

## روند تغییرات بافتی اندام های جنسی لای ماهی (*Tinca tinca*) در تالاب انزلی و شرایط پرورشی

اکرم تهرانی فرد<sup>۱\*</sup>، محدثه معتقدی<sup>۱</sup>

۱- گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۹/۲۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۵/۷

### چکیده

در این مطالعه، تغییرات بافتی اندام های جنسی لای ماهی (*Tinca tinca*) در تالاب انزلی و شرایط پرورشی مقایسه گردید. تعداد ۹۶ و ۳۶ ماهی از استخر پرورشی و تالاب انزلی جمع آوری شد. برای تعیین هم آوری، ماهیانی که در مرحله چهارم از رشد شش مرحله ای غدد جنسی، یعنی هم زمان با مرحله پیش از تخم ریزی بودند مورد بررسی قرار گرفتند. در مطالعه میکروسکوپی برش های تخمدان و بیضه و رشد و نمو تخمدان و بیضه آن طی مراحل مختلف جنسی، از نمونه های تالاب، از ۳ ماهی ماده تخمدان دو مورد از آنها در مرحله III-IV رسیدگی بوده و یکی از آنها در مرحله III بود (آب سردتر). همچنین، در نمونه های پرورشی، ۸ ماده مورد بررسی قرار گرفت که از این تعداد تخمدان، ۷ مورد آنها در مرحله رسیدگی بوده و یکی از آنها از مرحله III-IV بود (در شرایط آب گرم تر). در اواخر اردیبهشت که دمای آب به ۱۹ درج سانتی گراد افزایش یافت، بافت های تهیه شده از تخمدان ماهیان دارای فولیکول های بعد از تمخک گذاری (اووسیت هایی با تجمع زرده و اووسیت های باز جذب شده) بودند. در بزرگترین اووسیت دیده شده واکوئل ها نزدیک هسته رسیده بودند. بررسی بر روی ۲۴ نمونه لای ماهی ماده مرحله ۴ و ۵ که دارای وزن ۵۰/۹ تا ۲۳۸/۲ گرم و میانگین  $41/01 \pm 99/86$  گرم و طول کل ۱۴۶ تا ۲۳۳ با میانگین  $22/28 \pm 176/93$  میلیمتر بودند و سنی معادل ۳ تا ۶ با میانگین  $0/93 \pm 4/00$  سال داشتند نشان داد که هم آوری مطلق بین ۱۴۰۸۶ تا ۱۵۳۶۰۰ با میانگین  $28205/7$   $36362/4 \pm$  عدد و هم آوری نسبی بین ۱۷۰/۱ تا ۶۴۴/۸ با میانگین  $125/02 \pm 367/9$  عدد در ازای یک گرم ماهی ماده متغیر است. نتایج بدست آمده به این ترتیب است که: بیضه این ماهی از نوع لوبولار بوده و اسپرماتوزن در ماهیان هم زمان با ریخته شدن یا جذب اسپرم ها در فصل تخم ریزی آغاز می شود و بتدریج تا اواسط پاییز پیشرفت می کند، با افزایش دما، میزان تولید مثل و هم آوری ماهیان نر و ماده افزایش معنی داری نشان داد. بیشترین میانگین قطر تخمک ها در اردیبهشت ماه و کمترین در مرداد ماه مشاهده شدند. اوج رسیدگی جنسی در ماهیان ماده در ماه های اسفند و فروردین بود. تخم ریزی ماهیان از اردیبهشت شروع و تا اواخر تیر ماه ادامه داشت. اووزن و اسپرماتوزن در محیط های پرورشی زودتر از تالاب انزلی شروع میشود.

**کلمات کلیدی:** لای ماهی، تغییرات فصلی، تولید مثل، اندام های جنسی، تالاب انزلی.

## مقدمه

مطالعه زیست‌شناسی و بوم‌شناسی گونه‌های مختلف ماهیان در یک اکوسیستم آبی از ضرورت اولیه حفظ و بازسازی ذخایر آن‌ها بوده و منجر به شناخت و تحلیل اکولوژیکی زنجیره غذایی اکوسیستم می‌گردد، که این امر در اعمال مدیریت صحیح شیلاتی کاربرد فراوان دارد. با توجه به نیاز روز افزون استفاده از ماهیان در تغذیه انسان، مطالعه غدد تولیدمثلی، تعیین فصل تخم‌ریزی از طریق شاخص گنادی (GSI) و تاثیر شرایط اکولوژیکی بر زمان اسپرم ریزی، از نظر شیلاتی و اقتصادی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. تعیین دوره‌ی تخم‌ریزی و اوج تخم‌ریزی در مدیریت و بازسازی ذخایر یک گونه نقش بسیار مهمی را دارد (Siwicki et al., 2010؛ Mylonas et al., 2010). تخم‌ریزی یکی از مراحل مشخص دوره تولیدمثلی ماهیان استخوانی می‌باشد. موفقیت یا عدم موفقیت تخم‌ریزی اثر مستقیمی روی تراکم جمعیت و بقاء گونه دارد. ماهیان استخوانی دارای دوره تخم‌ریزی متفاوتی می‌باشند و زاد و ولد فصلی دارند. فصل تولید مثل ممکن است به وسیله شرایط آب و هوایی یا اثر متقابل بین گونه‌ای باشد. لای ماهی با نام علمی *Tinca tinca* (Linnaeus, 1758) و نام انگلیسی *tench* تنها گونه جنس *Tinca* است. لای ماهی در حد وسیعی در اروپا، بغیر از قسمت‌های شمالی پراکنش دارد. همچنین این ماهی در خاور نزدیک و غرب سیریری یافت می‌شود (Kujawa et al., 2011). لای ماهی یک ماهی eurytherm بوده و قادر به زیست در دامنه حرارتی وسیعی می‌باشد، اما مناسب‌ترین دما برای آن ۲۰ درجه سانتیگراد یا بالاتر می‌باشد و درجه حرارت مناسب آب برای تخم‌ریزی ۲۰-۱۹ درجه سانتی‌گراد می‌باشد.

مناسب‌ترین pH برای لای ماهی ۷/۵-۸ می‌باشد، اما این ماهی حتی قادر است در pH های اسیدی ۴-۳/۵ نیز تا مدتی زنده بماند. از نظر اکسیژنی بسیار کم توقع بوده و نسبت به کاهش اکسیژن در زمان حمل و نقل و استخرهای نگهداری مقاوم می‌باشد، اما این ماهی در استخرهایی که آب آن تخلیه شده و دمای آن زیاد است نمی‌تواند زنده بماند (Owen et al., 2010). که انواع جوان و بالغ این ماهی عمدتاً به تغذیه از موجودات کفزی می‌پردازند یا به عبارتی کفزی خواری (benthivorous) هستند. آزمایش میکروسکوپی و بافت‌شناسی دوره‌ای بیضه و تخمدان حداقل طی یکسال، به شناخت و آگاهی از تولید و تخلیه اندام‌های جنسی در سرتاسر چرخه‌ی بلوغ جنسی کمک می‌نماید (Nowosad et al., 2013). رشد تخمدان‌ها و بیضه‌ها نیز اغلب با یکدیگر یکسان نبوده و رشد بیضه‌ای به مراتب کمتر از تخمدان می‌باشد. سن بلوغ در لای ماهی با توجه به خصوصیات اقلیمی زیستگاه متفاوت می‌باشد. برای مثال لای ماهی در مصب رود ولگا در ۳ سالگی بالغ می‌شود و حدوداً ۴۰-۳۰ درصد از لای ماهیان این منطقه در این گروه سنی بالغ می‌شوند و در رده سنی ۵-۴ سال حدوداً ۶۰٪ بالغ می‌شوند (Siwicki et al., 2010؛ Alas et al., 2010). Horoszewicz (2010). در سال ۱۹۸۳، بر روی ریتم تولید مثلی لای ماهی در نوسانات دما بررسی‌هایی را انجام داد که نتایج زیر حاصل گردید: درصد ماهی‌های ماده شرکت‌کننده در تخمک‌گذاری بستگی به الگوی تغییرات دمایی در طول زمان دارد. تنوع ریتم تولید مثلی در فصولی که نوسانات دما بیشتر است بالاتر می‌باشد. طبق بررسی‌های Benzer در سال ۲۰۱۱، میزان همآوری مطلق لای ماهی بین ۱۴۰۸۶ تا ۱۵۳۶۰۰ متغیر بوده و

### زیست سنجی

تعداد ۹۹ عدد ماهی از استخرهای پرورشی (۶۸ عدد ماده و ۳۱ عدد نر) با میانگین سنی ۲ تا ۴ سال همچنین ۳۰ عدد دیگر از تالاب انزلی (۲۳ عدد ماده و ۷ عدد نر) با میانگین ۳ تا ۴ سال عدد دیگر از تالاب انزلی جمع آوری شدند. به منظور بررسی ریخت سنجی با توجه به منابع علمی ماهی شناسی، نمونه ها از نظر ویژگی های مورفومتریک مورد بررسی قرار گرفتند. پس از انجام بیومتری برای تعیین جنسیت، ماهی را تشریح و وزن گناد (G.W) را با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه گیری شده است. گنادها در محلول بوئن به منظور فیکس شدن به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند تا جهت مراحل بعدی عمل آوری بافت آماده شوند. گنادها از ۳ قسمت فوقانی، میانی و تحتانی بریده شده و در محلول بوئن فیکس شدند. برای تهیه اسلایدهای بافتی باید نمونه های بافتی را پس از فیکس کردن از مراحل آبگیری، شفاف سازی پارافینه، قالب گیری، برش، رنگ آمیزی و مونته عبور داد. مرحله آبگیری از بافت عبارت است از گرفتن آب از بافت و جایگزینی الکل به جای آب در این مرحله از الکل های ۵۰، ۷۰، ۸۰، ۹۶ درجه و الکل ۱- بوتانل استفاده گردید. سپس مرحله شفاف سازی انجام شد. این مرحله عبارت از جایگزینی کلروفرم یا بنزن و یا گزلیل به جای الکل و جذب چربی بافت است. پس از آن پارافینه کردن بافت انجام شد که برای نرم شدن نمونه ها مخلوط کلروفرم و پارافین خالص نرم بکار رفت. در این مرحله نمونه بافت در مخلوط کلروفرم و پارافین خالص نرم به نسبت یک به یک در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفته و سپس نمونه بافت در پارافین خالص نرم و تمیز در انکوباتور ۵۶ درجه سانتیگراد در دو مرحله و

میزان همآوری نسبی نیز بین ۱۷۰/۱ تا ۶۴۴/۸ بوده که با افزایش سن میزان هم آوری مطلق افزایش و هم آوری نسبی کاهش یافته است.

در ایران این ماهیان معمولا در سن ۲-۳ سالگی به بلوغ می رسند به نحوی که حتی در تالاب انزلی در اردیبهشت ماه ماهیان مولد رسیده به طول ۱۴-۱۳ سانتی متر و به سن بالای ۲ نیز مشاهده شده است. در ماهی ها عوامل زیست محیطی و اکولوژیکی نقش مهمی در تعیین جنسیت دارند و تعاملی که بین ژن ها و عوامل محیطی موثر مثل درجه حرارت، شوری، pH، O<sub>2</sub> و موقعیت های اجتماعی وجود دارد، می تواند به عنوان عامل تعیین کننده جنسیت شناخته شود (Elia et al., 2010). اهمیت همکاری های بین ژنتیک و محیط، سال هاست که در علوم کشاورزی و باغبانی شناخته شده است. تمام متغیرها محیطی مربوط به پرورش ماهی، می توانند از طریق همکاری با ژنوم ماهی، در تولید تاثیر داشته باشند.

### مواد و روش ها

#### زمان و مکان منطقه نمونه برداری

نمونه برداری لای ماهی از ایستگاه تحقیقات شیلات سفیدرود آستانه اشرفیه و نیز تالاب انزلی به صورت ماهیانه بمدت یکسال از بهمن ماه سال ۱۳۹۶ تا دی ماه سال ۱۳۹۷ صورت گرفت. ذخایر لای ماهی در تالاب انزلی بسیار ناچیز می باشد، بنابراین تهیه این ماهی خصوصا در فصل سرد سال به دلیل زمستان خوابی این ماهی بسیار دشوار است. به همین دلیل نمونه برداری از تالاب انزلی، قسمت مرکزی تالاب (سرخال کول) بوده، که فقط در ماه های تولید مثلی (اواخر اسفند تا اوایل تیر) صورت گرفت.

هر مرحله به مدت یک ساعت انجام شد. در مرحله قالب گیری، نمونه بافت ها در داخل قالب های ویژه قرار گرفته و با استفاده از پارافین مذاب پوشانده شدند. پس از سرد شدن قالب های پارافینی حاوی نمونه، بافت جهت تهیه برش های بافتی آماده شد. در این مرحله پارافین های حاوی نمونه بافت از قالب های کاغذی جدا و با استفاده از اسکالپل تا حد امکان پارافین های اضافه از اطراف نمونه ها بریده و در نهایت قالب های پارافینی حاوی نمونه بافت روی پایک های چوبی سوار شدند. مشخصات مربوط به هر نمونه بافت روی پایک ها یادداشت گردید. پس از آن از نمونه ها برش تهیه شد. در این مرحله نیز اطلاعات مربوط به هر نمونه بافت توسط برچسب روی لام ها یادداشت گردید. این لام های حاوی اسلایدهای برش داده شده، به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند تا خشک شوند. از هر نمونه بافتی ۵ لام جهت بررسی میکروسکوپی تهیه گردید. از روش هماتوکسیلین ائوزین برای رنگ آمیزی استفاده شد. مراحل تهیه بافت بر اساس پروتکل استاندارد از کتاب Fish pathology انجام شده است (Genten, 2009).

### زیست شناسی تولیدمثل

در بررسی تولیدمثل موارد زیر مورد بررسی قرار گرفت:

تعیین نسبت جنسی نر به ماده (Richer, 1975).

از تقسیم تعداد ماهیان نر در هر گروه سنی به تعداد ماهیان ماده در هر گروه سنی بدست آمد.

شاخص گنادوسوماتیک یا شاخص بلوغ جنسی (G.S.I) روش غیر مستقیمی برای تخمین فصل تخم ریزی ماهی است. برای تعیین وضعیت تکامل غدد

جنسی و میزان شاخص بلوغ جنسی معادله  $GSI = WG/WT \times 100$  به کار گرفته شد (Biswas, 1993)؛ (Bagenal, 1978):

که در آن،  $GSI$  = شاخص گنادوسوماتیک،  $WG$  = وزن گناد به گرم،  $WT$  = وزن بدن به گرم، تعیین هم آوری مطلق می باشد (Schiel, 1994).

برای تعیین هم آوری، ماهیانی که در مرحله چهارم از رشد شش مرحله ای غدد جنسی، یعنی هم زمان با مرحله پیش از تخم ریزی بودند مورد بررسی قرار گرفتند. برای تعیین هم آوری، مقداری زیر نمونه از تخمک های موجود در بخش های ابتدایی، میانی و انتهایی تخمدان جدا شده، برای استحکام بخشیدن و ثبات تخمک ها در فرمالین ۴٪ قرار داده شد (آذری تاکامی، ۱۳۵۸). تخمک های موجود در زیر نمونه به دقت شمارش و به وزن کل تخمدان تعمیم داده شد. هم آوری مطلق از روش وزنی و معادله زیر بدست آمد:

وزن کامل تخم ها  $\times$  تعداد تخم ها در یک گرم = هم آوری مطلق

پس از محاسبه هم آوری مطلق، به منظور تعیین هم آوری نسبی از معادله زیر استفاده شد:

هم آوری نسبی = تعداد کل تخمک / وزن بدن

### نتایج

#### نتایج بافت شناسی

#### مراحل رشد تخمدانی (اووژنز) بر مبنای

#### مطالعات میکروسکوپی

مراحل اووژنز به طور کلی به دسته های زیر تقسیم می شود (شکل ۱ و جدول ۱):

مرحله پیش از زرده سازی - مرحله زرده سازی - مرحله رهاسازی تخمک - پسروی تخمدان و استراحت. مرحله پیش از زرده سازی شامل مراحل V, IV, III, II, I می باشد. در این مطالعه این مراحل مشاهده شدند. تغییرات مشاهده شده در تخمدان های ماهی از فروردین شروع شد. از نظر بافت شناسی تخمدان ها در مرحله III رسیدگی بودند.

در ۲۳ اردیبهشت ۱۳۹۳، ۳ ماهی ماده گرفته شد. تخمدان دو مورد از آن ها در مرحله III-IV رسیدگی بوده و یکی از آن ها در مرحله III بود (آب سردتر). در ۲۳ اردیبهشت ۱۳۹۳، ۸ ماده گرفته شد که از این تعداد تخمدان ۷ مورد آن ها در مرحله رسیدگی بوده و یکی از آن ها از مرحله III-IV بود (در شرایط آب گرم تر).

### STAGE III

اووسیت ها در این ۷ تخمدان دارای ۴-۵ ردیف واکوئل بودند و در بعضی اووسیت ها واکوئل ها به نزدیک هسته رسیده بودند.

### STAGE III-V

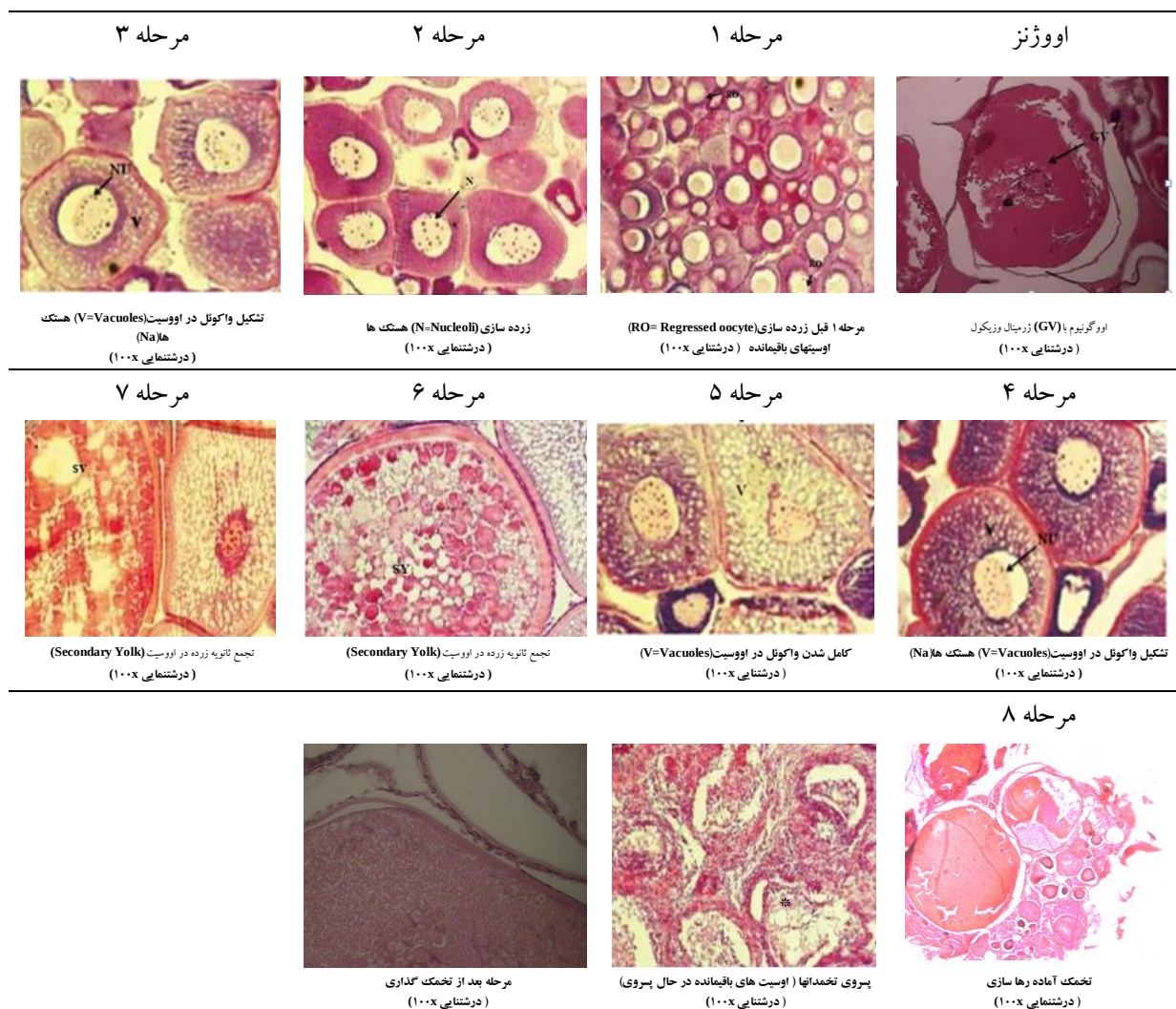
تخمدان در مرحله III-IV رسیدگی دارای اووسیت هایی در فاز اولیه از تجمع زرده به همراه ۳-۴ ردیف واکوئل در اطراف سلول بودند.

در اواخر اردیبهشت که دمای آب به ۱۹ درج سانتی گراد افزایش یافت، بافت های تهیه شده از تخمدان ماهیان دارای فولیکول های بعد از تمخک - گذاری (اووسیت هایی با تجمع زرده و اووسیت های باز جذب شده) بودند. در بزرگترین اووسیت دیده شده واکوئل ها نزدیک هسته رسیده بودند. تخمدان این در مرحله VI و IV بودند تصور می شود که برخی از تخمک ها خارج شده باشند. تخمدان یک ماهی ماده در

مرحله V و IV بود بسیاری از سلول ها پر از زرده بودند و به سمت Circumference حرکت کرده بود. در خرداد ۹۳ نمونه ها دو بار گرفته شدند یک بار ۷ خرداد و بار دوم ۲۲ خرداد ماه نمونه های اول زمانی گرفته شدند که دمای آب سبب القای تخم ریزی در ماهی شده بود. در نمونه های ماده تخمدان ها در مرحله V و IV بودند.

تخمدان ها محتوای اووسیت های فراوانی پر از زرده بودند. هسته این سلول ها به سمت میکروپیل حرکت کرده بود. ۲ تا از ماده های گرفته شده در حال تخم - ریزی بودند. تخمدان این نمونه ها محتوای تعداد زیادی اووسیت پر از زرده به همراه تشکیل میکروپیل و مهاجرت هسته بود. همچنین در این نمونه ها فولیکول - های خالی مشاهده شدند. تخمدان در این ماده در مرحله VI و V و IV بود. نمونه گیری بعدی در اواخر خرداد ماه بود که تخمدان بیشتر آن ها در مرحله VI و IV بودند، اما بعضی نمونه ها دارای تخمدانی در مرحله IV و III هم دیده شدند.

در نمونه های تیر ماه تخمدان ها محتوای اووسیت - های atretic در مراحل V و VI بود. تخمدان های همه در مرحله تخم ریزی بودند اووسیت های فراوان و کاملاً پر از زرده بوده و محتوای میکروپیل مشاهده شده. همچنین فولیکول های کوچک قابل توجه هستند. در مرداد ماه تخمدان از اووسیت خالی شده و آن هایی که باقیمانده اند در حال بازجذب می باشند (شکل ۱) تخم ریزی کامل شده است. در شهریور ماه ۷ ماده گرفته شد تخمدان آنها در مرحله پسروی بوده (بعد از تخم ریزی). در فصل پاییز و زمستان از محیط تالاب به دلیل زمستان خوابی لای ماهی صید این ماهی امکان پذیر نبود.



شکل ۱: مراحل مختلف رشد تخمدانی لای ماهی بر اساس رسیدگی اووژنز (گروه پرورشی)

اندازه تخمدان متوسط بوده و  $\frac{1}{4}$  و  $\frac{3}{4}$  حفره بدن را اشغال می کند. اوویست ها قابل رؤیت یوده و با چشم غیر مسلح دیده نمی شود و یا به سختی دیده می شود. عروق فراوان در سطح تخمدان وجود دارد. مقداری ذرات زرده ای در آنها دیده می شود.

#### مرحله در حال بلوغ (رسیده ۳)

تخمدان های بزرگ  $\frac{3}{4}$  حفره بدن را پر می کنند. همراه آن ها مویرگ های خونی زیادی دیده می شوند.

#### مراحل رشد تخمدانی اووژنز بر مبنای مطالعات ماکروسکوپی

مراحل رشد تخمدانی اووژنز بر مبنای مطالعات ماکروسکوپی در جدول ۱ نشان داده شده است.

#### مرحله نابالغ

تخمدان کوچک و بدون اوویست های قابل مشاهده بوده، دیواره تخمدان نازک است. تخمک ها با چشم غیر مسلح دیده نمی شوند.

#### مرحله رسیده ۲ (استراحت)

رنگ تخمدان ها زرد/ نارنجی بوده و اوویست هایی به اندازه ۰/۵ میلی متر با چشم دیده می شود و دارای ذرات زرده ای فراوان هستند.

تخمدان ارغوانی رنگ و خیلی شل و چروک شده و گاهی دارای تعداد کمی اوویست های مات می باشد (اوویست با چشم دیده می شود و بزرگ و زردرنگ می باشند).

### مرحله کاملاً رسیده

اوویست ها نیم شفاف (مات) که ممکن است جریان داشته یا نداشته باشد. اوویست های آب دار شده و شفاف هستند و با چشم به خوبی دیده می شوند.

تخمدان ارغوانی رنگ و چروک شده و دیواره تخمدان ضخیم شده و مویرگ های خونی بزرگ شده -

### مرحله تخلیه

اند. اوویست های مرحله پیشرفته در تخمدان دیده نمی - شوند.

### مرحله بی رمق

جدول ۱: ویژگی های ماکروسکپی و میکروسکپی تخمدان های لای ماهی در مراحل مختلف رسیدگی

| مرحله رسیدگی                        | احتمال تشخیص درست براساس ویژگی های ماکروسکپی | صفات ماکروسکپی                                                                                                                                                             | صفات میکروسکپی                                                                                                                  |
|-------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| نارس ۱ (immature)                   | زیاد                                         | تخمدان کوچک و بدون اوویست های قابل مشاهده بوده، دیواره تخمدان نازک است.                                                                                                    | همه اوویست ها در مرحله پیش زرده (previtelogenic) یعنی در مراحل اولیه رشد هستند.                                                 |
| رسیده ۲                             | کم (با مراحل ۵ و ۶ اشتباه می شوند)           | اندازه تخمدان متوسط بوده ۱ و ۳ حفره بدن را اشغال می کند. اوویست ها قابل رویت بوده و با چشم انسان مشاهده نمی شوند (۰/۲-۰/۵ mm)                                              | فرآیند رسیدگی شروع شده و اوویست های پیشرفته در مراحل اولیه و تیلوژنیز یا زرده سازی هستند.                                       |
| رسیده ۳                             | زیاد                                         | تخمدانهای بزرگ ۳ حفره بدن را پر می کنند. همراه آنها مویرگهای خونی زیادی دیده می شوند. رنگ تخمدانها زرد/نارنجی بوده و اوویست هایی به اندازه ۰/۵ مترمتر با چشم دیده می شوند. | اوویست ها در پیشرفته ترین مرحله در داخل تخمدان دیده می شوند و تخمدان در مراحل زرده سازی است.                                    |
| تخمیزی                              | زیاد                                         | اوویست ها نیم شفاف (مات) که ممکن است جریان داشته یا نداشته باشد. اوویست های آب دار شده بزرگتر از اوویست های مات هستند.                                                     | تخمیزی قریب الوقوع بوده که اوویست ها در مرحله مهاجرت هستند و آگیری هستند.                                                       |
| استراحت ۵                           | کم (با مرحله ۲ و ۶ اشتباه می شوند)           | تخمدان ارغوانی رنگ و خیلی شل و چروک شده و گاهی دارای تعداد کمی اوویست های مات می باشد (اوویست ها با چشم دیده می شوند و بزرگ و زرد رنگ می باشند).                           | بعضی تخمک ها رها شده اند و فولیکول های بعد از تخمیزی مشاهده می شوند.                                                            |
| بی رمق (نیروی خود را از دست داده) ۶ | کم (با مرحله ۵ و ۲ اشتباه می شود)            | تخمدان ارغوانی رنگ و بسیار شل و چروک شده است. دیواره تخمدان ضخیم شده و مویرگهای خونی بزرگ شده اند. اوویست های مرحله پیشرفته در تخمدان دیده نمی شوند.                       | آخرین رسته تخمک ها رها شده اند. اووگونیا و هسته دارای شبکه کروماتین در اوویست دیده می شود. اوویست های باقیمانده بازجذب می شوند. |

## مراحل رشد بیضه (اسپرما توژنز) بر مبنای مطالعات میکروسکوپی

تغییرات بافتی بیضه در طی چرخه تولید مثلی لای- ماهی در شکل ۲ و جدول ۲ نشان داده شده است. سلول‌های زایا در گناد نابالغ و در حال استراحت، اسپرما توژنیا (SG) می‌باشند. این سلول‌ها در طول اسپرما توژنریس در بافت بیضه وجود دارند و در لوله‌های سمنی فر (اسپرم ساز) بر روی غشاء پایه قرار گرفته‌اند. در بین آن‌ها سلول‌های سرتولی مشاهده می‌شوند.

قبل از مرحله رسیدگی جنسی، سلول‌های اسپرما توژنیا (SG<sub>A</sub>) شروع به تقسیم شدن می‌کنند. ابتدا تقسیم ناکاملی انجام داده بدین ترتیب که مرحله سیتوکنیزیر انجام نشده و در نتیجه سلول‌ها تقسیم یک پل سیتوپلاسمی به هم متصلند (GG<sub>B</sub>).

در حین رسیدگی گناد، تعداد بیشتری اسپرما توژنیا نوع B بوجود آمده و زمانی که تقسیم میوز (با کاهش کروموزومی) شروع می‌گردد تبدیل به اسپرما توژسیت اولیه (SC<sub>1</sub>) می‌شوند. با شروع مرحله دوم تقسیم میوزی که خیلی سریع اتفاق می‌افتد، اسپرما توژسیت ثانویه (SC<sub>2</sub>) بوجود می‌آید چون این مرحله خیلی با سرعت انجام می‌شود می‌توان دلیل ایجاد اسپرما توژسیت ثانویه به تعداد زیاد را بیان نمود.

بعد از تقسیم میوز، داخل لومن لوله‌ها، اسپرماتیدها مشاهده می‌شوند سپس با کامل شدن اسپرژنریس، سلول‌ها به اسپرما توژوآ (SZ) تبدیل شده و داخل لومن لوله‌های اسپرم ساز پر از اسپرم می‌شوند. هنگامی که تعداد اسپرما توژوآها زیاد شد به سمت لوله‌های خروجی حرکت می‌کند. در طی تخم‌ریزی (spawning) اسپرما توژوآهای رسیده رها می‌شوند. تا

شروع سیکل بعدی اسپرما توژنریس، لوبول‌ها چروکیده شده و دیواره لوله‌ها ضخیم‌تر می‌شوند. اسپرما توژوآهایی که بعد از تخم‌ریزی در بیضه باقی بمانند توسط سول‌های سرتولی فاگوسیت می‌شوند. هنگامی که لوله‌های اسپرم ساز از وجود اسپرما توژوآها پاک می‌شوند، واکوئل‌های سلول‌های سرتولی از نظر اندازه افزایش پیدا می‌کنند. در بافت همبند بین لوله‌ها، رگهای خونی و سلول‌های لیگ دیده می‌شوند.

Stage 1: اکثر لوله‌های سمنی فروس (اسپرم ساز) پر از اسپرما توژسیت بودند.

Stage 2: تعداد زیادی کیست در محیط لوله‌های اسپرم ساز دیده می‌شوند که پر از اسپرما توژسیت II و اسپرما توژید هستند. اسپرما توژوگنیاها و اسپرما توژسیت‌های اولیه کمتر از stage 1 بودند.

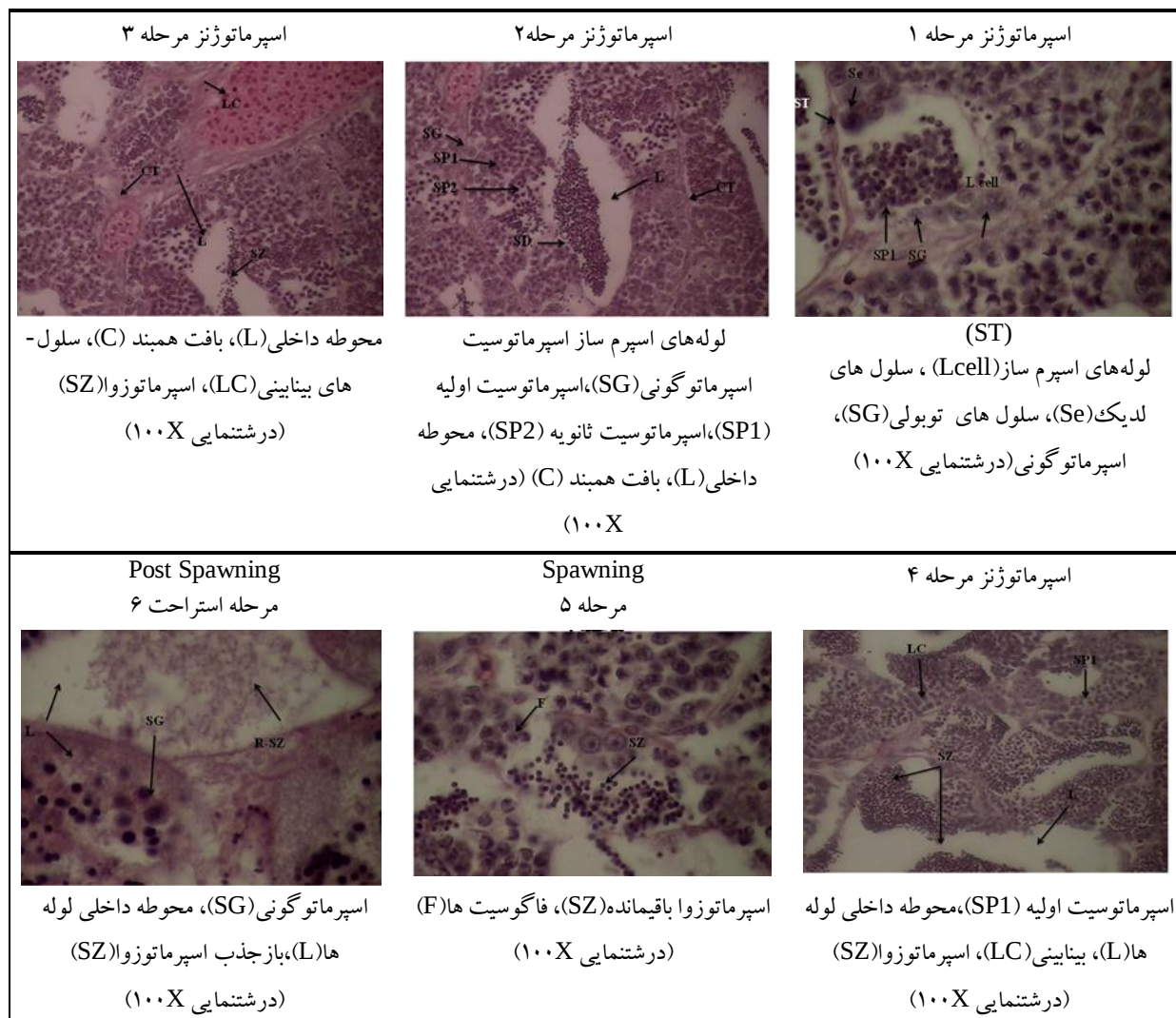
Stage 3: اسپرما توژوآها سلول‌های غالب در لوله‌های اسپرم ساز هستند (شکل) تعداد زیادی سلول‌های بینابینی دیده می‌شوند.

Stage 4: اسپرما توژوآها فراوان بوده، اسپرما توژسیت‌های اولیه در محیط لوله‌های اسپرم ساز مشاهده می‌شوند. سلول‌های بینابینی نمو خوبی یافته‌اند.

Spawning تخم‌ریزی یا رهاسازی اسپرم

Stage 5: اسپرما توژوآها رهاسازی شده اند و لوله‌های اسپرم ساز کاملاً یا در بعضی موارد بخشی از آنها تخلیه شده‌است. اسپرما توژوآها در مرکز (لومن) لوله‌ها هنوز دیده می‌شوند (تعداد کمی) بافت بین لوله‌ها وسیع تر شده نسبت به مرحله ۴ و فاگوسیت‌ها فراوانند.

Stage 6: بیضه‌ها در مرحله خاموشی یا استراحت هستند. لوله‌های اسپرم ساز دارای تعداد زیادی اسپرما توژوگنیا (SG) می‌شوند.



شکل ۲: تغییرات بافتی بیضه لای ماهی در طی چرخه تولید مثلی

جدول ۲: مراحل رشد بیضه لای ماهی بر مبنای مطالعات میکروسکوپی

| مرحله                                | مشخصات                                                                                                                                                             |
|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| نابلغ (Immature Phase)               | در این مرحله گناد غیر فعال و نابالغ است. بیضه ها کوچک و باریک و ظاهری شفاف دارند.                                                                                  |
| در حال بالغ شدن (Maturing Virgin)    | در این مرحله بر ضخامت بیضه تا حدودی افزوده شده و در حال سفید رنگ شدن می باشند.                                                                                     |
| در تکامل حال (Developing male)       | در این مرحله بیضه سفید رنگ و در مقایسه با قبل پهن تر، ضخیم تر و نرم تر است.                                                                                        |
| تکامل یافته یا بالغ (Developed male) | در این مرحله بیضه نرم و لطیف و پهن تر شده است و در مقایسه با مرحله قبل فضای بیشتری در محوطه شکمی به خود اختصاص میدهد. شیر اسپرم با فشار از محوطه شکمی خارج می شود. |
| کاملا رسیده (Ripe male)              | در این مرحله بیضه تقریباً تمام محوطه شکمی را پر می کند و اسپرم با یک فشار آرام بر محوطه شکمی خارج می شود.                                                          |
| اسپرم ریزی کرده (Spent male)         | بیضه ها در این مرحله قرمز رنگ و بافت آنها سست می باشد.                                                                                                             |

افزایش سن میزان هم‌آوری نسبی به طور نامنظم تغییر می‌نماید به طوریکه در ماهیان ۶ ساله  $۴۵۷/ \pm ۱۶۲/۵$  محاسبه گردیده است.

### بحث

در این تحقیق روند تکامل تخمدان و بیضه لای- ماهی در تالاب انزلی، منطقه سرخانکل و استخر پرورش واقع در شیلات سفیدرود آستانه اشرفیه با استفاد از مطالعات بافت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفت. در لای ماهی ماده هشت مرحله تکامل تخمک را می‌توان مشاهده نمود. این تشریح مراحل تکامل تخمک مطابق با آنچه بود که در برخی مطالعات پیشین نیز بیان شده بود.

مطالعات گسترده‌ای درباره تغییر ساختار بافتی و مورفولوژی تخمدان در ماهیان استخوانی طی روند اوورژنر توسط محققین مختلفی انجام شده است که این تحقیقات نشان می‌دهد که ماهیان استخوانی از دو نوع تخم‌ریزی برخوردار می‌باشند (Oropesa et al., 2015) ؛ Pula et al., 2018). نوع اول در بیشتر ماهیان دیده می‌شود مانند قزل‌آلا و ماهیان آزاد که نوع تخم‌ریزی آنها همزمان (synchronous) می‌باشند، بدین معنی که تخمک‌های رسیده در یک زمان از تخمدان خارج می‌شوند، درحالی که در ماهیانی مانند لای ماهی از نوع (Asynchronous) می‌باشد. روند تخمک‌زایی بر طبق اندازه و محتویات تخمک‌ها به مراحل مختلف تقسیم می‌شود. تقسیم بندی مراحل تکامل تخمک‌ها فقط جهت تسهیل مطالعه است. برای مثال تکامل تخمک‌ها در قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به هشت مرحله، در سوزن ماهی (*Syngnathus scovelli*) و ماهی لجنی (*Labeo capensis*) به پنج مرحله، در

بیشترین میانگین قطر تخمک‌ها در اردیبهشت ماه و کمترین در مرداد ماه مشاهده شدند. افزایش تدریجی قطر تخمک‌ها از مرداد شروع شده تا فصل تخم‌ریزی بعدی که به حداکثر می‌رسند. در بررسی روند رسیدگی جنسی در دو جنس نر و ماده لای ماهی، اوج رسیدگی جنسی در ماهیان ماده در ماه‌های اسفند و فروردین رخ می‌دهد، بنابراین تخم‌ریزی از اردیبهشت شروع و تا اواخر تیر ماه ادامه می‌یابد.

### هم‌آوری مطلق و نسبی

بررسی بر روی ۲۴ نمونه لای ماهی ماده مرحله ۴ و ۵ که دارای وزن ۵۰/۹ تا ۲۳۸/۲ گرم و میانگین  $۹۹/۸۶ \pm ۴۱/۰۱$  گرم و طول کل ۱۴۶ تا ۲۳۳ با میانگین  $۲۲/۲۸ \pm ۱۷۶/۹۳$  میلی تر بودند و سنی معادل ۳ تا ۶ با میانگین  $۰/۹۳ \pm ۴/۰۰$  سال داشتند. هم‌آوری مطلق بین ۱۴۰۸۶ تا ۱۵۳۶۰۰ با میانگین  $۲۸۲۰۵/۷ \pm ۳۶۳۶۲/۴$  عدد و هم‌آوری نسبی بین ۱۷۰/۱ تا ۶۴۴/۸ با میانگین  $۳۶۷/۹ \pm ۱۲۵/۰۲$  عدد در ازای یک گرم ماهی ماده متغیر بود. با افزایش سن بر میزان هم‌آوری مطلق افزوده می‌شود، به طوریکه در ماهیان ۳ ساله (تعداد=۷) میانگین هم‌آوری مطلق  $۹۷۴۸/۵ \pm ۲۳۷۴۵/۴$  عدد، در ماهیان ۴ ساله ها (تعداد=۱۳) میانگین هم‌آوری مطلق  $۳۱۳۸۱/۸ \pm ۱۲۳۲۰/۳$  عدد، در ماهیان ۵ ساله ها (تعداد=۱) میانگین هم‌آوری مطلق  $۳۵۶۷۲/۷ \pm ۰/۰$  عدد و در ماهیان ۶ ساله‌ها (تعداد=۳) میانگین هم‌آوری مطلق  $۸۷۶۱۴/۹ \pm ۵۷۳۹۵/۸$  عدد می‌باشد. بین وزن بدن و هم‌آوری مطلق همبستگی بالایی وجود داشته ( $r=۰/۷۴$ ) و معادله خطی برقرار است. همچنین بین هم‌آوری مطلق و طول کل بدن نیز میزان همبستگی بالا بوده ( $r=۰/۵۱$ ) و معادله خطی پردازش گردید. با

آلای قهوه‌ای به موازات شروع کاهش طول روز، آغاز می‌گردد. دما تأثیر محدودتری بر گامتوزن آزادماهیان دارد. دوره‌های نوری نسبت به دما در زمان‌بندی دوره های تولید مثل در ماهیان دریای آبهای سرد نقش بیشتری دارد (Overturf et al., 2015؛ Zeilinger et al., 2009).

در ماهیان آب‌های گرم نظیر کپورماهیان، دما عامل تأثیرگذارتر می‌باشد، اگرچه دوره‌های نوری نیز در تنظیم گامتوزن نقش دارد. لای ماهی هم مانند کپور ماهیان دیگر همزمان با افزایش دمای آب، تخم‌ریزی می‌نماید. چند هفته پس از تخم‌ریزی، در حالی که دما همچنان رو به افزایش است، دوره جدید گامتوزن آغاز می‌گردد. تخمک‌ها مراحل زرده زایی را به سرعت طی می‌نمایند. در این زمان، دمای آب کاهش می‌یابد و تکامل تخمک‌ها تا بهار سال بعد متوقف می‌گردد. با افزایش مصنوعی دمای آب می‌توان دوره تخم‌ریزی کپورماهیان را طولانی‌تر نمود (Avlijas et al., 2017؛ Rojo et al., 2016). ماهی کفال‌خاکستری از ماهیان دریایی است که در زمستان تخم‌ریزی می‌نماید و گامتوزن در آن توسط کاهش طول روز و دمای آب القاء می‌گردد. بنابراین اگر این ماهی در معرض روزهای کوتاه و دمای پایین قرار گیرند، می‌توان تخم‌ریزی را القا نمود. تخم‌ریزی تحت تأثیر شرایط محیطی می‌باشد، این عوامل تخم‌ریزی ماهیانی که در شرایط پرورشی رشد می‌یابند را القا می‌نماید. در برخی از ماهیان که در تابستان تخم‌ریزی می‌نمایند مانند ماهی کپور معمولی آب گرم جهت تخم‌ریزی مورد نیاز است که از این نظر شباهت زیادی با لای ماهی دارد زیرا این ماهی نیز با گرم شدن آب شروع به تخم‌ریزی می‌کند. افزایش دمای آب برای برخی از گونه‌های ماهیان

هیبرید تاس ماهی (بستر) به پنج مرحله و در کفال قرمز (*Mullus surmuletus*) به شش مرحله تقسیم شده است. که این تحقیقات نشان می‌دهد که لای ماهی نیز در تکامل تخمک‌ها همانند قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) بوده و از هشت مرحله تبعیت می‌کند (Schreck et al., 1998؛ Dolomatov, 2012؛ Arcand and al., 2001).

خصوصیات محیطی مکان‌های تخم‌ریزی باعث القاء بلوغ نهایی تخمک‌ها، اوولاسیون و تخم‌ریزی می‌شود. ترکیب فصل مطلوب و محیط مطلوب تخم‌ریزی، احتمالاً باعث ایجاد بهترین شرایط جهت بقای لاروها و بچه ماهیان می‌شود. کنترل محیطی گامتوزن هم بر اثرات بلند مدت جهت تکمیل گامتوزن و هم اثرات سریع بر مراحل اسپرمیشن، اوولاسیون و تخم‌ریزی می‌شود. پرورش ماهی در شرایط مصنوعی آن‌ها را از دستیابی به شرایط مطلوب جهت تولید مثل محروم می‌کند. این دلیل اصلی عدم انجام اوولاسیون و تخم‌ریزی در مولدین ماده‌ای که در شرایط پرورش نگهداری می‌شود، می‌باشد. به وسیله دستکاری محیط مولدین، می‌توان هم‌زمان تخم‌ریزی را تنظیم نمود و هم می‌توان در تمام طول سال تولید تخم و اوولاسیون و تخم‌ریزی را القا نمود. در مناطق معتدله، مهمترین عامل محیطی تأثیرگذار در تولید مثل طول روز و دما می‌باشد (Brion et al., 2004؛ Mylonas et al., 2010).

زمان‌بندی محیط دوره تولیدمثل ماهی در سال‌های اخیر مورد توجه محققین قرار گرفته‌است. بیشترین ماهیان مورد مطالعه، آزادماهیان و کپورماهیان بوده‌اند. دوره‌نوری، مهمترین محرک محیطی است که زمان‌بندی تولید مثل در آزاد ماهیان را تعیین می‌کند. رشد توده‌ای اووسیت در قزل‌آلای رنگین‌کمان و قزل-

بخصوص در کپورماهیان جهت القا تخم‌ریزی در شرایط پرورشی مورد استفاده قرار گرفته‌است. فصل تخم‌ریزی لای‌ماهی از اردیبهشت شروع شده و تا اواخر تیر پایان می‌پذیرد. این ماهی در شرایط طبیعی فقط یک‌بار در سال تخم‌ریزی می‌کند. درحالی که در ماهی کفال خاکستری تخم‌ریزی از مرداد تا مهرماه می‌باشد. در پژوهش حاضر، نیز فصل تخم‌ریزی لای‌ماهی از اردیبهشت تا اوایل مرداد تخمین زده شده‌است. میزان هم‌آوری مطلق با افزایش سن قابل توجهی افزایش می‌یابد. به سبب وجود این افزایش است که شاخص گونادوسوماتیک در ماهیان ماده نیز با افزایش سن اضافه می‌شود هر چه سن ماهی بالاتر می‌رود، تخم‌ها بزرگتر، چسبان‌تر و سنگین‌تر شده و در عوض تعداد آن‌ها در یک گرم کاهش می‌یابد. ماهیان هر چه به زمان تخم‌ریزی نزدیک‌تر می‌شوند مراحل سوم و چهارم رسیدگی جنسی در آن‌ها افزایش یافته و بالعکس از طرفی هر چه از زمان تخم‌ریزی فاصله می‌گیرند مراحل اول و دوم بیشتر مشاهده می‌گردد. سن رسیدگی جنسی در لای‌ماهی در ماده ۳ سالگی و در نرها ۳-۴ سالگی بوده است که با نتایج Benzer در سال ۲۰۱۱ تطبیق دارد. و همچنین نسبت جنسی نر به ماده تقریباً ۱: ۱ نمی‌باشد (Pimpicka, 1990). که این نسبت با اطلاعات بدست آمده در این تحقیق همخوانی می‌کند. میانگین شاخص گونادوسوماتیک ماهانه از  $0.06 \pm 38$  را در ماه مهر تا  $0.03 \pm 8$  در ماه اردیبهشت تغییر می‌کند. میانگین تعداد تخمک‌ها در لای‌ماهی تخمین زده شده و بین  $17047 \pm 23403$  می‌باشد (Benzer et al., 2007). به طور کلی، وزن ماهی‌ها و سایر جانوران تحت تاثیر طول بدن افزایش می‌یابد. پس می‌توان گفت که در یک گونه طول و رشد با هم نسبت دارند. سن

بلوغ جنسی در لای‌ماهی در دریاچه Mogan برای ماده ها ۳ سالگی و برای نرها ۳-۴ سالگی تخمین زده شد و همچنین در دریاچه Porsuk سن بلوغ جنسی در لای-ماهی در ماده‌ها ۳ سالگی تعیین شد (Yilmaz, 2002). دوره تخم‌ریزی در Kapurukaya بین اواخر فروردین تا اوایل خرداد ماه تعیین شد (Yilmaz, 2002). از سوی دیگر این دوره در دریاچه Mogan و Porsuk به ترتیب در ماه‌های فروردین تا تیر و تیر تا شهریور تعیین شد (Benzer et al., 2011) و همین‌طور این دوره در Kayabogazi در ماه‌های خرداد- تیر تخمین زده شد و نیز بیان شد که دوره تخم‌ریزی لای‌ماهی در دریاچه pamvotida در یونان در ماه‌های اردیبهشت تا خرداد می‌باشد. در پژوهش کنونی نیز دوره تخم‌ریزی از ماه اردیبهشت شروع شده و تا اواخر تیر ماه ادامه دارد. زمان این دوره تخم‌ریزی در لای‌ماهی در محیط پرورشی به دلیل دمای بالاتر آب زودتر اتفاق افتاده و از فروردین ماه شروع می‌شود. طبق بررسی‌ها بر روی ریتم تولیدمثلی لای‌ماهی در نوسانات دما، درصد ماهی‌های ماده شرکت‌کننده در تخم‌ریزی بستگی به الگوی تغییرات دمایی در طول روز داشته و تنوع ریتم تولید-مثلی در فصولی که نوسانات دما بیشتر است بالاتر می‌باشد، و نیز در تحقیق کنونی هم وابستگی شدید دما و زمان تخم‌ریزی دیده شد که با افزایش دما، زمان تخم‌ریزی فرا رسید و بهترین دما برای آن ۲۰-۱۹ درج سانتی‌گراد تخمین زده شد.

با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان گفت که بیضه این ماهی از نوع لوبولار بوده و اسپرماتوزن در ماهیان همزمان با ریخته شدن یا جذب اسپرم‌ها در فصل تخم‌ریزی آغاز می‌شود و بتدریج تا اواسط پاییز پیشرفت می‌کند، با افزایش دما، میزان تولید مثل و هم-

5. Bagenal, T., 1978. Methods for assessment of fish production in fresh waters. IBP Handbook No. 3: Blackwell Science Publication.
6. Benzer, S. Ş., Ali, G. Ü. L., & Yilmaz, M. (2007). Breeding properties of *Tinca tinca* (L., 1758) living in Hirfanlı dam lake (Kırşehir, Turkey). *Su Ürünleri Dergisi*, 24(1), 127-129.
7. Benzer, S., Gül, A., Yılmaz, M., 2010. Growth properties of tench (*Tinca tinca* L., 1758) living in Kapulukaya Dam Lake, Turkey. *University of Kastamonu Education Journal*, 18(3), 839-848.
8. Benzer, S., Gül, A., Yılmaz, M., 2011. Breeding properties of *Tinca tinca* (L., 1758) living in Kapulukaya Reservoir (Kırıkkale, Turkey). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 10(3), 375-882.
9. Biswas, S., 1993. Manual of methods in fish biology: South Asian Publishers, p.157.
10. Brion, F., Tyler, C. R., Palazzi, X., Laillet, B., Porcher, J. M., Garric, J., & Flammarion, P. (2004). Impacts of 17 $\beta$ -estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile-and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic toxicology*, 68(3), 193-217.
11. Dolomatov, S. I., Zukow, W., Novikov, N. Y., Muszkiet, R., Bulatowicz, I., Dzierzanowski, M., ... & Strojek, K. (2012). The regulation of osmotic and ionic balance in fish reproduction and in the early stages of ontogeny. *Russian Journal of Marine Biology*, 38(5), 365-374.
12. Elia, A.C., Dörr, A.J.M., Abete, M.C., Prearo M., 2010. Seasonal variability of detoxificant response and heavy metal accumulation in tissues of both sexes in *Tinca tinca* (L.) from Lake Trasimeno. *Reviews in fish biology and fisheries*, 20(3), 425-534.
13. FEIST, S. W., 2009. Atlas of fish histology-Edited by F. Genten, E. Terwinghe and A. Danguy. *Journal of Fish Biology*, 75(3), 757-758.

آوری ماهیان نر و ماده افزایش معنی داری نشان داد. بیشترین میانگین قطر تخمک ها در اردیبهشت و کمترین در مرداد مشاهده شدند. اوج رسیدگی جنسی در ماهیان ماده در ماه های اسفند و فروردین بود. تخم ریزی ماهیان از اردیبهشت شروع و تا اواخر تیر ماه ادامه داشت. اووزنر و اسپرماتوزنر در محیط های پرورشی زودتر از تالاب انزلی شروع میشود.

### سپاسگزاری

از پژوهشگر گرامی شهریار تقی پورکوه بجهت پیشبرد اهداف علمی این پژوهش کمال تشکر و قدردانی را داریم.

### منابع

۱. آذری تاکامی، ق.، محمد، ا.، نقوی، م.، ۱۳۸۵. بررسی امکان ایجاد جنس تمام نر در ماهی گویی *Poecilia reticulata* توسط هورمون ۱۷-آلفا متیل تستوسترون. مجله علوم آب و خاک (علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی)، ۱۰(۲)، ۲۷۹ - ۲۸۷.
2. Alaş A., Altındağ A., Yılmaz M., Kırpık MA., Ak. A., 2010. Feeding Habits of Tench (*Tinca tinca* L., 1758) in Beyşehir Lake (Turkey). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 10(2), 187-194.
3. Arcand-Hoy, L.D., Benson, W.H., 1998. Fish reproduction: an ecologically relevant indicator of endocrine disruption. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 17(1), 49-57.
4. Avlijaš, S., Ricciardi, A., Mandrak, N.E., 2017. Eurasian tench (*Tinca tinca*): the next Great Lakes invader. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 75(2), 169-179.

22. Pula, H.J., Trenzado, C.E., García-Mesa, S., Fallola, C., Sanz, A., 2018. Effects of different culture systems on growth, immune status, and other physiological parameters of tench (*Tinca tinca*). *Aquaculture*, 485, 101-110.
23. Richer, G., Desrochers, M., Guevin, R., Turgeon, F., Viallet, A., 1975. Hepatitis B antigen in Montréal blood donors: childhood institutionalization as an epidemiologic factor. *Canadian Medical Association Journal*, 112(1), 49.
24. Rojo-Bartolomé, I., de Cerio, O.D., Diez, G., Cancio, I., 2016. Identification of sex and female's reproductive stage in commercial fish species through the quantification of Ribosomal Transcripts in gonads. *PloS one*, 11(2), e0149711.
25. Schiel, D., 1994. Kelp communities. *Marine Biology* (Eds LS Hammond and RN Synnot), 345-361.
26. Schreck, C.B., Contreras-Sanchez W., Fitzpatrick M.S., 2001. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Reproductive Biotechnology in Finfish Aquaculture: Elsevier*, 3-24.
27. Siwicki, A.K., Zakęś, Z., Terech-Majewska, E., Kazuń K., Lepa A., Głabski E., 2010. Dietary Macrogard reduces *Aeromonas hydrophila* mortality in tench (*Tinca tinca*) through the activation of cellular and humoral defence mechanisms. *Reviews in fish biology and fisheries*, 20(3), 435-9.
28. Yilmaz, F., 2002. Reproductive biology of the tench *Tinca tinca* (L., 1758) inhabiting Porsuk Dam lake (Kutahya, Turkey). *Fisheries Research*, 55(1-3), 313-317.
29. Zeilinger, J., Steger-Hartmann, T., Maser, E., Goller, S., Vonk, R., Länge, R., 2009. Effects of synthetic gestagens on fish reproduction. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(12), 2663-2670.
14. Horoszewicz, L., 1983. Reproductive rhythm in tench, *Tinca tinca*, in fluctuating, temperatures. *Aquaculture*, 32(-2), 79-92.
15. Kujawa, R., Kucharczyk, D., Mamcarz, A., Żarski, D., Targońska, K., 2011. Artificial spawning of common tench *Tinca tinca* (Linnaeus, 1758), obtained from wild and domestic stocks. *Aquaculture International*, 19(3), 513-521.
16. Mylonas, C.C., Fostier, A., Zanuy, S. 2010., Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 516-534.
17. Nowosad, J., Żarski, D., Biłas, M., Dryl, K., Krejszeff, S., Kucharczyk, D. 2013. Dynamics of ammonia excretion in juvenile common tench, *Tinca tinca* (L.), during intensive rearing under controlled conditions. *Aquaculture International*, 21(3), 629-637.
18. Oropesa, A., Martín-Hidalgo, D., Fallola, C., Gil, M., 2015. Effects of exposure to 17-alpha-ethynylestradiol on sperm quality of tench (*Tinca tinca*). *Ecotoxicology and environmental safety*, 120, 318-325.
19. Overturf, M.D., Anderson, J.C., Pandelides, Z., Beyger, L., Holdway, D.A. 2015. Pharmaceuticals and personal care products: A critical review of the impacts on fish reproduction. *Critical reviews in toxicology*, 45(6), 469-491.
20. Owen, M.A., Davies, S.J., Sloman, K.A. 2010. Light colour influences the behaviour and stress physiology of captive tench (*Tinca tinca*). *Reviews in fish biology and fisheries*, 20(3), 375-380.
21. Pimpicka, E. (1990). Formation of fecundity of tench, *Tinca tinca* (L.) females in Lake Drwęckie. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 20(2), 129-141.