"مقاله پژوهشی"

تکثیر خارج از فصل مولدین ماهی کلمه (*Rutilus caspicus*) با استفاده از دما و دوره‌ی نوری

مامی خلیلی[۱]، محمدرضا ایمان‌پور[۱]، وحید تقی‌زاده[۱]، ناصر کرمی‌راد[۲]، زهرا روحی[۱*]

۱- گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۲- سازمان شیلات ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۵/۱۹

چکیده

این مطالعه به منظور القای تکثیر خارج از فصل در مولدین ماهی کلمه با استفاده از دوره‌ی نوری، دما و هورمون‌تراپی انجام شد. ماهیان به دو گروه شامل گروه شاهد (تحت شرایط طبیعی آزمایشگاه) و گروه تیمار (تحت شرایط کنترل شده دما و دوره‌ی نوری) تقسیم شدند. در گروه تیمار، دمای آب از ۸ درجه سانتی‌گراد به ۱۵ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و طول دوره‌ی نوری در ۱۲ ساعت روشنایی: ۱۲ ساعت تاریکی حفظ شد. ماهیان به مدت ۲ هفته در این شرایط نگهداری شدند. به منظور القاء تخم‌ریزی، به همه‌ی گروه‌ها اوواپریم تزریق شد. در گروه شاهد تخم‌ریزی صورت نگرفت. نتایج نشان داد که در گروه تیمار، شاخص گنادوسوماتیک افزیش معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). علاوه‌براین، غلظت تستوسترون و ۱۷ آلفا هیدروکسی پروژسترون در ماهیان تیمارشده در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). بیش‌ترین سطح هورمون ۱۷ بتا استرادیول (E2) در گروه تیمار ثبت‌شد؛ با این‌حال، غلظت E2 در بین گروه‌ها اختلاف معنی‌داری نداشت ($p>۰/۰۵$). این نتایج نشان می‌دهد که دوره‌ی نوری و دمای آب می‌تواند به‌طور موفقیت آمیزی جهت القاء تکثیر خارج از فصل در ماهی کلمه استفاده شود.

کلمات کلیدی: ماهی کلمه، تکثیر خارج از فصل، هورمون‌های استروئیدی، دما، دوره‌ی نوری.

* عهده‌دار مکاتبات: roohi26_iut@yahoo.com

مقدمه

ماهی کلمه (*Rutilus caspicus*) یکی از گونه‌های ارزشمند اقتصادی در دریای خزر می‌باشد که نقش مهمی در تغذیه فیل ماهی ایفا می‌کند (Verma *et al.*, 2009). متأسفانه در سال‌های اخیر به دلیل صید بی‌رویه، آلودگی آب‌ها و تخریب محل‌های تولید مثل، نسل آن کاهش‌یافته و حتی جزء گونه‌های در معرض خطر انقراض قرار گرفته است (کشیری و همکاران، ۱۳۸۸). از این‌رو، سازمان شیلات ایران با توجه به اهمیت این ماهی اقدام به تکثیر مصنوعی و بازسازی ذخایر آن کرده است (Keyvanshokooh *et al.*, 2007).

تحقیقات نشان می‌دهد که با استفاده از دستکاری پارامترهای محیطی و هورمون‌تراپی می‌توان ماهیان را به تخم‌ریزی خارج از فصل تولید مثلی وادار نمود (Davies and Bromage, 2002; Targonska *et al.*, 2010). بنابراین، علاوه‌بر تکثیر در فصل تولید مثل، با استفاده از تکثیر خارج از فصل می‌توان فرایند تولید گامت را در مولدین تحت کنترل درآورد و منبع پایداری از ماهیان را در هر زمان از سال تولید کرد (Mylonas and Zohar, 2001). در بین پارامترهای محیطی، عموماً دما و دوره‌ی نوری به عنوان مهم‌ترین فاکتور محیطی کنترل کننده تولید گامت و تخم‌ریزی ماهیان در نظر گرفته می‌شود (Migaud *et al.*, 2002). این عوامل از طریق عمل هورمون‌های استروئیدی بر تکامل گناد اثر می‌گذارند (نقیبی و همکاران، ۱۳۹۲). در واقع تولید هورمون‌های جنسی استروئیدی به همراه هورمون‌های گنادوتروپین مترشحه از هیپوفیز جزء عوامل نهایی غدد مترشحه داخلی درگیر در فعالیت تولیدمثل می‌باشند (Devlin and Nagahama, 2002; Patiño *et al.*, 2002). هورمون پروژسترون، تستوسترون و استرادیول از جمله مهم‌ترین هورمون‌های استروئیدی هستند که رشد و رسیدگی گناد را در مراحل مختلف تحت کنترل دارند (Butts *et al.*, 2010). علاوه‌براین، هورمون‌های استروئیدی جنسی با اعمال واکنش‌های پس خور مثبت و منفی بر محور مغز-هیپوفیز جهت تنظیم رهاسازی هورمون‌های گنادوتروپین می‌روند. بنابراین، سطوح هورمون‌های استروئیدی در خون می‌تواند به عنوان ابزاری کارامد در جهت درک کنترل آندوکرینی گامتوژنز به‌کار گرفته شود (Bjerselius *et al.*, 2001).

مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد که عواملی مانند دما، دوره‌ی نوری، شوری، تزریق هورمون، سن مولدین، کیفیت آب و نیز فصل تکثیر می‌تواند بر کیفیت گامت‌ها تأثیرگذار باشد (Rurangwa *et al.*, 2004). در صنعت آبزی‌پروری توجه به کیفیت تخم و یا لارو نسبت به اسپرم در اولویت می‌باشد، اگر چه کیفیت هر دو گامت بر موفقیت لقاح و بقای لارو تأثیر می‌گذارد، اما کیفیت اسپرم، فاکتوری کلیدی در تولید مثل و لقاح موفق محسوب می‌شود (نقیبی و همکاران، ۱۳۹۲). به‌طوری که کیفیت اسپرم را می‌توان به‌عنوان توانایی آن برای لقاح موفق یک تخم و متعاقباً تکامل جنین سالم تعریف کرد (Bobe and Labbe, 2010). بنابراین، جهت به‌دست آوردن لاروهای با کیفیت، دسترسی به گامت‌های با کیفیت ضروری است و کیفیت اسپرم یکی از فاکتورهای با اهمیت در خصوص کسب لقاح مصنوعی با کارایی بالا می‌باشد. مهم‌ترین پارامترهایی که برای ارزیابی کیفیت اسپرم مورد استفاده قرار می‌گیرند عبارتند از درصد اسپرم‌های متحرک، طول دوره‌ی تحرک، تراکم اسپرم و اسپرماتوکریت (محمدیان و همکاران، ۱۳۹۳).

با توجه به اهمیت ماهی کلمه، تا کنونی مطالعه‌ای در زمینه تکثیر خارج از فصل این صورت نگرفته است. بنابراین هدف از این پژوهش القاء تکثیر خارج از فصل و اثرات آن بر پارامترهای کیفی اسپرم، هورمون‌های استروئیدی جنسی و موفقیت لقاح در این گونه می‌باشد. بدیهی است که نتایج به دست آمده به مدیریت تولید و تکثیر این ماهی با ارزش کمک شایان توجهی می‌کند.

مواد و روش‌ها

طراحی آزمایش

این پژوهش در پاییز ۱۳۹۴ در سالن آبزی‌پروری شهید فضلی‌برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی مولد کلمه با وزن تقریبی ۵۰ تا ۶۰ گرم از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان استخوانی سیجوال در استان گلستان تهیه و به مدت دو هفته سازگاری انجام شد. ماهیان در تانک‌های فایبرگلاس (۲۰۰۰ لیتر) تا شروع آزمایش نگهداری شدند. در طول دوره‌ی نگهداری، دمای آب ۱± ۱۷ درجه سانتی‌گراد، pH آب ۰/۶±۷/۵۲ و در شرایط ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی بود. ماهیان به میزان ۳ درصد وزن بدن با غذای تجاری (انرژی) با ۴۲٪ پروتئین تغذیه شدند.

به منظور انجام آزمایش، ۳۰ قطعه از مولدین (به عنوان گروه شاهد) در دما و نور طبیعی داخل سالن ونیرو نگهداری شدند (متوسط دمای ۱۸-۱۶ درجه سانتی‌گراد و ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی). از سوی دیگر، جهت انجام عملیات تکثیر خارج از فصل، ۹۰ قطعه مولد (به عنوان گروه تیمار) به شکل کاملاً تصادفی به صورت گروه‌های ۱۰ تایی در آکواریوم‌های ۶۵ لیتری مجهز به سیستم تنظیم‌کننده نوری و دمایی، قرار داده گرفتند. در ابتدا یک کمون سرمایی ۸ درجه سانتی‌گراد با استفاده از کاهش دمایی به صورت مرحله‌ای و به میزان حداکثر ۲ درجه سانتی‌گراد در روز اعمال گردید. همزمان با کاهش دما، نور نیز با دامنه ۹ ساعت روشنایی و ۱۵ ساعت تاریکی با استفاده از کاهش تدریجی ۱۵ دقیقه در روز، تنظیم گردید. ماهیان به مدت ۱۰ روز در شرایط ذکرشده نگهداری شدند. پس از پایان دوره کمون سرمایی، به منظور تحریک اوولاسیون، درجه حرارت آب با استفاده از افزایش تدریجی به میزان حداکثر ۲ درجه سانتی‌گراد در روز، به حدود ۱۵درجه سانتی‌گراد افزایش داده شد. همزمان با افزایش درجه حرارت، دوره نوری نیز با استفاده از افزایش تدریجی ۱۵ دقیقه در روز، به دامنه ۱۲ساعت تاریکی و ۱۲ساعت روشنایی تغییر داده شد (شکل ۱). ماهیان به مدت ۲ هفته در شرایط ذکرشده نگهداری شدند. تنظیم دوره نوری و درجه حرارت به ترتیب توسط لامپ‌های فلورسنت ۲۰ واتی متصل به یک زمان سنج دیجیتالی و یخچال مجهز به سیستم گرمایی (هیتر)، صورت گرفت.

جهت اطمینان از رسیدگی کامل مولدین، اوایل صبح هر روز مولدین تحت بررسی قرار گرفتند. پس از حصول اطمینان از رسیدگی کامل (با مشاهده علائم خارجی رسیدگی جنسی)، مولدین با استفاده از هورمون اوواپریم[2] (٪۸۰ هورمون GnRH و ۲۰٪ ماده آنتی دوپامین) به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و مولدین نر به میزان ۰/۳ میلی‌لیتر به ازای کیلوگرم وزن بدن در یک مرحله تزریق شدند و ۲۴ ساعت پس از تزریق تخم‌کشی و اسپرم‌کشی به‌صورت دستی در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت.

[2] Ovaprim (Syndel Laboratories, India)

نمونه‌برداری

ماهیان ابتدا جهت خون‌گیری با پودر گل میخک (۱۵۰ ppm) بیهوش شدند. سپس سطح بدن ماهیان کاملاً با استفاده از یک پارچه تمیز خشک گردید. طول کل با استفاده از تخته بیومتری و وزن ماهیان و گنادها توسط ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد. پس از وزن کردن ماهیان نر و ماده، خون‌گیری از ماهیان از رگ ساقه دمی صورت گرفت. نمونه‌های خون، یک ساعت پس از لخته شدن با استفاده از سانتریفوژ (۱۰ دقیقه با ۴۵۰۰ دور در دقیقه) گلبول‌های قرمز خون ترسیب و بدین ترتیب سرم از خون قابل تفکیک شد. سپس سرم به ویال‌هایی که مشخصات مربوطه به ماهی و مرحله آزمایش توسط برچسب روی آن نصب شده انتقال داده شد و ویال یاد شده توسط پارافیلم و درب پلاستیکی بسته و در دمای زیر انجماد (۲۱- درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند تا به آزمایشگاه انتقال یابد (Spano *et al.*, 2004). پس از اتمام خون‌گیری، تعدادی از ماهیان کشته شدند و سپس وزن ماهی، وزن گناد و طول کل هم اندازه‌گیری شد. شاخص گنادوسوماتیک به صورت درصد و با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

شاخص گنادوسوماتیک (درصد) = (وزن گناد ÷ وزن بدن) ×۱۰۰

اندازه‌گیری پارامترهای فیزیکی اسپرم

به منظور سنجش مدت زمان تحرک، اسپرم با محلول فعال‌کننده (آب مقطر) به نسبت ۱:۲۰۰۰ رقیق شد و بلافاصله (با تأخیر زمانی کمتر از ۷ ثانیه) بعد از شروع فعالیت اسپرم تا زمانی که ۱۰۰٪ اسپرم‌ها غیرمتحرک شدند، توسط میکروسکوپ فازکنتراست (Leica-Gallen-III, CCD-Gp240, Japan) ثبت شد (Turner and Montgomerie, 2002). برای اندازه‌گیری اسپرماتوکریت، لوله‌های میکروهماتوکریت حاوی نمونه‌های اسپرم در دور ۳۰۰۰ به مدت ۸ دقیقه سانتریفیوژ شدند، سپس با استفاده از هماتوکریت خوان، درصد اسپرم به پلاسمای سمینال اندازه‌گیری شد (Butts *et al.*, 2010). تراکم اسپرم با روش استاندارد هموسیتومتری اندازه‌گیری شد (Alavi *et al.*, 2006). حجم اسپرم با استفاده از سرنگ انسولین و بر حسب میلی‌لیتر محاسبه شد (Tiersch, 2001).

تعیین درصد لقاح و درصد تفریخ

تخمک‌های حاصله از ۴ قطعه مولد ماده با اسپرم ۳ قطعه مولد نر مخلوط گردید و لقاح به روش خشک صورت گرفت. به منظور رفع چسبندگی تخمک‌ها از محلول لقاح کاربامید (۰/۴ درصد اوره به همراه ۰/۵ درصد کلرید سدیم) استفاده گردید. در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد، حدود ۱۳۲ ساعت پس از اتمام لقاح، فرایند تفریخ مشاهده گردید. جهت تعیین درصد تفریخ، در حدود ۵۰۰ عدد تخمک در داخل تشت مجهز به سیستم هوادهی قرار داده شد و پس از پایان دوره انکوباسیون، تخمک‌های مرده جمع‌آوری گردید و درصد لقاح و درصد تفریخ از فرمول زیر محاسبه گردید.

(تعداد کل تخمک‌ها / تعداد تخمک‌های لقاح یافته) ×۱۰۰= درصد لقاح

(تعداد کل تخمک‌های لقاح یافته / تعداد لاروهای تفریخ شده) ×۱۰۰= درصد تفریخ

سنجش هورمون‌های جنسی

هورمون تستوسترون (در مولدین نر)، ۱۷-بتا استرادیول (E2) و هورمون ۱۷-آلفا هیدروکسی پروژسترون (در مولدین ماده) با دستگاه کمی-لومینسانس زیمنس درآزمایشگاه هورمون شناسی پیمان- ترکمن اندازه گیری شد (Guzman *et al.*, 2008).

تجزیه و تحلیل آماری

شیوه نمونه‌برداری به صورت تصادفی و در قالب طرح کاملاً تصادفی بود. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون t-test با سطح اطمینان ۹۵ درصد تعیین گردید. برای عملیات آماری از نرم‌افزار SPSS ۲۰ استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است.

نتایج

نتایج مربوط با پارامترهای فیزیکی اسپرم (جدول ۱) نشان می‌دهد که در بین مولدین کلمه‌ای که تحت تأثیر تکثیر خارج از فصل قرار گرفتند با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($p<۰/۰۵$)، به‌طوری که در مولدین کلمه‌ای که تحت تکثیر خارج ازفصل قرار گرفتند (گروه تیمار)، اسپرمیشن مشاهده گردید، با این‌حال در مولدینی (گروه شاهد) که دوره کمون را ندیدند، مرحله اسپرمیشن و اوولاسیون صورت نگرفت.

طبق شکل ۱، شاخص گنادوسوماتیک در مولدینی که تحت تأثیر تکثیر خارج از فصل قرار گرفتند با مولدین گروه شاهد اختلاف معنی داری داشت ($p<۰/۰۵$). بیشترین مقدار شاخص گنادوسوماتیک در مولدینی (تیمار) که دوره کمون سرمایی را دیده‌اند ثبت شد.

سطوح هورمون‌های تستوسترون و ۱۷-آلفا هیدروکسی پروژسترون در مولدین ماهی کلمه که تحت تأثیر تکثیر خارج از فصل قرار گرفتند در مقایسه با مولدین گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$) و بیشترین مقادیر در گروه تیمار ثبت شد (جدول ۲). با این‌حال، مقدار هورمون ۱۷ بتا استرادیول در بین مولدین گروه تیمار با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت ($p>۰/۰۵$).

درصد لقاح و درصد تفریخ در بین مولدینی که تحت تأثیر تکثیر خارج از فصل قرار گرفتند با مولدین گروه شاهد اختلاف معنی‌دار داشت ($p<۰/۰۵$)، به گونه‌ای که در مولدین کلمه‌ای که تحت تأثیر تکثیر خارج از فصل قرار گرفتند، اسپرم و تخمک از مولدین استحصال و لقاح داده شد، که در نتیجه منجر به تولید لارو شد (جدول ۳).

جدول ۱: پارامترهای فیزیکی اسپرم مولدین نر ماهی کلمه در تکثیر خارج از فصل و گروه شاهد

متغیر	طول دوره تحریک (ثانیه)	حجم اسپرم (میلی‌لیتر)	اسپرماتوکریت (درصد)	ترکم اسپرم ($\times۱۰^{۹}$)
شاهد	۰[b]	۰[b]	۰[b]	۰[b]
تیمار	۲۹/۰±۷۵/۱[a]	۰/۰±۳۵/۱۳[a]	۷۵/۴±۷۵/۳۵[a]	۵/۰±۲۵/۹۶[a]

حروف انگلیسی غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌داری در سطح $p<۰/۰۵$

جدول ۲: سطح هورمون‌های استروئیدی مولدین ماهی کلمه تحت تأثیر تکثیر خارج از فصل و گروه شاهد

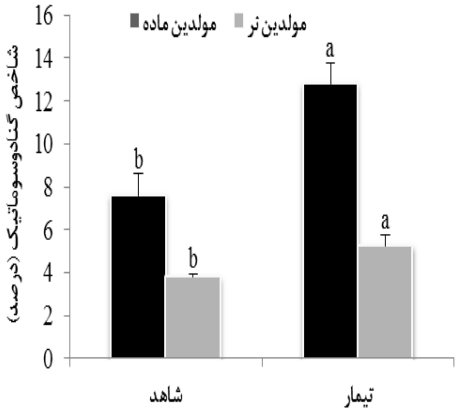
متغیر (نانوگرم بر میلی‌لیتر)	تستوسترون	پروژسترون	استرادیول
شاهد	۰/۰±۲۲/۰۲^{b}	۰/۰±۱۲/۰۲^{b}	۰/۰±۰۵/۰^{a}
تیمار	۰/۰±۶۴/۰۵^{a}	۰/۰±۴/۰۴^{a}	۰/۰±۰۷/۰۴^{a}

حروف انگلیسی غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌داری در سطح $p<۰/۰۵$

جدول ۳: مقایسه میانگین (±انحراف معیار) موفقیت لقاح مولدین در تیمارهای مختلف

متغیر	درصد لقاح	درصد تفریخ
شاهد	۰^{b}	۰^{b}
تیمار	۵±۸۰/۷۱^{a}	۵±۷۲/۵۹^{a}

حروف انگلیسی غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌داری در سطح $p<۰/۰۵$



شکل ۱: شاخص گنادوسوماتیک مولدین ماهی کلمه در تیمارهای مختلف

بحث

درجه حرارت و طورل دوره‌ی نوری دو عامل مهم زیست محیطی در کنترل روند بلوغ جنسی ماهیان هستند (Davies and Bromage, 2002). با این‌حال، اثر نوع پارامترهای محیطی در بین گونه‌های مختلف بسیار متفاوت است. به طوری‌که در اکثر آزادماهیان اثر تغییرات دوره نوری بر تولیدمثل از اهمیت بیشتری برخوردار می‌باشد، در صورتی که در کپورماهیان درجه حرارت تأثیر بسیار مهمی نسبت به دوره نوری دارد (Bromage *et al.*, 2001). نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که در تکثیر خارج از فصل، تزریق هورمون به تنهایی برای بلوغ نهایی گامت و اوولاسیون کافی نیست و دستکاری شرایط محیطی (دوره‌ی نوری و دما) اثر بسیار مهمی بر چرخه تولید مثلی ماهی کلمه دارد. در این راستا Wang و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که کاهش هر دو فاکتور دما و طول دوره‌ی نوری سبب تحریک مولدین کپور ماهیان به تولید مثل گردید. علاوه‌براین، احمدی‌فر و همکاران (۱۳۹۵) گزارش کردند که دستکاری‌هایی دمایی و نوری همراه با تزریق هورمون سبب تکثیر خارج از فصل در ماهی قرمز[3] می‌گردد. مطالعات نشان می‌دهد که دوره‌ی کمون سرمایی یک مرحله بسیار مهم در تکامل گامت ماهیان است (Migaud *et al.*, 2002). ایجاد یک دوره سرما باعث انجام فرآیند زرده‌سازی می‌شود و در نهایت افزایش درجه حرارت جهت همزمان‌سازی مراحل پایانی فرآیند بلوغ صورت می‌گیرد. بنابراین، کنترل‌های زیست محیطی در تولید مثل ماهیان، رویکردی قابل توجه برای توسعه آینده صنعت آبزی‌پروری می‌باشد (Wang *et al.*, 2010).

شاخص گنادوسوماتیک یکی از علائم بلوغ گامت می‌باشد که می‌تواند به‌عنوان فاکتور مهمی در تعیین رسیدگی جنسی ماهیان استفاده شود (Ziari *et al.*, 2015). در این مطالعه شاخص گنادوسوماتیک در ماهیان تیمار به نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. افزایش شاخص گنادوسوماتیک به افزایش مقدار E2 و سطوح ویتلوژنین در جنس ماده و افزایش

[3] Carassius auratus

تستوسترون در جنس نر مربوط می‌شود (Migaud *et al.*, 2002). Melamed و همکاران (۲۰۰۰) ارتباط مثبت و معنی‌داری بین شاخص گنادوسوماتیک و سطح هورمون تستوسترون و مراحل اسپرماتوژنیک در ماهیان نر تیلاپیای هیبرید (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) گزارش کردند. به‌طور کلی، تکامل گناد در همه مراحل تحت تأثیر هورمون‌های استروئیدی جنسی قرار دارد (Qu *et al.*, 2010).

استروئیدهای جنسی بر فرآیندهای فیزیولوژیک مهم در مهره‌داران تأثیر می‌گذارند و به‌طور گسترده با چرخه تولید مثلی در ارتباط می‌باشند (Mehdinejad *et al.*, 2013). ویتلوژنین با هورمون ۱۷-بتا استرادیول تنظیم می‌شود. بنابراین افزایش مقدار این هورمون در ماهیان ماده در طول بلوغ و تکامل گناد بر شروع فرآیند ویتلوژنز دلالت می‌کند (پور اسماعیلیان و همکاران، ۱۳۹۵). در این مطالعه، افزایش ناچیزی مقادیر E2 در گروه تیمار نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید. به‌طور کلی در مراحل اولیه تکامل اووسیت‌ها، غلظت E2 پایین می‌باشد ولی مقادیر این هورمون در مرحله زرده‌سازی اووسیت‌ها، افزایش‌یافته و سپس با آغاز مرحله‌ی رسیدگی اووسیت‌ها، مقدار این هورمون کاهش می‌یابد (آخوندیان و همکاران، ۱۳۹۴). لذا عدم تفاوت معنی‌داری مقادیر هورمون E2 در گروه تکثیر یافته با گروه شاهد را می‌توان به پایان دوره زرده‌سازی و آغاز مرحله رسیدگی نهایی گامت‌های این گروه نسبت داد. بعد از مرحله زرده‌سازی، توانایی لایه‌های فولیکولی برای تولید E2 کاهش می‌یابد. در این مرحله، توانایی سلول‌های تکا در پاسخ به افزایش گنادوتروپین برای تولید تستوسترون افزایش‌یافته و با آغاز مرحله‌ی رسیدگی اووسیت‌ها، تولید ۱۷ آلفا هیدروکسی پروژسترون توسط سلول‌های لایه تکا افزایش می‌یابد (آخوندیان و همکاران، ۱۳۹۴). در این مطالعه، سطوح هورمون ۱۷آلفا هیدروکسی پروژسترون در ماهیان تکثیر شده در مقایسه با ماهیان شاهد افزایش معنی‌داری داشت. روند مشابهی از نوسانات این دو هورمون در ماهی کلمه تالاب انزلی توسط Naddafi و همکاران (۲۰۰۵) و نیز ماهی کلمه خزری توسط آخوندیان و همکاران (۱۳۹۴) گزارش شده است. هورمون‌های پروژسترونی در تحریک بلوغ نهایی و اوولاسیون در جنس ماده نقش مهمی بر عهده دارد (Paulos *et al.*, 2010).

سطوح هورمون تستوسترون در سرم خون ماهیان، با توجه به فصل و مراحل رسیدگی جنسی، متفاوت است (Orlando *et al.*, 2003). افزایش سطح تستوسترون در ماهیان نر با تأثیر بر سلول‌های لایدیک موجب تولید اسپرماتید و اسپرماتوزوآ می‌شود (Mylonas and Zohar, 2001) و با نزدیک شدن به مرحله اسپرم‌ریزی فعال، میزان تستوسترون افزایش می‌یابد (پور اسماعیلیان و همکاران، ۱۳۹۴). براساس نتایج بدست آمده میزان هورمون تستوسترون در مولدین تکثیر یافته بیشتر از ماهیان شاهد بود. در تطابق با نتایج پژوهش حاضر، Bagheri و همکاران (۲۰۰۸) دریافتند که با پیشرفت مراحل رسیدگی جنسی مقادیر تستوسترون و پروژسترون افزایش می‌یابد. علاوه‌براین، بهمنی و همکاران (۱۳۹۱)، ثابت کردند که هورمون پروژسترون و تستوسترون ماهیان نر و ماده در مرحله نهایی رسیدگی جنسی، همزمان با تکامل گناد در گونه تاسماهی شیپ افزایش یافته و به بالاترین حد خود می‌رسد.

در مجموع، مطالعه حاضر نشان می‌دهد که ماهی کلمه را می‌توان در فصل خارج از فصل تکثیر با استفاده

از کنترل شرایط محیطی و تزریق هورمون وادار به تخم‌ریزی نمود. علاوه‌براین، تأثیر تکثیر خارج از فصل روی تولیدات جنسی مولدین نر و ماده فاقد اثر منفی می‌باشد. در پایان می‌توان ذکر نمود که با توجه به نتایج تحقیق حاضر و سایر مطالعات صورت گرفته، تاثیر تکثیر خارج از فصل روی توانایی تولیدمثل و کیفیت گامت تولیدی در رابطه با اکثریت گونه‌ها اختصاصی می‌باشد.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم که از زحمات تمام کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

منابع

۱. آخوندیان، م.، سواری، ا.، سلامات، ن، موحدی‌نیا، ع.، سالاری، م.ع.، ۱۳۹۴. تغییرات سطح پلاسمایی هورمون‌های استروئیدی (۱۷بتا استرادیول، ۱۷ آلفا ۲۰ بتا هیدروکسی پروژسترون و کورتیزول) و الکترولیت‌ها (کلسیم، سدیم و پتاسیم) طی مراحل مختلف چرخه‌ی تولید مثلی ماهی کلمه خزری (*Rutilus rutilus caspicus*) در بندر ترکمن (جنوب دریای خزر). اقیانوس‌شناسی، ۶(۲)، ۱۲۶-۱۱۷.

۲. احمدی‌فر، ا.، ایمان‌پور، م.ر.، امینی، ک.، زادمجید، و.، عنایت غلامپور، ط.، ۱۳۹۵. روش‌های مختلف بکارگیری هورمون LHRHa در تکثیر خارج از فصل جنس نر ماهی قرمز (*Carassius auratus*). بیولوژی کاربردی، ۶(۱)، ۳۹-۲۹.

۳. بهمنی، م.، یوسفی جوردهی، ا.، کاظمی، ر.، پوردهقان، م.، حلاجیان، ع.، دژندیان، س.، جلیل-پور، ج.، ۱۳۹۱. بیوتکنیک مولدسازی، تکثیر مصنوعی و مطالعه برخی شاخص‌های فیزیولوزیک تاسماهی شیپ پرورشی (*Acipenser nudiventris*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۱(۳)، ۱۲-۱.

۴. پور اسماعیلیان، م.، خارا، ح.، احمدنژاد، م.، ۱۳۹۴. روند رسیدگی جنسی ماهی بالغ نر شاه‌کولی دریای خزر (*Alburnus chalcoides*) مهاجر به تالاب انزلی. ماهی‌شناسی کاربردی، ۳(۱)، ۱۴-۱.

۵. پور اسماعیلیان، م.، خارا، ح.، احمدنژاد، م.، ۱۳۹۵. بررسی هورمون‌های جنسی و بافت‌شناسی تخمدان مولد ماده شاه‌کولی (*Alburnus chalcoides*) مهاجر به تالاب انزلی. زیست‌شناسی جانوری تجربی، ۵(۱)، ۲۲-۹.

۶. کشیری، ح.، شعبانی، ع.، شعبانپور، ب.، رضایی، م.ص.، ۱۳۸۸. بررسی ساختار جمعیتی ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*) در مناطق انزلی و گمیشان با استفاده از نشانگر ریز ماهواره. علوم و فنون دریایی، ۱۰(۴)، ۱۴-۴.

۷. نقیبی، م.، قرایی، ا.، غفاری، م.، ۱۳۹۲. بررسی تأثیر مس وسرب بر برخی پارامترهای حرکتی اسپرم ماهی سفیدک سیستان (*Schizothporax zarydnyi*). ماهی‌شناسی کاربردی، ۱(۴)، ۶۴-۵۳.

۸. محمدیان، ت.، آلبوشوکه، س.ن.، محمدیان، ع.، مصباح، م.، محمدی، ا.، شیرالی، ط.، ۱۳۹۳. روند تغییرات سالانه هورمون‌های استروئیدی جنسی مولدین ماده بنی. تحقیقات دامپزشکی، ۶۹(۲)، ۱۶۴-۱۵۹.

9. Alavi, S.M.H., Cosson, J., Kazemi, R., 2006. Semen characteristics in *Acipenser persicus* in relation to sequential stripping. Journal of Applied Ichthyology, 22, 400-405.
10. Bagheri, T., Hedayati, A.A., Jaferian, A., Hesni, M.A., Movahedinia, A., 2008. The study of seasonal fluctuation of steroid hormones in great sturgeon (*Huso huso*) cultured in brackish water condition. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 14(4), 432-435.
11. Bjerselius, R., Lundstedt-Enkel, K., Olsén, H., Mayer, I., Dimberg, K., 2001. Male goldfish reproductive behaviour and physiology are severely affected by exogenous exposure to 17β-estradiol. Aquatic Toxicology, 53(2), 139-152.
12. Bobe, J., Labbe, C. 2010. Egg and sperm quality in fish. General and Comparative Endocrinology, 165, 535-548.
13. Bromage, N., Porter, M., Randall, C. 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. Aquaculture, 197(1), 63-98.
14. Butts, I.A.E, Litvak, M.K., Trippel, E.A., 2010. Seasonal variations in seminal plasma and sperm characteristics of wild-caught and cultivated Atlantic cod (*Gadus morhua*). Theriogenology, 73, 873-885.
15. Davies, B., Bromage, N., 2002. The effects of fluctuating seasonal and constant water temperatures on the photoperiodic advancement of reproduction in female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. 205(1), 183-200.
16. Devlin, R.H., Nagahama, Y., 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture, 208, 191-364.
17. Guzman, J.M., Norberg, B., Ramos, J., Mylonas, C.C., Manano, E.L. 2008. Vitellogenin, steroid plasma levels and spawning performance of cultured female Senegalese sole (*Solea senegalensis*). General and Comparative Endocrinology, 156, 285–297.
18. Keyvanshokooh, S., Ghasemi, A., Shahriari Moghadam, M., Nazari, R.M., Rahimpour, M., 2007. Genetic analysis of *Rutilus rutilus* caspicus populations in Iran by microsatellite markers. Aquaculture Research, 38, 953–956.
19. Mehdinejad, N., Taghizadeh, V., Imanpoor, M.R., 2013. Corre;ation between serum steroid hormones and some biological parameters of gonad of common carp (*Cyprinus carpio*) in Caspian sea, Iran. Global Veterinaria, 10(1), 55-59.
20. Melamed, P., Gur, G., Rosenfeld, H., Elizur, A., Schulz, R.W., Yaron, Z., 2000. Reproduction development of male and female Tilapia hybrids (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) and changes in mRNA levels of gonadotropin (GtH) I β and II β subunits. Journal of Experimental Zoology, 286, 64–75.
21. Migaud, H., Fontaine, P., Sulistyo, I., Kestemont, P., Gardeur, J.N. 2002. Induction of out-of-season spawning in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*): effects of rates of cooling and cooling durations on female gametogenesis and spawning. Aquaculture, 205(3), 253-267.
22. Mylonas, C.C., Zohar, Y., 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 10, 463-491.
23. Mylonas, C.C., Fostier, A., Zanuy, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulation of reproduction. Aquaculture, 165, 516-534.
24. Naddafi, R., Abdoli, A., Hassanzadeh Kiabi, B., Mojazi Amiri, B., Karami, M. 2005. Age, growth and reproduction of the Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) in the Anzali and Gomishan wetlands, North Iran. Journal of Applied Ichthyology, 21(6), 492-497.
25. Orlando, E.F., Binczik, G.A., Thomas, P., Guillette, J.L.J., 2003. Reproductive seasonality of the male Florida gar (*Lepisosteus platyrhincus*). General and Comparative Endocrinology, 131, 356–371.
26. Patiño, R., Yoshizaki, G., Thomas, P., Kagawa, H., 2001. Gonadotropic control of ovarian follicle maturation: the two-stage concept and its mechanisms. Comparative Biochemistry and Physiology, 129, 427–233.

and ovarian oogenesis in immature Trichogaster trichopterus. Animal Reproduction Science, 161, 32-39.

27. Paulos, P., Runnalls, T.J., Nallani, G., La Point, T., Scott, A.P., Sumpter, J.P., Huggett, D.B., 2010. Reproductive responses in fathead minnow and Japanese medaka following exposure to a synthetic progestin, Norethindrone. Aquatic Toxicology, 99(2), 256-262.
28. Qu, Q.Z., Sun, D.J., Wan, B.Q., Ma, G.J., 2010. The relationships between gonad development and sex steroid levels at different ages in Acipenser schrenckii. Journal of Applied Ichthyology, 26(1), 1-5.
29. Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollevier, F., Nash J.P., 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquaculture, 234, 1–28.
30. Spano, L., Tyler, C.R., Aerle, R.V., Devos, P., Mandiki, S.N.M., Silvestre, F., Thome, J.P., Kestemont, P., 2004. Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (Carassius auratus). Aquatic Toxicology, 6, 369-379.
31. Targonska, K., Kucharczyk, D., Kujawa, R., Mamcarz, A., Żarski, D., 2010. Controlled reproduction of asp (*Aspius aspius*) using luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) analogues with dopamine inhibitors. Aquaculture, 306(1), 407-410.
32. Tiersch, T.R. 2001. Cryopreservation in aquarium fishes. Marine Biotechnology, 3, 212–223.
33. Turner, E., Montgomerie, R., 2002. Ovarian fluid enhances sperm movement in Arctic charr. Journal of Fish Biology, 63, 1570–1579.
34. Verma, D.K., Routry, P., Dash, C., Dasgupta, S., Jena, J.K., 2009. Physical and biochemical characteristics of semen and ultrastructure of spermatozoa in six carp species. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 9, 67-76.
35. Wang, N., Teletchea, F., Kestemont, P., Milla, S., Fontaine, P., 2010. Photothermal control of the reproductive cycle in temperate fishes. Reviews in Aquaculture, 2(4), 209-222.
36. Ziari, S.B., Naji, T., Sahafi, H.H., 2015., Comparison of the effects of Origanum vulgare with LHRH-A2 and 17β-estradiol on the ultrastructure of gonadotroph cells