

تأثیر چندین روش تزریق هورمون GnRHa در تحریک و همزمانی اوولاسیون قزل آلی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

آریا وزیرزاده^۱، عبدالمجید حاجی مرادلو^۱، احمد ایمانی^۲،
کامران رضایی توابع^۲ و اشکان اژدهاکش پور^۳

^۱به ترتیب دانش آموزخته کارشناسی ارشد و دانشیار دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران،
^۲گروه شیلات و محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران، بخش آبی پروری، مرکز تحقیقات شیلاتی آبهای دور، چابهار، ایران

Email: vazir@ut.ac.ir

چکیده

در این مطالعه اثرات آنالوگ هورمون آزاد کننده گنادوتروپین (GnRHa) به شکل امولسیون آب در روغن (w/o) و خالص در تحریک و همزمانی اوولاسیون قزل آلی رنگین کمان بررسی شد. آنالوگ هورمون GnRH در محلول نمکی ۰/۹ درصد و یا گلیکول پروپیلین حل شد و با حجم برابری از آدجوانت ناقص فروند (GnRHa-FIA) ترکیب گردید. در ماهیان تیمارهای مختلف ۰/۵ میلی لیتر از ترکیب مذکور تزریق شد. میزان هورمون در همه تیمارها به جز تیمار شاهد-که محلول نمکی ۰/۹ درصد دریافت نمود- ۲۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن بود. همه ماهیانی که هورمون GnRHa حل شده در محلول نمکی ۰/۹ درصد را همراه با آدجوانت یا در دو مرحله تزریق دریافت نمودند به ترتیب ۱۰ و ۱۱ روز بعد از تزریق تخم ریزی کردند، در حالی که درصد تجمعی اوولاسیون در گروه شاهد و ماهیانی که هورمون GnRHa را به شکل خالص و در یک مرحله تزریق دریافت نمودند تا ۳۶ روز بعد از تزریق به ترتیب ۷۵ و ۶۰ درصد بود، ولیکن ۸۷ درصد ماهیانی که هورمون GnRHa محلول در گلیکول پروپیلین را همراه با آدجوانت دریافت کردند تا ۳۶ روز بعد از تزریق تخم ریزی نمودند و همه ماهیانی که هورمون یاد شده را در دو مرحله دریافت نمودند ۱۳ روز بعد از تزریق تخم ریزی کردند. درصد لقاح، چشم زدگی و تفریح در همه تیمارها مناسب بود و بین تیمارها تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($P > 0.05$). مرگ و میر قبل و بعد از تخم ریزی در مولدین مورد آزمایش مشاهده نشد. نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق ترکیب هورمون حل شده در محلول نمکی و آدجوانت ناقص فروند (GnRHa-FIA) سبب پیشرس کردن، همزمانی و کوتاه شدن دوره تخم ریزی در مولدین قزل آلی رنگین کمان در مقایسه با گروه شاهد و گروه دریافت کننده هورمون GnRHa به شکل خالص و در یک مرحله گردید. تزریق GnRHa-FIA تأثیر منفی بر کیفیت تخم های استحصالی نداشته و مرگ و میری در مولدین مشاهده نشد.

واژه های کلیدی: آدجوانت ناقص فروند، القا تخم ریزی، کیفیت تخم، قزل آلی رنگین کمان، GnRHa

مقدمه

اوولاسیون و تخم ریزی در آنها صورت نمی گیرد (۱۱)، در حالی که در ماهیان نر حجم و کیفیت اسپرم تولیدی کاهش می یابد (۳).
در چند دهه اخیر توجه زیادی به کنترل تولید مثل ماهیان به ویژه آزاد ماهیان با استفاده از هورمون GnRHa

متأسفانه بسیاری از ماهیان هنگامی که در شرایط آبی پروری نگهداری می شوند اختلالاتی در سیستم تولید مثل آنها بروز می نماید. در ماهیان ماده اغلب تخمک ها به مراحل نهایی رسیدگی جنسی نرسیده و

مطالعه ذکر شده استفاده از آدجوانت ناقص فروند سبب افزایش کارایی هورمون GnRHa در القا اوولاسیون شد. نتایج اولیه به دست آمده از کاربرد آدجوانت ناقص فروند در رسانش پایدار هورمون GnRHa بسیار امیدبخش بوده و در مقایسه با سایر روش‌ها در عین کارایی مناسب بسیار ارزانتر است و کاربرد آن نیز آسان می‌باشد ولیکن این روش بسیار جدید بوده و برای اظهار نظر دقیق در رابطه با کارایی آن نیاز به مطالعات بیشتر می‌باشد. لذا در این تحقیق برای اولین بار در کشور از این روش استفاده شد و بخشی از جنبه‌های این ماده در رسانش پایدار هورمون GnRHa بررسی گردید. در این تحقیق اهداف ذیل مد نظر بود.

- ۱- مطالعه قابلیت آدجوانت ناقص فروند به عنوان منبع امولسیون کننده هورمون GnRHa.
- ۲- مقایسه اثرات چند روش تزریق GnRHa در تحریک و همزمانی اوولاسیون ماهی قزل آلا^۱ رنگین کمان.
- ۳- بررسی اثرات مواد و روش‌های به کار رفته بر کیفیت تخم‌های استحصالی و مرگ و میر قبل و بعد از تخم‌ریزی مولدین.
- ۴- ارتقاء مدیریت تکثیر ماهیان قزل آلا

مواد و روش‌ها

زمان و مکان تحقیق: این تحقیق در اوایل مهرماه سال ۱۳۸۴ در مرکز تکثیر قزل آلا^۱ شرکت تعاونی ۲۲ بهمن در شهرستان سپیدان استان فارس انجام گرفت. تعداد ۴۰ قطعه ماهی ماده قزل آلا با میانگین وزنی 170 ± 2000 گرم انتخاب گردید و در ۶ تیمار مختلف مورد تزریق قرار گرفتند.

نحوه تهیه و آماده سازی هورمون و آدجوانت: هورمون GnRHa ([D-Ala⁶, des Gly¹⁰]m GnRHa) مورد استفاده در این تحقیق ساخت شرکت ثامن مشهد و شرکت سان شنگ^۵ چین بود. هورمون شرکت ثامن مشهد به صورت محلول در گلیکول پروپیلن استفاده شد.

شده است (۲). به دلیل تجزیه سریع این هورمون دکاپتید در بدن از روش‌های رسانش پایدار^۱ برای افزایش کارایی استفاده می‌گردد. با استفاده از این تکنیک‌ها می‌توان هورمون‌های مورد نظر را به مدت طولانی‌تری (چند روز تا چند هفته) در اختیار ماهی قرار داد (۱۲). اما استفاده از روش‌های رسانش پایدار هورمون GnRHa در ماهیان اغلب پرهزینه بوده و برای همه پرورش دهندگان ماهی دسترسی به این مواد مقدور نمی‌باشد. در برخی از این روش‌ها نیز نیاز به دستگاه‌های پیشرفته و نیروی کار ماهر وجود دارد که سبب محدودیت استفاده از آنها در کارگاه‌های تکثیر می‌شود. از سوی دیگر در کشور ما نیز دسترسی به این مواد و روش‌ها در حال حاضر مشکل و تا حدودی ناممکن است و باید از خارج از کشور تهیه شود که سبب افزایش بیش از پیش قیمت این مواد می‌گردد. لذا نیاز به روش‌های کارا و ارزان قیمت به شدت احساس می‌گردد. یکی از روش‌های موثر و کاربردی که در چند سال اخیر برای رسانش پایدار هورمون GnRHa استفاده شده است، استفاده از ماده‌ای به نام آدجوانت ناقص فروند می‌باشد. آدجوانت‌ها یا مواد کمکی، موادی هستند که در اصل برای تقویت ایمنی استفاده می‌گردند. یکی از آدجوانت‌های بسیار معمول آدجوانت فروند^۲ می‌باشد. آدجوانت فروند به شکل امولسیون آب در روغن بوده و به دو نوع کامل^۳ (به اختصار FCA) و ناقص^۴ (به اختصار FIA) تقسیم می‌شود. نوع کامل آن علاوه بر روغن‌های معدنی حاوی مایکو باکتر سل کشته شده نیز می‌باشد (۱۰).

Arabachi در سال ۲۰۰۰ برای اولین بار از آدجوانت ناقص فروند برای تزریق هورمون GnRHa در ماهی شانک اروپایی (*Sparus aurata*) استفاده کرد. همین محقق و همکاران در سال ۲۰۰۴ از ترکیب یاد شده در ماهی قزل آلا^۱ رنگین کمان استفاده نمودند. در هر دو

- 1- Sustained releasing delivery systems
- 2- Freund,s adjuvant
- 3- Freund's Complete Adjuvant
- 4- Freund's Incomplete Adjuvant

وزن بدن بود. ماهیان تیمار ۱ هورمون GnRHa محلول در حلال نمکی را همراه با آدجوانت ناقص فروند، در یک مرحله تزریق دریافت نمودند. ماهیان تیمار ۲ همان هورمون را به شکل خالص (بدون آدجوانت) و در دو مرحله تزریق با فاصله زمانی ۲۴ ساعت دریافت نمودند. ماهیان تیمار ۳ هورمون محلول در گلیکول پروپیلن را به شکل ترکیب با آدجوانت و ماهیان تیمار ۴ همان هورمون را به شکل خالص و در دو مرحله دریافت نمودند. ماهیان تیمار ۵ هورمون محلول در گلیکول پروپیلن را به شکل خالص و در یک مرحله دریافت نمودند. ماهیان گروه شاهد ۰/۵ میلی لیتر محلول نمکی دریافت نمودند (جدول ۱).

هورمون چینی به شکل لیوفیلیزه استفاده شد. آدجوانت ناقص فروند مورد استفاده در این تحقیق از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی در حصارک کرج تهیه گردید.

برای تهیه امولسیون آدجوانت و هورمون، هورمون محاسبه شده برای هر ماهی در ۰/۲۵ میلی لیتر محلول نمکی ۰/۹ درصد و یا گلیکول پروپیلن حل شد و با حجم برابری از آدجوانت ناقص فروند به روش دابل سرنگ ترکیب شدند (۶). به این ترتیب هر ماهی مولد ۰/۵ میلی لیتر محلول تزریقی دریافت نمود. کلیه تزریق‌ها به شکل داخل صفاقی بود.

میزان هورمون و مشخصات تیمارهای مورد آزمایش: میزان هورمون در همه تیمارها ۲۵ میکروگرم بر کیلوگرم

جدول ۱- میزان هورمون تزریقی، نوع ماده ترکیبی، تعداد تکرار و تعداد تزریق در تیمارهای مورد آزمایش

شماره تیمار	تیمار	میزان هورمون $\mu\text{g/kg}$	ماده ترکیبی	تعداد تکرار (تعداد ماهی)	تعداد تزریق
۱	GnRHa-FIA (China)	۲۵	آدجوانت	۷	۱
۲	GnRHa (2 Steps)	۲۵	خالص	۶	۲
۳	GnRHa-FIA (Iran)	۲۵	آدجوانت	۸	۱
۴	GnRHa (2 Steps)	۲۵	خالص	۶	۲
۵	GnRHa (Acute)	۲۵	خالص	۵	۱
۶	محلول نمکی	-	-	۸	۱

درصد لقاح، درصد چشم زدگی و درصد تفریح در هر ماهی محاسبه گردید.

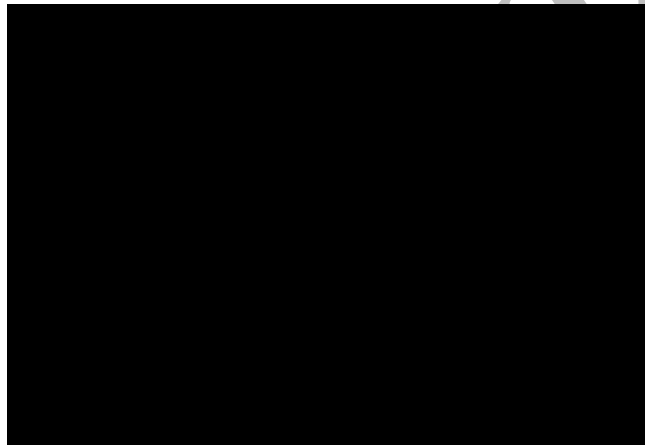
بررسی آماری داده‌های بدست آمده: داده‌های بدست آمده از این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS10 بررسی و ارزیابی گردید. برای تعیین اثر هورمون بر میانگین زمان اوولاسیون از آزمون کروسکال-والیس و برای تعیین اثرات هورمون بر کیفیت تخم‌های استحصالی از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. برای مقایسه داده‌های درصدی از آرکسین آنها استفاده شد. نمودارها در محیط Excel و SPSS ترسیم گردید. سطح مورد قبول ($P \leq 0/05$) بود.

تکثیر ماهیان و بررسی کیفیت تخم‌های استحصالی: ماهیان هر هفته ۲ بار مورد معاینه قرار گرفته و از نظر رسیدگی تخمک‌ها به شکل ظاهری بررسی شدند. پس از اولین تخم‌ریزی ماهیان ۵ بار در هفته معاینه شدند. تخمک‌های استحصالی از هر ماهی ماده با اسپرم سه ماهی نر لقاح داده شد. ۲۵۰ عدد تخم از هر ماهی به صورت جداگانه در داخل سبدهای مخصوص جهت انکوباسیون نگهداری شدند و پس از چشم زدگی، کلیه تخم‌های تلف شده جمع‌آوری گردید و با شفاف‌سازی در محلول استوکارد مرکب از فرمالین، اسیداستیک، گلیسرین و آب با نسبت حجمی ۵:۶:۸۵، تعداد تخم‌های لقاح نیافته و لقاح یافته تلف شده شمارش گردید (۹). بدین ترتیب

نتایج

تأثیرات تزریق GnRHa در روش‌های مختلف بر هم‌زمانی اوولاسیون مولدین: تخم‌ریزی در گروه‌هایی که هورمون محلول در سرم فیزیولوژی را به شکل امولسینه یا به شکل خالص و در دو نوبت دریافت کرده بودند، ۸ روز پس از شروع آزمایش آغاز شد و ۱۱ روز پس از شروع آزمایش همه مولدین در این دو گروه تخم‌ریزی نمودند. در گروه‌هایی که هورمون محلول در گلیکول پروپیلن را به شکل امولسینه یا به شکل خالص در دو نوبت دریافت کردند، تخم‌ریزی به ترتیب از روزهای نهم

و هشتم بعد از شروع آزمایش آغاز شد، ولیکن فقط در تیمار چهار که هورمون را در دو نوبت دریافت نمودند همه مولدین تا سیزده روز بعد از شروع آزمایش تخم‌ریزی کردند. تخم‌ریزی در گروه دریافت کننده هورمون به شکل خالص در یک مرحله و گروه شاهد به ترتیب از روزهای چهاردهم و پانزدهم بعد از تزریق شروع شد ولیکن تا پایان آزمایش تکمیل نگردید (شکل ۱). برخی از پارامترهای ثبت شده در جدول ۲ ارائه شده است.



شکل ۱- درصد تجمعی تخم‌ریزی در تیمارهای مورد آزمایش

جدول ۲- تعداد مولدین در هر تیمار، تعداد تکثیر شده، زمان اولین و آخرین تکثیر و درصد موادین تکثیر شده در هر تیمار

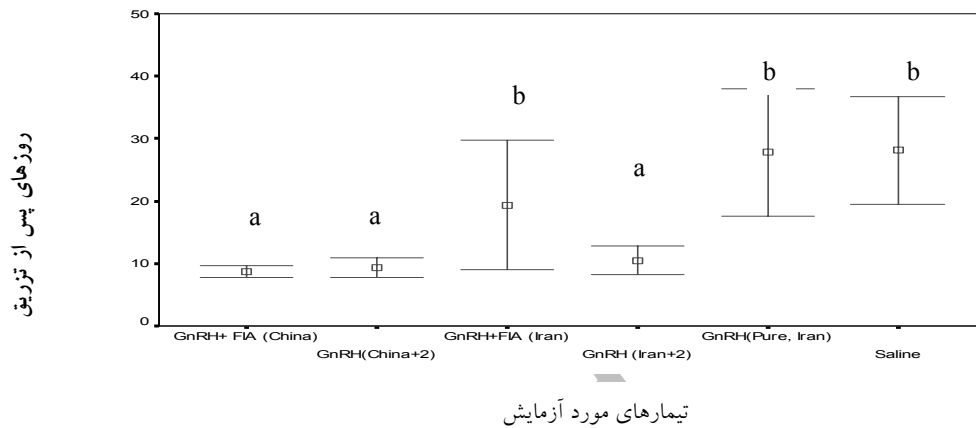
تیمار	تعداد مولدین	تعداد تکثیر شده	زمان اولین تکثیر بعد از تزریق (روز)	زمان آخرین تکثیر بعد از تزریق (روز)	درصد مولدین تکثیر شده
۱	۷	۷	۸	۱۰	۱۰۰
۲	۶	۶	۸	۱۱	۱۰۰
۳	۸	۷	۹	۲۲	۸۷
۴	۶	۶	۸	۱۳	۱۰۰
۵	۵	۳	۱۴	۳۲	۶۰
۶	۸	۶	۱۵	۳۶	۷۵

تیمار دریافت‌کننده ترکیب GnRHa-FIA با استفاده از حلال گلیکول پروپیلن و گروه دریافت کننده هورمون GnRHa در یک مرحله کاهش داد ($P > 0.05$). اما در ماهیانی که هورمون محلول در سرم فیزیولوژی یا گلیکول پروپیلن را در دو مرحله تزریق دریافت نمودند (تیمارهای

تأثیرات تزریق GnRHa در روش‌های مختلف بر میانگین زمان اوولاسیون مولدین، کیفیت تخم‌های استحصالی و مرگ و میر ماهیان در این آزمایش تزریق امولسیون GnRHa-FIA با استفاده از لال نمکی به طور معنی داری زمان تخم‌ریزی ماهیان مولد را در مقایسه با

برای تیمارهای ۲، ۳، ۴ و ۵ به ترتیب ۹/۳۳، ۱۰/۵، ۱۹/۳۳ و ۲۷/۸ روز بدست آمد (شکل ۲). ماهیان تیمارهای ۱، ۲ و ۴ حدود سه هفته زودتر از سایر ماهیان گروه شاهد و ماهیان تزریق شده با هورمون GnRHa خالص و در یک مرحله تخم‌ریزی کردند.

یک و دو) تفاوت آماری معنی‌داری با مولدین تیمار یک که هورمون محلول در سرم فیزیولوژی و آدجوانت را دریافت نموده بودند مشاهده نگردید ($P > 0.05$). تیمار ۱ دارای کوتاهترین میانگین زمان اوولاسیون (۸/۷۱ روز) و تیمار ۶ دارای طولانی‌ترین میانگین زمان اوولاسیون (۲۸/۱۳ روز) بود. میانگین زمان اوولاسیون



شکل ۲- میانگین زمان اوولاسیون (\pm انحراف معیار) تیمارهای مورد آزمایش. تیمارهای با حروف یکسان لاتین فاقد تفاوت معنی‌دار می‌باشند ($P > 0.05$)

یکدیگر نداشتند ($P > 0.05$) و در هیچ‌کدام از تیمارها مرگ و میر قبل یا بعد از تخم‌ریزی مشاهده نگردید.

درصد لقاح، چشم زدگی و تفریح در کلیه تیمارها نرمال بود (جدول ۳) و تفاوت آماری معنی‌داری با

جدول ۳- درصد لقاح، چشم زدگی و تفریح تخم‌های بدست آمده از مولدین تیمارهای مورد آزمایش، تفاوت معنی‌داری در بین تیمارهای مختلف در صفات اندازه‌گیری شده مشاهده نگردید ($P > 0.05$).

تیمارها	درصد لقاح	درصد چشم زدگی	درصد تفریح
۱	۷۵/۱۵ \pm ۲/۰۵	۹۰/۰۰ \pm ۱/۸۲	۹۳/۲۹ \pm ۰/۴۳
۲	۷۶/۴۰ \pm ۲/۱۴	۹۰/۰۵ \pm ۱/۴۷	۹۳/۲۹ \pm ۱/۲۲
۳	۷۸/۸۰ \pm ۳/۵۲	۹۱/۷۷ \pm ۱/۵۸	۹۳/۸۸ \pm ۱/۷۵
۴	۷۷/۶۸ \pm ۲/۲	۹۰/۳۲ \pm ۰/۶۶	۹۳/۶۸ \pm ۱/۱
۵	۷۸/۴۰ \pm ۲/۲۸	۹۱/۶۴ \pm ۱/۸۲	۹۳/۷۰ \pm ۱/۵۴
۶	۷۸/۸۲ \pm ۲/۹۵	۹۲/۱۰ \pm ۱/۶۳	۹۴/۵۰ \pm ۰/۷۹

بحث و نتیجه گیری

آزاد ماهیان از جمله ماهیانی هستند که تاکنون مطالعات بسیاری در رابطه با روند تاثیر هورمون‌های تولیدمثلی در تحریک و تسریع اوولاسیون در آنها صورت گرفته است و بخش عظیمی از دانش اکوفیزیولوژی تولید مثل ماهیان با مطالعه بر روی این خانواده از ماهیان به دست آمده است.

تاکنون هورمون‌های مختلفی با موفقیت در تحریک تولید مثل ماهیان استفاده شده است. این عمل با استفاده از هیپوفیز از سال ۱۹۳۰ شروع شده و تا به امروز که آنالوگ‌های فوق‌العاده مؤثری از هورمون GnRH به‌طور مصنوعی ساخته شده و تکنیک‌های بسیار مؤثری جهت رسانش این هورمون ابداع شده، توسعه فراوانی یافته است.

در آزاد ماهیان طول دوره گامتوژنیز تحت کنترل گنادوتروپین‌ها قرار دارد (۴). پس می‌توان گفت که برای پیش‌رشد و همزمان نمودن اوولاسیون در ماهی قزل‌آلا نیاز به تحریک دراز مدت و کنترل شده ترشح GnRH می‌باشد. به عبارت دیگر اوولاسیون القایی در آزاد ماهیان نیازمند تزریقات مکرر هورمون GnRH می‌باشد که در شرایط کارگاهی چندان مقدور نیست. از طرف دیگر تزریق چند باره هورمون GnRH باعث مصرف زیاد هورمون و ایجاد استرس در ماهیان می‌گردد که استرس خود عامل مهمی در کاهش کیفیت گامت ماهیان و حتی بازدارنده رشد گناد آنان می‌باشد. بنابراین با توجه به نتایج تحقیقات صورت گرفته در پزشکی، استفاده از روش‌های رسانش پایدار هورمون در ماهی نیز رواج پیدا کرد.

برای افزایش کارایی و در دسترس بودن زیستی هورمون GnRH چندین روش رسانش پایدار تا کنون با موفقیت در بسیاری از گونه‌های ماهیان استفاده شده است. این روش‌ها شامل پمپ‌های اسمزی، پلت‌های کلسترولی، پلت‌های کلسترولی-سلولزی، استات اتیلن-ونیل، ترکیب پلی‌لاکتیک-گلیکولاکتیک و میکروسفرهای اسید چرب و GnRH-FIA می‌باشد (۲، ۴، ۶ و ۱۲).

نتایج این تحقیق نیز نشان داد که آدجوانت ناقص فروند در امولسیون نمودن هورمون GnRH کارایی لازم را داشته و تزریق ترکیب GnRH-FIA همانند روش معمول استفاده از این هورمون در کارگاه‌های تکثیر قزل‌آلا (پروتکل تزریق دو مرحله‌ای) در تحریک و همزمانی اوولاسیون مولدین قزل‌آلا موثر می‌باشد. لذا با یک بار تزریق GnRH-FIA علاوه بر تحریک مناسب اوولاسیون ماهیان از تزریقات مکرر و ایجاد استرس جلوگیری می‌شود. Arabachi (۲۰۰۰) و Arabachi و همکاران (۲۰۰۴) نیز از این روش در ماهی شانک اروپایی و قزل‌آلای رنگین کمان استفاده و القا اوولاسیون مناسبی را گزارش نمودند. به نظر می‌رسد با استفاده از امولسیون هورمون و آدجوانت، GnRH به تدریج در بدن آزاد می‌گردد که در تحریک مناسب هیپوفیز و آزادسازی هورمون GnRH و در نهایت بلوغ نهایی تخمک‌ها موثر می‌باشد. اما در این تحقیق هنگامی که هورمون GnRH به شکل خالص و در یک مرحله با میزان مشابه استفاده گردید در همزمانی اوولاسیون مولدین بی‌تأثیر بود. محققان دیگر نیز نتایج مشابهی را گزارش نمودند که از دلایل آن می‌توان به تجزیه و در نتیجه دفع سریع GnRH از بدن ماهی اشاره نمود که فقط در ماهیانی موثر خواهد بود که در مراحل نهایی بلوغ اووسیت بوده و در سایر ماهیان تأثیر مناسبی ندارد (۴، ۹ و ۱۲).

از طرف دیگر تزریق هورمون محلول در گلیکول پروپیلن همراه با آدجوانت ناقص فروند در همزمانی اوولاسیون مولدین تأثیری نداشت. از دلایل احتمالی این موضوع می‌توان به ماهیت حلال هورمون (گلیکول پروپیلن) اشاره نمود. چرا که گلیکول پروپیلن یک نوع حلال روغنی است و به نظر می‌رسد به‌طور مناسب با آدجوانت ناقص فروند ترکیب نگشته است. به عبارت دیگر در تیمار یک، هورمون در محلول نمکی حل شد و با آدجوانت ترکیب و امولسیون ایجاد گردید، اما در تیمار ۳ بخش آبی که برای تشکیل امولسیون ضروری است

Arabachi و همکاران بود. از آنجا که اثرات جانبی آدجوانت فروند وابسته به میزان می‌باشد (۷ و ۸)، شاید از دلایل مرگ و میر زیاد تحقیق یاد شده بتوان به میزان بالای آدجوانت اشاره نمود.

با توجه به مطالب ذکر شده می‌توان استفاده از آدجوانت ناقص فروند را برای امولسینه نمودن هورمون GnRHa و در نتیجه رسانش پایدار آن در ماهی قزل‌آلا پیشنهاد نمود. توصیه می‌شود به جای تزریقات متعدد و چند باره هورمون GnRHa از این روش استفاده گردد که علاوه بر کاهش استرس مولدین در کاهش هزینه‌های کارگری در کارگاه‌های تکثیر نیز مؤثر خواهد بود.

سپاسگزاری

از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان برای تامین بخشی از هزینه‌های این تحقیق سپاسگزاری می‌گردد. از همت بلند و همکاری بسیار صمیمانه مهندس نیکوکار و مهندس قاسمپور و کلیه کارکنان کارگاه تکثیر ۲۲ بهمن سپیدان که ماهیان مورد نیاز را تأمین نمودند، صمیمانه تشکر می‌گردد.

وجود نداشت و ترکیب آدجوانت و گلیکول پروپیلن که هر دو ترکیبی روغنی می‌باشند سریعاً از هم جدا شده و تأثیر مناسبی بر روند غدد درون‌ریز ماهیان نداشتند.

مورد قابل توجه دیگر در این تحقیق در مقایسه با تحقیق Arabachi و همکاران (۲۰۰۴) در ماهی قزل‌آلا، عدم وجود مرگ و میر، قبل یا بعد از تخم‌ریزی مولدین در این تحقیق بود. اما Arabachi و همکاران حدود ۵۰ درصد مرگ و میر بعد از تخم‌ریزی را در مولدین ماده قزل‌آلا پس از تزریق ترکیب GnRHa-FIA گزارش نمودند ولیکن در تحقیق Arabachi در سال ۲۰۰۰ در ماهی شانک اروپایی مرگ و میری مشاهده نشد. تحقیق Arabachi و همکاران (۲۰۰۴) تنها گزارش بی‌سابقه‌ای است چنین درصد بالایی از مرگ و میر را در هنگام استفاده از روش‌های رسانش پایدار گزارش می‌نماید (۲). از دلایل احتمالی این تفاوت می‌توان به میزان آدجوانت مصرفی در دو تحقیق اشاره کرد. Arabachi و همکاران برای هر کیلوگرم وزن بدن مولدین ۰/۵ میلی‌لیتر آدجوانت استفاده نمودند ولی در تحقیق حاضر برای هر مولد (نه هر کیلوگرم وزن بدن) ۰/۲۵ میلی‌لیتر آدجوانت استفاده شد که حدود یک چهارم آدجوانت مصرفی توسط

منابع

1. Arabaci, M., 2000. Induction and synchronization of spawning in sea bass and sea bream broodstocks by using long-acting LH-RHa preparation. Ege University, Thesis of Ph.D., 87 pp., Izmir, Turkey. In Turkish (Abstract in English).
2. Arabaci, M., Diler, I., and Sari, M., 2004. Induction and synchronization of ovulation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by administration of emulsified buserelin (GnRHa) and its effects on egg quality. *Aquaculture*, 237: 475-484.
3. Billard, R., Reinand, P., Hollebecq, M., and Breton, B., 1984. Advancement and synchronization of spawning in *Salmo gairdneri* and *S. trutta* following administration of LRH-a combined or not with pimozone. *Aquaculture*, 43: 57-66.
4. Breton, B., Weil, C., Sambroni, E., and Zohar, Y., 1990. Effects of acute versus sustained administration of GnRHa on GtH release and ovulation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 91: 371-383.
5. Crim, L.W., and Glebe, B.D., 1984. Advancement and synchrony of ovulation in Atlantic salmon with pelleted LHRH analog. *Aquaculture*, 43: 47-56.
6. Flies, D.B., and Chen, L., 2003. A simple and vortex method for preparing antigen/adjuvant emulsions for immunization. *J. Immunology Methods*, 276: 239-242.
7. Melingen, G.O., and Wergeland, H.I., 2002. Physiological effects of an oil-adjuvanted vaccine on out-of-season Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolt. *Aquaculture*, 214: 397-409.

8. Midtlyng, P.J., Reitan, L.J., and Spielberg, L., 1996. Experimental studies on the efficacy and side effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar*) against frunculosis. *Fish & Shellfish Immunology*, 6: 335-350.
9. Mylonas, C.C., Hinshaw, M.J., and Sullivan, V.C., 1992. GnRHa-induced ovulation of brown trout (*Salmo trutta*) and its effects on egg quality. *Aquaculture*, 106: 379-392.
10. Stills, J.R., and Bailey, M.Q., 1991. The use of Freund's complete adjuvant. *Lab Animal*, 20: 25-30.
11. Zohar, Y., 1988. Gonadotropin releasing hormone in spawning induction in teleost: basic and applied consideration. In: Zohar, Y., Breton, B. (Eds). *Reproduction in fish: Basic and Applied Aspects in Endocrinology and Genetics*. INRA press, Paris, pp: 47-62.
12. Zohar, Y., and Mylonas, C.C., 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, 197: 99-136.
13. Zohar, Y., Goren, A., Fridkin, M., Elhanati, E., and Koch, T., 1990. Degradation of gonadotropin releasing hormone in the gilthead seabream *Sparus aurata*: II. Cleavage of native salmon GnRHa, Mammalian LHRH and their analogs in the pituitary, kidney and liver. *Gen. Comp. Endocrinol*, 79: 306-331.

Archive of SID

Effects of several methods of GnRHa administration on induction and synchronization of ovulation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*

*A. Vazirzadeh¹, A.M. Hajimoradloo¹, A. Imani², K. Rezaei² and A. Azhdehakosh pour³

¹Dept. of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, ²Dept. of Fisheries and Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karadj, Iran, ³Dept. of Aquaculture, Off Shore Fisheries Research Institute, Chabahar, Iran
E-mail: vazir@ut.ac.ir

Abstract

In this study likely effects of water in oil (w/o) emulsion versus acute administration of gonadotropin releasing hormone agonist (GnRHa) on induction and synchronization of ovulation in rainbow trout were examined. GnRHa was diluted in physiological saline (PS) or propylene glycol (PG) and mixed with equal volume of Freund's incomplete adjuvant (GnRHa-FIA). All fish received 0.5 ml intraperitoneal injections. Dose of hormone in all groups was 25 µg/kg⁻¹ except control fish which received physiological saline. All fish injected with PS diluted GnRHa, combined with adjuvant or in two injections protocol ovulated 10 and 11 days after injection respectively. In contrast only 75% in control fish and 60% of fish with an acute injection of pure GnRHa ovulated up to 36 days after injection. In fish injected with PG diluted GnRHa combined with adjuvant ovulation percentage reached to 87% until the end of experiment compared to 100 % ovulation for fish injected twice with PG diluted GnRHa. Fertilization, eyeing and hatching percentages were normal in all treatment groups and did not differ significantly among groups ($P>0.05$). None of treatments caused any pre or post-spawning mortality. In conclusion, combination of physiological diluted GnRHa with Freund's incomplete adjuvant (GnRHa-FIA) was effective in advancing the onset of ovulation, synchronizing the ovulation of treated fish and shortening the reproductive period, relative to control or acute GnRHa injected group ($P<0.05$). GnRHa-FIA did not affect egg quality or cause any mortality in the treated broodstock.

Keywords: Freund's incomplete adjuvant; Induced spawning; Egg quality; Rainbow trout; GnRHa