تکثیر مصنوعی ماهی سفیدک سیستان، *Schizothorax zarudnyi* با استفاده از هورمون های سنتتیک

احمد قرایی*[1]، عبدالعلی راهداری[2]، مصطفی غفاری[1]

1. گروه شیلات، پژوهشکده تالاب بین المللی هامون، دانشگاه زابل
2. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل

تاریخ دریافت: 89/1/22 تاریخ پذیرش: 89/5/27

چکیده

در این تحقیق امکان تکثیر مصنوعی ماهی سفیدک سیستان با استفاده از هورمون های القایی تکثیر (ovaprim® و hCG) به منظور دستیابی به بیوتکنیک تکثیر مصنوعی بررسی شد. تعداد 44 قطعه مولد ماده و 53 قطعه مولد نر به ترتیب با میانگین وزنی 45± 1328 و 17/6±632 گرم صید شده از چاه نیمه های سیستان انتخاب و بطور تصادفی در 5 گروه تیماری تقسیم شدند. گروه های تیماری شامل: 1- مولدین دریافت کننده هورمون ovaprim که در چهار مرحله به ترتیب با دوزهای 2، 5، 5 و 3میلی لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن ماهی ماده و مولدین نر همزمان با تزریق مرحله دوم ماده ها به میزان 3میلی لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تزریق شدند، 2- مولدین دریافت کننده ترکیبی از هورمون های ovaprim و hCG در سه مرحله به ترتیب با دوزهای 2 ،5 و 5 میلی لیتر و 1000، 2000 و 2000 واحد بین المللی به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ماهی ماده و مولدین نر همزمان با تزریق مرحله دوم ماده ها به میزان 3میلی لیتر ovaprim و1500 واحد hCGبه ازای هر کیلوگرم وزن بدن تزریق شدند، 3- مولدین دریافت کننده ترکیبی از هورمون های ovaprim و hCG در چهار مرحله به ترتیب با دوزهای 2، 5، 5، 3میلی لیتر و 200 ، 400، 400 و300 واحد به ازای هر کیلوگرم وزن ماهی ماده تزریق گردیدند. مولدین نر همزمان با تزریق مرحله دوم ماده ها به میزان 3میلی لیتر ovaprim و200 واحد hCG به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تزریق شدند، 4- مولدین دریافت کننده هورمون hCG در سه مرحله به ترتیب با دوزهای 400، 800 و 800 واحد به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ماهی ماده تزریق شدند. مولدین نر همزمان با تزریق مرحله دوم ماده ها به میزان 500 واحد به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تزریق گردید. 5- مولدین شاهد که به این مولدین محلول کلرید سدیم به میزان 3میلی لیتر به ازای وزن بدن آنها تزریق شد. نتایج به دست آمده نشان داد که بین گروه دریافت کننده ovaprim با گروه کنترل اختلاف معنی داری وجود دارد ($P<0.05$) و ovaprim می تواند بعنوان یک القاء کننده مناسب جهت تکثیر مصنوعی ماهی سفیدک سیستان عمل نماید.

واژگان کلیدی: ماهی سفیدک، *Schizothirax zarudnyi*، تکثیر مصنوعی، هورمون های سنتتیک.

* نویسنده مسوول، پست الکترونیک: agharaei551@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir

1. مقدمه

ماهیان زیرخانواده Schizothoracinae که متعلق به خانواده کپورماهیان می‌باشند به لحاظ داشتن دو سری فلس بزرگ در دوطرف مجرای تناسلی و مخرج از بقیه ماهیان متمایز هستند و بومی فلات مرکزی آسیا محسوب می‌شوند (Chen and Chen, 2001). ماهی سفیدک سیستان (*Schizothora x zarudnyi*, Nikolskii, 1897) بومی جنوب شرق ایران (تالاب هامون) می‌باشد. این ماهی در گویش محلی منطقه سیستان ماهی سفیدک و وطنی خوانده می‌شود و بیش از هر ماهی دیگری مورد پسند مردم می‌باشد. در محیط طبیعی این ماهی در دمای 14 تا 18 درجه سانتیگراد و هنگام جریانهای سیلابی رودخانه هیرمند تخم ریزی می‌کند. خشکسالی‌های پی‌درپی و ورود گونه های غیربومی مانند کپورماهیان چینی به تالاب هامون باعث شد تا به تدریج از جمعیت این ماهی کاسته شود و هم اکنون پراکنش آن محدود به مخازن چاه نیمه‌های سیستان می‌باشد.

از آنجا که ماهی سفیدک در اسارت به طور طبیعی تخمریزی نمی‌کند، بنابراین جهت حفظ این گونه ارزشمند باید از تکنیک‌های هورمونی برای القای تخمریزی مصنوعی بهره برد. یکی از مشکلات بسیار اساسی در بحث آبزی‌پروری کپورماهیان بدست آوردن گامتهایی با کیفیت مناسب می‌باشد (Kulikovsky *et al*., 1996; Horvath *et al*., 1997). به همین دلیل آزمایشات هورمونی زیادی جهت تحریک و القاء رسیدگی گامتها در گونه‌های تجاری کپورماهیان انجام شده است. یکی از معمولترین موادی که در القای تخمریزی بکار می‌رود عصاره هیپوفیز است که در برخی موارد گنادوتروپین جفت انسانی(hCG) هم به آن افزوده می‌شود (Kucharczyk *et al*., 1997a). همچنین القای اوولاسیون کپورماهیان با استفاده از آنالوگ سنتتیک هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRH) همراه با ضددوپامین های قوی نتایج قابل قبولی به همراه داشته است (Barth *et al*., 1997). مشکل اشاره شده در تخمریزی مصنوعی کپورماهیان وحشی که اکثراً از محیطهای طبیعی صید می‌شوند، ملموس‌تر است. از آنجا که بسیاری از ذخایر وحشی کپورماهیان منقرض می‌شوند، نیاز به توسعه سریع تکنیکهای تکثیر این ماهیان تحت شرایط کنترل شده وجود دارد.

براساس تجارب بدست آمده از تفریخگاه های کپورماهیان به خصوص در مورد گونه های وحشی، یکی از مشکلات اصلی عدم انجام اوولاسیون می باشد (Kucharczyk, 2002). روشهای مختلفی برای القای تخمریزی مصنوعی ماهیان بکار رفته‌اند. از بین عصاره هیپوفیز، گنادوتروپین جفت انسانی (hCG)، گنادوتروپین (GTH)، هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRH) و آنالوگهای GnRH، استفاده از GnRH و آنالوگهای آن نسبت به فرآورده‌های GTH مزایای بیشتری دارند. GnRH قادر است تحریک متوازن‌تری در رخدادهای تولیدمثلی ایجاد نموده و ارتباط متقابل بهتری بین این رخدادها و سایر اعمال فیزیولوژیکی ایجاد کند. این کار بطور مستقیم یا غیرمستقیم از طریق آزادسازی سایر هورمون های ضروری جهت رسیدگی نهایی موفق اووسیت و تخمریزی در ماهیان انجام می‌شود (Zohar and Mylones, 2001). هورمون آزادکننده گنادوتروپین(GnRH) محرک اصلی آزاد شدن هورمون محرک فولیکول (FSH= GTHI) و هورمون آزاد کننده (LH= GTHII) در ماهیان استخوانی می‌باشد (Van Der Kraak *et al*., 1998). علاوه بر نقش تحریک کنندگی هیپوتالاموس که به آن اشاره شد، در ماهیان استخوانی هیپوتالاموس نقش دیگری هم دارد که کنترل یا بازدارندگی ترشح LH می‌باشد. این فاکتور بازدارنده ترشح گنادوتروپین، دوپامین نامیده می‌شود (Peter *et al*., 1986). دوپامین مستقیماً مانع آزاد شدن LH در بسیاری از ماهیان استخوانی مانند ماهی طلایی (*Carassius auratus*; Peter *et al*., 1991)، کپور معمولی (*Cyprinus carpio*; Billard *et al*., 1983)، مارماهی اروپایی (*Anguilla anguilla*; Dufour *et al*., 1988)، گربه ماهی (*Claris gariepinus*; De

Archive of SID

www.SID.ir

(Leeuw *et al*., 1986) و تیلاپیا (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*; Levavi-Sivan *et al*., 1995) می‌گردد. معمولاً رسیدگی نهایی اووسیت و تخمریزی در این گونه‌ها بعد از تیمار آنها با ترکیبی از GnRH و یک ضد دوپامین حاصل می-گردد.

دو تا از هورمون های مترشحه از هیپوفیز به نام های FSH و LH همراه با هورمون محرک تیروئید و گنادوتروپین جفت انسانی ساختاری تقریباً مشابه داشته و هورمون های گلیکوپروتئین خوانده می‌شوند (Pierce and Parsons, 1981). فعالیت زیستی هورمون های گنادوتروپین به چند عامل بستگی دارد: طول مدت دوره‌ای که هورمون در چرخه حضور دارد (نیمه عمر)، پیوند با گیرنده های ویژه و فعالیت مکانیسم‌های انتقال سیگنال درون سلولی که منجر به پاسخ بیولوژیکی می‌گردد(Hearn and Gomme 2000). نیمه عمر هورمون های گنادوتروپین در جریان خون اساساً بوسیله درجه گلیکولیزاسیون تعیین می‌گردد. همین امر یکی از دلایل اصلی استفاده از هورمون جفت انسانی در درمان هورمونی انواع نقص‌های تولیدمثلی از جمله در پروتوکل های القای تخمریزی ماهی می‌باشد. هورمون جفت انسانی(hCG) بالاترین درجه گلیکولیزاسیون را در بین هورمون های گنادوتروپین دارد و نسبت به هر نوع گلیکوپروتئین دیگری بیشترین مقاومت در برابر تجزیه داشته و بنابراین مدت اثر آن طولانی تر است. هورمون جفت انسانی با گیرنده های مشابه LH پیوند برقرار می‌کند. همین امر مهمترین دلیلی است که استفاده از hCG را بعنوان یک درمان هورمونی جهت القای تخمریزی در ماهی توجیه می‌کند، زیرا hCG می‌تواند وظایفی مشابه LH ایفا و بنابراین تخمک ریزی و اسپرم ریزی را در ماهیان تحت اسارت القا می‌کند(Cabrita *et al*., 2008).

hCG به تنهایی معمولاً برای گونه های دریایی که در یک فصل چندین بار تخمریزی می کنند از قبیل snapper (*Pagrus auratus*) (Battaglene and Talbot 1992)، *Argyrosomus hololepidotus* (Battalglene and Talbot, 1994) و *Sillago ciliata* (Battalglene, 1996) استفاده گردیده است. در کپورماهیان hCG به تنهایی معمولاً موثر نیست. (Kucharczyk *et al*. 1997a,b) و تنها در گونه های محدودی مانند rudd نتایج بدست آمده رضایت بخش بوده است (Kucharczyk *et al*, 1997c). مقدار دوز hCG مورد استفاده بسیار متفاوت بوده است؛ از 300 $IU\ Kg^{-1}$ گرفته (Battaglegne, 1996) تا 4000 $IU\ Kg^{-1}$ (Battaglene, Selosse 1996, Kucharczyk *et al*., 1997c). بعلاوه تزریق توام hCG و عصاره هیپوفیز در بسیاری از کپورماهیان موثر بوده است.

با توجه به این که در زمینه بیوتکنیک تکثیر مصنوعی ماهی سفیدک سیستان در کشور تنها یک گزارش وجود دارد که از تعداد 13 مولد تزریق شده فقط یک مولد تخم ریزی نموده است (Aquaculture development in Sistan-Baluchestan, 2006)، و در خارج کشور نیز تکثیر مصنوعی این گونه گزارش نشده است؛ هدف از این مطالعه تکثیر مصنوعی این ماهی به منظور تعیین بهترین نوع و دوز موثر هورمون های سنتتیک جهت رسیدن به حداکثر تخم دهی، کارآیی لقاح و تولید لارو می باشد.

2. مواد و روش کار

تعداد 44 قطعه مولد ماده ماهی سفیدک با وزن تقریبی 45 ± 1328 گرم و 53 قطعه مولد نر با وزن تقریبی 17/6 ± 632 گرم از چاه نیمه های سیستان توسط تور گوشگیر صید و به مرکز تکثیر و پرورش ماهیان بومی زهک (سیستان) منتقل و با شرایط استخرهای پرورشی سازگار شدند. در بهمن ماه همزمان با شروع فصل رسیدگی جنسی، مولدین به طور مداوم مورد بررسی قرار می‌گرفتند و مولدین ماده ائی که دارای شکم برآمده، منفذ تناسلی قرمز و برجسته و ماهیان نری که یا در روی پوزه آنها برجستگی های جنسی با دست قابل لمس بود و یا با

Archive of SID

www.SID.ir

فشار ملایم به شکم مقداری اسپرم از آنها خارج می شد از استخر خاکی پرورشی انتخاب و به سالن تکثیر منتقل شدند. ماهیان نر و ماده در سالن تکثیر وزن کشی و علامتگذاری شده و در حوضچه های مجزا به مدت 24 ساعت جهت سازگاری با شرایط سالن تکثیر و رفع استرس نگهداری می شدند.

در این تحقیق ماهیان مولد به پنج گروه (گروههای یک، دو و سه هر کدام تعداد 12 قطعه مولد ماده و 15 قطعه مولد نر و گروههای چهار و پنج(کنترل) هر کدام تعداد 4 قطعه مولد ماده و 4 قطعه مولد نر مطابق جداول 1 و 2 تقسیم شدند.

برای انجام آزمایشات از دو نوع هورمون؛ ovaprim وhCG استفاده شد به طوری که هر میلی لیتر از ovaprim مصرفی دارای 20 میکروگرم آنالوگ GnRH آزادماهیان و 10 میلی گرم ضد دوپامین دامپریدون (domperidone) بود. ماهیان در هنگام دستکاری (علامتگذاری، تزریق هورمون، بررسیهای پس از آن و تخم کشی) با استفاده از عصاره گل میخک بیهوش گردیدند. سپس مطابق جدول 1 مولدین تحت تزریق در دوزهای مختلف طی دفعات متفاوت قرار گرفتند.

جدول 1. میانگین وزنی و طولی مولدین ماده گروههای مختلف

گروه	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*
میانیگن وزنی (گرم)	1375±108/84	1463/33±72/81	1257/5±72/65	1050±86/60	1270±136/56
میانگین طولی (سانتیمتر)	50/67±1/26	50/75±0/97	48/58±0/78	45/75±1/88	49±2/19

جدول 2. میزان و دفعات تزریق مولدین ماده شیزوتوراکس با استفاده از هورمون های ovaprim وhCG

گروهها	*نوع هورمون*	*واحد*	*دوز تزریق به ازای هر کیلو گرم وزن زنده*				*تعداد ماهی*	*فاصله دو تزریق (ساعت)*
			نوبت اول	نوبت دوم	نوبت سوم	نوبت چهارم		
1	Ovaprim	ml/kg	2	5	5	3/0	12	*24
2	Ovaprim	ml/kg	2	5	5	0	12	24
	hCG	IU/kg	1000	2000	2000	0		
3	Ovaprim	ml/kg	2	5	5	3/0	12	24
	hCG	IU/kg	200	400	400	300		
4	hCG	IU/kg	400	800	800	0	4	24
5(کنترل)	NaCl	ml/kg		3/0			4	

*به استثنای فاصله تزریق سوم و چهارم که 12 ساعت بوده است.

کلیه ماهیان نر همزمان با تزریق مرحله دوم ماده ها تزریق شدند (جدول 2). سپس ماهیان نر به یک حوضچه گرد واقع در سالن تکثیر منتقل شدند. جریان ملایم آب بصورت مدور برقرار گردید و جهت جلوگیری از بیرون پریدن ماهیان روی حوضچه با توری پوشانده شد. بعد از تزریق مرحله دوم ماهیان هرچند ساعت بررسی می شدند. بر اساس تغییرات مشاهده شده در ظاهر مولدین مانند شل شدن شکم و بیرون آمدگی منفذ تناسلی زمان بررسی کوتاهتر (تا 4 ساعت) می گردید. ماهیانی که اوولاسیون در آنها اتفاق افتاده بود و تخم با فشار اندک از بدن آنها خارج می شد انتخاب و با روش لقاح خشک تخم گیری (حجم تخم خشک اندازه گیری می‌گردید) و لقاح انجام گرفت. رفع چسبندگی به مدت نیم ساعت با آب معمولی انجام و سپس تخم ها به انکوباتورهای ویس منتقل و تا مرحله چشم زدگی در این انکوباتورها

Archive of SID

www.SID.ir

نگهداری شدند. در پایان مرحله چشم زدگی شمارش تخم های چشم زده صورت گرفته و درصد تبدیل تخم خشک به چشم زده تعیین شد. تخمها از مرحله چشم زدگی وارد تراف شده و تا مرحله جذب کیسه زرده در این انکوباتورها قرار داشتند. در پایان درصد تبدیل تخم چشم زده بواسطه تعداد لارو بدست آمده، تعیین شد.

جدول 3. میزان و دفعات تزریق مولدین نر شیزوتوراکس با استفاده از هورمون های ovaprim وhCG

گروهها	نوع هورمون	واحد	دوز تزریق به ازای هر کیلوگرم وزن زنده	تعداد ماهی
1	ovaprim	ml/kg	3/0	15
2	ovaprim	ml/kg	3/0	15
	hCG	IU/kg	1500	
3	ovaprim	ml/kg	3/0	15
	hCG	IU/kg	200	
4	hCG	IU/kg	500	4
5	NaCl	ml/kg	3/0	4

به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها و تعیین سطوح اختلاف بین گروههای تیماری از آزمون آنالیز یک طرفه واریانس (ANOVA) ($P<0.05$) و برای مقایسه میانگین بین تیمارها از آزمون توکی[1] در محیط نرم افزار SPSS ویرایش دهم استفاده شد.

3. نتایج

در گروه یک بیشترین نسبت تخمریزی، هماوری کاری، هماوری نسبی، درصد تبدیل تخم خشک به چشم زده و تخم چشم زده به لارو نسبت به سایر گروهها بدست آمد که دارای اختلاف معنی داری با گروههای دیگر بود ($P<0.05$) ولی دوره پنهان در این گروه طولانی تر از سایر گروهها بود. همچنین حجم تخم دهی به ازای هر کیلوگرم وزن بدن از گروه دوم کمتر و از گروه سوم بیشتر بود (جدول 4). تخمک های بدست آمده در این گروه بزرگتر از سایر گروهها و در نتیجه تعداد تخمک در هر میلی لیتر کمتر از سایر گروهها بود. کیفیت ظاهری تخمک بدست آمده خوب و تخم کشی راحت و آسان مولدین و خالی شدن کامل شکم حاکی از اوولاسیون نسبتاً کامل آنها بود. تخم ها در دمای 17/3 درجه سانتیگراد پس از 135 ساعت به مرحله چشم زدگی رسیده، سپس تخم های چشم زده به ترافهای کالیفرنیایی منتقل شدند. هچ تخم ها در دمای 18/3 تا 18/5 درجه سانتیگراد پس از حدود 24 تا 48 ساعت کامل شد. سینی های تراف برداشته شده و تعداد تخم های مرده هر مولد شمارش و براساس آن میزان لارو حاصل از هر مولد شمارش شد.

در گروه دو نسبت تخمریزی، هماوری کاری، هماوری نسبی، درصد تبدیل تخم خشک به چشم‌زده و تخم چشم‌زده به لارو محاسبه شد. از 12 قطعه مولد موجود در این گروه، تعداد 3 قطعه مولد به درمان جواب دادند که از این بین فقط در یک مولد تخمک‌ریزی به صورت کامل انجام گردید. علاوه بر پایین بودن پارامترهای تخمریزی از جمله نسبت تخمریزی، سایر مولدین هم بعد از دریافت هورمون دچار تغییرات نامطلوبی از قبیل تیرگی شدید رنگ بدن، متورم شدن بیش از حد شکم در ناحیه حد

1. Tukey's test

Archive of SID

www.SID.ir

فاصل باله سینه ای و باله مخرجی گشته و فشار ناحیه شکمی موجب خروج خون از منفذ تناسلی و خروج تخم بصورت توده‌ای و همراه با لخته خون می‌گشت. مدت زمان به هوش آمدن و برگشت به حالت عادی پس از بیهوشی بسیار طولانی‌تر از گروه یک بود. تخم بدست آمده از سه مولد مذکور دارای رنگ متمایل به سفید خامه‌ای بود که با رنگ تخم مولدین گروه یک (متمایل به نارنجی) متفاوت بوده و همچنین مایع تخمدانی آبکی بود. علیرغم پایین بودن شاخص های تخمریزی، کوتاهترین دوره پنهان مربوط به ماهیان این گروه بود. تخم‌ها در دمای 18/2 درجه سانتیگراد پس از 144 ساعت به مرحله چشم زدگی رسیده، سپس تخم‌های چشم زده به ترافهای کالیفرنیایی منتقل شدند. هچ تخم‌ها در دمای 19/5 درجه سانتیگراد پس از حدود 22 تا 35 ساعت کامل شد. سینی های تراف برداشته شده و تعداد تخم‌های مرده هر مولد شمارش و براساس آن میزان لارو حاصل از هر مولد شمارش شد.

در گروه سه نسبت تخمریزی، هماوری کاری، هماوری نسبی، درصد تبدیل تخم خشک به چشم زده و تخم چشم زده به لارو بدست آمد. از 12 قطعه مولد موجود در این گروه، تعداد 5 قطعه مولد به درمان جواب دادند که از این بین فقط در یک مولد تخمک‌ریزی به صورت کامل انجام گردید. تخم‌کشی از بقیه مولدین به سختی، در یک مورد توام با خونریزی و در یک مورد توام با بیرون‌زدگی یک چشم همراه بود. تخم ها در دمای 17/4 درجه سانتیگراد پس از 125 ساعت به مرحله چشم‌زدگی رسیده، سپس تخم‌های چشم‌زده به ترافهای کالیفرنیایی منتقل شدند. هچ تخم ها در دمای 17/25 پس از حدود 72 ساعت کامل شد. سینی های تراف برداشته شده و تعداد تخم‌های مرده هر مولد شمارش و براساس آن میزان لارو حاصل از هر مولد شمارش شد.

در گروه چهار پس از انجام تزریقات مراحل مختلف و با گذشت چندین ساعت از زمان آخرین تزریق هیچ گونه تغییری در وضعیت مولدین که حاکی از تاثیر هورمون باشد مشاهده نشد و وضعیت مولدین کاملاً مشابه با قبل از انجام تزریق بود.

در گروه کنترل در طی دوره تیمار هیچ گونه تغییری در مولدین مشاهده نشد.

4. بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق موفقیت تخمریزی که با شاخصهای ماهیان تخمریزی کرده و نسبت تخمریزی ارائه شده است نشان می دهد که میزان این شاخص ها در گروه اول بیشتر از سایر گروهها است (جدول 3) به طوری که 83 درصد از ماهیان تزریق شده تخمریزی کرده اند. در این گروه از ovaprim استفاده شد که ترکیبی از GnRH آزادماهیان و ضددوپامین دامپریدون می‌باشد (به ترتیب 20 میکروگرم و 10 میلی گرم در هر میلی لیتر). آنالوگهای GnRHa حاوی ضد دوپامین‌های قوی، معمولاً در تحریک گونه‌های وحشی و پرورشی بسیار موثر هستند (Kulikovsky *et al*., 1996, Barth *et al*., 1997). در کپورماهیان، عمل بازدارندگی دوپامین بر ترشح LH بسیار قوی است و استفاده از داروهای ضد دوپامینی به صورت ترکیبی با آنالوگهای GnRH جهت القای اوولاسیون مولدین ضروری است (Peter *et al*., 1986; Zohar and Mylonas, 2001; Mikolajczyk *et al*., 2003). استفاده از داروهای ضد دوپامینی برای تقویت عمل تحریک کنندگی GnRH یا آنالوگهای آن و القای اوولاسیون در ماهی، روشی معروف و متداول در آبزی پروری سراسر دنیا به ویژه آسیا و اروپای مرکزی می‌باشد (Peter *et al*., 1986; Peter and Yu, 1997). از سالهای نخست دهه 1980 که پدیده بازدارندگی دوپامینی ترشح گنادوتروپین در ماهی کشف شد (Chan *et al*., 1984) تاکنون، گزارش های زیادی در زمینه استفاده از آنالوگ‌های مختلف GnRH و داروهای مختلف ضددوپامینی در القای نهایی رسیدگی جنسی و تخمریزی گونه‌های بسیار متعددی از ماهیان منتشر شده است (Peter *et al*., 1986a;

Archive of SID

www.SID.ir

(Sokolowska *et al*., 1988; Lin *et al*., 1988). براساس تحقیقات گسترده بر روی کپورماهیان، Peter و همکاران (1998) روشی موسوم به روش "لینپه" را تعریف نمودند که در این روش آنالوگ LH-RH با یک ضددوپامین ترکیب می‌شود. ovaprim بر اساس همین روش ساخته شده است. Nandesha و همکاران (1990b) پاسخ مثبت مریگال به ovaprim با دوز 3میلی لیتر به ازای هر کیلوگرم را گزارش دادند که نشان دهنده توانایی این دارو برای القای تخمریزی است. دوز هورمونی توصیه شده برای کپور ها 3تا 0/4 میلی لیتر به ازای هر کیلوگرم می‌باشد (Nandeesha *et al*., 1993).

درصد لقاح معمولاً نشان‌دهنده درصد تخمهای لقاح یافته می‌باشدکه براساس درصد تخمهای دارای جنین محاسبه می‌گردد و به همین منظور از تخمهای شناور درون انکوباتورها نمونه برداری می‌شود. با اینحال، در برخی از ماهیان مانند توربوت[1] و هالیبوت اطلس[2] درصد لقاح از شمارش تخمهای در حال رشد و نمو جنینی که در مرحله 8 سلولی هستند با کسر تخم های غیرشناور بدست می‌آید (Kjorsvik *et al*., 2003, Brown *et al*., 2006). با توجه به اینکه دوره تخم‌گشایی در ماهی سفیدک طولانی (140 تا 170 ساعت) می‌باشد و در تمام این مدت احتمال مرگ تخم‌ها به علل مختلف وجود دارد و از طرفی نمونه برداری و شمارش تخم های لقاح یافته درون انکوباتورها بازگو کننده تخمهایی که در نهایت چشم زده و تبدیل به لارو می شدند نیست، در مرحله چشم زدگی، درصد تخم خشکی که تبدیل به چشم‌زده شده اند، تعیین شد. در واقع تخمهای مرده و چشم زده به راحتی قابل تشخیص و تفکیک بودند و بنابراین معیار خوبی از نتیجه لقاح می باشد. این درصد در گروه یک بیشترین (بالای 88 درصد) و در گروه دو کمترین مقدار را داشت. البته اختلاف بین گروه یک با کنترل معنی دار و اختلاف بین سایر گروهها قابل ملاحظه نبود.

اندازه تخم یکی از پارامترهای کیفیت تخم محسوب می شود. معمولاً تخم هایی بزرگتر دارای کیسه زرده بزرگتری هستند که باعث بقای افزونتر لارو می گردد (Blaxter, 1969). اندازه تخم تحت تاثیر عوامل مختلفی می باشد که عمدتاً عبارتند از: وضعیت تغذیه‌ای مولد مادر، اندازه و سن مولد مادر، نوع تخم ریزی (تخم کشی، طبیعی، القا شده و غیره) یا زمان تخم ریزی (ابتدا، وسط یا پایان فصل تخم ریزی) (Bromage and Roberts, 1994). با توجه به نبود اختلاف قابل ملاحظه در اندازه تخم ها بین گروه های تیماری و به ویژه مشخص نبودن سن مولدین نمی توان علت اختلاف اندک مشاهده شده را تفسیر نمود. ولی آنچه که مسلم است این است که تخمک های گروه یک از نظر رنگ و مایع تخمدانی همراه شان کاملاً با گروه دو متفاوت بودند. رنگ تخمک های گروه یک زرد متمایل به ارغوانی یا قرمز بودند در حالیکه تخمکهای گروه دو متمایل به سفید و گروه سه حد واسط دو گروه فوق به طوریکه در اولین مشاهده تفاوت فاحش رنگ ظاهری تخمک های گروه یک که شبیه به تخمکهای ماهی در هنگام کالبدگشایی بود نمایان بود. مایع تخمدانی گروه یک نیز غلیظ و با گروه دو که کاملاً آبکی بود به وضوح تفاوت داشت. علاوه بر اینها تخم کشی در گروه یک به آسانی انجام شد و تغییرات منفی در ماهی مشاهده نشد در حالیکه در گروه های دو و سه و به ویژه گروه دو تغییرات منفی شدیدی در بدن ماهی رخ داد و تخم کشی نیز همراه با خونابه و خروج لخته ای تخم همراه بود. با توجه به انتخاب تصادفی مولدین نمی توان این نتایج را به نوع مولد یا زمان تخم کشی ارتباط داد و همه نتایج و شواهد حاکی از آن است که hCG با دوز بالا عامل بروز این تغییرات منفی در ماهی بود چرا که در تیمار چهار که فقط از hCG ولی

1. Turbot
2. Atlantic halibut

Archive of SID
www.SID.ir

با دوز پایین استفاده شد هیچ گونه تغییرات منفی در ماهی بروز نکرد ضمن اینکه هیچ مولدی تخم نداد.

Basu و همکارانش (2000) کارایی غده هیپوفیز و ovaprim را به عنوان مواد القاکننده در ماهی *claris batrachus* مطالعه کردند. آنها اظهار نمودند که استفاده از ovaprim تاثیر بهتری از نظر درصد لقاح و تفریخ دارد. به طوریکه در این ماهی القا با استفاده از ovaprim باعث ٪80 لقاح و ٪60 تفریخ تخم ها شد، در حالیکه القا با استفاده از عصاره غده هیپوفیز باعث ٪45 لقاح و ٪25 تفریخ تخم ها گردید (Basu *et al*.,2000). اشکال مختلفی از GnRHa که گاهی از منابع مختلفی مانند پستاندارن، ماهی و جوجه بدست می‌آید وجود دارند که فعالیت های متفاوتی را بروز می‌دهند. مهمترین تفاوتی که مشاهده شده مربوط به دوره پنهان بوده است. کوتاهترین زمان بین زمان تزریق و اوولاسیون هنگامی مشاهده شده است که CPE همراه با hCG استفاده شده که درست برعکس زمانی بوده که ovopel (هر پلت ovopel با وزن متوسط حدود 25 میلی گرم داراری آنالوگ GnRH پستانداری به میزان 20-18 میکروگرم و ضد دوپامین متوکلوپرامايد به میزان 10-8 میلی گرم می باشد) بکار رفته است (Kucharczyk *et al*., 2005). در این تحقیق نیز کوتاهترین زمان دوره پنهان مربوط به گروه دو می-باشد که از ترکیب ovaprim و hCG با دوز بالا استفاده شده است و در واقع وجود hCG موجب کوتاهتر شدن دوره پنهان شده است (جدول 3). در واقع تنها نکته مثبت hCG کوتاهتر کردن دوره پنهان بود که با توجه به پایین بودن سایر پارامترهای تولیدمثلی این مزیت بر معایب زیاد آن که قبلاً اشاره شد فائق نمی آید. وجود اختلاف در دوره پنهان در مورد ماهیان ماده ای که با CPE و GnRH درمان شده اند در مقالات زیادی گزارش شده است. علت این امر شاید به این دلیل است که آزاد شدن GnRH از هیپوفیز و پاسخ تخمدانی به هورمون های آزاد کننده یک فرآیند متوالی است در حالیکه در ماهی تزریق شده با عصاره هیپوفیز کپور پاسخ تخمدانی به هورمون های گنادوتروپین خارجی یک پروسه منفرد می‌باشد(Kucharczyk *et al*., 2005).

در مورد حجم اسپرم نیز مشخص شد که حجم اسپرم ماهی سفیدک در این تحقیق پس از دریافت هورمون افزایش یافت، به طوریکه قبل از دریافت هورمون خروج میلت از بدن به سختی و به میزان اندکی صورت می گرفت ولی پس از دریافت هورمون فشار بسیار ملایم شکم ماهی منجر به خروج مقدار قابل توجهی میلت شد. حجم اسپرم جمع‌آوری شده از ماهی سوف اوراسیایی (*Perca fluvaitilis* L.) (Kucharczyk *et al*., 1998)، سوف زرد (Dabrowski *et al*., 1994) و کپور معمولی هم پس از القاء بوسیله هورمون به طور معناداری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است. افزایش یافتن حجم و کیفیت اسپرم نه تنها برای تکثیر مصنوعی هر گونه در شرایط هچری بلکه برای هرنوع برنامه بازسازی ذخایر مانند ایجاد بانک ژنی یا انجمادسازی اسپرم مهم می باشد (Glogowski *et al*., 1997). البته به نظر می رسد که تاثیرات کمی و کیفی هورمون ها بر اسپرم این ماهی نیاز به مطالعه و بررسی بیشتری دارد.

نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان می دهد که امکان القاء موثر تولیدمثل کنترل شده ماهی سفیدک با بکار بردن القای هورمونی مناسب وجود ارد. همچنین این مطالعه موید مناسب بودن ovaprim برای تحریک تولیدمثل ماهی سفیدک می-باشد. زیرا این هورمون از مزایای متعددی برخوردار است: با توجه به محدود بودن تعداد مولدین ماهی سفیدک، هورمونی برای القای تخمریزی مناسب‌تر می‌باشد که بیشترین نسبت تخمریزی، لقاح، تولید لارو و بطورکلی بالاترین شاخصهای تولیدمثلی را بدنبال داشته باشد. نتایج این تحقیق حاکی از برخورداری ovaprim از این مزایا می‌باشد. همچنین هورمون مذکور از قیمت مناسبی برخوردار بوده و تهیه آن نسبتاً آسان می‌باشد. به علاوه هورمون مذکور

Archive of SID

www.SID.ir

جدول 4. اثر دوزهای مختلف دو نوع هورمون ovaprim وhCG بر برخی پارامترهای تخمریزی ماهی سفیدک

گروه	تعداد ماده تزریق شده	تعداد ماده تخمریزی کرده	وزن ماده (گرم)	نسبت تخمریزی[1] (٪)	هماوری کاری (عدد تخمک)	هماوری نسبی (عدد تخمک)[2]	حجم تخم خشک به ازای هر ماده (ml)	کل حجم تخم خشک (ml)
1	12	10	1375±108/8	83/3	39531/25±7802/30 [a]	28410/61± 4796/26 [a]	172/5 ± 25/09 [a]	1725
2	12	3	1463±72/8	25	18265/5±9704/69 [b]	11667/59± 6282/52 [b]	246 ± 28/21 [a]	738
3	12	5	1257/5±72/6	41/6	15682/33±5982/30 [b]	12931/48± 4828/18 [b]	131/6±19/02 [a]	658
4	4	0	1050±86/6	0	0 [b]	0[b]	0 [a]	0
5	4	0	1270±136/5	0	0 [b]	0 [b]	0 [a]	0

وزن ماده، هماوری کاری، هماوری نسبی و حجم تخم خشک بصورت میانگین ± انحراف استاندارد از میانگین ارائه شده اند. میانگین هایی که با حروف مشابه نشان داده شده اند اختلاف معناداری با یکدیگر ندارند($P> 0.05$).

ادامه جدول 4. اثر دوزهای مختلف دو نوع هورمون ovaprim وhCG بر پارامترهای مختلف تخم و لارو ماهی سفیدک

گروه	تخم خشک (عدد در هر میلی لیتر)	قطر تخم خشک (میلی لیتر)	دوره پنهان (ساعت)	تبدیل تخم خشک به چشم زده (٪)	تبدیل تخم چشم زده به لارو (٪)	لارو بدست آمده از هر ماده (عدد)
1	275	1/72 ± 0/104	36/20 ± 3/77[a]	88/97±0/9[a]	81/93 ± 1/15[a]	34120 ± 4562/84[a]
2	297	1/45 ± 0/012	12/33 ± 0/66[b]	73/19 ± 2/04[b]	75/67 ± 0/19[b]	40383/33 ± 4508/35[b]
3	286	1/57 ± 0/124	32/80 ± 2/20[b]	75/26 ± 3/9[b]	71/03 ± 1/03[b]	20600 ± 4008/14[b]
4	0	0	0[b]	0[b]	0[b]	0[b]
5	0	0	0[b]	0[b]	0[b]	0[b]

قطر تخم خشک، دوره پنهان، درصد تبدیل تخم خشک به چشم زده، درصد تبدیل چشم زده به لاور و تعداد لارو بدست آمده از هر مولد ماده بصورت میانگین ± انحراف استاندارد از میانگین ارائه شده اند. میانگین هایی که با حروف مشابه نشان داده شده اند اختلاف معناداری با یکدیگر ندارند($P> 0.05$).

Archive of SID

www.SID.ir

به صورت محلول آماده مصرف می‌باشد و برخلاف برخی از روش‌های دیگر القای تخمریزی مانند تهیه عصاره هیپوفیز از نظر زمانی و نیروی انسانی مقرون به صرفه می‌باشد.

تقدیر و تشکر

نگارندگان از مدیرکل محترم شیلات سیستان، معاونین، کارشناسان و پرسنل محترم آن اداره کل و مرکز تکثیر و پرورش ماهیان بومی سیستان، مهندسان تقی نجفی، مرتضی جهانتاب، افسانه نوری-جنگی، رضا ناصحی، مجید مرادی و آقایان ویرانگرد، شیرزایی، دهمرده‌کمک، اسدی، سندگل و سایر عزیزان که در این تحقیق همکاری داشته اند تقدیر و تشکر می‌نمایند.

منابع

Aquculture Development in Sistan-Baluchestan Project financed by Italian Cooperation, 2006. Technical report, artificial reproduction of *Schizothorax zarudnyi*, methodological approach, Zabol/Zahedan, Italian Ministry of Foreign Affairs.

Barth T., Kouril J., Hamackova J., Velek J., Barthova J., Hulowa I., Jezek, J. and Pospisek J. 1997. Induced ovulation and artificial stripping in tench *(Tinca tinca L.)* and other freshwater fish species by means of GnRH analogues. Czech experiences 1980-1996. A minireview. Pol. Arch. Hydrobiol. 44: 183-190.

Basu D., Rana G.C., Mondal B.K., Sengupta, K.K. and Dhar, P.K. 2000. Studies on the comparative efficacy of ovaprim, hCG and Piscine pituitary gland in Induced Breeding of *Clarias batrachus* (Lin). Fishing Chimes 19: 103-104.

Battaglene, S.C. 1996. Hormone-induced ovulation of sand whiting (*Sillago ciliata*). Asian Fisheries Sci. 9: 169-176.

Battaglene, S.C. and Talbot, R.B. 1992. Induced spawning and larval rearing of snapper, *Pagrus auratus* (*Pisces, Sparidae*), from Australian waters. New Zealand, J. Marine Freshwater Res. 26: 179-183.

Battaglene, S.C. and Talbot, R.B. 1994. Hormone induction and larval rearing of mulloway. *Argyrosomus hololepidotus* (Pisces, Sciaenidae). Aquaculture 126: 73-81.

Battaglene, S.C. and Selosse, P.M. 1996.Hormone-induced ovulation and spawning of captive and wild broodfish of the catadromous Australian bass, *Macquaria novemaculeata* (*Steindachner*), (*Per cichthyidae*). Aquacult. Res. 27: 191-204.

Billard, R., Alagarswami, k., Peter, R.E. and Breton, B. 1993. Potentialisation par le pimozide des effects du LHRH-A sur la sécrétion gonadotropine hypophysaire, l'ovulation et la spermition chez la carpe commune (*Cyprinus carpio*). C. R. Acad. Sci. 296: 181-184.

Blaxter, J.H.S. 1969. Development eggs and larvae, in Fish Physiology, Hoar, W.S. and Randall, D.J. (eds). Academic Press, New York, 177.

Bromage, N.R. and Roberts, R.J 1994. Broodstock management and egg and larval quality, Blackwell Science, Oxford, p. 424.

Brown, N.P., Shields, R.J. and Bromage, N.R. 2006. The influence of water temperature on spawning patterns and egg quality in the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus L.*). Aquaculture 261: 993-1002.

Cabrita, E., Robles, V. and Paz Herráez, p. 2008. Methods in reproductive aquaculture: marine and freshwater species. Taylor and Francis Group. P. 574.

Chen, Z. and Chen, Y. 2001. Phylogeny of the specialized Schizothoracinae Fishes (Teleostei: Cypriniformes: Cyprinidae). Zool. stud. 40: 147-157.

Dabrowski, K., Ciereszko, A., Ramseyer, L., Culver, D. and Kestemont, P. 1994. Effects of hormonal treatment on induced spermiation and ovulation in the yellow perch (Perca flavercens). Aquaculture 12: 171–180.

De Leeuw, R., Goos, H.J.T.H. and Van Oordt, P.G.W.J. 1986. The dopaminergic inhibition of the gonadotropin-releasing hormone induced gonadotropin release: an in vitro study with fragments and cell suspensions from pituitaries of African catfish, *Claris gariepinus* (Burchell). Gen. Comp. Endocrinol. 63: 171-177.

Dufour, S., Lopez, E., Le Menn, F., Le Belle, N., Baloche, S. and Fontaine, Y.A. 1988. Stimulation of gonadotropin release and ovarian development by administration of gonadoliberin agonist and of dopamine antagonist in female silver eel pretreated with estradiol. Gen. Comp. Endocrinol. 70: 20-30.

Archive of SID

www.SID.ir

Pro9, NEt]-LHRH (LHRH-A) in combination with pimozide or domperidone on gonadotropin release and ovulation in the Chinese loach and common carp. Gen. Comp. Endocrinol. 69: 31–40.

Mikolajczyk, T., Chyb, J., Sokolowska-Mikolajczyk, M., Enright, W.J., Epler, P., Filipiak, M. and Breton, B. 2003. Attempts to induce an LH surge and ovulation in common carp (*Cyprinus carpio* L.) by differential application of a potent GnRH analogue, azagly-nafarelin, under laboratory, commercial hatchery and natural conditions. Aquaculture 223: 141–157.

Nandeesha, M.C., Bhandraswami, G., Patil, J. G. Vargheset, J., Kamal, S. and Keshavanath, P. 1993. Preliminary results on induced spawning of pond varied mahseer, Tor Khudri J. Aqua. Trop. 8: 55-60.

Penaz, M. and Gajdusek, J. 1979. Early development of bream, *Abramis brama* from the water reservoir Mostiste, CSSR. Folia Zool. 28: 347–360.

Peter, R.E. and Yu, K.L. 1997. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. Rev. Fish Biol. Fish. 7: 173– 197.

Peter, R.E., Sokolowska, M., Nahorniak, C.S., Rivier, J.E. and Vale, W.W. 1986. Comparison of [D-Arg6, Trp7, Leu8, Pro9 NEt]-luteinizing hormone-releasing hormone (sGnRH-A), and [D-Ala6, Pro9 NEt]-luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH-A), in combination with pimozide, in stimulating gonadotropin release and ovulation in the goldfish, Carassius auratus. Can. J. Zool. 65: 987–991.

Peter, R.E., Chang, J.P., Nahorinak, C.S., Omeljaniuk, R.J., Sokolowska, M., Shih, S.H. and Billard, R. 1986. Interactions of catecholamines and GnRH in regulation of gonadotropin secretion in teleost fish. Rec. Prog. Horm. Res. 42: 513-548.

Peter, R.E., Trudeau, V.L., Sloley, B.D., Peng, C. and Nahorinak, C.S. 1991. Actions of catecholamines, peptides and sex steroids in regulation of gonadotropin-II in the goldfish. In: Scott A.P., Sumpter J.P., Kime D.E., Rolfe M.S. (Eds.), Proc. 4th Symp. Reprod. Physiol. Fish. Fish Symp., vol. 91, p. 30. Sheforld.

Pierce, J.G. and Parsons, T.F. 1981. Glycoprotein hormones: structure and function, Annu. Rev. Biochem. 50: 465.

Sokolowska, M., Mikolajczyk, T., Epler, P., Peter, R.E., Piotrowski, W. and Bieniarz, K.

Glogowski, J., Babiak, I., Kucharczyk, D. and Luczynski, M. 1997. The effect of individual male variability on cryopreservation of bream (*Abramis brama* L.) sperm. Pol. Arch. Hydrobiol. 44: 281–285.

Hearn, M.T.W. and Gomme, P.T. 2000. Molecular architecture and biorecognition processes of the cystine knot protein superfamily: part I. The glycoprotein hormones, J. Mol. Recog. 13: 223.

Kjørsvik, E., Hoehne-Reitan, K. and Reitan, K.I. 2003. Egg and larval quality criteria as predictive measures for juvenile production in turbot (*Scophthalmus maximus L.*). Aquaculture 227: 9-13.

Kucharczyk, D. 2002. Artificial spawning and androgenesis of chosen cyprinids (in Polish). Dissertations and monographs 63, Wyd. UWM, Olsztyn. 80 pp.

Kucharczyk, D., Kujawa, R., Luczynski, M., Glogowski, J., Babiak, I. and Wyszomirska, E. 1997a. Induced spawning in bream. *Abramis brama* (L.), using carp pituitary extract and hCG. Aquacult. Res., 28: 139-144.

Kucharczyk, D., Kujawa, R., Mamcarz, A. and Wyszomirska, E. 1997b. Artificial spawning in bream (*Abramis brama* L.). Pol. Arch. Hydrobiol. 44: 201-205.

Kucharczyk, D., Kujawa, R., Mamcarz, A. and Wyszomirska, E. 1997c. Induced spawning in rudd (*Scardinius erythrophthalmus* L.). Pol. Arch. Hydrobiol. 44: 207-211.

Kucharczyk, D., Kujawa, R., Mamcarz, A., Skrzypczak, A. and Wyszomirska, E. 1998. Induced spawning in perch, *Perca fluviatilis* L., using FSH+LH with pimozide or metoclopramide. Aquaculture Res. 29:,131–136.

Kucharczyk, D., Kujawa, R., Mamcarz, A., Targonska-Dietrich, K., Wyszomirska, E., Glogowski, J., Babiak, I. and Szabo, T. 2005. Induced spawning in bream (Abramis brama L.) using pellets containing GnRH. Czech jornal of animal science 50: 89-95.

Levavi-Sivan, B., Ophir, M. and Yaron, Z. 1995. Possible sites of dopaminergic inhibition of gonadotropin release from the pituitary of a teleost fish, tilapia. Mol. Cell. Endocrinol. 109: 87-95.

Lin, H.R., Van der Kraak, G., Zhou, X.J., Liang, J.Y., Peter, R.E., Rivier, J.E. and Vale, W.W. 1988. Effects of [D-Arg6, Trp7, Leu8, Pro9, Net]-LHRH (sGnRH-A) and [D-Ala6,

Archive of SID

www.SID.ir

1988. The effects of reserpine and LHRH or salmon GnRH analogues on gonadotropin release, ovulation and spermiation in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Reprod. Nut. Dev. 28: 889–897.

Van Der Kraak, G., Chang, J.P. and Janz, D.M. 1998. Reproduction. In: Evans, D.H. (ed.), The physiology of Fishes. CRC Press, 465-488.

Zarski, D., Kucharczyk, D., Targonska, K., Jamroz, M., Krejszeff, S. and Mamcarz, A. 2009. Application of ovopel and ovaprim and their combination in controlled reproduction of two reophilic cyprinid fish species. Pol. J. Nat. Sci. 24: 235-244.

Zohar, Y. and Mylonas, C.C. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. Aquaculture 197: 99–136.

Archive of SID

www.SID.ir