

القاء و همزمان سازی اوولاسیون ماهی تیلاپای نیل (*Oreochromis niloticus*) با استفاده از آنالوگ LHRH و آنتاگونیست های اختصاصی رسپتورهای دوپامینی D2 و D4

داود ضرغام^{۱*}، علی شعبانی^۱، همایون حسین زاده صفافی^۲، محمدرضا ایمانپور^۱

۱- گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران،

صندوق پستی: ۴۹۱۷۸-۵۷۴۷۸

۲- مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۴۹/۱۴۹۶۵

تاریخ پذیرش: ۳ بهمن ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: ۲۵ شهریور ۱۳۹۵

چکیده

تیلاپیا یکی از پر مصرف ترین ماهی های جهان است و به همین دلیل کشورهای پرورش دهنده و میزان تولید آن با سرعت بسیار زیادی رو به افزایش است. بیولوژی تولید مثل جنس *Oreochromis niloticus* دارای برخی ویژگی های منفی مانند همآوری پایین و تخم ریزی غیر همزمان است و به همین دلیل تلاش هایی برای کم کردن این مشکلات صورت گرفته است. یکی از مشکلات و چالش ها در کارگاه های تکثیر تیلاپیا نیز همین عدم همزمانی در رسیدگی جنسی مولدین و تخم ریزی ماهی های مولد ماده می باشد. در این تحقیق اثر تحریکی یک آنالوگ LHRH به تنهایی و نیز همراه با دو آنتاگونیست دوپامینی نسل سوم به نام Olanzapine و Clozapine که به ترتیب محدود کننده عملکرد رسپتورهای دوپامینی D2 و D4 می باشند بر همزمانی و افزایش راندمان تکثیر ماهی تیلاپای نیل مورد بررسی قرار گرفته و با یک آنتاگونیست شناخته شده عمومی (دامپریدون) مقایسه گردید. نتایج تحقیق حاکی از بهبود راندمان تولید مثلی تیلاپیا در شاخص های کیفی و کمی مورد بررسی تحت تأثیر آنتاگونیست های دوپامینی بود که در بسیاری از موارد اختلاف معنی داری با تیماری بود که تنها آنالوگ LHRH را دریافت کرده بود. این نتایج نشان دهنده وجود ممانعت دوپامینرژیک در ماهی تیلاپای نیل می باشد. تسریع و همزمانی تخم ریزی در مولدین، افزایش قطر تخمک، افزایش درصد تخم ریزی مولدین و افزایش شاخص اوولاسیون بخشی از اثرات مثبت تزریق آنتاگونیست های دوپامینی در تکثیر این ماهی بود. با جمع بندی مقایسه شاخص های تکثیر تیمارها می توان نتیجه گرفت که تیمارهای نسل سوم در شاخص های تکثیر کمی بهتر از دامپریدون عمل کرده اند. همچنین نتایج بهتر دوزهای اولانزاپین نسبت به کلوزاپین نشان می دهد که رسپتورهای D2 در ماهی تیلاپیا نقش مؤثرتری در تأخیر فرایند تولیدمثل دارند و بلاک کردن این رسپتورها مفیدتر از بلاک کردن رسپتورهای D4 است که احتمالاً تأثیر کمتری در ممانعت از تولید مثل دارند.

کلمات کلیدی: تیلاپای نیل، دوپامین، آنتاگونیست دوپامین، اوولاسیون

* عهده دار مکاتبات: Davoodzargham61@gmail.com

مقدمه

تیلایا دومین گروه مهم ماهیان پرورشی هستند و پرورش آنها در سه دهه اخیر به دلیل پرورش و بازاریابی آسان رشد قابل توجهی را دارا بوده است، به طوری که از ۱/۵ میلیون تن در سال ۲۰۰۴ به ۳/۹۶ میلیون تن در سال ۲۰۱۰ افزایش یافته است و هم‌اکنون در بیش از ۱۳۰ کشور دنیا پرورش داده می‌شود (FAO, 2013). یکی از خصوصیات مثبت پرورشی تیلایا، تحمل کیفیت پایین آب پرورشی و نیز توان استفاده از محدوده وسیعی از غذاهای زنده می‌باشد. پرورش تیلایا در دنیا به خوبی در آب‌های شیرین، لب شور و دریایی انجام شده است (Campos-Mendoza et al., 2004). همچنین این ماهی توان پرورش چند گونه‌ای (polyculture) را به همراه سایر گونه‌های پرورشی را نیز داراست (Green et al., 2002). گونه *Oreochromis niloticus* یا تیلایای نیل مهم‌ترین و اقتصادی‌ترین گونه تیلایای پرورشی در جهان است که بیش از ۹۰ درصد سهم پرورش در بین گونه‌های مختلف تیلایا را در دنیا به خود اختصاص داده است (Wang and lu, 2015). این گونه توان رشد مناسب تا شوری ۱۵ ppt را دارا می‌باشد و در شوری زیر ۱۰-۱۵ ppt قابلیت تکثیر دارد. ماهی تیلایای ماده بسته به شرایط محیطی و نحوه پرورش هر ۱-۴ هفته و به‌طور غیر همزمان (asynchronous) تخم‌ریزی می‌کند (Baroiller et al., 1997). درحقیقت باید این ماهی را یک ماهی با شکل تولیدمثلی Multi Spawning قلمداد کرد. خصوصیات ذکر شده و مجموع مشخصات فیزیولوژیک این ماهی، آن را به یک ماهی مدل مخصوصا در بررسی‌های مرتبط با فیزیولوژی تولید مثل تبدیل نموده است (Levavi-Sivan et al., 2010).

تولید و پرورش تیلایا در ایران سابقه چندانی ندارد. تنها اقدام انجام شده مربوط به وارد کردن تیلایای نیلی و قرمز در سال ۱۳۸۷ توسط مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی ایران باهدف معرفی گونه جدید به صنعت آبی‌پروری می‌باشد. تحقیقات روی تکثیر، پرورش، تغذیه و سایر عوامل مربوط به تولید این ماهی در مرکز تحقیقات ماهیان آب شور بافق استان یزد با موفقیت در حال انجام است.

در فرایند تولیدمثل ماهیان استخوانی، به علت عدم وجود ارتباط خونی بین هیپوتالاموس و هیپوفیز، تعداد کثیری از نوروهورمون‌های هیپوتالاموسی مسئولیت تنظیم ترشح GnRH را بر عهده دارند (Wang et al., 2011) که از مهم‌ترین این نوروهورمون‌ها می‌توان به GnRH و دوپامین اشاره کرد (Levavi-Sivan et al., 2010). طبق تحقیقات انجام شده، معرفی آنالوگ‌های GnRH راندمان القاء بلوغ و تخم‌ریزی را در بسیاری از گونه‌های ماهیان دریایی ارتقا می‌دهد (Park et al., 2007). در برخی از گونه‌های ماهی‌ها مانند قزل‌آلا و برخی ماهیان دریایی، GnRH به تنهایی رسیدگی جنسی را القاء و روند تخم‌ریزی را تسریع می‌کند. ولی در بسیاری از ماهیان به علت وجود بازدارندگی‌های دوپامینرژیک اثرممانعتی دوپامین درون‌زاد به حدی قوی است که شدیداً توان GnRH وارد شده به بدن ماهی جهت افزایش ترشح گنادوتروپین خنثی می‌کند. اهمیت و شدت ممانعت‌های دوپامینرژیک در بین ماهیان استخوانی متفاوت است. وجود این بازدارندگی در ماهی تیلایا به اثبات رسیده است (De Leeuw et al., 1989; Levavi-Sivan et al., 1995). به علت وجود این بازدارندگی‌های دوپامینرژیک در این گروه از ماهیان ضرورت اضافه کردن ترکیبات آنتاگونیست

که محدود کننده عملکرد رسپتورهای دوپامینی گروه D2 می باشند بر هم زمانی و افزایش راندمان تکثیر ماهی تیلایای نیل مورد بررسی قرار گرفته و با یک آنتاگونیست شناخته شده عمومی (دامپریدون) مقایسه شده است. Olanzapine آنتاگونیست اختصاصی رسپتورهای D2 و Clozapine آنتاگونیست اختصاصی رسپتورهای دوپامینی D4 هستند و میل ترکیبی آنها با رسپتورهای غیر اختصاصی خود به شدت پایین است. اولانزاپین به طور اختصاصی رسپتورهای D2 (DRD2) را تحت تأثیر قرار می دهد و با آنها اتصال برقرار می کند و کلوزاپین به طور اختصاصی گرایش به رسپتورهای D4 (DRD4) دارد (Bohmeler et al., 2007; Van Tol et al., 1991). به طوری که گرایش کلوزاپین به اتصال با رسپتورهای D4 ۱۰ برابر بیش تر از رسپتورهای D2 است (Sanyal and Van Tol, 1997).

مواد و روش ها

مراحل عملی این تحقیق از فروردین تا مرداد ۱۳۹۳ در مرکز تحقیقات ماهیان آب شور مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی ایران واقع در شهر بافق استان یزد انجام شد.

آماده سازی و نگهداری ماهی ها

به منظور شروع کار، مولدین ماده و نر تیلایای نیل (*Oreochromis niloticus*) موجود در مرکز به نسبت ۱:۳ و به طریق Mix Breeding تکثیر شدند. از نسل حاصله، تعدادی بچه ماهی جهت انجام این تحقیق به طور جداگانه نگهداری شدند (Arabaci and Sari., 2004). بچه ماهی های به دست آمده تا پیش از اولین بلوغ در شرایط عادی پرورش و رژیم نوری ۱۲ L +

دوپامین به منظور ترشح گنادوتروپین ها در پاسخ به GnRHa و تقویت عملکرد GnRH احساس شد (Peter et al., 1988; Podhorec et al., 2012). طبق این روش ها استفاده همزمان یک آنتاگونیست قوی رسپتور دوپامین و آنالوگ فوق فعال GnRH پاسخ به GnRH را از طریق کاهش فعالیت بازدارندگی دوپامینرژیک در گونه هدف تقویت و باعث ترشح گنادوتروپین درون-زاد (GtH) می شود (Sharaf, 2012; Wang et al., 2009). به کار بردن چنین تیمارهای ترکیبی به عنوان " Linpe شناخته شده است (Lin et al., 1986; Peter et al., 1988).

در ماهی ها دو گروه رسپتور دوپامین به نام D1 like و D2 like وجود دارند که تحریک رفتار جنسی جنس ماده در حیوانات مختلف، پس از دستکاری رسپتورهای گروه D2 گزارش شده است. گروه رسپتورهای D2 شامل رسپتورهای D2، D3 و D4 می باشد. آزمایشات مختلفی درگیری و حضور رسپتورهای D2 Like را در ممانعت دوپامینرژیک برای ترشح گنادوتروپین مستقیماً در سطح هیپوفیز اثبات و بیان کرده اند (Vacher et al., 2000; Levavi-Sivan et al., 1991; Peter et al., 2005).

بیولوژی تولیدمثل جنس *Oreochromis* دارای برخی ویژگی های منفی مانند همآوری پایین و تخم ریزی غیر همزمان است (Rana 1990; Ridha 2004) و به همین دلیل تلاش هایی برای کم کردن این مشکلات صورت گرفته است (Little et al., 1993; Bhujel, 2000). در این تحقیق اثر تحریکی یک آنالوگ LHRH (LH-RH [D-Ala6], des-Gly10, Ethylamide) به تنهایی و نیز همراه با دو آنتاگونیست دوپامینی نسل سوم به نام Clozapine و Olanzapine

D 12 ننگه‌داری و با تراکم ۵ بچه ماهی در لیتر پرورش داده شدند (El-Sayed, 2006). در شرایط طبیعی این مرکز اولین تکثیر ماهیها بالای وزن ۸۰ گرم صورت می‌پذیرد (مشایی، ۱۳۹۲). با نزدیک شدن به سن بلوغ، ماهی‌ها به طور هفتگی به منظور بررسی مرحله رسیدگی گنادی معاینه و توزین شدند. زمانی که میانگین وزن ماهی‌ها به نزدیک ۸۰ گرم رسید، تزریق آنتاگونیست‌ها انجام شد.

آماده‌سازی محلول‌های تزریقی

برای انجام این تحقیق آنالوگ LHRH با نام D-LHRH ethylamide Ala6-des-Gly10 ساخت شرکت Syndel کانادا استفاده شد. همچنین دامپریدون مورد نیاز این آزمایش ساخت شرکت VASUDHA PHARMA CHEM LTD هندوستان بود. دو آنتاگونیست مورد استفاده در این آزمایش Clozapine و Olanzapine بودند که به ترتیب ساخت شرکت Cambrex profarmaco ایتالیا و شرکت Lee Pharma هندوستان بودند. این دو آنتاگونیست جزو نسل سوم آنتاگونیست‌های دوپامینی به‌شمار می‌آیند (Gerald and Maguire; 2002). حلال مورد استفاده در این آزمایش دی‌متیل سولفو کساید (DMSO) و ساخت شرکت DAEJUNG چین بود (Wang et al., 2009). LHRHa جهت تزریق در حلال DMSO حل و رقیق شد تا نهایتاً برای تیماری که می‌بایست LHRHa تنها را دریافت کند به میزان ۲۰ میکروگرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن LHRHa به ماهی‌ها تزریق گردید (تیمار LHRH). برای تیماری که می‌بایست LHRHa و دامپریدون دریافت کند (تیمار DOM)، دامپریدون نیز در حلال DMSO حل شد و با مقادیر لازم از

محلول LHRHa مخلوط شد به‌طوری که به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن ماهی‌های این تیمار ۱۰ میلی گرم دامپریدون و ۲۰ میکروگرم LHRHa تزریق شود (Wang et al., 2009; Pham et al., 2010; Podhorec et al., 2007; Peykan Heyrati et al., 2012). اولانزاپین و کلوزاپین نیز به صورت محلول تهیه شد و تیمارهای دریافت کننده اولانزاپین به ترتیب ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم دارو را به همراه ۲۰ میکروگرم LHRHa به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن ماهی دریافت کردند (تیمارهای OLA1, OLA2, OLA3). همچنین تیمارهای دریافت کننده کلوزاپین به ترتیب ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم دارو را به همراه ۲۰ میکروگرم LHRHa به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن ماهی دریافت کردند (تیمارهای CLO1, CLO2, CLO3). یک تیمار نیز ترکیب ۵ میلی گرم در کیلوگرم کلوزاپین و ۵ میلی گرم اولانزاپین را به همراه ۲۰ میکروگرم در کیلوگرم LHRHa را دریافت کرد (تیمار CO) تیمار شاهد مثبت فقط مورد تزریق با حلال قرار گرفت (تیمار PC). تیمار شاهد منفی نیز بدون تزریق در شرایط برابر با تیمارها نگهداری شد (تیمار NC). حجم تزریق ۰/۱ تا ۰/۱۵ میلی گرم به‌ازای هر ماهی بود (Peykan Heyrati et al., 2007).

عملیات تزریق و تکثیر

آزمایش در ۱۱ تیمار انجام گرفت و هر تیمار به ۳ تکرار تقسیم گردید. مجموعاً ۱۶۵ ماهی پیش‌مولد ماده در ۳۳ تکرار آزمایش تقسیم و آماده تزریق گردید. تزریق داروها به صورت یک مرحله ای و به‌روش درون‌صفاقی یا Intraperitoneal صورت گرفت (Podhorec et al., 2012; Park et al., 2007). پس از تزریق ماهی‌های ماده به نسبت ۱:۱ در کنار مولدین نر

در تانک های فایبرگلاس و با تراکم ۱۲ ماهی در تانک ۲۰۰۰ لیتری نگهداری شدند و از ۶ ساعت پس از تزریق جهت بررسی اوولاسیون در فواصل ۴ ساعته به طور منظم معاینه شدند. در زمان تزریق pH آب برابر با ۸/۲۲، شوری ۸/۷-۸/۹، دما ۲۶/۹ و اکسیژن محلول ۶/۵۶ ثبت شد. تعداد ماهی هایی که تا ۵ روز پس از تزریق در هر تیمار تخم ریزی کردند یادداشت و به عنوان موفقیت تخم ریزی یا درصد تخم ریزی ثبت گردید. فاصله زمان تخم ریزی نمونه های هر تیمار با تزریق به عنوان دوره تاخیر (Latency period) منظور و ثبت شد. پس از تکثیر، قطر تخمک استحصالی از هر تیمار اندازه گیری و درصد باروری هر تیمار نیز ثبت گردید (Szabo et al., 2002). ماهی ها پس از تکثیر به منظور بررسی و توزین گناد و نمونه برداری از گناد و کبد به آرامی کشته شدند. پس از تشریح، گنادها بیرون آورده و به منظور محاسبه شاخص گنادوسوماتیک توزین شدند و باقی مانده تخمک های درون تخمدان جهت تعیین شاخص اوولاسیون (OI) (نسبت تخمک استحصالی از هر ماهی به کل تخمک تولید شده) شمارش شد و نرخ اوولاسیون یا موفقیت اوولاسیون (نسبت ماهیان اووله شده به کل ماهی های تزریقی) محاسبه گردید. همچنین کبد ماهی ها جهت محاسبه شاخص هپاتوسوماتیک جداسازی و توزین گردید (Sharaf, 2012; wang et al., 2009). در نهایت تلفات هر کدام از تیمارها در طول دوره آزمایش به منظور مقایسه تأثیرات منفی داروها یادداشت گردید.

آنالیز آماری

نتایج حاصله در این تحقیق به صورت میانگین $\pm$ انحراف از معیار (Mean $\pm$ SD) ارائه گردیده اند. به

منظور بررسی های آماری نرم افزار SPSS نسخه ۲۰.۰ مورد استفاده قرار گرفت. در اولین گام نتایج سطوح هورمونی، موفقیت تخم ریزی، دوره تاخیر، شاخص اوولاسیون، موفقیت باروری، غلظت ویتلوژنین، آنزیم آروماتاز، GSI و قطر اووسیت از نظر نرمال بودن داده ها با آزمون One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test بررسی شدند و پس از تأیید نرمال بودن نتایج، آزمون پارامتریک آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) جهت بررسی معنی دار بودن اختلافات اجرا شد. سپس تست چند دامنه ای دانکن (Duncan Multiple Range Test). جهت تعیین اختلاف معنی دار بین گروه ها اجرا گردید و نتایج به دست آمده با سطح اطمینان ۹۵٪ ($P \leq 0.05$) بیان گردید (Pham et al., 2010).

نتایج

با اندازه گیری و محاسبه شاخص های مختلف تکثیر نتایج زیر حاصل گردید: نتایج مربوط به موفقیت تخم ریزی به این صورت بود که کم ترین درصد تخم ریزی در تیمارهای شاهد مثبت و شاهد منفی با ۲۰٪ موفقیت تخم ریزی اتفاق افتاد که تنها ۳ ماهی از ۱۵ ماهی این دو تیمار تخم ریزی کردند. بالاترین درصد تخم ریزی نیز متعلق به تیمار OLA1 با ۸۰٪ موفقیت بود (جدول شماره ۱). البته همگی تیمارهای تزریقی آزمایش درصد بالاتری از تخم ریزی را نشان دادند و از این نظر دارای اختلاف معنی دار با تیمارهای شاهد بودند ($P \leq 0.05$). میانگین دوره تأخیر تخم ریزی تیمار شاهد منفی 4 ± 48 ساعت و میانگین دوره تأخیر تیمار شاهد مثبت 8 ± 52 ساعت ثبت گردید. این دو تیمار طولانی ترین دوره تأخیر را داشتند و از این نظر اختلاف

معنی داری با یکدیگر نداشتند. تیمار DOM با 5 ± 20 ساعت و تیمار OLA 1 با دوره تأخیر 4 ± 20 سریع ترین جواب دهی را دارا بودند. در این شاخص هم همه تیمارهای تزریقی با تیمارهای شاهد دارای اختلاف معنی دار بودند (جدول ۱). میزان لقاح یا موفقیت باروری در بین تخم های استحصالی از ماهی های تیمار های مختلف اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند و نتایج همه تیمارها از 68% تا 75% متغیر بود. نتایج شاخص اوولاسیون در مورد تیمارهای مختلف آزمایش به این صورت بود که تیمار شاهد منفی با 4 ± 45 درصد کم ترین شاخص اوولاسیون را دارا بود و این عدد در مورد تیمار شاهد مثبت 2 ± 57 درصد به دست آمد. بالاترین مقدار شاخص اوولاسیون نیز برای تیمار OLA2 با 6 ± 74 درصد ثبت گردید. این شاخص در تیمارهای DOM، OLA1، OLA2 و CO اختلاف

معنی داری با تیمارهای شاهد و LHRH دارا بود (جدول ۱). تلفات تیمارها از زمان تزریق تا ۵ روز پس از آزمایش به این ترتیب بود که تیمار شاهد منفی هیچ گونه تلفاتی نداشت ولی در تیمار شاهد مثبت ۱ ماهی تلف شد. تیمار LHRH نیز تلفاتی را در طول این مدت نداشت و بالاترین تلفات نیز متعلق به تیمار OLA3 بود که ۴ ماهی در آن تیمار تلف گردید (جدول شماره ۲). کم ترین قطر تخمک های استحصالی از تیمارهای آزمایش در تیمار شاهد مثبت و معادل 0.41 ± 1.7 میلی متر بود و تیمار ترکیبی CO با 0.36 ± 3.1 بالاترین قطر تخمک را در بین تیمارها دارا بود. قطر تخمک در تیمارهای DOM، OLA1، OLA2، OLA3 و OLA3 نیز اختلاف معنی داری با تیمارهای شاهد و LHRH داشت (جدول ۲).

جدول ۱: نتایج مربوط به موفقیت تخم ریزی، دوره تأخیر، موفقیت باروری و شاخص اوولاسیون (میانگین $\pm$ انحراف ازمعیار)

نام تیمار	موفقیت تخم ریزی (درصد)	دوره تأخیر (ساعت)	موفقیت باروری (درصد)	شاخص اوولاسیون (درصد)
NC	20^a	48 ± 4^c	75 ± 2^a	45 ± 4^a
PC	20^a	54 ± 8^c	71 ± 4^a	57 ± 2^{ab}
LHRH	40^b	28 ± 6^b	74 ± 6^a	62 ± 6^b
DOM	66^c	20 ± 5^a	68 ± 4^a	67 ± 3^c
OLA 1	80^c	20 ± 4^a	68 ± 2^a	70 ± 5^c
OLA 2	72^c	22 ± 2^a	69 ± 3^a	74 ± 6^c
OLA 3	60^{bc}	24 ± 4^a	74 ± 4^a	62 ± 2^b
CLO 1	47^b	34 ± 6^b	75 ± 7^a	64 ± 5^b
CLO 2	59^{bc}	26 ± 4^a	76 ± 4^a	68 ± 1^{bc}
CLO 3	53^b	24 ± 2^a	70 ± 1^a	65 ± 4^b
CO	72^c	24 ± 0^a	72 ± 2^a	67 ± 3^c

جدول ۲: نتایج مربوط به شاخص های درصد تلفات، قطر تخمک، شاخص گنادوسوماتیک و شاخص هپاتوسوماتیک (میانگین $\pm$ انحراف از معیار)

نام تیمار	تلفات (درصد)	قطر تخمک (میلی متر)	شاخص گنادوسوماتیک (درصد)	شاخص هپاتوسوماتیک (درصد)
NC	-	2 ± 0.12^a	$3/19 \pm 0.1^a$	$2/31 \pm 0.3^a$
PC	۶/۶	$1/7 \pm 0.41^a$	$3/21 \pm 0.35^a$	$2/24 \pm 0.46^a$
LHRH	-	$1/9 \pm 0.27^a$	$3/92 \pm 0.51^{ab}$	$2/27 \pm 0.3^a$
DOM	۱۳/۲	$2/5 \pm 0.32^b$	$5/1 \pm 0.67^c$	$2/85 \pm 0.65^b$
OLA 1	۶/۶	$2/6 \pm 0.4^{ab}$	$5/27 \pm 0.8^c$	$3/57 \pm 0.5^{bc}$
OLA 2	۱۳/۲	$2/4 \pm 0.43^b$	$4/7 \pm 0.8^b$	$3/63 \pm 0.81^{bc}$
OLA 3	۲۷	$2/7 \pm 0.16^b$	$4/61 \pm 0.61^b$	$3/85 \pm 0.97^c$
CLO 1	-	$1/8 \pm 0.21^a$	$3/95 \pm 0.45^{ab}$	$2/35 \pm 0.5^a$
CLO 2	۱۳/۲	$1/9 \pm 0.13^a$	$4/03 \pm 0.2^{ab}$	$2/53 \pm 0.75^a$
CLO 3	۲۰	$2/2 \pm 0.43^{ab}$	$4/23 \pm 0.35^{ab}$	$2/69 \pm 0.58^{ab}$
CO	۱۳/۲	$3/1 \pm 0.36^b$	$4/56 \pm 0.78^b$	$3/01 \pm 0.68^b$

نتایج مربوط به شاخص گنادوسوماتیک به این ترتیب بود که تیمار شاهد منفی با $3/19 \pm 0.1$ و تیمار شاهد مثبت با $3/21 \pm 0.35$ کم ترین مقادیر را دارا بودند و از این نظر اختلاف معنی داری نداشتند. بالاترین رقم مربوط به تیمار OLA1 و برابر با $5/27 \pm 0.8$ به دست آمد که به جز تیمار DOM با سایر تیمارها اختلاف معنی داری داشت (جدول ۲).

نتایج مربوط به شاخص هپاتوسوماتیک تیمارهای مختلف به این صورت بود که این شاخص برای تیمار شاهد منفی معادل $2/31 \pm 0.3$ و برای تیمار شاهد مثبت برابر $2/24 \pm 0.46$ به دست آمد. در مورد تیمار LHRH این عدد اختلاف معنی داری با تیمارهای شاهد مثبت نداشت. این شاخص در تیمار DOM با تیمارهای شاهد مثبت و شاهد منفی و تیمار LHRH اختلاف معنی داری داشت ($P \leq 0.05$). این اختلاف معنی دار در مورد تیمارهای OLA1، OLA2 و OLA3 هم مشاهده شد

اما در تیمارهای CLO1 و CLO2 و CLO3 اختلاف معنی داری با تیمارهای شاهد و LHRH دارا نبود. تیمار ترکیبی CO دارای شاخص هپاتوسوماتیک $3/01 \pm 0.68$ بود که این عدد اختلاف معنی داری با نتایج مربوط به تیمارهای شاهد و تیمار LHRH داشت (جدول ۲).

بحث

یکی از مشکلات و چالش ها در کارگاه های تکثیر تیلاپیا عدم هم زمانی در رسیدگی جنسی مولدین و تخم ریزی ماهی های مولد ماده می باشد که برای یک کارگاه تکثیر دشوار و هزینه بر است (El-sayed, 2006). وقوع تخم ریزی در تیمارهای شاهد نشان دهنده انتخاب مناسب سائز ماهی های مورد آزمایش آمادگی جنسی ماهی های انتخاب شده برای آزمایش بود. مشایبی (۱۳۹۲) نیز نخستین سائز بلوغ را در شرایط

مذکور در همین محدوده وزنی ذکر کرده است. دلیل انتخاب ماهی‌های پیش‌مولد این بود که ممانعت دوپامینرژیک در مرحله پیش‌بلوغ شروع می‌شود و اوج این ممانعت در مرحله ویتلوژنز دیده می‌شود (Levavi-Sivan *et al.*, 2010). مقایسه نتایج شاخص‌های تکثیر در تیمارهای آنتاگونیستی با تیمار LHRH تأیید کننده وجود ممانعت دوپامینرژیک در وقایع رسیدگی تخمدانی و تخم‌ریزی ماهی تیلپیا می‌باشد که مانع از عملکرد LHRH در فرایند تولیدمثل می‌شود. وجود این ممانعت دوپامینرژیک در ماهی تیلپای نیل توسط Levavi-Sivan و همکاران در سال‌های ۱۹۹۵ و ۲۰۰۳ بیان شده است. جداول ۱ و ۲ نشان می‌دهد که نتایج تکثیر گروه‌های کنترل مثبت و منفی تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که حلال دی‌متیل سولفو کساید در روند تولیدمثل بی‌تأثیر است. در تحقیقات دیگری نیز از این ماده به عنوان حلال استفاده شده است که گزارشی از تأثیر آن بر روند تولیدمثل ماهی‌ها وجود ندارد (Wang *et al.*, 2009). نتایج موفقیت باروری در بین تیمارهای آزمایش اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌داد که این مسأله نشان می‌دهد که استفاده از LHRHa، دامپریدون، کلوزاپین و اولانزاپین تأثیر منفی بر روی زیست‌پذیری (Viability) تخمک آزاد شده ماهی‌ها ندارد. نتایج مشابهی نیز در مورد کپور معمولی (Dorafshan *et al.*, 2003)، شاه‌ماهی مرواریدی (Arabasi and Sari, 2004) و ماهی سفید (Paykan Heyrati *et al.*, 2007) گزارش شده است. موفقیت باروری در تیمارهای این آزمایش از ۶۸٪ تا ۷۵٪ متفاوت بود که کمی پایین‌تر از نتایج گزارش شده توسط هوی و همکاران در سال ۲۰۱۲ می‌باشد که

حداکثر باروری را ۸۷/۵٪ گزارش کرده‌اند. احتمالاً این اختلاف به علت تفاوت در فاکتورهای فیزیوشیمیایی آب تکثیر در دو آزمایش است. Hui و همکاران (۲۰۱۲) بهترین ترکیب درجه حرارت/شوری/ pH برای به‌دست آوردن بالاترین درصد باروری در تیلپای نیل را چنین اعلام می‌کند: درجه حرارت ۲۷/۶ درجه سانتی‌گراد/شوری ۹/۵ گرم در لیتر و pH برابر با ۷/۵. همچنین مشایی (۱۳۹۴) نیز بهترین شوری را برای تکثیر تیلپای نیل ۸ میلی‌گرم در لیتر بیان می‌دارد. بالاترین قطر تخمک در تیمار CO با 36 ± 0.3 میلی‌متر و کم‌ترین آن ۴۱ در تیمار شاهد با 41 ± 0.7 میلی‌متر ثبت گردید. Kjorswik و همکاران (۱۹۹۰) افزایش سایز تخمک را ناشی از افزایش ویتلوژنین خون و جذب بالاتر آن توسط اووسیت در حال رشد می‌دانند. مشایی (۱۳۹۲) میانگین قطر تخمک ماهی تیلپای نیل مولد را در شرایط پرورشی مشابه 58 ± 0.2 بیان کرده است. همچنین Campos-Mendoza و همکاران (۲۰۰۴) نیز بالاترین قطر تخمک تیلپای نیل را در تحقیق خود 47 ± 0.2 میلی‌متر و کم‌ترین میزان را 36 ± 0.2 میلی‌متر اندازه‌گیری کردند که این اعداد در محدوده نتایج تحقیق حاضر قرار دارد. نتایج شاخص گنادوسوماتیک در تیمارهای DOM و OLA1 در بالاترین حد بود و پایین‌ترین میزان آن متعلق به تیمارهای شاهد، LHRH و CLO1 بود. این نتایج با نتایج سایر شاخص‌ها به جز قطر تخمک انطباق و مشابهت دارد. شاخص هپاتوسوماتیک در تیمار OLA3 بیش‌ترین مقدار بود که این نتیجه با نتایج قطر تخمک انطباق دارد. نتایج این شاخص می‌تواند علت قطر بالای تخمک را در این تیمار توجیه کند. بدین ترتیب که افزایش سایز کبد ناشی از عملکرد بالای

ویتلوژنیک ماهی بوده که تأثیر خود را در سنتز و آزادسازی بیش تر ویتلوژنین و به تبع آن جذب ویتلوژنین و ترکیبات زرده و آب بیش تر توسط تخمک می گذارد (Kjorswik *et al.*, 1990). نتایج سه تیمار اولانزاپین نشان می دهد که دوز پایین تر این دارو بهترین عملکرد را در فرایند تکثیر و تولید مثل ماهی تیلایا ایجاد می کند و نتایج آن از دامپریدون نیز بهتر است. این مسأله قدرت بالاتر آنتاگونیست های دوپامینی نسل سوم را در مقایسه با نسل های قبل آنتاگونیست ها نشان می دهد. Gerald و Maguire (۲۰۰۲) نیز قدرت بالاتر آنتاگونیست های نسل سوم را نسبت به نسل های قبلی بیان کرده اند. این در حالست که دوز بهینه اولانزاپین نصف دوز دامپریدون مورد استفاده است و در مقایسه با دامپریدون مقدار کمتری دارو به بدن ماهی وارد می گردد. همچنین این نتایج اثبات می کند که رسپتورهای دوپامینی D2 نقش اصلی را در ممانعت دوپامینرژیک ماهی تیلایا ایفا می کنند و جلوگیری از عملکرد این رسپتورها عملکرد دوپامین را مختل و تضعیف می کند. Salingaut و همکاران (۱۹۹۸) نیز رسپتورهای دوپامینی D2 را دارای بیش ترین نقش در ایفای اثر ممانعتی دوپامین بر آزادسازی گنادوتروپین دانسته اند. اما با توجه به بالاتر بودن شاخص هپاتوسوماتیک و قطر تخمک در تیمار OLA3 می توان نتیجه گرفت که اولانزاپین در دوز بالا توانسته است ویتلوژنز را در ماهی به بهترین شکل القا کند اما دوز بالای دارو احتمالاً دارای اثرات جانبی منفی (Side effects) است که مانع از تخم ریزی بیش تر و سریع تر ماهی ها شده است و در دوزهای بالا بصورت تلفات نمایان می گردد (Kieran *et al.*, 2012). با در نظر گرفتن نتایج تکثیر این دو تیمار، دوز ۱۰ میلی گرم کلوزاپین راندمان بهتری را

نسبت به دوز ۵ میلی گرم ارائه داد و تلفات این تیمار نیز ۱ ماهی در طول دوره آزمایش بود. تیمار CLO3 در مقایسه با دو تیمار دیگر کلوزاپین در مورد شاخص های دوره تأخیر، قطر تخمک، شاخص گنادوسوماتیک و شاخص هپاتوسوماتیک نتایج بهتری را از خود نشان داد ولی در مورد شاخص های موفقیت تخم ریزی، موفقیت باروری و شاخص اوولاسیون عملکرد ضعیفتری نسبت به تیمار CLO2 داشت. تلفات این تیمار نیز بالاتر از دو تیمار قبلی و به تعداد ۲ ماهی در طول دوره آزمایش بود. نتایج بهتر تیمارهای کلوزاپین نسبت به تیمارهای شاهد و LHRH نیز تأیید کننده وجود ممانعت دوپامینی در ماهی تیلایاست و نشان می دهد که رسپتورهای دوپامینی D4 نیز علاوه بر رسپتورهای D2 در کنترل فرایند رسیدگی جنسی ماهی تیلایا نقش دارند. با مقایسه عملکرد آنتاگونیست کلوزاپین با اولانزاپین به روشنی می توان دریافت که این آنتاگونیست عملکرد ضعیفتری نسبت به اولانزاپین داشته است. به عنوان مثال همه تیمارهای هورمونی به جز تیمار CLO1 اختلاف معنی داری از نظر شاخص اوولاسیون با تیمارهای شاهد دارا بودند. تأثیر گذاری این آنتاگونیست در دوز ۱۰ میلی گرم و ۱۵ میلی گرم نشان دهنده اینست که قدرت (potency) مهار کنندگی این دارو نسبت به اولانزاپین کم تر است و در دوز پایین اثربخشی مطلوبی ندارد. بنابراین نتیجه بررسی شاخص های تکثیر نشان می دهد که رسپتورهای دوپامینی D4 به اندازه رسپتورهای D2 در ایفای نقش ممانعتی دوپامین در فرایند تولید مثل تأثیر گذار و دخیل نیستند و به نظر می رسد که دوپامین همان طور که شواهد قبلی نیز در این مورد ارائه گردیده است، اثر مهاری خود را بیش تر از طریق رسپتورهای D2 القاء

منابع

۱. مشایی، ن.، ۱۳۹۲. تعیین بیوتکنیک تکثیر و تولید بچه ماهیان نورس تیلایپای پرورشی در شرایط آب لب شور (گزارش نهایی)، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، ۷۵ صفحه.
۲. مشایی، ن.، ۱۳۹۴. تعیین اپتیم‌های تکثیر (شوری، دوره نوری، تراکم، و نسبت جنسی مولدین) ماهیان تیلایپای پرورشی سیاه در شرایط آب لب شور بافق (گزارش نهایی)، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، ۸۳ صفحه.
3. Arabaci, M., Sari, M., 2004. Induction of ovulation in endemic pearl mullet (*Chalcalburnus tarichi*), living in the highly alkaline Lake Van, using GnRHa ([D-Ser(tBu)6,Pro9-Net]-GnRH) combined with haloperidol. Short communication. *Aquaculture*, 238, 529-535.
4. Baroiller, J.F., Desprez, D., Carteret, Y., Tacon P., Borel, F., Hoaraeu, M.C., Mèlard C., Jalabert, B., 1997. Influence of environmental and social factors on the reproductive efficiency in three tilapia species, *Oreochromis niloticus*, *O. aureus*, and the red tilapia (Red Florida Strain). In: El-Sayed, A.M., 2006. *Tilapia Culture*, CABI Publishing, Oxford, London, UK, 112-139.
5. Bhujel, R.C., 2000. A review of strategies for the management of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodfish in seed production systems, especially hapa-based systems. *Aquaculture*, 181, 37-59.
6. Boehmler, W.T., Carr, C., Thisse, B., Thisse, A., Canfield Levenson, R., 2007. D4 Dopamine receptor genes of zebrafish and effects of the antipsychotic clozapine on larval swimming behavior. *Genes. Brain and behavior*, 6, 155-165.
7. Campos-Mendoza, A., McAndrew, B.J., Coward, K., Bromage, N., 2004. Reproductive response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to photoperiodic manipulation; effects on spawning periodicity, fecundity and egg size. *Aquaculture*, 231, 299-314.
8. De Leeuw, R., Habibi, H.R., Nahorniak, C.S. and Peter, R.E., 1989. Dopaminergic regulation of pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor activity in the goldfish (*Carassius-*

می کند (Salingaut *et al.*, 1998). نتایج تیمار CO نیز نشان دهنده اثر مثبت ترکیب دو آنتاگونیست D2 و D4 دوپامین در بهبود روند رسیدگی جنسی تیلایپا است. در مورد تیمار CO نیز با این که دوز اولانزاپین این تیمار برابر با تیمار OLA1 بود ولی نتایج شاخص‌های تکثیر این تیمار ضعیف‌تر از تیمار OLA1 بود و البته بهتر از تیمارهای کلوزاپین بود. به نظر می‌رسد علت این مسأله بالا بودن دوز آنتاگونیستی تزریق شده به ماهی‌ها (مجموعاً ۱۰ میلی گرم) باشد که مانند تیمار OLA2 که کاهش راندمان را نسبت به تیمار OLA1 شاهد بودیم، در این تیمار نیز دوز بالای آنتاگونیست فراتر از تحمل ماهی‌ها بوده باشد.

به عنوان نتیجه گیری می‌توان بیان کرد که ممانعت دوپامینرژیک در روند تولیدمثل ماهی تیلایپای نیل وجود دارد و آنالوگ‌های LHRH به تنهایی قادر به القاء و تسریع اوولاسیون در این ماهی نیستند. همچنین نتایج بهتر دوزهای اولانزاپین نسبت به کلوزاپین نشان می‌دهد که رسپتورهای D2 در ماهی تیلایپا نقش مؤثرتری در تأخیر فرایند تولیدمثل دارند و بلاک کردن این رسپتورها مفیدتر از بلاک کردن رسپتورهای D4 است که احتمالاً تأثیر کم‌تری در ممانعت از تولید مثل دارند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از خانم مهندس مشایی رییس مرکز تحقیقات آب شور بافق یزد و همه پرسنل خونگرم آن مرکز به علت همکاری و مساعدت در انجام این تحقیق صمیمانه سپاس‌گزاری می‌گردد.

- R.E., 1986. The effect of LHRH analogue and drugs which block the effects of domapine on gonadotropin secretion and ovulation in fish cultured in China. In: Billard R., Marcel J. (Eds.), Aquaculture of Cyprinids. INRA, Paris, France, 139–150.
21. Little, D.C., Macintosh, D.J., Edwards, P., 1993. Improving spawning synchrony in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture and Fisheries Management, 24, 399–405.
22. Park, W., Lee, C. H., Kim, D., Kim, J.H., Tamaru, C.S., Sohn, Y.C., 2007. Effects of a gonadotropin-releasing hormone analog combined with pimozide on plasma sex steroid hormones, ovulation and egg quality in freshwater-exposed female chum salmon (*Oncorhynchus keta*). Aquaculture, 271, 488–497.
23. Peter, R.E., Lin, H.R., Van, Der Kraak, G., 1988. Induced ovulation and spawning in cultured fresh water fish in China: advanced in application of GnRH analogue and dopamine antagonists. Aquaculture, 74, 1–10.
24. Paykan Heyrati, F.P., Mostafavi, H., Toloee, H., Dorafshan, S., 2007. Induced spawning of kutum, *Rutilus frisii kutum* (Kamenskii, 1901) using (D-Ala⁶, Pro⁹-NEt) GnRHa combined with domperidone. Aquaculture, 265, 288–293.
25. Pham, H.Q., Kjorsvik, E., Nguyen, A.T., Nguyen, M.D., Arukwe, A., 2010. Reproductive cycle in female Waigieu seaperch (*Psammoperca waigiensis*) reared under different salinity levels and the effects of dopamine antagonist on steroid hormone levels. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 383, 137–145.
26. Podhorec, P., Socha, M., Sokolowska-Mikolajczyk, M., Policar, M., Svinger, V. W., Drozd, B., Kouril J., 2012. Dopamine control of LH release in the tench (*Tinca tinca*), Short communication. General and Comparative Endocrinology, 175, 34–38.
27. Rana, K.J., 1990. Reproductive biology and the hatchery rearing of tilapia eggs and fry. In: Recent Advances in Aquaculture (ed. by J.F. Muir, R.J. Roberts), pp. 343–406. Croom Helm, London, UK.
28. Ridha, M.T., 2004. Observations on the reproductive performance of three mouth-brooding tilapia species in low-salinity underground water. Aquaculture research, 35, 1031–1038.
29. Saligaut, C., Linard, B., Mananos, E.L., Kah, O., Breton, B., Govoroun, M., 1998. Release of pituitary gonadotrophins GtH I and GtH II in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*: *Auratus*). Journal of Endocrinology, 121, 239–247.
9. Dorafshan, S., Mostafavi, H., Amiri, B.M., 2003. Induction of spawning in common carp (*Cyprinus carpio*) using pituitary extract and GnRH analogue in combination with Domperidone. Iranian Journal of Biotech, 1, 213–217.
10. El-Sayed, A.M., 2006. Tilapia Culture. CABI Publishing, Oxford, London, UK, pp. 112–139.
11. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations FishStatJ: A Tool for Fishery Statistics Analysis, Version 1.0.1. Available at: <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en> (Accessed 26 March 2013).
12. Gerald, A., Maguire, M.D., 2002. Prolactin elevation with antipsychotic medications: Mechanism of action and clinical consequences. Journal of clinical psychiatry, 63(4), 56–62.
13. Green B.W. El Nagdi Z., Hebicha, H., 2002. Evaluation of Nile tilapia pond management strategies in Egypt. Aquaculture research, 33, 1037–1048.
14. Hui, W., Xiaowen Z., Haizhen, W., Jun Q., Pao, X., Ruiwei L., 2012. Joint effect of temperature, salinity and pH on the percentage fertilization and hatching of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture research, 1–11.
15. Kieran, J., Davey, S., Cryan, J.F., 2012. Gender-dependent consequences of chronic olanzapine in the rat: effects on body weight, inflammatory, metabolic and microbiota parameters. psychopharmacology, 221, 155–169.
16. Kjorsvik, E., Magnor-Jensen, A., Holmefjord, I., 1990. Egg quality in fishes. Adv. Mar. Biology, 26, 71–113.
17. Levavi-Sivan, B., Avitan, A., Kanias, T., 2003. Characterization of the inhibitory dopamine receptor from the pituitary of tilapia. Fish Physiol. Biochemistry, 28, 73 –75.
18. Levavi-Sivan, B., Ofir, M., Yaron, Z., 1995. Possible sites of dopaminergic inhibition of gonadotropin release from the pituitary of a Teleost fish, tilapia. Mol. Cell. Endocrinology, 109, 87–95.
19. Levavi-Sivan, B., Bogerd, J., Mananos E.L., Gómez, A., Lareyre, J.J., 2010. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. General and Comparative Endocrinology, 165, 412–437.
20. Lin, H.R., Kraak, G., Liang, J.Y., Peng, C., Li, G.Y., Lu, L.Z., Zhou, X.J., Chang M.L., Peter

34. Van Tol, H.H., Bunzow, J.R., Guan, H.C., Sunahara, R. K., Seeman, P., Niznik, H. B., Civelli, O., 1991. Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature*, 350, 610–4.
35. Wang, W., Hu, M., Wang, W., Liu, X., Cheung S.G., Shin P.K.S., Song L., 2009. Effects of GnRHa (D-Ala6, Pro9-NEt) combined with domperidone on ovulation induction in wild loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Aquaculture*, 291, 136–139.
36. Wang, X., Zhao, T., Wei, H., Zhou, H., 2011. Regulation of dopamine D2 receptor expression in grass carp pituitary cells: A possible mechanism for dopaminergic modification of luteinizing hormone synthesis. *General and Comparative Endocrinology*, 173, 48–55.
37. Wang, M., Lu, M., 2015. Tilapia polyculture: a global review. *Aquaculture research*, 1-12.
- modulation by estradiol and catecholamines. *Gen. Comp. Endocrinology*, 109, 302–309.
30. Sanyal, S., Van Tol, H.H., 1997. Review the role of dopamine D4 receptors in schizophrenia and antipsychotic action. *Journal of Psychiatr Research*, 31, 219–32.
31. Sharaf, S.M., 2012. Effect of GnRHa, pimozone and Ovaprim on ovulation and plasma sex steroid hormones in African catfish *Clarias gariepinus*. *Theriogenology*, 77, 1709–1716.
32. Szabo, T., Medgyasszay, C., Horvath, L., 2002. Ovulation induction in nase (*Chondrosoma nasus*, Cyprinidae) using pituitary extract or GnRH analogue combined with domperidone. *Aquaculture*, 203, 389–395.
33. Vacher, C., Mananos, E.L., Breton, B., Marmignon, M.H., Saligaut, C., 2000. Modulation of pituitary dopamine D1 or D2 receptors and secretion of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone during the annual reproductive cycle of female rainbow trout. *J. Neuroendocrinology*, 12, 1219–1226.