoology*. 91 (3), 904-916.
19. Sharma, P., & Patiño, R. (2013). Regulation of gonadal sex ratios and pubertal development by the thyroid endocrine system in zebrafish (*Danio rerio*). *General Comparative Endocrinology*. 184, 111-119.
20. Deal, C. K., & Volkoff, H (2020). The Role of the Thyroid Axis in Fish. *Frontier Endocrinology*. 11, 596585. **doi: 10.3389/fendo.2020.596585.**
21. Glasauer, S. M., & Neuhauss, S. C. (2014). Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Molecular Genetics and Genomics*.
22. Kawakami, Y., Tanda, M., Adachi, S., & Yamauchi, K. (2003). cDNA cloning of thyroid hormone receptor betas from the conger eel, *Conger myriaster*. *General Comparative Endocrinology*. 131, 232-40.
23. Kawakami, Y., Tanda, M., Adachi, S., & Yamauchi, K. (2003). Characterization of thyroid hormone receptor alpha and beta in the metamorphosing Japanese conger eel, *Conger myriaster*. *General Comparative Endocrinology*. 132, 321-32.
24. Lazcano, I., & Orozco, A. (2018) Revisiting available knowledge on teleostean thyroid hormone receptors. *General Comparative Endocrinology*. 265, 128-32. **doi: 10.1016/j.ygcen. 2018. 03.022.**
25. Yen, P. M., & Chin, W. W. (1994). New advances in understanding the molecular mechanisms of thyroid hormone action. *Trends* Endocrinology Metabolism. 5, 65-72.
26. Shibata, Y., Tanizaki, Y., & Shi, Y. (2020). Thyroid hormone receptor beta is critical for intestinal remodeling during *Xenopus tropicalis* metamorphosis. *Cell Biosci*. 10, 46.
27. Liu, Y. W., & Chan, W. K. (2002). Thyroid hormones are important for embryonic to larval transitory phase in zebrafish. *Differentiation*, 70 (1), 36-45.
28. Walpita, C. N., Van der Geyten, S., Rurangwa, E., & Darras, V. M. (2007). The effect of 3,5,3'-triiodothyronine supplementation on zebrafish (*Danio rerio*) embryonic development and expression of iodothyronine deiodinases and thyroid hormone receptors. *General Comparative Endocrinology*. 152, 206-14.
29. Yamano, K., Araki, K., Sekikawa, K., & Inui Y. (1994). Cloning of thyroid

hormone receptor genes expressed in metamorphosing flounder. *Developmental Genetics*. 15, 378-82.

30. Yamano, K., & Miwa, S. (1998). Differential gene expression of thyroid hormone receptor alpha and beta in fish development. *General Comparative Endocrinology*. 109, 75-85.
31. Yu, J., Fu, Y., & Shi, Z. (2017). Coordinated expression and regulation of deiodinases and thyroid hormone receptors during metamorphosis in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 43, 321-336.
32. Essner, J. J., Breuer, J. J., Essner, R. D., Fahrenkrug, S. C., & Hackett, P. B. (1997). The zebrafish thyroid hormone receptor alpha 1 is expressed during early embryogenesis and can function in transcriptional repression. *Differentiation*, 62 (3), 107-117.
33. Liu, Y. W., Lo, L. J., & Chan, W. K. (2000). Temporal expression and T3 induction of thyroid hormone receptors a1 and b1 during early embryonic and larval development in zebrafish, *Danio rerio*. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 159, 187e95. **http:// dx. doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00193-8.**
34. Takayama, S., Hostick, U., Haendel, M., Eisen, J., & Darimont, B. (2008). An F-domain introduced by alternative splicing regulates activity of the zebrafish thyroid hormone receptor alpha. *General Comparative Endocrinology*. 155, 176-89.
35. Liu, W. Y., & Chan, W. K. (2002). Thyroid hormones are important for embryonic to larval transitory phase in zebrafish. *Differentiation*. 70, 36-45.
36. Marelli, F., Carra, S., Agostini, M., Cotelli, F., Peeters, R., Chatterjee, K., & Persani, L. (2016). Patterns of thyroid hormone receptor expression in zebrafish and generation of a novel model of resistance to thyroid hormone action. *Molecular and Cellular Endocrinolog*. 424, 102-17.
37. Jones, I., Rogers, S. A., Kille, P., & Sweeney, G. E. (2002). Molecular cloning and expression of thyroid hormone receptor alpha during salmonid development. *General Comparative Endocrinology*. 125, 226e35.
38. Raine, J. C., Cameron, C., Vijayan, M. M., Lamarre, J., & Leatherland, J. F. (2004). The effect of elevated oocyte triiodothyronine content on development of rainbow trout embryos and expression of mRNA encoding for thyroid hormone receptors. *Journal of Fish Biology*. 65 (1), 206-226.
39. Quesada-García A., Valdehita, A., Kropf, C., Casanova-Nakayama, A., Segner, H., & Navas, J. M. (2014). Thyroid signaling in immune organs and cells of the teleost fish rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*. 38 (1), 166-74.
40. Marchand, O., Safi, R., Escriva, H., Van Rompaey, E., Prunet, P., & Laudet, V. (2001). Molecular cloning and characterization of thyroid hormone receptors in teleost fish. *Journal of Molecular Endocrinology*. 26, 51e65.
41. Manchado, M., Infante, C., Rebordinos, L., & Cañavate, J. P. (2009.) Molecular characterization, gene expression and transcriptional regulation of thyroid hormone receptors in Senegalese sole. *General Comparative Endocrinology*. 160, 139e47. **http://dx.doi.org/10. 1016/ j.ygcen.2008.11.001.**
42. Galay-Burgos, M., Power, D. M., Llewellyn, L., & Sweeney, G. E. (2008). Thyroid hormone receptor expression during metamorphosis of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Molecular and Cellular Endocrinology*. 281, 56-63.
43. Harada, M., Yoshinaga, T., Ojima, D., & Iwata, M. (2008). cDNA cloning and expression analysis of thyroid hormone receptor in the coho salmon *Oncorhynchus kisutch* during smoltification. *General Comparative Endocrinology*. 155, 658-67.
44. Kawakami, Y., Nozaki, J., Seoka, M., Kumai, H., & Ohta, H. (2008). Characterization of thyroid hormones and thyroid hormone receptors during the early development of Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *General Comparative Endocrinology*. 155, 597-606.

45. Nowell, M. A., Power, D. M., Canario, A. V., Llewellyn, L., & Sweeney, G. E. (2001). Characterization of a sea bream (*Sparus aurata*) thyroid hormone receptor-beta clone expressed during embryonic and larval development. *General Comparative Endocrinology*. 123, 80-9.
46. Kawakami, Y., Nomura, K., Ohta, H., & Tanaka, H. (2013). Characterization of thyroid hormone receptors during early development of the Japanese eel (*Anguilla japonica*). *General Comparative Endocrinology*. 194, 300-10.
47. Tang, X., Liu, X., Zhang, Y., Zhu, P., & Lin, H. (2008). Molecular cloning, tissue distribution and expression profiles of thyroid hormone receptors during embryogenesis in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *General Comparative Endocrinology*. 159, 117-24.
48. Abdollahpour, H., Falahatkar, B., Efatpanah, I., Meknatkhah, B., & Van Der Kraak, G. (2019). Hormonal and physiological changes in Sterlet sturgeon *Acipenser ruthenus* treated with thyroxine. *Aquaculture*. 507, 293-300.
49. Alinezhad, S., Abdollahpour, H., Jafari, N., & Falahatkar, B. (2020). Effects of thyroxine immersion on Sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*) embryos and larvae: Variations in thyroid hormone levels during development. *Aquaculture*. 519, 734-745.
50. Akbari, P., freidouni, M. S., & akhlaghi, M. (2015). The effect of levothyroxine sodium hormone on percentage of hatching and survival rate and the early growth stage of *Oncorhynchus mykiss* larvae. *Journal of Animal Research (Iranian Journal of Biology)*, 28 (2), 146-153. [In Persian]
51. Zimmer, A. M., Wright, P. A., & Wood, C. M. (2017). Ammonia and urea handling by early life stages of fishes. *Journal of Experimental Biology*. 220, 3843-3855.
52. Malakpour Kolbadinezhad, S., Coimbra, J., & Wilson, J. M. (2018). Osmoregulation in the Plotosidae Catfish: Role of the Salt Secreting Dendritic Organ. *Frontiers Physiology*. 9, 761.
53. Rozen, S., & Skaletsk, Y. H. (2000). "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers", in Bioinformatics Methods and Protocols, Eds. Misener S, Krawetz SA. Humana Press, Totowa New Jersey. 365-386.
54. Raine, J. C., & Leatherland, J. F. (2003). Trafficking of L-triiodothyronine between ovarian fluid and oocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology, B* 136, 267-274. **https://doi.org/10.1016/S1096-4959(03)00203-3.**
55. Raine, J. C., Takemura, A., & Leatherland, J. F. (2001). Assessment of thyroid function in adult medaka (*Oryzias latipes*) and juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using immunostaining methods. *Journal of Experimental Zoology*. 290, 366-378.
56. Wright, P. A., & Wood, C. M. (2009). A new paradigm for ammonia excretion in aquatic animals: role of Rhesus (Rh) glycoproteins. *Journal of Experimental Biology*. 212, 2303-2312.
57. Jamili, S. (2004). The final report of the project "Investigating the effect of thyroxine hormone in predisposing the sex of the female and accelerating the growth and development of the larval eggs of the rainbow trout, grass carp, silver carp and barbell of Caspian Sea. The approved number of the project is 01-0710436000-80. *Iranian Fisheries Scientific Journal - Anzali Inland Water Aquaculture Research Institute*. p39. [In Persian]
58. Moradian, F., Jamili, Sh., Bahmani, M., Toloui, M. H., & Mohammadi, G. H. (2004). The effect of thyroxine on the number of hatched eggs of phytophagous fish Hypophthalmichthys molitrix. *Iranian Fisheries Scientific Journal*. 12 (3), 172-167. [In Persian]
59. Lam, T. J., & Sharma, R. (1985). Effects of salinity and thyroxine on larval survival, growth and development in the carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*. 44, 201-212.
60. Lam, T. J., & Loy, G. L. (1985). Effect of l-thyroxine on ovarian development and gestation in the viviparous guppy,

Poecilia reticulata. *General Comparative Endocrinology*. 60 (2), 324-330.
61. Lam, T. J., Juario, J. V., & Banno, J. E. (1985). Effect of thyroxine on growth and development in post-yolk-sac larvae of milkfish, *Chanos chanos*. *Aquaculture*. 46 (3), 179-184.
62. Tagawa, M., & Hirano, T. (1987). Presence of thyroxine in eggs and changes in its content during early development of chum salmon, *Onchorhynchus keta*. *General Comparative Endocrinology*. 68, 129-135.
63. Dales, S., & Hoar, W. S. (1954). Effects of thyroxine and thiourea on the early development of chum salmon (*Onchorhynchus keta*). *Canadian Journal of Zoology*. 32, 244-251.
64. Nacario, J. F. (1983). The effect of thyroxine on the larvae and fry of *Sarotherodon niloticus* L. Tilapia nilotica. *Aquaculture*. 34, 73-83.
65. Reddy, P. K., & Lam, T. J. (1992). Effect of thyroid hormones on the morphogenesis and growth of larvae and fry of telescopic-eye black goldfish, *Carassius auratus*. *Aquaculture*. 107, 383-394.
66. Rania, O. B., El-Gamal, A. E., El-Mezayen, M. M., El-Greisy, Z. A., & Sheha, M. A. (2021). Role of exogenous thyroxin hormone on eggs, thyroid gland development and growth performance of the monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* Larvae. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*. 25 (4), 253-269.
67. Woodhead, A. D. (1966). Effects of thyoid drugs on the larvae of the brown trout, *Salmo trutta*. *Journal of. Zoology*. (Lond.), 149, 394-413.
68. Filby, A. L., & Tyler, C. R. (2007). Cloning and characterization of cDNAs for hormones and/or receptors of growth hormone, insulin-like growth factor-I, thyroid hormone, and corticosteroid and the gender-, tissue-, and developmental specific expression of their mRNA transcripts in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *General Comparative Endocrinology*. 150, 151-163.
69. Darras, V. M., Van Herck, S. L. J., Heijlen, M., & DeGroef, B. (2011). Thyroid hormone receptors in two model species for vertebrate embryonic development: chicken and zebrafish. *Journal of Thyroid Research*. 402320, 1-8.