

نوسان هورمون‌های تستوسترون و GTH_{II} مولدین ماده تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) در مراحل قبل و بعد از تزریق با $LHRH_2$

حسین محمدی پرشکوه^۱، حسین خارا^{۲*}، رضوان اله کاظمی^۳

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات گیلان، گروه شیلات، رشت، ایران، صندوق پستی: ۴۱۶۳۵-۴۱۹۶

۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

۳- موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر، رشت، ایران، صندوق پستی ۳۴۶۴ - ۴۱۶۳۵

تاریخ دریافت: ۲۸ فروردین ۱۳۹۲

تاریخ پذیرش: ۳۰ تیر ۱۳۹۲

چکیده

تحقیق حاضر به منظور دستیابی به غلظت بهینه هورمون سنتتیک $LHRH_2$ جهت افزایش راندمان تکثیر مصنوعی روی ۱۸ عدد مولد ماده تاسماهی ایرانی طبیعی در سه تیمار با مقادیر تزریق ۴، ۶ و ۸ میکروگرم در کیلوگرم وزن ماهی با سه تکرار در هر تیمار طراحی و انجام شد. بدین منظور غلظت هورمون‌های تستوسترون و گنادوتروپین ۲ در مراحل قبل و بعد از تزریق هورمون (قبل از اوولاسیون) به روش رادیوایمنوآسی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که میانگین سطوح هورمون تستوسترون در پلاسما خون مولدین ماده در زمان قبل و بعد از تزریق در تیمارهای ۴، ۶ و ۸ میکروگرم در کیلوگرم وزن بدن به ترتیب، ۲۴/۸۸، ۱۴/۸ و ۲۲/۵۶؛ ۹/۵۷، ۶/۲ و ۶/۶۹ نانوگرم در میلی‌لیتر و سطح هورمون گنادوتروپین ۲ به ترتیب ۲/۱۲، ۱/۹۶ و ۰/۹۴؛ ۰/۹۱، ۰/۷۰ و ۰/۶۶ نانوگرم در میلی‌لیتر متغیر بود. سطح هورمون تستوسترون در هر سه تیمار و سطح هورمون گنادوتروپین ۲ در تیمارهای ۴ و ۶ میکروگرم در کیلوگرم دارای اختلاف معنی‌دار در دو مرحله قبل و بعد از تزریق بودند ($P < 0.05$). در حالی که سطح هورمون گنادوتروپین II در تیمار ۸ میکروگرم در دو مرحله فوق فاقد اختلاف معنی‌دار بود ($P > 0.05$). همچنین نتایج نشان داد که اوولاسیون در تیمار ۴ میکروگرم در کیلوگرم (۱۰۰٪) نسبت به دو تیمار دیگر (۶۷٪) بالاتر بود. با توجه به نتایج مطالعه حاضر غلظت ۴ میکروگرم هورمون $LHRH_2$ مناسب‌ترین غلظت جهت افزایش راندمان تکثیر مصنوعی مولدین تاسماهی ایرانی طبیعی توصیه می‌گردد.

کلمات کلیدی: تاسماهی ایرانی، هورمون $LHRH_2$ ، تکثیر مصنوعی، هورمون‌های تولید مثلی.

مقدمه

در شرایط فعلی کاهش مولدین طبیعی، پایین بودن اوولاسیون تخمک، درصد لقاح و تلفات سنگین در مراحل انکوباسیون از مهم ترین چالش ها و مسایل حل نشده تکثیر مصنوعی به ویژه در گونه تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) می باشد. یکی از مهم ترین جنبه های مجهول و مبهم مسأله فوق غلظت مناسب هورمون تزریقی است. اگرچه در سال های اخیر با مطالعه روی هورمون های مختلف، تقریباً نوع هورمون سنتتیک مناسب مورد استفاده جهت تکثیر مصنوعی تاسماهیان مشخص شده است، اما هنوز غلظت مناسبی که بتوان بیشترین اوولاسیون تخمک و در پی آن لارو و بچه ماهی را با کمیت و کیفیت بالا به دست آورد، ناشناخته می باشد. یکی از روش های بازنگری در فرآیند تکثیر مصنوعی به منظور افزایش راندمان تولید، به کارگیری مناسب هورمون های مورد نظر برای رسیدگی نهایی، اوولاسیون و تخم ریزی است. هورمون $LHRH-A_2$ (Luteinizing Hormone Releasing Hormone) یکی از هورمون های سنتتیک است که برای القاء رسیدگی نهایی، اوولاسیون و تکثیر مصنوعی گونه های مختلف مورد استفاده قرار می گیرد (Horvath et al., 1986).

بررسی سطوح هورمون تستوسترون در بسیاری از گونه های ماهیان استخوانی معرف حداکثر غلظت سطوح این هورمون در قبل از تخم ریزی و هنگام رسیدگی نهایی تخمک ها در مولدین ماده می باشد. اما بلافاصله پس از تخم ریزی سطوح هورمون تستوسترون به حداقل میزان خود می رسد. مطالعات Truscott و همکاران (۱۹۸۶)، در Sockeye Salmon (*Oncorhynchus nerka*) و همکاران

(۲۰۰۱)، در Midshipman (*Porichthys notatus*)، Unal و همکاران (۲۰۰۵)، در *Chalcalburnus tarichi* موید کاهش سطوح هورمون تستوسترون پس از تخم ریزی می باشد.

در هیپوتالاموس هورمون های آزاد کننده و فاکتورهای بازدارنده ساخته می شوند که روی هیپوفیز اثر کرده، هورمون های گنادوتروپین (GTH) با ساختار پپتیدی را آزاد می کنند. هورمون های پپتیدی هیپوفیزی، در غشاء به گیرنده های خاص خود می چسبند و سپس کمپلکس تولید شده روی گیرنده های استروئیدی خود در غشاء اثر می گذارند. هورمون های استروئیدی گنادها از طریق یک مکانیسم فیدبکی بسیار قوی روی آزاد سازی گنادوتروپین ها از هیپوفیز قدامی اثر گذاشته و باعث تنظیم و ترشح استروئید ها در ماهیان می گردند (صافی، ۱۳۷۷).

اثر ممانعت کننده دوپامین مترشحه از هیپوتالاموس روی ترشح GTHII، در بسیاری از ماهیان استخوانی عالی از جمله کپور ماهیان، آزاد ماهیان و غیره از طریق گیرنده های D_2 موجود روی سلول های محرک غدد جنسی صورت می گیرد. در برخی گونه ها نیز دوپامین، ترشح GTHII را مستقیماً در سطح سلول های هیپوفیزی کاهش می دهد (Pavlick and Moberg, 1997). مطالعه حاضر به منظور دستیابی به بهینه غلظت هورمون سنتتیک $LHRHA_2$ جهت افزایش راندمان تولید لارو و بچه ماهی از مولدین وحشی تاسماهی ایرانی طراحی و اجرا گردید.

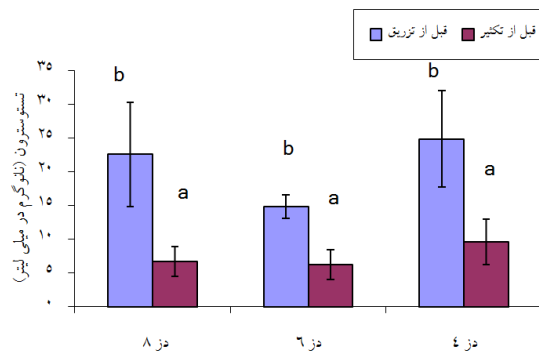
مواد و روش ها

در این تحقیق از ۱۸ قطعه مولد ماده تاسماهی ایرانی وحشی صید شده از صیدگاه های استان گیلان (به

آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ و جهت رسم نمودارها از نرم افزار Excel ۲۰۰۷ استفاده گردید.

نتایج

میانگین سطوح هورمون تستوسترون در پلاسمای خون مولدین تاسماهی ایرانی در مراحل قبل از تزریق و قبل از تکثیر در تیمارهای ۴، ۶ و ۸ میکروگرم در کیلوگرم وزن بدن ماهی به ترتیب $24/88 \pm 7/11$ ، $14/8 \pm 1/77$ و $22/56 \pm 7/74$ نانوگرم در میلی‌لیتر و $6/69 \pm 2/17$ و $6/2 \pm 2/23$ و $9/57 \pm 3/37$ میلی‌لیتر بود. نتایج آماری بیانگر اختلاف معنی‌دار بین دو مرحله آزمون در تمام تیمارها بود ($P < 0/05$) (شکل ۱). بیشینه مقدار هورمون تستوسترون پلاسمای خون نیز در تیمار ۴ میکروگرم در کیلوگرم مشاهده شد.



شکل ۱: میانگین سطوح تستوسترون پلاسمای خون مولدین تاسماهی ایرانی در دو مرحله آزمون

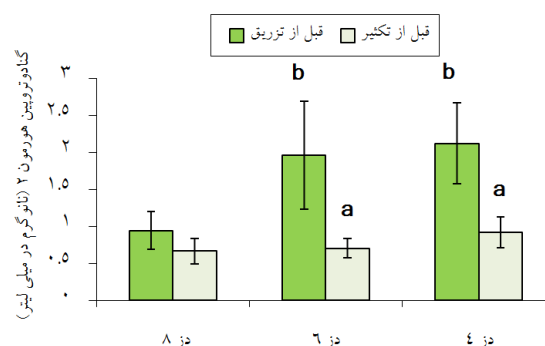
همچنین میانگین سطوح هورمون GTHII در پلاسمای خون مولدین ماده تاسماهی ایرانی در مراحل قبل از تزریق و قبل از تکثیر در تیمارهای ۴، ۶ و ۸ میکروگرم در کیلوگرم وزن بدن ماهی به ترتیب $0/94 \pm 0/25$ ، $1/96 \pm 0/72$ ، $2/12 \pm 0/54$

وسیله دام و پره) که به حوضچه‌های کورانسکی مرکز تکثیر بازسازی شهید بهشتی انتقال و به مدت ۱۰ تا ۲۰ روز در آب شیرین نگهداری شده بودند، استفاده شد. این آزمون که از سه تیمار هورمونی $LHRHA_2$ (با غلظت‌های ۴، ۶ و ۸ میکروگرم در کیلوگرم وزن بدن ماهی) و هر تیمار با سه تکرار تشکیل شده بود، (تزریق $LHRHA_2$ با محلول سرم فیزیولوژی به غلظت ۶/۵ گرم نمک طعام در یک لیتر آب مقطر و در ۲ سی سی سرم فیزیولوژی) در بهار ۱۳۹۱ به انجام رسید. نمونه برداری از تخمک مولدین نیز به منظور تعیین موقعیت هسته زایشی (GV) به وسیله سوک و خونگیری با استفاده از سرنگ ۵ سی سی از بخش پشتی باله دمی در دو مرحله قبل از تزریق و قبل از تکثیر به عمل آمد. برای جداسازی سرم از یاخته‌های خونی از دستگاه سانتریفیوژ (مدل ۲۰۰ Labofuge ساخت شرکت Heraeus sepatech، آلمان) با دور ۳۰۰۰ در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. برای سنجش سطوح هورمون‌های تستوسترون و گنادوتروپین II از کیت‌های Immunotech فرانسوی و ردیاب I_{125} به روش رادیو ایمنواسی (RIA)، با دستگاه گاما کانتر LKB ساخت فنلاند بر حسب نانوگرم در میلی‌لیتر (Web et al., 2002) در آزمایشگاه رشت - ایران انجام شد. به منظور بررسی توزیع نرمال داده‌ها در گروه‌ها و تکرارها جهت تشکیل تیمارها از آزمون Shapiro-Wilk و Kolmogorov-smirnov و به منظور مقایسه آماری بین گروه‌ها در تیمارها از آزمون واریانس یکطرفه و جهت مقایسه گروه‌ها با یکدیگر از آزمون دانکن و برای مقایسه سطوح هورمونی در دو مرحله قبل از تزریق و قبل از اوولاسیون تخمک از آزمون Independent-samples T-Test استفاده شد. کلیه

تستوسترون به حداقل میزان خود رسید. مطالعات Truscott و همکاران (۱۹۸۶)، روی گونه *Oncorhynchus nerka* Sockeye Salmon، Erdogan و همکاران (۲۰۰۱)، روی گونه جنس ماده *Porichthys notatus* Midshipman و Unal و همکاران (۲۰۰۵)، در جنس ماده *Chalcalburnus tarichi* مویید کاهش سطوح هورمون تستوسترون پس از تخم‌ریزی بود. همچنین مطالعات انجام یافته در تاسماهیان نشان داد که غلظت هورمون تستوسترون پلاسمای خون تاسماهیان طبیعی مهاجرت کرده جهت تولید مثل نسبت به قبل از مهاجرت و نیز در مولدین نر و ماده پرورشی بالغ نسبت به مولدین نابالغ بیشتر است، یعنی غلظت این هورمون طی گامتوزنیز افزایش می‌یابد، اما پس از رسیدگی جنسی نهایی به شدت افت می‌کند (Barannikova, 1997; Barannikova et al., 2004؛ بهمنی و همکاران، ۱۳۸۹).

Barannikova و همکاران (۲۰۰۴)، غلظت هورمون تستوسترون بین تاسماهی روسی نر و ماده مرحله دوم رسیدگی جنسی را فاقد اختلاف معنادار آماری اعلام نمودند اما در طی دوره گامتوزنیز به شدت این هورمون‌ها افزایش یافت. غلظت تستوسترون در طول چرخه اووژنز ماهیان ماده افزایش می‌یافته و بطوریکه به حداکثر مقدار خود می‌رسد و پس از رسیدگی جنسی نهایی غلظت آن به شدت کاهش می‌یابد. تستوسترون در چرخه تولید هورمون‌های جنسی تاسماهیان ماده نقش دارد و مانند یک لایه آروماتاز در ساخت استرادیول شرکت می‌کند. در واقع هورمون‌های تستوسترون و ۱۱-کتوتستوسترون در گیر کنترل تولیدمثل ماهیان خاویاری هستند. همچنین Bukovskaya و همکاران (۱۹۹۷)، هورمون

میلی‌لیتر و 0.70 ± 0.17 و 0.91 ± 0.13 و 0.66 ± 0.17 نانوگرم در میلی‌لیتر بود. نتایج آماری بیانگر اختلاف معنی‌دار بین دو مرحله آزمون در دو تیمار ۴ و ۶ و عدم اختلاف در تیمار ۸ میکروگرم در کیلوگرم بود ($P < 0.05$) (شکل ۲). سطح این هورمون نیز در مرحله قبل از تزریق در تیمار ۴ میکروگرم در کیلوگرم نسبت به دو تیمار دیگر بیشتر بود.



شکل ۲: میانگین سطوح GTHII پلاسمای خون مولدین تاسماهی ایرانی وحشی در دو مرحله آزمون

بحث

در پژوهش حاضر نوسان هورمون‌های تستوسترون و گنادوتروپین II در مراحل قبل و بعد از تزریق با هورمون $LHRH_2$ در تاسماهی ایرانی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده بیانگر آن بود که میانگین سطوح تستوسترون در سرم خون مولدین در زمان قبل از تزریق و قبل از تکثیر در غلظت‌های مختلف دارای اختلاف معنی‌دار بود ($P < 0.05$). بررسی سطوح هورمون تستوسترون در بسیاری از گونه‌های ماهیان استخوانی معرف حداکثر غلظت سطوح این هورمون در قبل از تخم‌ریزی و هنگام رسیدگی نهایی تخمک‌ها در مولدین ماده بود. اما بلافاصله پس از تخم‌ریزی سطوح هورمون

تستوسترون را در شرایط طبیعی اصلی‌ترین هورمون تولیدی گنادها معرفی نمودند.

Fontanin و همکاران (۱۹۹۸)، در مطالعه چرخه تولید مثلی و استروئیدهای جنسی ماده سوف اروپایی دریافتند که میزان تستوسترون و ۱۷- به تا استرادیول در خلال استراحت جنسی پایین بود. هورمون‌های استرادیول و تستوسترون به طور معنی‌داری پس از شروع اووژنز و در مرحله سوم رسیدگی جنسی (۳-۴) نانوگرم در میلی‌متر) افزایش یافت. میزان تستوسترون و ۱۷ به تا- استرادیول تا زمان تخم‌ریزی در حد بالا باقی ماندند که بیانگر وجود فعالیت زرده سازی بود.

نتایج دیگر محققین نیز نشان داد که در آغاز مهاجرت تاسماهیان به منظور تولیدمثل در رودخانه ولگا و حوضه شمالی دریای خزر تغییراتی در سطوح هورمون تستوسترون (T) رخ داده و تقریباً دو برابر شده است (Barannikova, 1997). Johnson و همکاران (۱۹۹۸)، ثابت کردند که میزان هورمون پروژسترون و تستوسترون سرم خون ماهیان نر و ماده در مرحله نهایی رسیدگی جنسی، همزمان با تکامل گنادها در فصل تخم‌ریزی (بهار) در ماهی *Epinephelus morio* افزایش یافته و به بالاترین حد خود می‌رسد، ولی بعد از تخم‌ریزی میزان آن‌ها کاهش یافته و به حداقل می‌رسد. در واقع نوسان در هورمون‌های استروئیدی مرتبط با چرخه‌های تولیدمثلی سرانجام در رفتار تولید مثلی مؤثر بوده، و برای موفقیت در امر تولید مثل در همه مهره داران لازم و ضروری می‌باشند (بهمنی و همکاران، ۱۳۸۹). تستوسترون ممکن است فعالیت و تیلوژنی در غلظت‌های بالای خود داشته باشد (Fostier et al., 1983)، بنابراین، در نگهداری اووسیت‌ها در

هنگام تکامل و تیلوژنیز نقش مهم ایفا کند (Kime, 1993).

میانگین هورمون GTHII در سرم خون مولدین مطالعه حاضر، در زمان قبل از تزریق و قبل از تکثیر در غلظت‌های مختلف دارای اختلاف معنی‌دار آماری بود ($P < 0.05$). بر اساس نتایج حاصل میزان هورمون II GTH قبل از تکثیر در سه غلظت مذکور کمتر از میزان هورمون در زمان قبل از تزریق بود. بطوریکه قبل از تکثیر میزان این هورمون کاهش یافت. مطالعات محققین نشان داد که میزان این هورمون به طور قابل توجهی در هیپوفیز و خون، در طول مراحل رشد و نمو جنسی تغییر می‌یابد، بطوریکه GTHII، گنادوتروپین غالب در زمان بلوغ نهایی اووسیت می‌باشد (Nagahama et al., 1995). می‌توان اذعان نمود این هورمون یکی از چند عامل اصلی در اوولاسیون تخمک ماهیان ماده بوده که در اثر تحریک هورمون محرک مترشح از هیپوتالاموس یعنی GnRH روی بخش پیشین هیپوفیز غده‌ای در مراحل پس از زرده- سازی آزاد می‌شود و باعث رسیدگی نهایی تخمک در تخمدان می‌گردد. قبل از اوولاسیون به دلیل عدم نیاز به این هورمون از مقدار آن در پلاسمای خون کاسته می‌شود (Kumakura et al, 2004). یعنی گنادوتروپین‌ها با اثر روی گنادها و سپس ترشح هورمون‌های استروئیدی از لایه تکا و گرانولوزای تخمدان (مانند هورمون‌های استروژنی از تخمدان) سبب رسیدگی جنسی اولیه، نهایی و نیز بروز صفات ثانویه در ماهی می‌شوند (Khan et al., 1999) که با نتایج به‌دست آمده در این تحقیق مطابقت دارد. در مجموع با توجه به نتایج پژوهش حاضر می‌توان اذعان نمود که با استفاده از هورمون‌های تولید مثلی تستوسترون و گنادوتروپین

- hormonal treatment. Journal of Fish Biology, 64 (5): 1330-1338.
5. Bukovskaya, O.S., Lambert, J.G.D., Kime, D.E. 1997. In vitro steroidogenesis by gonads of the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedti* Brandt. Fish Physiology and Biochemistry, 16: 345-353.
 6. Erdogan, O., Haliloglu, H.I. and Ciltas, A., 2001. Annual cycle of serum gonadal steroids and serum lipids in *Capoeta capoeta umbla*, 1772 (Pisces: Cyprinidae). Turkish Journal of Veterinary and Animal Science, 26:1093-1096.
 7. Fontaine, P., Sulisty, I., Richard, Jgardeur, J.N., Capdeville, B., Kestemont, P., 1998. Reproductive cycle and plasma levels of sex steroids in female Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. Aquatic Living Resource, 11, (2): 101-110.
 8. Fosteir, A., Jalabert, B., Billard, R., Breton, B., 1983. The gonadal steroids. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. (Eds.), Fish Physiology, Vol IXA. Academic press, New York, pp.277-372.
 9. Horvath, L., Peteri, A., Kouil, J., 1986. Successful Sterlet, *Acipense ruthenus* L., Propagation with synthetic LHRH hormone. Aquaculture and Fisheries Management, 17, 113-116.
 10. Johnson, A.K., Thomas. P. and Wilson R.R., 1998. Seasonal cycles of gonadal development and plasma sex steroid levels in *Epinephelus morio*, a protogynous grouper in the eastern Gulf of Mexico. Journal of Fish Biology, 52:502-518.
 11. Khan, I.A., Hawkins, M.B. and Thomas, P., 1999. Gonadal stage-dependent effects of gonadal steroids on gonadotropin II secretion in the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). Biology of Reproduction, 61, 834-841.
 12. Kime, D.E., 1993. Classical and non classical reproductive steroid in fish. Review Fish Biology Fishereis, 3,160-180.
 13. Kumakura, N., Okuzawa, K., Gen, K. Yamaguchi., Lim, B.S. and Kagawa, H., 2004. Effects of gonadotropin-releasing hormone on Pituitary ovarian axis of one-year old pre-pubertal Red Sea Bream. General and Comparative Endocrinology, 138, 105-112.
 - Nagahama, Y., Yoshikoni, M., Yamashita, M., Tokamoto, T. and Katsa, Y., 1995. Regulation of Oocyte growth and maturation in fish. Current Topics in Developmental Biology, 30(103-145).
 14. Troscott, B., Idler, D.R., So, Y.P. and Walsh, J.M., 1986. Maturational migratory sockeye

II می‌توان به زمان دقیق تزریق مولدین پی برد. همچنین می‌توان گفت، غلظت ۴ میکروگرم هورمون LHRHA₂ مناسب‌ترین غلظت جهت افزایش راندمان تکثیر مصنوعی (افزایش تولید لارو و بچه ماهی) مولدین تاسماهی ایرانی می‌باشد.

سپاسگزاری

از مدیریت محترم و همکاران بخش تکثیر مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری شهید بهشتی رشت و محققین بخش فیزیولوژی و بیوشیمی موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر و کلیه کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری می‌شود.

منابع

۱. بهمنی، م.، کاظمی، ر.، یوسفی جوردی، ا.، یزدانی ساداتی، م.ع.، پوردهقانی، م.، حلاجیان، ع.، دژندیان، س. و محسنی، م.، ۱۳۸۹. گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی، بررسی امکان تکثیر مصنوعی شیپ و تاسماهی ایرانی پرورشی. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۸۰ ص.
۲. صافی، ش.، ۱۳۷۷، اندازه‌گیری هورمون‌های مشابه LH و FSH، پروژسترون، استرادیول و تستوسترون در ماهی قره برون جهت تفکیک ماهیان مولد بارور و نابارور. رساله دکتری. دانشگاه تهران. ۶۰ ص.
3. Barannikova, I.A., 1997. Sex steroid concentration in blood serum of Sturgeons and its specific cytosol binding in brain in different stages of migratory cycle. 3th International Symposium Of sturgeon, Italy.
4. Barannikova, I.A., Bayounova, L.V., Semenkov, T.B., 2004. Serum levels of testosterone, 11-ketotestosterone and estradiol-17 β in three species of sturgeon during gonadal Development and final maturation induced by

- Chalcalburnus tarichi* pallas.1811. Turkish Journal of Veterinary and Animal Science, 29: 645-653.
17. Webb, M.A.H., Feist G.W., Trant, J.M., Van Eenennaam, J.P., Fitzpatrick, M.S., Schreck, C.B., Doroshov, S.I., 2002. Ovarian steroidogenesis in White Sturgeon (*Acipenser transmontanus*) during oocyte maturation and induced ovulation. General and Comparative Endocrinology, 129:27–38.
 - salmon. General and Comparative Endocrinology, 62(1): 99- 110.
 15. Pavlick, R.J., and Moberg, G.P., 1997. Dopaminergic influence on gonadotropin secretion in White Sturgeon (*Acipenser transmontanus*). Fish Physiology and Biochemistry, Vol. 16No.1 pp 35-43.
 16. Unal, C., Arakisi, H., Elp, M., 2005. Ovarian follicle ultrastructure and change in levels of ovarian steroids during oogenesis in