Archive of SID

بررسی عملکرد زیستی GnRH نوترکیب به عنوان القاء کننده تخم‌ریزی در ماهی طلایی (*Carassius auratus*)

صدیقه محمدزاده[۱]، سکینه یگانه*[۱]، فاطمه مرادیان[۲]، مسعود رکابی[۱]

*skyeganeh@gmail.com
*s.yeganeh@sanru.ac.ir

۱- گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۲- گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۸

چکیده

هورمون‌های مختلفی برای تکثیر مصنوعی آبزیان در مراکز تکثیر و پرورش استفاده می‌شود و یکی از انواع این هورمون‌ها، آنالوگ‌های مختلفی از هورمون آزاد کننده گنادوتروپین (GnRH) با نام‌های تجاری مختلف می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی فعالیت زیستی GnRH نوترکیب تولیدی در آزمایشگاه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری بر القاء و همزمانی اوولاسیون در مولدین ماهی طلایی (*Carassius auratus*) می‌باشد. برای این منظور ۲۰ جفت مولد آماده تکثیر ماهی طلایی از یکی از مراکز تکثیر و پرورش خریداری شده و به سالن تکثیر و پرورش ماهی گروه شیلات منتقل گردید و بعد از گذراندن دو هفته دوره سازگاری با شرایط آزمایش در ۴ گروه آزمایشی تقسیم شدند، سپس به گروه اول، دوم و سوم بترتیب ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن هورمون GnRH نوترکیب تولیدی به همراه ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن متوکلوپرامید (آنتی‌دوپامین) و به گروه شاهد سرم فیزیولوژی ۰/۰۹ درصد به همراه ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن متوکلوپرامید طی یک مرحله تزریق گردید. نتایج نشان داد هورمون GnRH تولیدی قابلیت القاء بلوغ نهایی را در مولدین مورد مطالعه داشته و تمامی گروه‌های دریافت کننده این هورمون به مرحله باروری رسیدند، اما هیچیک از مولدین گروه شاهد تخم‌ریزی نکردند. دوره تاخیر در مولدین تزریق شده با دوز ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن به طور معنی‌داری کمتر از سایر تیمارها بود ($p<0/05$). در میزان تخم استحصالی و هماروی نسبی اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای دریافت کننده هورمون GnRH نوترکیب وجود نداشت ($p>0/05$). از نتایج بدست آمده می‌توان استنباط کرد که هورمون GnRH نوترکیب تولیدی فعالیت بیولوژیک مناسبی داشته و می‌تواند به عنوان یک جایگزین مناسب برای درمان اختلالات تولید مثلی در مولدین پرورشی معرفی گردد.

لغات کلیدی: GnRH نوترکیب، القای هورمونی، ماهی طلایی، *Carassius auratus*

*نویسنده مسئول

www.SID.ir

Downloaded from isfj.ir at 9:01 +0430 on Monday July 27th 2020

Archive of SID

Downloaded from isfj.ir at 9:01 +0430 on Monday July 27th 2020

مقدمه

استفاده از آکواریوم و نگهداری ماهیان زینتی در گذشته جنبه تجملاتی و تفننی داشت، ولی در حال حاضر در اکثر کشورها از جمله ایران، نگهداری ماهیان آکواریومی در خانواده‌ها مرسوم شده است. پرورش این ماهیان به عنوان یک صنعت که از قابلیت‌های اشتغال‌زایی قابل توجیهی برخوردار است، اهمیت دارد (مقدسی، ۱۳۸۱؛ رامین و همکاران، ۱۳۹۶). ماهیان زینتی آب شیرین در مناطق مختلفی از جهان وجود دارند که کشورهای مختلف از جمله کشورهای آسیای جنوب شرقی و برخی از کشورهای اروپایی، این ماهیان را تکثیر و پرورش می‌دهند و به عنوان ماهیان زینتی در محل تولید به فروش می‌رسانند یا به سایر کشورها صادر می‌کنند (عبدلی، ۱۳۷۸) بطوریکه پرورش و صادرات ماهیان تزئینی در برخی کشورها به یک تجارت سودآور تبدیل شده است. در کشور ایران نیز این صنعت در دهه اخیر رونق زیادی یافته است و تعداد زیادی از افراد در روند تولید، فروش و صادرات آن سهیم می‌باشند. یکی از مهم‌ترین گونه‌های زینتی، ماهی طلایی (گلدفیش) (*Carassius auratus*) می‌باشد که از خانواده کپور ماهیان و تخم‌گذار بوده و به لحاظ زینتی دارای ارزش اقتصادی می‌باشد (رعیت‌پیشه و همکاران، ۱۳۹۰). ماهی طلایی گونه بسیار مناسبی برای مطالعات تولید مثلی، آندوکرینولوژی، سلولی، ایمنی‌شناسی، سم‌شناسی و مولکولی می‌باشد، زیرا برای تحقیقات آزمایشگاهی از اندازه مناسبی برخوردار است و همچنین در محیط‌های آزمایشگاهی براحتی قادر به بلوغ و تولید مثل می‌باشد. در واقع، از این گونه به عنوان مدل برای بررسی کپورماهیان استفاده می‌شود (Munakata and Kobayashi, 2010).

گسترش صنعت آبزی‌پروری این ماهیان با یک چالش بزرگ در مرحله بلوغ نهایی و تکثیر مولدین در شرایط اسارت در مراکز تکثیر و پرورش روبرو می‌باشد. یکی از پیش‌نیازها برای تکثیر و پرورش مصنوعی این ماهیان و تولید پایدار کنترل فرآیند تولید مثل این ماهیان در شرایط اسارت و بدست آوردن تخم‌های (اسپرم و تخمک) با کیفیت بالا می‌باشد. تولید مثل ماهی در شرایط اسارت بوسیله دستکاری عوامل محیطی از قبیل دوره نوری، دمای آب یا بستر تخم‌ریزی قابل کنترل می‌باشد (Mylonas and Zohar, 2001). با توجه به اینکه نیاز زیستی بعضی از گونه‌ها هنوز بخوبی شناخته شده نیست و با شبیه‌سازی پارامترهای محیطی انجام تولید مثل طبیعی غیر ممکن می‌باشد، مهمترین گام جهت تکثیر مصنوعی ماهیان و مطلوب کردن مدیریت و فن‌آوری پرورش مولدین استحصال تخم و همزمان سازی استحصال سلول‌های جنسی از جنس نر و ماده می‌باشد. این عمل سبب کاهش هزینه، ساده کردن جمع‌آوری سلول‌های جنسی و انکوباسیون تخم می‌گردد. تقریباً تمام ماهیان در محیط پرورشی عملکرد تولیدمثلی ضعیفی را از خود نشان می‌دهند. غالباً در جنس ماده، ناتوانی در بلوغ نهایی اووسیت‌ها، تخمک‌گذاری و تخم‌ریزی وجود دارد (Mylonas *et al*., 2010) و در جنس نر ممکن است اسپرم با کیفیت ضعیف تولید شود (Mylonas and Zohar, 2007). این عملکرد ضعیف ناشی از این واقعیت است که ماهی در شرایط اسارت، شرایط تخم‌ریزی طبیعی را تجربه نکرده است. بنابراین، غده هیپوفیز در ترشح گنادوتروپین‌ها، بلوغ و تخمک‌گذاری ناتوان است. دستکاری هورمونی در آبزی‌پروری تجاری حتی در مورد گونه‌هایی که به صورت طبیعی مرحله تخمک‌گذاری و اسپرمیشن را طی می‌کنند، نیز اهمیت فوق‌العاده‌ای دارد بطوریکه در بسیاری از کارگاه‌های تکثیر ماهیان جهت بهینه‌سازی و همزمانی تولید تخم و لارو، کاهش دستکاری و استرس وارده به ماهیان و نیز کاهش هزینه‌های تخمک‌گذاری و اسپرم‌ریزی، القاء هورمونی صورت می‌گیرد (سوداگر و همکاران، ۱۳۹۵). مطالعات نشان داده است که پارامترهای مختلف تولید مثلی از جمله زمان رسیدگی، هم‌آوری کاری، تعداد تخم، درصد لقاح و سطح استروئیدهای جنسی تحت تاثیر هورمون‌های مورد استفاده در تکثیر مصنوعی آبزیان قرار می‌گیرد (Aizen *et al*., 2005; Barrero *et al*., 2008). هورمون‌های مختلفی برای تکثیر مصنوعی آبزیان در مراکز تکثیر و پرورش استفاده می‌شود و یکی از انواع این هورمون‌ها، آنالوگ‌های مختلفی از GnRH با نام‌های تجاری مختلف

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from isfj.ir at 9:01 +0430 on Monday July 27th 2020

می‌باشد (Zohar and Mylonas, 2001). GnRH یک نوروهورمون دکاپپتیدی است که از هیپوتالاموس ترشح شده و سبب تحریک سنتز و ترشح گنادوتروپین‌ها از هیپوفیز می‌شود (Okubo and Nagahama, 2008). یکی از بزرگترین معایب استفاده از آنالوگ‌های تولیدی توسط شرکت‌های مختلف قیمت بالای آن می‌باشد که تهیه آن را برای بسیاری از مراکز تکثیر و پرورش ماهیان زینتی غیر ممکن می‌کند. از سویی، مشکلات زیادی پیش‌روی واردات محصول از سایر کشورها وجود دارد که نیاز به استفاده از ذخیره ارزی کشور می‌باشد. همچنین تولید هورمون به کمک روش DNA نوترکیب، روشی مناسب جهت تولید داروهای پروتئینی می‌باشد که با توجه به ساختار پپتیدی GnRH و عدم تغییرات پس از ترجمه می‌توان از میزبان پروکاریوتی همانند باکتری *Escherichia coli* استفاده نمود که دارای قابلیت کشت در محیط کشت‌های ارزان قیمت می‌باشد. بنابراین، تولید این پروتئین در داخل کشور به روش نوترکیب روش مقرون به صرفه‌ای می‌باشد. لذا، هدف از این مطالعه بررسی فعالیت زیستی هورمون GnRH نوترکیب تولیدی در آزمایشگاه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری (محمدزاده و همکاران، ۱۳۹۸) بر القاء و همزمانی اوولاسیون در ماهی طلایی (*C. auratus*) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تولید GnRH نوترکیب به روش محمدزاده و همکاران (۱۳۹۸) انجام شد. بدین صورت که توالی DNA مربوط به هورمون GnRH ماهیان مختلف از بانک اطلاعاتی NCBI[1] استخراج گردید. توالی پپتیدی این هورمون در انواع مختلف ماهیان نیز بررسی شد و بهترین توالی به لحاظ پایداری بیشتر در برابر هضم آنزیم‌های پروتئولیتیک و ماندگاری بیشتر در سیستم زنده در نظر گرفته شد. سپس با توجه به توالی انتخابی برای این پپتید، توالی ژنی آن ترجمه شد. پس از انتخاب توالی ژنی و نواحی مورد نظر از جمله ناحیه دکاپپتید (پپتید فعال) و ناحیه GAP، جهت تسهیل در امر کلونینگ و بیان ژن، تغییراتی از جمله اضافه کردن کدون شروع و خاتمه بر توالی ژن و افزودن جایگاه برش آنزیم‌های محدود کننده در هر دو انتهای ژن صورت گرفت. با مجموعه تغییرات صورت گرفته، توالی مورد نظر با ۱۸۶ جفت باز به شرکت Shainegene (کشور چین) برای سنتز بیوشیمیایی ارسال شد و به صورت کلون شده در وکتور بیانی $pET28a^{+}$ دریافت گردید. وکتور نوترکیب به باکتری میزبان *Escherichia coli* BL21(DE3) انتقال داده شد و بعد از بررسی بیان، میزان تولید پپتید نوترکیب بهینه سازی شده و سپس خالص‌سازی انجام شده و صحت خالص‌سازی با تکنیک‌های SDS-PAGE و وسترن بلات سنجیده شد.

ماهی و شرایط پرورش

برای بررسی فعالیت زیستی هورمون نوترکیب در ماهی طلایی، در این آزمایش ابتدا تعداد۴۰ جفت مولد ماهی طلایی (با میانگین وزن ۶/۲۱ ± ۷۲/۲ گرم) آماده تکثیر (مولدین ماده با شکمی نرم و برآمده) از مرکز تکثیر و پرورش ماهی گرمابی در استان گیلان خریداری شد و پس از انتقال به سالن تکثیر و پرورش ماهی در دانشکده علوم دامی و شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به مدت دو هفته به شرایط آزمایش سازگار شدند. سپس در ۴ گروه آزمایشی تقسیم گردیدند. در هر تیمار ده مولد مورد بررسی قرار گرفت. هر جفت ماهی در یک آکواریوم ۵۰ لیتری به ابعاد ۱۵×۱۵×۲۰ سانتی‌متر مجزا به صورت کاملاً تصادفی قرار داده شدند. بعد از گذراندن دوره آداپتاسیون و مناسب شدن دمای محیط، تکثیر مولدین انجام شد. آب مورد استفاده برای نگهداری ماهیان با استفاده از تیوسولفات سدیم و همچنین هوادهی، کلرزدایی گردید و شرایط فیزیکوشیمیایی آب در حد بهینه گونه شامل درجه حرارت ۱±۲۶ درجه سانتی‌گراد، pH ۰/۳±۸/۳ کنترل شد (رعیت‌پیشه و همکاران، ۱۳۹۰) (pH مطلوب برای تکثیر و پرورش در طولانی‌مدت برای گونه‌ی مورد مطالعه ۸-۷ می‌باشد (ارجینی، ۱۳۸۸). اما بنظر می‌رسد با توجه به کوتاه بودن دوره تکثیر، در مطالعه

[1] National Center Biotechnology Information

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from isfj.ir at 9:01 +0430 on Monday July 27th 2020

حاضر pH مذکور اثر منفی در عملکرد مولدین نداشت) و میزان اکسیژن محلول بوسیله هوادهی مداوم در حد اشباع نگهداری شد و به میزان ۰/۸±۱۱/۵ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد. سختی کل ۱۵/۱±۱۸۴/۶ میلی‌گرم در لیتر بود. سیستم آبرسانی به تانک‌های نگهداری ماهیان متصل به آب لوله‌کشی شهری (شهر ساری) بود و آب مورد استفاده پیش از ورود به تانک نگهداری ماهیان، در تانک‌های ذخیره آب با استفاده از تیوسولفات سدیم کلرزدایی و به مدت ۴۸ ساعت هوادهی گردید. طول دوره روشنایی ۱۶ ساعت و طول دوره تاریکی ۸ ساعت طی ۲۴ ساعت بود. برای تکثیر مصنوعی این مولدین ۴ تیمار آزمایشی در نظر گرفته شد. در تیمارهای اول، دوم و سوم از دوزهای مختلف هورمون GnRH نوترکیب تولیدی شامل۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن (زادمجید و همکاران، ۱۳۸۸؛ رعیت‌پیشه و همکاران، ۱۳۹۰؛ احمدی‌فر و همکاران، ۱۳۹۴) به همراه ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن متوکلوپرامید (آنتی‌دوپامین) (Podhorec *et al.*, 2016) و در تیمار چهارم از سرم فیزیولوژی ۰/۰۹ درصد به همراه ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن متوکلوپرامید با حجم یک میلی‌لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به عنوان شاهد استفاده شد. تزریق هورمون به وسیله سرنگ انسولین در یک مرحله انجام گرفت و مولدین قبل از تزریق با پودر گل میخک با دوز ۱۵ ppm بیهوش شدند (احمدی‌فر و همکاران، ۱۳۹۴). سوزن سرنگ حاوی محلول هورمون با زاویه ۴۵ درجه در زیر ناحیه باله پشتی وارد گردید و هورمون به میزان تعیین شده به صورت عضلانی به ماهی تزریق شد. بعد از انجام عمل تزریق، خروج سرنگ به آرامی، همراه با ماساژ ناحیه تزریق هورمون صورت گرفت تا محلول هورمون تزریقی از بدن خارج نشود.

بررسی عملکرد تولیدمثلی مولدین ماهی طلایی

در این آزمایش تخم‌کشی و اسپرم‌گیری به صورت دستی از مولدین صورت گرفت و تخم و اسپرم در ظرفی استریل و خشک مخلوط گردید، سپس آب شیرین بتدریج اضافه شد تا حرکت اسپرم به سمت تخمک تسهیل گردد و به مدت یک دقیقه با پر به آرامی هم زده شدند و پس از یک دقیقه لقاح انجام شد. برای رفع چسبندگی تخم‌های لقاح یافته از محلول کاربامید (۳ گرم اوره، ۴ گرم نمک در یک لیتر آب) استفاده شد و به مدت ۳۰ دقیقه تخم‌ها در محلول قرار گرفتند (هر ده دقیقه یکبار تعویض محلول کاربامید صورت گرفت و مقدار محلول اضافه شده به اندازه ۱۰ درصد از حجم کل تخم بود) و بعد از ۳۰ دقیقه شستشو با محلول کاربامید، به مدت یک ساعت و ۳۰ دقیقه توسط آب شیرین شستشو داده شدند و سپس تخم‌ها به آرامی وارد آکواریوم انکوباسیون شدند. تعیین هماوری، شمارش تخمک‌ها به صورت تخمینی و با روش وزنی صورت گرفت. در تعیین هماوری نسبی نیز، مولدین وزن شده و نسبت تعداد تخم‌های استحصال شده به وزن ماهیان برحسب گرم براساس رابطه ذیل محاسبه گردید (Targonska and Kucharczyk, 2011):

وزن مولدین (کیلوگرم) / تعداد کل تخمک‌ها = هم‌آوری نسبی

آنالیز آماری

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. بررسی نرمال بودن داده‌ها از طریق آزمون Kolmogorov-Smirnov، تجزیه و تحلیل داده‌های بدست آمده به‌روش آنالیز واریانس یک طرفه انجام گردید و برای آنالیز آماری از نرم‌افزار SPSS 25، مقایسه میانگین‌ها از آزمون آماری دانکن در سطح احتمال ۹۵ درصد استفاده شد.

نتایج

بعد از تزریق هورمون، مولدین ماده طی روز اول، چندین بار مورد معاینه قرار گرفتند تا در صورت آماده بودن و اوله شدن تخم‌ها تکثیر شوند. این روند معاینه مولدین تا ۲۴ ساعت پس از تزریق ادامه یافت و ماهیان رسیده و آماده تکثیر شناسایی و همان روز تکثیر شدند. در پایان این دوره، از گروه‌های دریافت کننده هورمون، در تیمار اول از ۵ جفت مولد ۴ جفت، در تیمار دوم ۳ جفت مولد و در تیمار سوم تمامی ۵ جفت مولد به مرحله باروری رسیدند در حالیکه از گروه شاهد هیچیک از مولدین به

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from isfj.ir at 9:01 +0430 on Monday July 27th 2020

این مرحله نرسیدند (جدول ۱). اختلاف معنی‌داری بین تیمارها در دوره تاخیر مشاهده شد و کمترین زمان در مولدین تیمار سوم ثبت گردید (جدول ۲؛ $p<۰/۰۵$). در مقدار تخم استحصالی در هر تیمار و هماوری نسبی (جدول ۲) اختلاف معنی‌داری بین سطوح مختلف هورمون نوترکیب تزریقی مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$).

جدول ۱. نرخ جواب دهی مولدین ماهی طلایی تزریق شده با تیمارهای آزمایشی

Table 1: The response rate of goldfish broods injected with experimental treatments

تیمارها	نوع هورمون تزریقی	دور تزریقی هورمون (میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن) +۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن متوکلروپرامید	تعداد مولدین تخم‌ریزی کرده	درصد مولدین تخم‌ریزی کرده
اول	GnRH نوترکیب	۱۰	۴	۸۰[b]
دوم	GnRH نوترکیب	۱۵	۳	۶۰[c]
سوم	GnRH نوترکیب	۲۰	۵	۱۰۰[a]
چهارم	سرم فیزیولوژی	۰/۰۹	-	-

حروف لاتین نامشابه در هر ستون نماینگر وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی می‌باشد ($p<۰/۰۵$)

جدول ۲: عملکرد تولید مثلی مولدین ماهی طلایی تزریق شده با تیمارهای آزمایشی

Table 1: Reproductive performance of goldfish broods injected with experimental treatments

تیمارها	دور تزریقی هورمون (میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن) +۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن متوکلروپرامید	دوره تاخیر (ساعت)	تعداد تخم استحصالی	هم‌آوری نسبی
اول	۱۰ GnRH نوترکیب	۲۲ ± ۰/۶[a]	۲۵۴۲ ± ۵۷/۱[a]	۱۷/۸۶ ± ۰/۶[a]
دوم	۱۵ GnRH نوترکیب	۲۱ ± ۰/۵[a]	۲۵۴۰ ± ۴۸/۲[a]	۱۸/۰۵ ± ۰/۳۳[a]
سوم	GnRH۲۰ نوترکیب	۱۷ ± ۰/۵[b]	۲۵۵۶ ± ۵۷/۶[a]	۱۸/۴ ± ۰/۴۸[a]
چهارم	۰/۰۹ سرم فیزیولوژی	-	_	-

حروف لاتین نامشابه در هر ستون نماینگر وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی می‌باشد ($p<۰/۰۵$)

بحث

یکی از بزرگترین مشکلات آبزی‌پروری تجاری خانواده کپورماهیان، مشکلات بدست آوردن تخم‌های با کیفیت در مقدار بالا می‌باشد (Targonska and Kucharczyk, 2011). تکثیر مصنوعی کپورماهیان سخت می‌باشد و نیاز به تحریکات هورمونی مناسب دارد (Brzuska, 2005). بسیاری از ماهیان در زمان پرورش به دلیل کاهش هورمون‌های استروئیدی در روند تولیدمثلی خود دچار نقصان می‌شوند. برخی از مواقع تنها راه کنترل تولیدمثل ماهیان پرورشی استفاده از هورمون‌ها به منظور افزایش سطح هورمون استروئیدی همچون تستوسترون و ۱۱ کتوتستوسترون جهت القاء تولیدمثل می‌باشد (Zohar and Mylonas, 2001). در مطالعه حاضر، کارایی هورمون GnRH نوترکیب تولیدی در آزمایشگاه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در القاء رسیدگی نهایی جنسی در مولدین ماهی طلایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که مولدین دریافت کننده سطوح مختلف (۱۰، ۱۵ و۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن همراه با آنتی‌دوپامین) این هورمون به مرحله باروری رسیدند، اما هیچیک از مولدین گروه شاهد (تزریق با سرم فیزیولوژی همراه با آنتی‌دوپامین) به این مرحله نرسیدند. مطالعات مختلفی در زمینه استفاده از GnRH سنتتیک برای القاء بلوغ نهایی در ماهیان انجام شد، اثر القایی GnRH در گونه‌های مختلف ماهیان به اثبات رسیده است

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from isfj.ir at 9:01 +0430 on Monday July 27th 2020

(Drori *et al*., 1994; Podhorec *et al*., 2016). القاء کننده‌های مختلفی در بازار وجود دارند که برای القاء بلوغ نهایی در مولدین پرورشی مورد استفاده قرار می‌گیرند. یکی از القاءکننده‌ها عصاره هیپوفیز می‌باشد، اما استفاده از عصاره هیپوفیزی با اشکالات مختلفی در ارتباط است و یکی از مهمترین مشکلات در این زمینه انتقال بیماری از ماهی‌دهنده به ماهی گیرنده می‌باشد. همچنین برداشت و آماده‌سازی عصاره هیپوفیز کار سخت و زمان‌بری بوده و این عصاره علاوه بر هورمون‌های گنادوتروپین، دارای سایر هورمون‌هایی می‌باشد که می‌توانند فعالیت گنادوتروپین‌ها را تقویت یا مهار کنند (Aizen *et al*., 2017). القاء کننده دیگری که به طور گسترده در هچری‌ها استفاده می‌شود، هورمون گنادوتروپین می‌باشد. این هورمون مزایای بیشتری نسبت به عصاره هیپوفیز دارد، اما از قیمت بالایی برخوردار می‌باشد و همچنین یک مولکول بزرگ می‌باشد. لذا، تزریق آن در دفعات مختلف ممکن است سبب بروز واکنش ایمنی گردد. بنابراین، قابلیت استفاده را در همه گونه‌ها ندارد (Mylonas and Zohar, 2001). اما رویکرد دیگری که در مورد القاء کننده‌ها وجود دارد، استفاده از آنالوگ‌های مختلف هورمون GnRH با نامهای تجاری مختلف می‌باشد. ترکیب GnRH شیمیایی بر خلاف عصاره هیپوفیز ریسک انتقال بیماری‌های عفونی را از بین می‌برد و نیز امکان کاربرد دوزهای صحیح GnRH را ایجاد می‌کند. علاوه بر آن، یک مولکول کوچک می‌باشد. لذا، احتمال تحریک سیستم ایمنی کاهش می‌یابد. همچنین از بالاترین سطح محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد عمل می‌کند و در این مسیر ممکن است سبب تحریک ترشح سایر عوامل از جمله هورمون رشد، هورمون تیروئید شود که به صورت غیر مستقیم در فرآیند تولید مثل نقش مثبت دارند. همچنین به دلیل همولوژی در توالی پروتئینی GnRH در بین گونه‌های مختلف ماهیان، آنالوگ‌های تولیدی قابلیت استفاده را برای تمامی گونه‌ها دارند (Nazari *et al*., 2009). لذا، در بیشتر گونه‌های تجاری از آنالوگ‌های سنتتیک GnRH که فقط شامل بخش فعال پپتید (دکاپپتید) می‌باشد و به روش شیمیایی تولید می‌شوند، استفاده می‌گردد. در مطالعه حاضر، از فرم نوترکیب تولیدی این هورمون استفاده شد که از مزیت‌های هورمون GnRH نوترکیب می‌توان به این نکته اشاره کرد که این هورمون همانند سایر آنالوگ‌های هورمون GnRH قابل سنتز و استحصال به شکل خالص است (بر خلاف هورمون هیپوفیز) و احتمال انتقال بیماری‌ها وجود ندارد و همچنین می‌توان در طراحی توالی آن از سایر قسمت‌های پپتید همانند قسمت پروتئولیتیک سایت (بخشی از پروتئین کامل GnRH که بعد از منطقه فعال بیولوژیک قرار دارد) و بخش وابسته به پروتئین استفاده نمود (بر خلاف آنالوگ‌های سنتتیک) که در پایداری و حفظ ساختار سوم آن کمک می‌کند. از سویی، با توجه به وارداتی بودن آنالوگ‌هایی سنتتیک هر ساله هزینه زیادی در مراکز تکثیر و پرورش صرف تهیه این آنالوگ‌ها می‌گردد که هزینه تولید را افزایش می‌دهد، ولی با توجه به تولید GnRH نوترکیب در میزبان باکتریایی و عدم نیاز به سنتز شیمیایی، هزینه تولید آن کمتر است. بنابراین، فرم نوترکیب تولیدی می‌تواند جایگزین مناسبی برای آنالوگ‌های سنتتیک موجود در بازار باشد.

در مطالعه حاضر، به همراه GnRH نوترکیب از آنتی‌دوپامین (متوکلوپرامید) استفاده شد. مطالعات مختلف نشان داد که آنتی‌دوپامین‌ها اثر القایی در بلوغ نهایی و اوولاسیون ندارند و با توجه به فعالیت بالای دوپامین و اثر بازدارندگی آنها در عملکرد تولید مثل در خانواده کپورماهیان در فصل تولید مثل، آنتی‌دوپامین‌ها فقط به عنوان بازدارنده دوپامین در این خانواده کاربرد دارند (Podhorec *et al*., 2016). به طور کلی، از ترکیب GnRH به عنوان القاء کننده بلوغ نهایی و آنتی‌دوپامین به عنوان بازدارنده عملکرد دوپامین به طور گسترده برای القاء اوولاسیون استفاده می‌شود (Podrorec *et al*., 2016). ترکیب آنالوگ‌های GnRH و آنتی‌دوپامین در چندین گونه از ماهیان موثر بوده و به عنوان ابزاری مفید برای غلبه بر اختلالات تولیدمثلی و بدست آوردن تخم باکیفیت در مولدین پرورشی می‌باشد (Heyrati *et al*., 2007; Podhorec *et al*., 2016).

در مطالعه حاضر، تمامی دوزهای مورد استفاده سبب القاء بلوغ نهایی شدند. اثر القایی هورمون نوترکیب مورد

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from isfj.ir at 9:01 +0430 on Monday July 27th 2020

استفاده در این مطالعه مشابه با اثر القایی هورمون GnRH سنتتیک مورد استفاده در ماهی طلایی در مطالعات گذشته توسط محققین مختلف می‌باشد (زامجید و همکاران، ۱۳۸۸؛ رعیت‌پیشه و همکاران، ۱۳۹۰). زادمجید و همکاران (۱۳۸۸) از دوز ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن هورمون GnRH سنتتیک و رعیت‌پیشه و همکاران (۱۳۹۰) از دوزهای ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن هورمون GnRH سنتتیک برای القاء بلوغ نهایی در ماهی طلایی استفاده نمودند. با توجه فقدان مطالعه پیشین در مورد دوز مطلوب هورمون نوترکیب تولیدی در مطالعه حاضر از سه دوز (۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن) استفاده شد و تمامی دوزها قابلیت القاء بلوغ نهایی را داشت، اما بهترین دوز مورد استفاده از لحاظ عملکرد تولید مثلی (مولدین تخم‌ریزی کرده بیشتر و دوره تاخیر کوتاه‌تر) در این مطالعه دوز ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن بود. بر اساس نتایج این تحقیق مشخص شد که در استفاده از دوز ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن هورمون GnRH نوترکیب تعداد مولدینی که موفق به تخم‌ریزی شدند، کمتر از سایر تیمارهای هورمونی بود که می‌توان آن را به نامناسب بودن مقدار تزریقی این هورمون برای القاء تخم‌ریزی مولدین ماهی طلایی نسبت داد، زیرا بر اساس یک بررسی انجام شده بر مولدین ماهی کپور (*Cyprinus carpio*)، استفاده از مقدار پایین آنالوگ‌های هورمون GnRH موجب عدم تخم‌ریزی مولدین گردید (Drori *et al*., 1994). سطح جواب‌دهی گونه‌های مختلف به هورمون GnRH متفاوت بود و میزان جواب‌دهی به عواملی مانند دوز اولیه هورمون تزریقی، میزان پایداری هورمون در بدن، گونه ماهی و دمای آب بستگی دارد (Mylonas and Zohar, 2001).

یکی از مهم‌ترین عوامل در فرآیند تکثیر مصنوعی مولدین، دفعات تزریق مولدین می‌باشد که بر عملکرد تولید مثلی مولدین تاثیرگذار می‌باشد. تکثیر مولدین با تزریق تک مرحله‌ای در برخی از گونه‌ها نتایج بهتری را بهمراه داشت، زیرا استرس ناشی از دستکاری که نقش تعیین کننده‌ای در عملکرد تولید مثلی برخی گونه‌ها ایفاء می‌کند، در تزریق تک مرحله‌ای کمتر می‌باشد (Targonska and Kucharczyk, 2011). تزریق در مطالعه حاضر به صورت تک مرحله‌ای انجام شد. به طور معمول تزریق GnRH سنتتیک در دو مرحله با فاصله زمانی ۱۸-۱۰ ساعت در خانواده کپورماهیان انجام می‌گیرد و تزریق تک مرحله‌ای برای القاء اوولاسیون در این خانواده کافی نمی‌باشد. عدم پاسخ‌دهی تزریق یکباره GnRH سنتتیک در القاء رسیدگی نهایی جنسی ماهیان مربوط به نیمه عمر کوتاه آن در گردش خون می‌باشد. با توجه به ساختار پپتیدی هورمون GnRH، این هورمون در معرض انواعی از اندوپپتیدازها در بدن قرار دارد که سبب کاهش نیمه عمر آن می‌شوند بطوریکه GnRH طبیعی به مدت ۵ دقیقه در بدن باقی می‌ماند و بعد از آن توسط پپتیدازها تخریب می‌شود (Gothilf and Zohar, 1991; Zohar and Mylonas, 2001). از سویی، رسیدگی نهایی برای کامل شدن در ماهیان ممکن است به چندین روز زمان نیاز داشته باشد. بنابراین، غلظت بالای GnRHa باید در این مدت در سیستم گردشی حفظ شود تا غلظت بالا و مورد نیازی را از گنادوتروپین نوع دوم القاء کند. همچنین ماهیان بلافاصله بعد از تزریق GnRHa شروع به بلوغ نهایی نمی‌کنند و غلظت LH پلاسما و استروئید ممکن است چند ساعت بعد از تزریق هورمون افزایش یابد. بنابراین، در پروتکل القاء رسیدگی جنسی با GnRH با توجه به نیمه عمر کوتاه آن در سیستم گردشی نیاز به تزریق پی در پی (۲-۳ مرتبه) آن می‌باشد (Mylonas and Zohar, 2001). در مطالعه حاضر، هورمون نوترکیب تولیدی در یک مرحله تزریق شد. تفاوت هورمون تولیدی با هورمون سنتتیک احتمالاً در میزان پایداری آن در بدن می‌باشد. هورمون نوترکیب تولیدی در بخش فعال بگونه‌ای طراحی شده است که مقاومت بالایی در برابر هضم پروتئولیتیک داشته باشد. برای افزایش پایداری از تغییر در برخی اسیدآمینه‌های بخش دکاپپتید استفاده شده است و ابتدا بخش دکاپپتید طراحی گردید (Mohammadzadeh *et al*., 2019). چندین روش برای افزایش نیمه عمر پپتید وجود دارد که این تکنیک‌ها شامل روش‌های شیمیایی و ژنتیکی می‌باشند (Moradi and

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from isfj.ir at 9:01 +0430 on Monday July 27th 2020

Varamini, 2015). در روش ژنتیکی جایگزینی اسیدآمینه‌هایی که در پایداری اهمیت بالایی دارند، برای افزایش نیمه عمر استفاده می‌شود، زیرا تغییر در اسیدآمینه در انتهای آمینی و کربوکسیلی می‌تواند سبب افزایش نیمه عمر و تمایل اتصال به گیرنده سطح سلول گردد (Blomenroh *et al*., 2002). برای طراحی بخش دکاپپتید، اسیدآمینه‌های شماره ۲، ۳، ۴، ۹ و ۱۰ که در بین گونه‌های مختلف ماهیان در GnRH نوع یک و نوع دو کاملاً حفظ شده بودند، بدون تغییر در نظر گرفته شدند، اما اسیدآمینه‌های شماره ۱، ۵، ۷، ۸ در بین گونه‌های مختلف متفاوت می‌باشد. بنابراین، اسیدآمینه پایدارتری که شامل اسیدآمینه‌های گلوتامیک‌اسید، هیستیدین، لوسین و تیروزین می‌باشد، انتخاب شد. اسیدآمینه شماره ۶ در تمام گونه‌ها در انواع GnRH اسیدآمینه گلایسین می‌باشد، اما حضور این اسیدآمینه در موقعیت ۶ می‌تواند محلی برای هضم پروتئولیتیک باشد. بنابراین، سبب کاهش نیمه عمر می‌شود (Moradi and Varamini, 2015). معمولاً جایگزینی گلاسین در موقعیت ۶ با اسیدآمینه‌ی دی مانند دی‌سرین یا با اسیدآمینه هیستیدین و لایزین سبب افزایش پایداری متابولیک می‌شود (Moradi and Varamini, 2015) و علاوه بر قسمت فعال پپتید (قسمت‌های پروتئولیتیک سایت و بخش وابسته به پروتئین)، سبب حفظ ساختار سوم و پایداری آن در برابر هضم پروتئولیتیک می‌گردد (Anderson and Klungland, 1993). در مطالعه حاضر، حضور سرین در این موقعیت پایداری بیشتری در برابر هیستیدین و لایزین نشان داد. لذا، با جواب‌دهی مناسب در مولدین مورد مطالعه با تزریق تک مرحله‌ای می‌توان استنباط کرد که هورمون مذکور از پایداری قابل قبولی در بدن ماهیان برخوردار است.

یکی دیگر از عوامل مهم در فرآیند تکثیر مصنوعی مولدین، دوره تاخیر می‌باشد که بر اساس آن برنامه‌ریزی‌های مربوط به عملیات تکثیر و سالن انکوباسیون انجام می‌شود. در مطالعه حاضر، کوتاه‌ترین زمان تأخیر در مولدین تیمار سوم (تزریق با دوز ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن) مشاهده شده است که به مدت ۱۷ ساعت بعد از تزریق اوولاسیون رخ داد و بالاترین مقدار آن در مولدین تیمار اول و دوم مشاهده شد که به مدت ۲۱ و ۲۲ ساعت بعد از تزریق هورمون اوولاسیون اتفاق افتاد. Targonska و Kucharczyk (۲۰۱۱) گزارش دادند تفاوت در دوره تأخیر مربوط به تفاوت در عملکرد هورمون در سطوح مختلف و دمای آب می‌باشد. با توجه به یکسان بودن شرایط آزمایشگاه برای همه تیمارهای آزمایشی می‌توان استنباط کرد که تفاوت در نتایج در تیمارهای مختلف به علت تفاوت در سطح هورمون مورد استفاده بود (Targonska and Kucharczyk., 2011).

در مطالعه حاضر، کاربرد هورمون GnRH نوترکیب تاثیر منفی بر عملکرد تولید مثلی مولدین ماهی طلایی نداشت که با نتایج سایر محققینی که تاثیر منفی در استفاده از آنالوگ‌های مختلف هورمون GnRH بر عملکرد تولید مثلی مولدین گونه‌های مختلف را مشاهده نکردند، مطابقت داشت (Nazari *et al*., 2009; Podhorec *et al*., 2016).

با توجه به نتیجه بدست آمده از مطالعه حاضر می‌توان استنباط کرد که هورمون GnRH نوترکیب تولیدی در آزمایشگاه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، دارای فعالیت بیولوژیک مناسب می‌باشد و قابلیت القاء بلوغ نهایی را در مولدین پرورشی دارد. لذا، می‌تواند به عنوان یک آنالوگ خاص برای درمان اختلالات تولیدمثلی در دسترس پرورش‌دهندگان قرار گیرد. برای تعیین دوز موثر، با توجه به حصول بهترین نتیجه در تیمار دریافت کننده ۲۰ میکروگرم هورمون نوترکیب بر کیلوگرم وزن بدن، عدم بررسی دوزهای بالاتر، جهت تعیین دوز هورمون نیاز به مطالعات بیشتر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شد. از همکاران آزمایشگاه سلولی و مولکولی، آزمایشگاه ژنتیک و تکثیر و پرورش گروه شیلات جهت همکاری و فراهم نمودن تسهیلات، سپاسگزاری می‌گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from isfj.ir at 9:01 +0430 on Monday July 27th 2020

منابع

احمدی‌فر، ا.، ایمانپور، م.ر.، امینی، ک.، زادمجید، و. و غلامپور، ط.ع.،۱۳۹۴. روش‌های محتلف بکارگیری هورمون LHRHa در تکثیر از از فصل جنس نر ماهی قرمز (*Carassius autatus*, Linnaeus 1758). فصلنامه علمی-پژوهشی بیولوژی کاربردی، دوره ۶، شماره ۱، صفحات ۲۹ تا ۳۹.

ارجینی، م.، ۱۳۸۸. راهنمای گلدفیش (تکثیر و پرورش، تغذیه و بیماری‌ها) انتشارات برهمند. ایران.

رامین، م.، دوستدار، م. و عوفی، ف.، ۱۳۹۶. معرفی ماهی *Chaana gachua* (Hamilton, 1822) جهت نگه‌داری در آکواریوم. مجله آبزیان زینتی، دوره ۴، شماره ۴، صفحات ۱۸ تا ۲۸.

رعیت‌پیشه، م.ک.، مجازی‌امیری، ب.، موسوی‌ثابت، ح.، مرادخانی، ز. و محبی، ص.، ۱۳۹۰. بررسی مقایسه‌ای اثر ترزیق GnRHa و عصاره هیپوفیز CPE بر القاء و همزمانی اوولاسیون، هماوری نسبی، درصد لقاح، تخمه‌گشایی، تلفات و بازماندگی لارو در ماهی طلایی *Carassius auratus*. مجله پژوهش‌های علوم و فنون دریایی، سال ۶، شماره ۱، صفحات۴۰ تا ۴۸.

زادمجید، و.، ایمانپور، م.ر.، سوداگر، م. و شعبانی، ع.، ۱۳۸۸. اثرات تزریق هورمون‌های GnRHa، HCG و عصاره هیپوفیز روی پارامترهای بیوشیمیایی پلاسمای اسپرمی در ماهی قرمز (*Carassius auratus gibelio*). مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۲، شماره ۲، صفحات ۳۳۳ تا ۳۴۲.

سوداگر، م.، صدق‌پورثابت، س.، ذکریائی، ح. و دادگر، ش.، ۱۳۹۵. بررسی اثر هورمون‌های اواپریم (sGnRHa + دامپریدون)، اوافکت (آنتاگونیست دوپامین + GnRH) و عصاره هیپوفیز بر بازده تکثیر مصنوعی ماهی سفید (*Rutilus kutum*). پژوهش‌های ماهی شناسی کاربردی، دوره ۴، شماره ۳، صفحات ۵۳ تا ۶۴.

عبدلی، ا.، ۱۳۷۸. ماهیان آب‌های داخلی ایران. موزه حیات وحش ایران. صفحه ۳۷۶.

محمدزاده، ص.، یگانه، س.، مرادیان، ف.، فلاحتکار، ب. و میلا، س.، ۱۳۹۸. انتقال و بیان ژن GnRH نوترکیب ماهی در باکتری *E. coli* BL21 به منظور تولید هورمون نوترکیب. مجله علمی شیلات ایران، سال ۲۸، شماره ۳. صفحات ۱۳۷ تا ۱۴۸. Doi: 10.22092/ISFJ.2019.119131

مقدسی، ا. و دندانی، ع.، ۱۳۸۱. اطلس رنگی ماهیان زینتی. چاپ کیمیا، صفحه ۲۱۲.

Aizen, J., Meiria, I., Tzchoria, I., Levavi-Sivan, B. and Rosenfeld, H., 2005. Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. *General and Comparative Endocrinology*, 142: 212-221. Doi: 10.1016/j.ygcen.2005.01.002.

Aizen, J., Hollander-Cohen, L., Shpilman, M. and Levavi-Sivan, B., 2017. Biologically active recombinant carp LH as a spawning-inducing agent for carp. *Journal of Endocrinology*, 232: 391-402. Doi: 10.1530/JOE-16-0435.

Andersen, O. and Klungland, H., 1993. The salmon GnRH encoding gene in teleost fish. *International Review Cytology*, 147: 165-191.

Barrero, M., Small, B.C., Dabramo, L.R., Waldbieser, G.C., Hanson, L.A. and Kelly, A.M., 2008. Effect of carp pituitary extract and luteinizing hormone releasing analog hormone on reproductive indices and spawning of 3-year-old channel catfish.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from isfj.ir at 9:01 +0430 on Monday July 27th 2020

North American Journal of Aquaculture, 70: 138-146. Doi: 10.1577/A06-072.1.

Blomenrohr, M., Laak, T.T., Kuhen, R., Beyermann, M., Hund, E., Bogerd, J. and Leurs, R., 2002. Chimaeric gonadotropin-releasing hormone (GnRH) peptides with improved affinity for the catfish (*Clarias gariepinus*) GnRH receptor. *Biochemistry Journal*, 361: 515-523. Doi: 10.1042/0264-6021:3610515.

Brzuska, E., 2005. Artificial spawning of carp (*Cyprinus carpio* L.), differences between females of Polish strain 6 and Hungarian strain W treated with carp pituitary homogenate, Ovopel or Dagin. *Aquaculture Research*, 36: 1015-1025. Doi: 10.1046/j.1365-2109.1999.00350.x.

Drori, S., Ofir, M., Levavi-Sivan, B. and Yaron, Z., 1994. Spawning induction in common carp (*Cyprinus carpio)* using pituitary extract or GnRH superactive analogue combined with metoclopramide: analysis of hormone profile, progress of oocyte maturation and dependence on temperature, *Aquaculture*. 1119: 393-407. Doi: 10.1016/0044-8486(94)90303-4.

Gothilf, Y. and Zohar, Y., 1991. Clearance of different forms of GnRH from the circulation of the gilthead seabream, *Sparus aurata*, in relation to their degradation and bioactivities. *In*: (Scott A.P., Sumpter J.P., Kime D.E. and Rolfe M.S) Reproductive Physiology of Fish. *Fish Symposium*, 91, Sheffield. pp. 35-37

Heyrati, F.P., Mostafavi, H., Toloee, H. and Dorafshan, S., 2007. Induced spawning of kutum, Rutilus frisii kutum (Kamenskii, 1901) using (D-Ala(6), Pro(9)-NEt) GnRHa combined with domperidoen. *Aquaculture*, 265: 288–293. Doi: 10.1016/j.2006.12.011.

Mohammadzadeh, S., Moradian, F., Yeganeh, S., Falahatkar, B. and Milla, S., 2019. Design, production and purification of a novel recombinant gonadotropin-releasing hormone associated peptide as a spawning inducing agent for fish. *Protein Expression and purification*, 166: 1-20. Doi: 10.1016/j.pep.2019.105510.

Moradi, V.S., Varamini, P. and Toth, I., 2015. Evaluation of the biological properties and the enzymatic stability of glycosylated luteinizing hormone-releasing hormone analogs. *The AAPS Journal*, 5: 1135-1143. Doi: 10.1208/s12248-015-9769-x.

Munakata, A. and Kobayashi, M., 2010. Endocrine control of sex behavior in teleost fish. *General and Comaparative Endocrinology*, 165: 456-468. Doi:10.1016/j.ygcen.2009.04.011.

Mylonas, C.C. and Zohar, Y., 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10: 463-491.Doi: 10.1023/A:1012279814708.

Mylonas, C.C. and Zohar, Y., 2007. Promoting oocyte maturation, ovulation and spawning in farmed fish. In: Babin, P.J., Cerdá, J., Lubzens, E. (Eds.), The Fish Oocyte: from Basic Studies to Biotechnological Applications. Kluwer

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from isfj.ir at 9:01 +0430 on Monday July 27th 2020

Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 433–470.

Mylonas, C.C., Fostier, A. and Zanuy, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 516-534. Doi: 10.1016/j.ygcen.2009.03.007.

Nazari, R.M., Modanloo, M., Ghomi, M.R. and Ovissipor, M.R., 2009. Application of synthetic hormone LHRH-A_2 on the artificial propagation of Persian sturgeon *Acipenser persicus*. *Aquaculture International*, 18: 837-841. Doi: 10.1007/s10499-009-9304-0.

Okubo, K. and Nagahama, Y., 2008. Structural and functional evolution of gonadotropin releasing hormone in vertebrates. *Acta Physiologica*, 193: 3-15. Doi: 10.1111/j.1748-1716.2008.01832.

Podhorec, P., Socha, M., Amma, B.I., Sokolowska, M., Brzuska, E., Milla, S., Gosiewski, G., Stejskal, V., Simko, M. and Kouril, J., 2016. The effects of GnRHa with and without dopamine antagonist on reproductive hormone levels and ovum viability in tench *Tinca tinca*, *Aquaculture*. 465: 158-163. Doi: .org/10.1016/j.

Targonska, K. and Kucharczyk, K., 2011. The Application of hCG, CPH and Ovopel in Successful Artificial Reproduction of Goldfish (*Carassius auratus auratus*) Under Controlled Conditions. *Reproduction in Domestic Animals*, 46: 651-655. Doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01723.x

Zohar, Y. and Mylonas, C.C., 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, 197: 99-136. Doi: 10.1016/S0044-8486(01)00584-1.

www.SID.ir

Archive of SID

Study on biological performance of recombinant GnRH as a spawning – inducing agent for goldfish (*Carassius auratus*)

Mohammadzadeh S.[1]; Yeganeh S.[1*]; Moradian F.[2]; Rekabi M.[1]

[*]skyeganeh@gmail.com; s.yeganeh@sanru.ac.ir

1-Fisheries Department, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

2-Department of Basic Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

Downloaded from isfj.ir at 9:01 +0430 on Monday July 27th 2020

Abstract

Different hormones are used to induce final sexual maturation in fish breeders and one of these hormones is different analogue of gonadotropin releasing hormone (GnRH) with different trade names. The aim of this study was to evaluate the biological activity of recombinant GnRH produced in the laboratory of Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University on the induction and synchronization of ovulation in goldfish broodstock (*Carassius auratus*). For this purpose, 20 pairs of mature goldfish were obtained from goldfish breeding centers and transferred to wet laboratory of the Fisheries Department. Fish were acclimated to experimental conditions for 2 weeks then they were divided to 4 treatments. The first, second and third groups received 10, 15 and 20 μg recombinant GnRH/kg body weight, respectively, as well as 20 mg metoclopramide (anti-dopamine)/ kg body weight and control group was injected by physiological saline with 20 mg metoclopramide (0.09% NaCl.) The results showed that the produced recombinant GnRH had the ability to induce final maturation in the studied broodstock and all groups received recombinant GnRH ovulated but none of the control group ovulated. The latency period in the broods injected by dose of 20 μg/kg was significantly lower than the other treatments ($p<0.05$). There was no significant difference in the total obtained egg and relative fecundity between treatments of recombinant GnRH ($p<0.05$). The results indicated that the recombinant GnRH has a good biological activity and it can be introduced as a suitable alternative for the treatment of reproductive disorders in goldfish.

Keywords: Recombinant GnRH, hormonal induction, Goldfish, *Carassius auratus*

[*]Corresponding author

www.SID.ir