اثر ایمپلنت هورمون ۱۷ بتا- استرادیول بر روند توسعه گنادی فیل ماهیان پرورشی در مرحله پیش زرده سازی

سبحان رعنای اخوان[۱]، بهرام فلاحتکار[۱*]، محمد حسین طلوعی گیلانی[۲] و باقر مجازی امیری[۳]

[۱] صومعه سرا، دانشگاه گیلان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات

[۲] بندرانزلی، اداره کل شیلات استان گیلان

[۳] کرج، دانشگاه تهران، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات و محیط زیست

تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۱/۵/۱۴

چکیده

نظر به روند طولانی بلوغ در ماهیان خاویاری، امروزه از راهکارهای مختلف مدیریتی، تغذیه‌ای و دستکاری‌های اندوکراینی محور تولیدمثلی برای تحریک رسیدگی جنسی استفاده می‌شود. ۱۷- بتا استرادیول یک هورمون ماده ساز بوده که به عنوان یکی از موثرترین هورمون‌های استروژنی شناخته می‌شود. مطالعه حاضر به بررسی اثر سطوح مختلف ایمپلنت هورمون استرادیول بر روند توسعه گنادی در ۲۰ عدد از فیل ماهیان پرورشی سه ساله که در مرحله پیش زرده سازی بودند، می‌پردازد. فیل ماهیان این مطالعه به صورت داخل صفاقی هر ۱/۵ ماه با کپسول‌هایی که با ۳، ۶ و ۱۲ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن استرادیول و کره کاکائو به عنوان حامل پر شده بودند مورد ایمپلنت قرار گرفتند و ماهیان تیمار کنترل، کپسول‌هایی را که تنها محتوی حامل بود دریافت نمودند. این میزان هورمون با توجه به نیاز متابولیک و بر اساس وزن بدن ماهیان انتخاب گشت. ماهیان در پایان مدت مطالعه (پس از طی ۱۹۰روز) برای تعیین مرحله رسیدگی جنسی، اندازه‌گیری قطر تخمک و تهیه اسلایدهای بافت شناسی مورد بیوپسی قرار گرفتند. مطالعات بافت شناسی به شیوه کلاسیک و رنگ آمیزی بافت به روش هماتوکسیلین-ائوزین و به وسیله مطالعات میکروسکوپیک و اندازه‌گیری از طریق نرم افزار Adobe Photoshop CS5 انجام گرفت. در اندازه‌گیری قطر تخمک ماهیان در پایان مدت مطالعه اختلاف معنی‌دار آماری در تیمارهای مختلف وجود نداشت (P>۰/۰۵). در بررسی هیستولوژیک به عمل آمده در پایان مدت مطالعه نیز هیچ اختلاف معنی‌داری به لحاظ مساحت تخمک، قطر تخمک، مساحت هسته، قطر هسته و نسبت مساحت هسته به مساحت تخمک مشاهده نشد (P>۰/۰۵). با تکیه بر مطالعات بافت شناسی و شاخصهای اندازه‌گیری شده در تخمک فیل ماهیان می‌توان بیان داشت که به کارگیری هورمون سبب تغییر در تخمک فیل ماهیان شده است اما به دلیل رشد کند تخمک در این مرحله و مدت محدود استفاده از این هورمون، اختلاف معنی‌داری یافت نشد.

واژه های کلیدی: فیل ماهی، ۱۷- بتا استرادیول، پیش رسی جنسی، ایمپلنت هورمون، هیستولوژی گناد

* نویسنده مسئول، تلفن: ۳۲۲۳۵۹۹-۰۱۸۲ ، پست الکترونیکی: falahatkar@guilan.ac.ir

مقدمه

در آبهای جهان ۲۷ گونه انواع ماهیان خاویاری وجود دارد که ارزش اصلی این ماهیان به واسطه خاویار بسیار مرغوب و ارزشمند و هم‌چنین گوشت‌گران قیمت آن‌ها می‌باشد (۳،۲ و۵). در بین ماهیان خاویاری خزر، فیل ماهی نه فقط به عنوان بزرگترین ماهی این دریا، بلکه بزرگترین ماهی در بین کلیه ماهیان آبهای شیرین می‌باشد. فیل ماهی به دلایل متعددی از جمله قابلیت اهلی شدن سریع و آسان، پذیرش زندگی در شرایط اسارت، سازگاری بسیار خوب به غذای

مصنوعی، سرعت رشد بالاتر، مقاومت بیشتر در مقابل استرس‌های محیطی و مدیریتی (۹)، خاویار گران بهاتر و قابلیت ایجاد دورگه بارور بستر بیش از سایر گونه‌های ماهیان خاویاری، مناسب جهت پرورش گوشتی و حتی تولید خاویار شناخته شده است.

استراتژی زندگی ماهیان خاویاری به گونه‌ای است که رسیدگی جنسی آن‌ها سالیان طولانی به درازا می‌انجامد. به طوریکه رسیدگی جنسی برای اولین بار در سن ۱۶-۱۰ سالگی در فیل ماهیان نر و۲۰- ۱۴ سالگی در ماهیان ماده اتفاق می‌افتد (۱۲). البته در شرایط مصنوعی می‌توان این زمان را در بسیاری از گونه‌های ماهیان خاویاری کاهش داد (۵). علاوه بر این، فاصله زمانی بین تخم‌ریزی‌ها نیز ممکن است چند سال (حتی ۲- ۳ سال) طول بکشد.

با توجه به این که محیط پرورشی از زیستگاه طبیعی ماهیان متفاوت می‌باشد درک رفتار و عملکرد ماهیان در شرایط اسارت و بررسی عواملی که در میزان کارایی تولید این ماهیان به هنگام پرورش دخیل هستند ضرورت پیدا می-نماید. در میان عوامل گوناگونی که تولیدمثل را تحت تاثیر قرار می‌دهند امروزه نقش هورمون‌ها به وضوح در کنترل تولید مثل ماهیان شناخته شده است (۴). با توجه به این مساله که رشد تخمک در ماهیان ماده پرورشی در مرحله پیش از زرده سازی بسیار کند شده و سلول‌های اووگونیا در مرحله پروفاز وارد مرحله سکون می‌شوند و نظر به ناشناخته باقی ماندن طول این دوره در ماهیان خاویاری و مدت زمان طولانی عبور از این مرحله به مرحله زرده سازی (۲۱)، امروزه در جهت حل این مشکل، برای دستیابی به سود بیشتر، افزایش عملکرد تولیدمثلی، کاهش سن تخمریزی، همزمان نمودن اوولاسیون و پیش رسی مولدین تلاش بر این است تا تحریک زرده سازی و القای مراحل بعدی رسیدگی تخمدان به کمک دستکاری‌های هورمونی (دستکاری اندوکراینی محور تولید مثلی) انجام پذیرد (۱۸،۱۶،۱و۲۱). این امر از این حیث حائز اهمیت است که ترشح یا عدم ترشح برخی از هورمون‌های موثر بر محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- گناد (HPG)، از دلایل اصلی طولانی تر شدن مرحله سکون تخمدان است (۲۲). امروزه کنترل هورمونی به عنوان یک ابزار مطالعاتی و کاربردی در جهت تکثیر و پرورش آبزیان بکار گرفته می-شود به نحوی که کاشت (Implantation) برخی از هورمون‌ها می‌تواند باعث جلو انداختن رسیدگی و موفقیت تولیدمثل (القای اوولاسیون) شود.

هورمون‌های جنسی از مهم‌ترین هورمون‌های استروئیدی محسوب می‌شوند. در این بین ۱۷ – بتا استرادیول (E_2) از جمله هورمون‌های استروئیدی است که نقش کلیدی آن در سنتز و تحریک ساخت پروتئین‌های زرده ای ویتلوژنین در هپاتوسیت‌های کبد بسیار برجسته است (۲۰ و ۲۵). همچنین این هورمون در توسعه عصبی، رشد، رسیدگی جنسی، کنترل فرایندهای تولیدمثلی و تنظیم تکثیر سلولی در بافت های عادی و سرطانی نیز نقش ایفا می‌نماید (۱۹).

مطالعات محدودی در زمینه القای زرده سازی در ماهیان خاویاری انجام گرفته است (۱ و ۲۱). بنابراین، با توجه به وجود اثرات مثبت هورمون استرادیول بر تحریک و سنتز زرده سازی و نظر به توقف طولانی مدت تخمک ماهیان خاویاری در مرحله پیش زرده سازی، این مطالعه به منظور بررسی اثر E_2 بر شاخصهای تخمک و هیستولوژی گناد و به دنبال یافتن راهکاری مناسب برای کوتاه کردن دوره بلوغ و تسریع در گذار از مرحله پیش زرده سازی در نظر گرفته شد.

مواد و روشها

ماهی: فیل ماهیان مورد استفاده در این مطالعه حاصل تکثیر مصنوعی مولدین سال ۱۳۸۵ در مجتمع تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی بودند که پس از عادت دهی به غذای دستی، به مزرعه پرورش ماهیان خاویاری قرق تالش منتقل شده و در آن جا به مدت سه

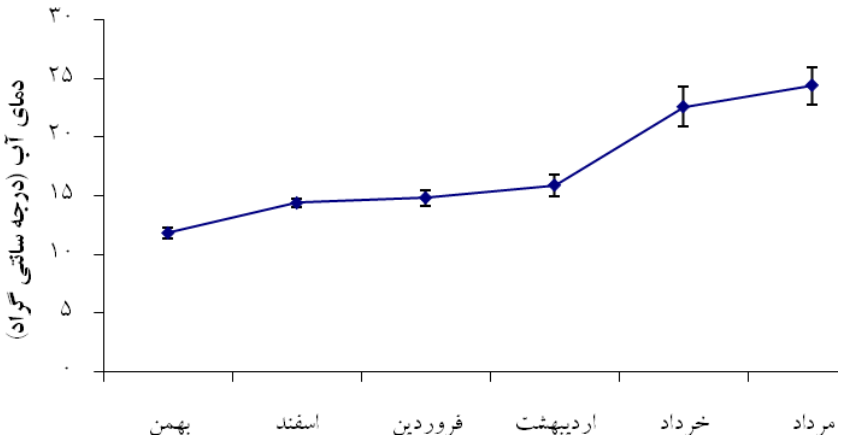
سال مورد پرورش قرار گرفته بودند. برای انتخاب ماهیان پس از ایجاد شکاف کوچک یک سانتی‌متری (به اندازه قطر سیستوسکوپ دستگاه لاپاراسکوپ) به وسیله اسکالپل شماره ۲۲، ماهیان به کمک دستگاه لاپاراسکوپ (LUT GmbH, Denzlingen, Germany) تعیین جنسیت شده (۹) و از میان ۷۰ ماهی ماده، ۲۰ عدد ماهی که بیشترین قرابت را به لحاظ وزنی (۱۶۷/۳۵ ± ۶۹۶۹/۷۵ گرم (mean ± SE)) و مرحله رسیدگی جنسی (ابتدای مرحله پیش زرده سازی) داشتند برای انجام مطالعه انتخاب گردیدند. نمونه-های کوچکی از گناد ماهیان به روش بیوپسی برای تشخیص دقیق مرحله رسیدگی جنسی و تهیه اسلایدهای بافت شناسی جدا گردید (۱۱).

مخازن پرورش و شرایط نگهداری: از سه حوضچه گرد با قطر ۳ متر، عمق ۵۷ سانتی متر، حجم آبگیری حدود ۴ متر مکعب و دبی ۴ ± ۳۳ لیتر بر دقیقه استفاده شد. میانگین دمایی در طی دوره مطالعه ۰/۲ ± ۱۸/۴ درجه سانتی‌گراد بود. روند تغییرات دمایی در طول مدت مطالعه در شکل ۱ ارائه شده است. میانگین اکسیژن محلول در آب mg/l ۰/۸ ± ۷ بود و دوره نوری متاثر از شرایط محیط طبیعی کارگاه بود. تغذیه ماهیان روزانه طی سه وعده (ساعات ۷:۳۰، ۳۰: ۱۵و ۲۲:۳۰) با غذای GFT3 قزل آلای فرادانه (شهرکرد، ایران) به میزان ۱٪ وزن بدن و به صورت دستی اعمال گردید.

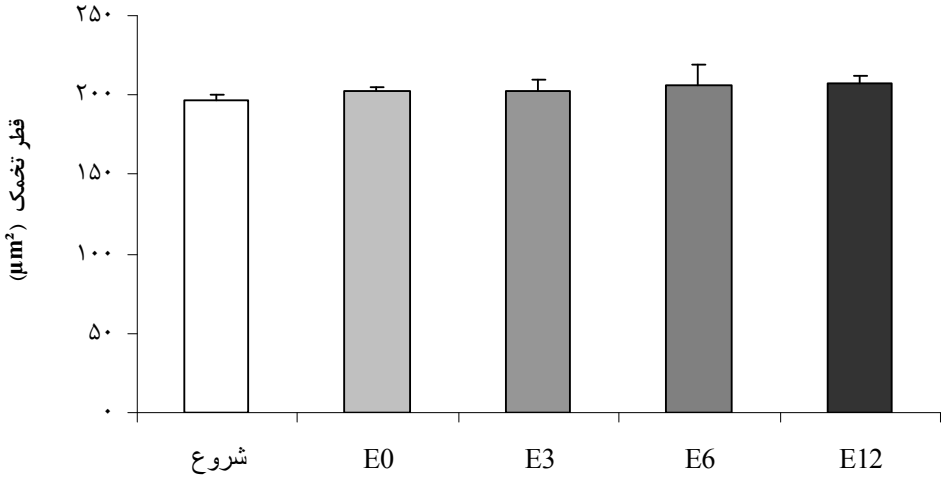
طراحی آزمایش و ایمپلنت هورمون: هورمون ۱۷- بتا استرادیول (E_2) استفاده شده در این مطالعه از شرکت Sigma-Aldrich(St Louis, MO - USA) تهیه شد. برای تهیه کپسول‌های هورمونی، با توجه به وزن ماهیان و تیمار مورد آزمایش، مقدار مناسب هورمون به کمک ترازوی با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم توزین شد (Sartorius, Germany). در این مطالعه از کره کاکائو (Altinmarka, Istanbul, Turkey) به عنوان حامل استفاده گردید (۲۳).

۴ تیمار و برای هر تیمار، ۵ قطعه ماهی به عنوان تکرار در نظر گرفته شد. تیمارها شامل سطح ۳، ۶ و ۱۲ میلی-گرم/کیلوگرم وزن بدن استرادیول و کره کاکائو تیمار شدند و ماهیان تیمار کنترل که تنها دریافت کننده کپسول‌های حاوی صرفاً کره کاکائو بودند. ایمپلنت هورمون هر ۱/۵ ماه یکبار به صورت داخل صفاقی (Intraperitoneal) انجام پذیرفت. در این مرحله، ناحیه شکمی ماهیان به اندازه ۱ سانتی‌متر به کمک اسکالپل شماره ۲۲ باز گردید و پس از ایمپلنت هورمون در ناحیه صفاقی، محل شکاف با یک بخیه بسته شد (۷). در پایان مدت مطالعه (پس از ۱۹۰ روز پرورش)، اقدام به بیوپسی گناد برای مشاهده وضعیت گنادی ماهیان و تهیه مقاطع بافت شناسی برای ارزیابی وضعیت رسیدگی ماهیان گردید و نمونه بافت در محلول فیکساتیو بوئن حاوی ۷۵٪ اسید پیکریک، ۲۵٪ فرمالین و ۵٪ اسید استیک، به مقدار حدود پنج برابر مقدار بافت تا تهیه اسلاید بافت شناسی تثبیت گردید.

تهیه مقاطع بافت شناسی: آماده سازی نمونه‌ها و تهیه اسلایدهای میکروسکوپی مطابق روش (Hinton1990) انجام شد. برای این منظور پس از نمونه برداری از گناد، عمل آوری بافت انجام گرفت. این گام شامل سه مرحله آبگیری، شفاف‌سازی و پارافینه نمودن بود. در مرحله آبگیری بافت‌ها به کمک دستگاه عمل آور بافت و قرار دادن آن در الکل با درجات مختلف عمل آبگیری صورت پذیرفت. در مرحله بعد، به منظور شفاف‌سازی، بافت‌ها به مدت سه ساعت در گزیلل قرار گرفتند. در این مرحله گزیلل جایگزین الکل گشت. در مرحله پارافینه کردن و قالب‌گیری، پارافین جامد با دمای ذوب۶۰-۵۸ درجه سانتی‌گراد برای پارافینه کردن بافت استفاده شد. در پایان، برش µm ۶-۵ از قالب‌های پارافینی با میکروتوم (Leica RM 2125RT, China) زده شد. رنگ‌آمیزی بافت نیز به روش هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) انجام گرفت.



شکل ۱- روند تغییرات دمایی (میانگین ± SE) آب در ماه های مختلف در حوضچه های پرورش فیل ماهیان تحت آزمایش.

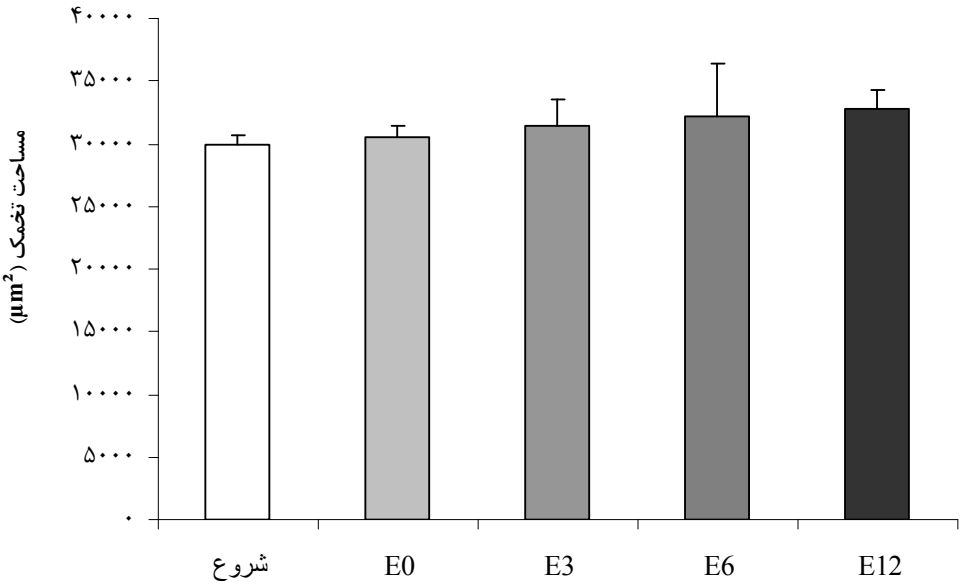


شکل ۲- مقایسه تغییرات قطر تخمک در فیل ماهیان ایمپلنت شده با سطوح مختلف هورمون E_2 پس از ۱۹۰ روز مطالعه و مقایسه آن با زمان آغاز. مقادیر به صورت میانگین ± SE ارائه شده است. E_0 = تیمار کنترل، E_3 = 3 mg E_2/kg، E_6 =6 mg E_2/kg و E_{12} = 12 mg E_2/kg. اختلاف معنی دار آماری در میان تیمارها مشاهده نشد (P >۰/۰۵).

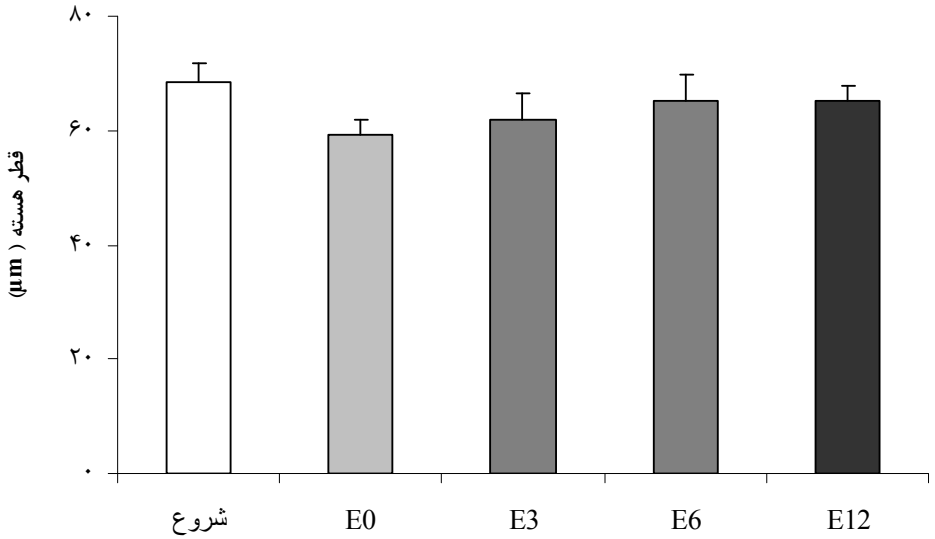
مطالعات هیستولوژیک: پس از تهیه اسلایدهای بافت شناسی، عکسبرداری از بزرگ ترین و پیشرفته ترین تخمک های اسلایدها به وسیله عدسی ۴۰ × میکروسکوپ نوری (Olympus SZ-STU2, Japan) انجام گرفت. سپس به کمک نرم افزار Adobe Photoshop CS5 (Version 12.0) مساحت تخمک، قطر تخمک، مساحت هسته، قطر هسته و نسبت مساحت هسته به مساحت تخمک محاسبه گردید. مرحله رسیدگی جنسی فیل ماهیان این مطالعه با توجه به اندازه‌گیری‌های انجام گرفته بر روی نمونه‌های تخمک و اسلایدهای بافت شناسی و هم چنین مقایسه خصوصیات ذکر شده در کلیدهای شناسایی نظیر تمایز یا عدم تمایز لایه‌های فولیکولی برای ماهیان خاویاری تعیین گردید (۲۲).

آنالیز آماری داده‌ها: برای بررسی آماری داده‌ها از نرم افزار SPSS (Version 18, Chicago, IL, USA) استفاده شد. جهت مقایسه تغییرات قطر تخمک و شاخصهای اندازه-

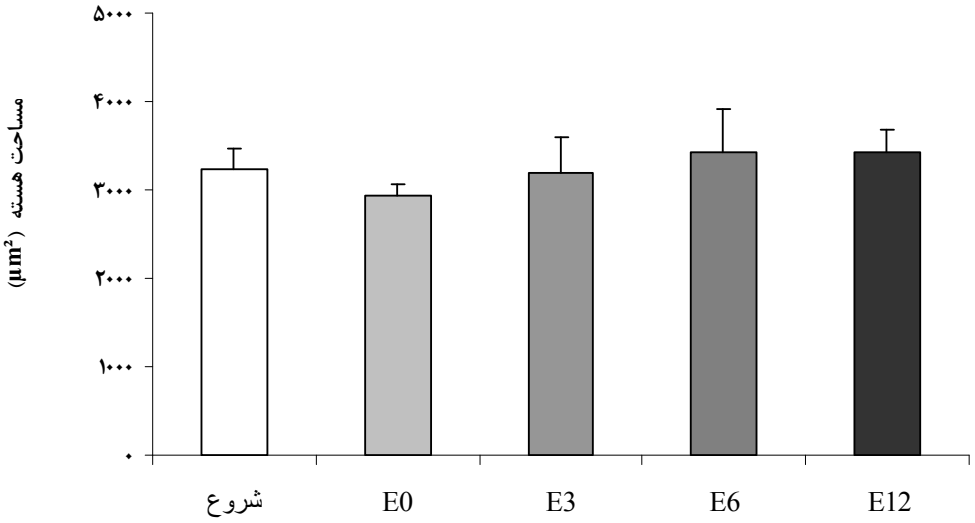
گیری شده در اسلایدهای بافت شناسی فیل ماهیان تیمارهای مختلف در پایان مدت مطالعه، از آزمون One-way ANOVA استفاده شد. پس از مشاهده اختلافات در میانگین‌ها، جهت تعیین اختلاف در تیمارها از آزمون Tukey استفاده گردید. سطح معنی‌داری داده‌ها در حد ۹۵ درصد و داده‌های درون متن به صورت میانگین ± خطای معیار ارائه شده است.



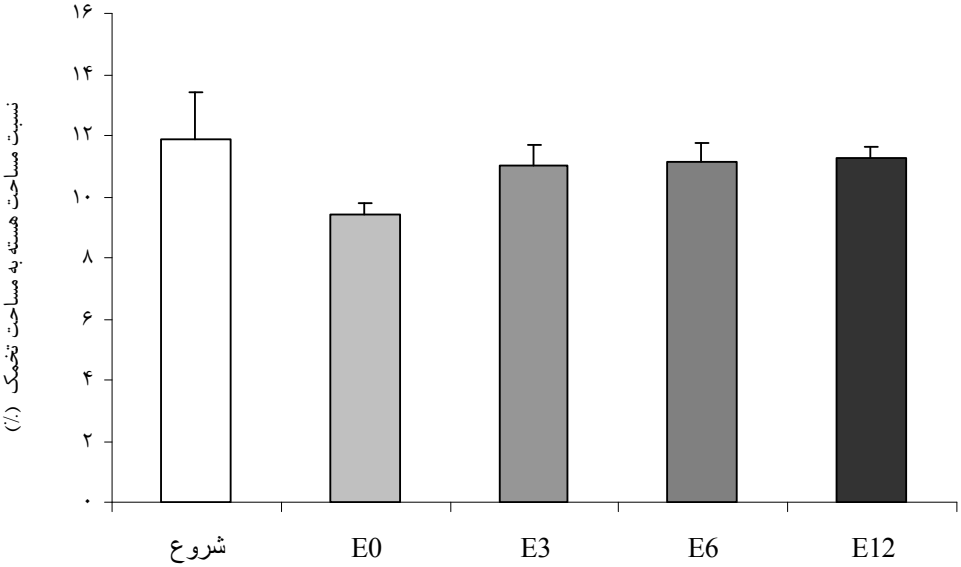
شکل ۳- مقایسه تغییرات مساحت تخمک در فیل ماهیان ایمپلنت شده با سطوح مختلف هورمون E_2 پس از ۱۹۰ روز مطالعه و مقایسه آن با زمان آغاز. مقادیر به صورت میانگین ± SE ارائه شده است. E_0 = تیمار کنترل، E_3 = 3 mg E_2/kg، E_6 =6 mg E_2/kg و E_{12} = 12 mg E_2/kg. اختلاف معنی دار آماری در میان تیمارها مشاهده نشد (P>۰/۰۵).



شکل ۴- مقایسه تغییرات قطر هسته در فیل ماهیان ایمپلنت شده با سطوح مختلف هورمون E_2 پس از ۱۹۰ روز مطالعه و مقایسه آن با زمان آغاز. مقادیر به صورت میانگین ± SE ارائه شده است. E_0 = تیمار کنترل، E_3 = 3 mg E_2/kg، E_6 =6 mg E_2/kg و E_{12} = 12 mg E_2/kg. اختلاف معنی دار آماری در میان تیمارها مشاهده نشد (P >۰/۰۵).



شکل ۵- مقایسه تغییرات مساحت هسته در فیل ماهیان ایمپلنت شده با سطوح مختلف هورمون E_2 پس از ۱۹۰ روز مطالعه و مقایسه آن با زمان آغاز. مقادیر به صورت میانگین ± SE ارائه شده است. E_0 = تیمار کنترل، E_3 = 3 mg E_2/kg، E_6 =6 mg E_2/kg و E_{12} = 12 mg E_2/kg. اختلاف معنی دار آماری در میان تیمارها مشاهده نشد (P>۰/۰۵).



شکل ۶- مقایسه تغییرات مساحت هسته به مساحت تخمک در فیل ماهیان ایمپلنت شده با سطوح مختلف هورمون E_2 پس از ۱۹۰ روز مطالعه و مقایسه آن با زمان آغاز. مقادیر به صورت میانگین ± SE ارائه شده است. E_0 = تیمار کنترل، E_3 = 3 mg E_2/kg، E_6 =6 mg E_2/kg و E_{12} = 12 mg E_2/kg. اختلاف معنی دار آماری در میان تیمارها مشاهده نشد (P >۰/۰۵).

نتایج

مقایسه شاخصهای بافت شناسی تخمک: نتایج حاصل از بررسی‌های به عمل آمده بر روی مقاطع بافت شناسی تخمک ماهیان تیمارهای مختلف در زمان آغاز و در پایان مدت مطالعه نشان داد که هیچ اختلاف معنی‌داری به لحاظ شاخصهای اندازه‌گیری شده بین ماهیان تیمارهای مختلف وجود ندارد. در اندازه‌گیری قطر تخمک ماهیان تیمارهای مختلف، بالاترین میانگین در تخمک‌های تیمار سطح بالای هورمون (E_{12}) به میزان ۴/۱۲ µm ± ۲۰۷/۵۲ و پایین‌ترین قطر در تخمک ماهیان تیمار کنترل به میزان ۳/۰۳ µm ±۲۰۲/۲۴ مشاهده شد، هر چند این میزان همچنان از

میانگین قطر اندازه‌گیری شده در ماهیان در زمان آغاز ۳/۶ ± ۱۹۷/۰۵ بالاتر بود اما اختلاف معنی‌داری بین مقادیر اندازه‌گیری شده قطر تخمک وجود نداشت (شکل ۲. F= ۰/۱۹۲ ; df= ۳; *P*= ۰/۹۰۱). در بررسی مساحت تخمک ماهیان مشابه قطر تخمک، بالاترین مقادیر در ماهیان تیمار E_{12} به میزان ۱۴۲۵۸/۷۴ μm^2 ± ۳۲۷۹۲/۹۸ و پایین‌ترین مقادیر در تیمار کنترل به میزان ۹۰۸/۴۶ μm^2 ± ۳۰۴۵۸/۱۲ مشاهده شد، هر چند مساحت تخمک نسبت به زمان آغاز (۷۶۸/۱۴ μm^2 ± ۲۹۸۸۹/۹۱) بیشتر بود، اما اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۳. F= ۰/۳۴۰df= ۳; *P*= ۰/۷۹۶ ;۳). در بررسی قطر هسته مشخص شد که بالاترین میزان قطر هسته در نمونه‌های آغاز دوره µm ۳/۴۸ ± ۶۸/۳۹ و پایین‌ترین میزان در ماهیان تیمار کنترل به میزان µm ۲/۳۸ ± ۵۹/۳۷ بود، هر چند اختلاف معنی‌دار نبود (شکل ۴. F= ۰/۸۹۱۲; df = ۳; *P*=۰/۴۵۴). در بررسی مساحت هسته، بالاترین مقادیر در ماهیان تیمارهای E_6 و E_{12} به میزان ۴۷۶/۲۵ μm^2 ± ۳۴۲۸/۸۳ و ۲۶۳/۱۸ ± ۳۴۲۶/۸۷ و پایین‌ترین میزان در ماهیان تیمار کنترل μm^2 ۱۳۲/۴۹ ± ۲۹۳۳/۱۲ مشاهده گردید (شکل ۵. F= ۱/۰۴۶; df = ۳*P*= ۰/۳۸۲ ;). در بررسی نسبت مساحت هسته به مساحت تخمک نیز اختلاف معنی‌داری یافت نشد (شکل ۶. F= ۱/۶۱۱; df = ۳; *P*=۰/۶۲۰).

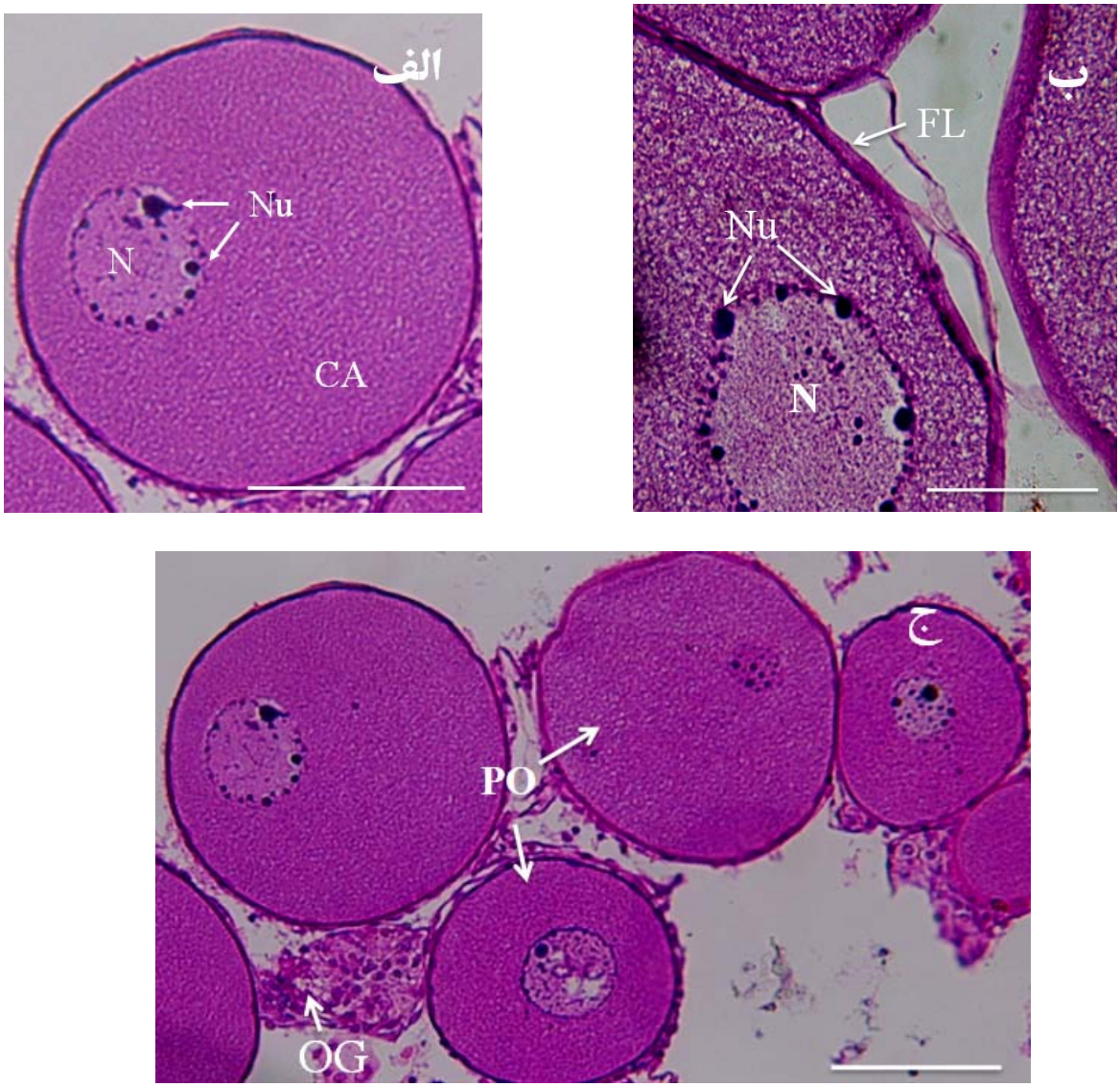
تغییرات هیستولوژیک و مرحله رسیدگی جنسی: نتایج مربوط به بررسی تصاویر هیستولوژیک ماهیان با میکروسکوپ نوری در پایان ۱۹۰ روز مدت مطالعه نشان داد که توسعه فولیکول‌های تخمدانی به وسیله تیمارهای مطالعه تحت تاثیر قرار نگرفت. مقایسه نتایج حاصل از تصاویر هیستولوژیک مطالعه حاضر با کلیدهای تشخیص نشان داد که به طور کلی کلیه ماهیان این مطالعه در مرحله پیش زرده سازی و به عبارت بهتر در مرحله Perinucleolus stage قرار دارند (شکل ۷).

بحث

مطالعه بافت شناسی و شاخصهای اندازه‌گیری شده در تخمک فیل ماهیان مطالعه حاضر نشان داد که بکارگیری هورمون استرادیول سبب تغییرات اندکی در رشد و توسعه تخمک ماهیان شده است، اما به دلیل رشد کند تخمک در مرحله پیش زرده سازی و مدت محدود استفاده از این هورمون، اخلاف معنی‌داری در بین ماهیان تیمارهای مختلف مشاهده نشد. میانگین قطر تخمک فیل ماهیان این مطالعه که در مرحله Perinucleolus قرار داشتند µm ۵/۳۶ ± ۲۰۴ بود. این میزان در فیل ماهیان پرورشی هفت ساله پیکان حیرتی و همکاران (۱۳۸۸) بین ۲۳۷/۲ – ۲۰۰/۴ بود (۱). همچنین مقادیر مذکور تقریباً مشابه با مقادیر قطر تخمک در تاسماهی سفید *Acipenser transmontanus* (µm ۳۰۰–۱۰۰) و یا تاسماهی اطلس *A. oxyrinchus* (حدود µm ۲۱۰) در مرحله پیش زرده سازی بود (۶ و۲۵). این در حالی بود که قطر تخمک ماهیان این مطالعه در مقایسه با قطر تخمک تاسماهیان روسی *A. gueldenstaedtii* که در مرحله پیش زرده سازی بودند (µm ۵۰ ±۴۰۰) کوچکتر به نظر می‌رسید (۱۳) و از اندازه تخمک‌های ماهیان دورگه بستر µm ۲۰۰– ۶۰ بزرگتر بود (۲۰). علت تفاوت در قطر تخمک‌های مطالعات مختلف را می توان در ویژگی‌های خاص هر گونه، تفاوت‌های بین نژادها، سن و اندازه ماهیان و حتی شرایط نگهداری و تغذیه‌ای آن‌ها دانست (۸، ۲۶ و ۲۹). علاوه بر این موارد، اختلاف در زمان نمونه‌برداری از ماهیان را می توان از جمله علل احتمالی دخیل در این امر دانست. به طور کلی نگهداری ماهیان در شرایط مطلوب چه از نظر تراکم و چه از نظر تغذیه‌ای می تواند سبب کاهش سن بلوغ و مدت زمان مورد نیاز برای تکمیل مراحل مختلف رسیدگی جنسی ماهیان از جمله مرحله پیش زرده سازی گردد.

Lokman و همکاران در مطالعه بر روی اثرات هورمون-های مختلف از جمله استرادیول بر اندازه قطر تخمک مارماهی استرالیایی *Anguilla australis* در مرحله پیش زرده سازی در شرایط *In vitro* به این نتیجه رسیدند که

تنها آندروژن ۱۱-کتوتستوسترون و IGF-I نوترکیب انسانی قادر به افزایش قطر تخمک ها هستند. در نتیجه، نقش ۱۱-کتوتستوسترون در مقایسه با استرادیول در مراحل اولیه توسعه گنادی تشخیص داده شد (۱۷).



شکل ۷- مقاطع بافت شناسی تهیه شده از ماهیان در پایان ۱۹۰روز مطالعه به روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (H&E). N = هسته، Nu= هستک، CA = سیتوپلاسم، FL = لایه فولیکولی، PO = تخمک در مرحله Perinucleolus. الف و ج – نمایی از تخمک ماهیان تیمار سطح بالای هورمون ب- نمایی از تخمک ماهیان تیمار کنترل. بزرگنمایی ۱۰۰۰ (الف و ب) و ۲۰۰ (ج) برابر. مقیاس ۱۰۰ میکرومتر.

Kortner و همکاران به نقش محرک آندروژن های تستوسترون و ۱۱-کتوتستوسترون در رشد تخمک ها در مرحله پیش زرده سازی در ماهیان کاد اقیانوس اطلس *Gadus morhua*به صورت *In vivo* اشاره نمودند. تحریک مراحل رشد تخمک بدون تغییر میزان استرادیول پلاسما و بیان ژن آروماتاز P450 در محل گناد، بیانگر نقش برجسته آندروژن ها در مقایسه با استرادیول در پیشرفت مرحله پیش زرده گیری در این گونه بود (۱۵). بر طبق شاخصهای

ارائه شده در مطالعه Mojazi Amiri و همکاران در مرحله Perinucleolous، همزمان با توسعه اووسیت ها، وابستگی سیتوپلاسم به رنگ اولیه به تدریج کم شده و هستک ها (nucleoli) در پیرامون قسمت داخلی پوشش هسته توزیع می شوند. در این مرحله سیتوپلاسم شبکه‌ای به صورت عمیق دیده می شود. این خصوصیات با مقاطع بافت شناسی تهیه شده از ماهیان این مطالعه هم خوانی داشت (۲۲). نتایج مطالعه حاضر مشابه تلاش‌های انجام گرفته برای القای زرده سازی به وسیله ایمپلنت‌های هورمونی (۲۱) و یا در معرض گذاری ماهیان نابالغ با هورمون‌های تولیدمثلی (۱۶ و ۱۸) نتوانست سبب القای زرده سازی در ماهیان مورد مطالعه شود. عدم توانایی فیل ماهیان ماده پرورشی ایمپلنت شده با سطوح مختلف E_2 به تحریک رسیدگی جنسی را شاید بتوان به علت عدم توانایی محور HPG تحت تاثیر E_2 برای ترشح مقادیر مناسب گنادوتروپین ها نسبت داد. از آن جایی که ترشح مقادیر کافی گنادوتروپین از محور HPG برای تحریک توسعه سیستم تولیدمثلی برای عبور از مرحله پیش زرده سازی ضروری است در نتیجه، سلول های فولیکولی قادر به سنتز مقادیر کافی استروژن برای تحریک تولید ویتلوژنین نیستند. لذا فولیکول آنقدر توسعه پیدا نمی‌کند که قادر به جذب ویتلوژنین باشد. این امر حتی در زمانی که غلظت‌های بالایی از E_2 در خون ماهیان وجود دارد نیز مشاهده شده است (۲۲). Chapman در مطالعه بر روی جنس ماده تاس ماهی سفید *A. transmontanus* ایمپلنت شده با E_2 توانست اثر تحریکی استرادیول را بر ترشح ویتلوژنین از کبد به اثبات برساند، اما به این نکته اشاره نمود که سطوح ویتلوژنین خون کاملاً تحت تاثیر کنترل استروژن نیست (۶). وی بیان داشت که E_2 قادر به تحریک تمایز تخمدانی نبوده و هم چنین نمی‌تواند اووسیت را به جذب ویتلوژنین تحریک نماید. جذب ویتلوژنین به وسیله اووسیت‌ها در ماهیان خاویاری مشابه سایر ماهیان به وسیله micropinocytosis صورت می‌گیرد و به نظر می‌رسد که تحت کنترل گنادوتروپین هیپوفیز می باشد (۲۷ و ۲۸). نظر به مشاهدات بافت شناسی انجام گرفته بر روی فیل ماهیان پرورشی مطالعه حاضر به نظر می‌رسد که این ماهیان قادر به آغاز طبیعی زرده سازی پیش از رسیدن به سن و اندازه مشخص نیستند. نتایج مطالعه Hurvitz و همکاران بر روی تاسماهیان روسی ماده ۴ و ۵ ساله *A. gueldenstaedtii* که با هورمون های GnRHa، GnRH + متوکلوپرومایند و hCG ایمپلنت شده بودند، هیچ تفاوتی را با ماهیان تیمار کنترل به لحاظ میزان E_2 نشان نداد. این در حالی بود که ماهیان ۶ ساله تیمار شده با هورمون‌های مشابه افزایش قابل توجهی در میزان E_2 را نشان ددند. آن‌ها دلیل عدم افزایش E_2 در پاسخ به GnRHa در ماهیان ۴ و ۵ ساله را فقدان گیرنده GnRH در سطح هیپوفیز و یا وجود گیرنده‌های اندک گنادوتروپین در سطح تخمدان دانستند. هم چنین دلیل پاسخ قابل توجه ماهیان به GnRHa در ماهیان ۶ ساله، افزایش میزان این گیرنده‌ها در این ماهیان در محدوده سنی ذکر شده بود (۱۳). مشابه این امر در ماهی کپور سیاه *Mylopharyngodon piceus* که از ماهیانی است که دیر به سن بلوغ می‌رسد مشاهده گردیده است (۱۰). علت عدم موفقیت در توسعه گنادی تاسماهیان را می‌توان به زمان تیمار نمودن ماهیان با استروئید نسبت داد (۲۴). به نظر می‌رسد که تاسماهیان می بایست مدت زمان طولانی‌تری با هورمون تیمار شوند. دلیل محتمل دیگر نبود و یا تراکم ناچیز گیرنده‌های مورد نیاز در سطح هیپوفیز تاسماهیان می‌باشد. البته لازم به ذکر است با توجه به اینکه E_2 اثرات سرکوب کننده ای بر رشد سوماتیک می گذارد تیمار نمودن با این هورمون باید در یک سطح مشخص، تعداد دفعات مناسب و زمان مطلوب صورت پذیرد تا بهترین اثر را داشته باشد. ۶ ماه تیمار نمودن با سطوح مختلف E_2 در مطالعه حاضر نشان از کاهش شاخصهای رشد و وزن در مقایسه با تیمار کنترل داشت (اطلاعات منتشر نشده). به طور کلی ایمپلنت ماهیان با تیمارهای به کارگرفته شده نتوانست سبب القای زرده سازی در فیل ماهیان این مطالعه

شود که این امر را می توان به رشد کند تخمک در مرحله پیش زرده سازی و مدت محدود استفاده از هورمون، سن پایین و نبود گیرنده های مورد نیاز در ماهیان تیمار شده نسبت داد. لذا، نتایج این مطالعه ضرورت تحقیقات آتی را در جهت روشن نمودن عوامل دخیل در توقف ماهیان خاویاری در مرحله زرده سازی روشن می نماید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مسئولین مزرعه پرورش ماهیان خاویاری قرق تالش به خاطر در اختیار قرار دادن ماهیان این مطالعه و امکانات مرکز و هم چنین از کمک‌های پرسنل محترم آن مرکز خصوصاً آقایان شاهواری و وزیری کمال تشکر را دارند. هم چنین از آقای دکتر سرژ دروشوف به خاطر راهنمایی‌های ارزشمند و از خانم مهندس سمانه پورسعید به خاطر کمک کردن در انجام مراحل مختلف این مطالعه تشکر و قدردانی می‌نماییم. انجام بخشی از این تحقیق با حمایت صندوق پژوهشگران کشور صورت گرفت که شایسته قدردانی و سپاس می باشد.

منابع

۱. پیکان حیرتی، ف.، ۱۳۸۸. مطالعه القای رشد تخمک فیل ماهی پرورشی در مرحله پیش زرده گیری با استفاده از کاشت هورمون. رساله دکتری شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران. ۸۸ ص.

۲. فلاحتکار، ب.، ۱۳۸۶. ساخت اسید اسکوربیک در سه گونه از ماهیان خاویاری (Acipenseriformes) و نقش آن در پارامترهای کمی رشد. مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۰. شماره ۱. صفحات ۱۳۷-۱۲۸.

۳. یارمحمدی، م.، پورکاظمی، م.، قاسمی حسن زاده صابر، م.، نوروزفشخامی، م. ر.، و برادران نویری، ش.، ۱۳۹۰. بررسی تعیین مارکر جنسیت در تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۴. شماره ۶. صفحات۹۴۳-۹۳۵.

4. Barannikova, I., Bayunova, L., and Semenkova, T., 2004. Serum levels of testosterone, 11-ketotestosterone and oestradiol-17β in three species of sturgeon during gonadal development and final maturation induced by hormonal treatment. J. Fish Biol. 64: 1330-1338.

5. Birstein, V. J., 1993. Sturgeons and paddlefishes: Threatened fishes in need of conservation. Conserv. Biol. 7: 773-787.

6. Chapman, F. A., Swallow, R. L., and Doroshov, S. I., 1987. Ovarian cycle of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). Proceeding of the 3rd International Symposium on Reproductive Physiology of Fishes. St. John S., Newfoundland, Canada, August 2-7.

7. Conte, F. S., Doroshov, S. I., Hung, S. S.O., and Strange, E. M., 1988. Hatchery manual for the white sturgeon *Acipenser transmontanus* Richardson with application to other North American acipenseridae. Publication no. 3322. Division of Agricultural and Natural Resource, University of California, USA, P: 104.

8. Doroshov, S. I., Moberg, G. P., and Van Eenennaam, J. P., 1997. Observations on the reproductive cycle of cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. Environ. Biol. Fish. 48: 265-278.

9. Falahatkar, B., Tolouei, Gilani, M. H., Falahatkar, S., and Abbasalizadeh, A., 2011. Laparoscopy, a minimally-invasive technique for sex identification in cultured great sturgeon *Huso huso*. Aquaculture. 321: 273-279.

10. Gur, G., Melamed, P., Gissis, A., and Yaron, Z., 2000. The pituitary–gonadal axis during maturation of the black carp, *Mylopharyngodon piceus*. J. Exp. Zool. 286: 405-413.

11. Hinton, D. E., 1990. Histological techniques. In Methods in Fish Biology. Eds. Schreck, C.B., Moyle, P.B. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, PP: 191-212.

12. Hochleithner, M., and Gessner, J., 1999. The Sturgeon and Paddlefish (*Acipenseriformes*) of the World: Biology and Aquaculture. Aqua Tech Publications, Kitzbuhl, P: 165.

13. Hurvitz, A., Jackson, K., Degani, G., and Levavi-Sivan, B., 2007. Use of endoscopy for gender and ovarian stage determinations in

Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) grown in aquaculture. Aquaculture. 270: 158-166.

14. Hurvitz, A., Jackson, K., Yom-Din, S., Degani, G., and Levavi-Sivan, B., 2008. Sexual development in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstadtii*) grown in aquaculture. Cybium, 32: 283-285.

15. Kortner, T. M., Rocha, E., and Arukwe, A., 2009. Previtellogenic oocyte growth and transcriptional changes of steroidogenic enzyme genes in immature female Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) after exposure to the androgens 11-ketotestosterone and testosterone. Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 152: 304-313.

16. Lee, C. S., Tamaru, C. S., Banno, J. E., and Kelly, C. D., 1986. Influence of chronic administration of LHRH-analogue and/or 17α-methyltestosterone on maturation in milkfish, *Chanos chanos*. Aquaculture. 59: 147-159.

17. Lokman, P. M., George, K. A. N., Divers, S. L., Algie, M., and Young, G., 2007. 11-ketotestosterone and IGF-I increase the size of previtellogenic oocytes from short finned eel, *Anguilla australis*, in vitro. Reproduction. 133: 955-967.

18. Magri, M. H., Solari, A., Billard, R., and Reinaud, P., 1985. Influence of testosterone on precocious sexual development in immature rainbow trout. Gen. Comp. Endocrinol. 57: 411-421.

19. Martyniuk, C. J., Gallant, N. S., Marlatt, S. C., Woodhouse, A. J., and Trudeau, V. L., 2006. Current perspectives on 17β-estradiol action and nuclear estrogen receptors in teleost fish in Fish endocrinology. In Fish Endocrinology. Eds. Reinecke, M., Zaccone, G., Kapoor, B. G., Enfield. Vol. 2. Science Publishers, New Hampshire, PP: 625-663.

20. Menuet, A., Adrio, F., Kah, O., and Pakdel, F., 2005. Regulation and function of estrogen receptors: comparative aspects. In World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore. Eds. Melamed, P., Sherwood, N. Hormones and their Receptors in Fish Reproduction, PP: 224-253.

21. Moberg, G. P., Doroshov, S. I., Chapman, F. A., Kroll K, J., Van Eenennaam, J., and Watson, J. G., 1991. Effects of various hormone implants on vitellogenin synthesis and ovarian development in cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. Proceedings of the First International Symposium on Sturgeon. Bordeaux Gironde, France, 3-6 October 1989. Eds. Williot, PP: 389-399.

22. Mojazi Amiri, B., Maebayashi, M., Hara, A., Adachi, S., and Yamauchi, K., 1996. Ovarian development and serum sex steroid and vitellogenin profiles in the female cultured sturgeon hybrid, the bester. J. Fish Biol. 48: 1164-1178.

23. Pankhurst, N. W., Stacey, N. E., and Peter, R. E., 1986. An evaluation of techniques for the administration of 17β-estradiol to teleosts. Aquaculture. 52:145-55.

24. Pavlick, R., and Moberg, G., 1997. Dopaminergic on gonadotropin secretion in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). Fish Physiol. Biochem. 16: 35-43.

25. Thomas, P., Tubbs, C., Berg, H., and Dressin, G., 2007. Sex steroid hormone receptors in fish ovaries. In The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications. Springer, Netherlands. Eds. Babin, P. J., Cerda, J., Lubzens, E, PP: 203–233. U. S. Environmental Protection Agency (USEPA), 2002. Draft Detailed Review Paper on a Fish Two-Generation Toxicity Test. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC (EPA/68/W-01/023).

26. Van Eenennaam, J. P., Doroshov, S. I., 1998. Effects of age and body size on gonadal development in Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus* mitchill). J. Fish. Biol. 53: 624-637.

27. Wallace, R. A., 1985. Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. In: Developmental Biology: a comprehensive synthesis Vol. 1, Oogenesis. L. W. Browder, ed. New York: Plenum Press, PP: 127-177.

28. Wallace, R. A., Selman, K., Greeley, M. S., Begovac, P. C., Lin, Y. W. P. C., McPherson, R. T., and Petrino, R., 1987. Current status of oocyte growth. In: Reproductive Physiology of Fish. Eds. D.R. Idler, L.W. Crim, J. M. Walsh,. St. John's, Newfoundland: Memorial University, PP: 167-177.

29. Williot, P., Burn, R., 1998. Ovarian development and cycles in cultured Siberian sturgeon, *Acipenser baeri*. Aquat. Living. Res. 11: 111-118.

Effects of 17-β estradiol implant on gonadal development of cultured great sturgeon *Huso huso* in pre-vitellogenic stage

Akhavan S.R.[1], Falahatkar B.[1], Toloei M.H.[2] and Mojazi Amiri B.[3]

[1]Fisheries Dept., Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, I.R. of Iran

[2] Aquaculture Dept., Fisheries General Directory of Guilan, Bandar Anzali, I.R. of Iran

[3]Fisheries Dept., Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, I.R. of Iran

Abstract

Puberty in sturgeon is a long process; therefore several managements, nutritional strategies and endocrine manipulation of the reproductive are used to induce sexual maturity. 17-β Estradiol (E_2) is a female hormone which is known as one of the most effective estrogenic hormones. The present study has been focused on the effects of different levels of E_2 implants on gonadal development in 20 three-year old cultured pre-vitellogenic great sturgeon (*Huso huso*). Great sturgeon were intraperitoneally implanted every 1.5 month with capsules that were filled with 3, 6 and 12 mg/kg body weight E_2 and cocoa butter as a career and the control fish received capsule that just contained career. The levels of hormone were designed based on metabolic needs and body weight of fish. They were biopsied at the end of the experiment in order to determine the gonadal stage and oocyte characteristics at day 190. Classical histology, hematoxilin-eosin staining method was performed for slides examination. Histological slides were assayed by a light microscopy and all measurements were done by Adobe Photoshop CS5 (Version 12.0). The result of egg diameter at the end of experiment showed no significant differences between treatments (P >0.05). Also there was no significant difference in histological observation in the case of egg area and diameter, nucleus area and diameter and ratio of nucleus area/egg area. Based on histological observations and oocyte indices we have found that E_2 implant can stimulate the growth and development of fish oocytes, but regard to slow growth at the pre-vitellogenic stage and the limit period of its usage, no significant differences were observed.

Key words: Great sturgeon (*Huso huso*), 17-β estradiol, Precocious maturity, Hormone Implant, Gonad histology