وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران ـ مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آبهای داخلی

عنوان :

مطالعه سیکل تکامل غدد و پویائی هورمونهای جنسی استروئیدی ماهی کفال خاکستری در استان گلستان

مجری :
سعید یلقی

شماره ثبت
۳۹۶۷۱

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور ـ مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آبهای داخلی

عنوان پروژه/طرح : مطالعه سیکل تکامل غدد و پویائی هورمونهای جنسی استروئیدی ماهی کفال خاکستری در استان گلستان

شماره مصوب : ۸۶۰۸۰-۱۲-۷۷-۲

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : سعید یلقی

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -

نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : سعید یلقی

نام و نام خانوادگی همکاران : حسینعلی رستمی خوشباور – مریم جرجانی – عبدالمجید مرادلو- عبدالقیوم شافعی – علی مکرمی-محمد مظلومی – یوسف ایری – نوراله حسام

نام و نام خانوادگی مشاوران : همایون حسین زاده صحافی – شهربانو عریان

نام و نام خانوادگی ناظر : -

محل اجرا : استان گلستان

تاریخ شروع : ۸۶/۹/۱

مدت اجرا : ۲ سال و ۶ ماه

ناشر : مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

شمارگان (تیتراژ) : ۲۰ نسخه

تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۱

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری»

پروژه : مطالعه سیکل تکامل غدد و پویائی هورمونهای جنسی استروئیدی ماهی کفال خاکستری در استان گلستان

کد مصوب : ۸۶۰۸۰ -۱۲ -۷۷ -۲

شماره ثبت (فروست) : ۳۹۶۷۱ تاریخ : ۹۰/۹/۱۹

با مسئولیت اجرایی جناب آقای سعید یلقی دارای مدرک تحصیلی دکترا در رشته شیلات می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش اصلاح‌نژاد و تکثیر و پرورش آبزیان مورد ارزیابی و با نمره ۱۸ و رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده □ مرکز ■ ایستگاه □

با سمت معاون تحقیقات‌مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آبهای داخلی مشغول بوده است.

به نام خدا

عنوان	«فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱- مقدمه ۲
۱-۱-کلیات ۶
۲ ـ ۱ـ سیستماتیک کفال خاکستری ۶
۳ـ۱ـ مشخصات عمومی خانواده کفال ماهیان ۶
۴ـ۱ـ بیولوژی تولیدمثل جنس ماده کفال خاکستری ۶
۵ـ۱ـ فیزیولوژی تولیدمثل ۱۰
۲- مواد و روش کار ۲۴
۱-۲- محل اجرای پروژه ۲۴
۲-۲ – اندازه گیری دمای آب ۲۴
۳-۲- بیومتری ماهیان و نمونه برداری از گناد ۲۴
۴-۲- خون گیری از ماهیان ۲۵
۵ـ۲ـ بررسی بافت‌شناسی ۲۶
۶-۲-اندازه گیری فاکتورهای بیوشیمیایی پلاسمای خون ۲۶
۷-۲- تجزیه و تحلیل آماری ۲۸
۳- نتایج ۲۹
۱-۳- دمای آب ۲۹
۲-۳- زیست سنجی مولدین کفال خاکستری ۳۰
۳-۳- بررسی بافت‌شناسی ۳۱
۴-۳- تغییرات میزان هورمون تستوسترون (T)در جنس نر ماهی کفال خاکستری ۳۶
۴- بحث و نتیجه گیری ۴۱
منابع ۴۴
چکیده انگلیسی ۴۷

چکیده

ماهی کفال خاکستری با نام علمی *Mugil cephalus* L. یکی از گونه های ارزشمند در صنعت شیلاتی و آبزی پروری است که به تغییرات وسیع شوری و حرارت مقاوم بوده و قابلیت توسعه در اراضی لم یزرع استانهای شمالی و جنوبی و نقاط مرکزی کشور را داراست.

بیومتری ماهیان در طی نمونه برداری ماهانه صورت گرفته و اطلاعات مربوط به طول کل و وزن کل به ترتیب با دقت ۱± سانتی متر و گرم اندازه گیری و کلاسه های طولی و وزنی هر دو جنس نر و ماده نیز تعیین گردید.

این مطالعه بمنظور فهم کارکرد فیزیولوژیک اندام تولید مثلی و روند رسیدگی جنسی ماهیان کفال خاکستری وارداتی از کشور هنگ کنگ در بهار ۱۳۷۲ و بکارگیری یافته های تحقیق در مدیریت تکثیر مصنوعی این گونه در شرایط کنترل شده، به انجام رسید. دمای روزانه آب و هوای محل نگهداری مولدین ثبت شد. بمنظور انجام مطالعات بافت شناسی و اندازه گیری هورمون های جنسی و متابولیت های کلسیم، کلسترول، تری گلیسرید و پروتئین کل پلاسمای خون از گنادهای جنسی ماهیان نر و ماده نمونه برداری و خون گیری بعمل آمد. رشد اووسیت و تخمک نیز با اندازه گیری قطر آنها با استفاده از لوپ مدرج روسی اندازه گیری شد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که با کوتاه شدن طول روز، قطر تخمک با شتاب بیشتری افزایش می یابد و همچنین مقادیر هورمونهای جنسی استروئیدی نظیر ۱۷ بتا – استرادیول و ۱۷ آلفا – هیدروکسی پروژسترون و میزان غلظت کلسیم پلاسمای خون نیز افزایش می یابد. مقادیر اندازه گیری شده کلسترول و تری گلیسیرید پلاسمای خون ماهی کفال خاکستری[1] مؤید تغییرات فصلی کلسترول و تری گلیسیرید و نشانگر ذخیره سازی سریع طی تابستان و مصرف آن طی مهاجرت پاییزه است.

واژگان کلیدی: ماهی کفال خاکستری، متابولیت پلاسما، هورمون استروئیدی جنسی، گمیشان

[1] - *Mugil cephalus*

۱- مقدمه

آبزی پروری بهترین راه حل برای تأمین تقاضا به محصولات شیلاتی است و امّا مشکل عمده در آبزی پروری ماهیان دریایی عدم همزمانی تخمریزی مولدین در شرایط اسارت و کنترل شده است و این شرایط در مرحله اول ناشی از فقدان متغیرهای محیطی مناسب از جمله طول دوره نوری مطلوب، شوری و عمق مناسب آب است که موجب تغییر در فرآیند کارکرد محور عصب – غدد درون ریز ماهی می شود (Evans, 1998)

ماهی کفال خاکستری یکی از معروفترین گونه های ماهیان است که متقاضیان زیادی برای پرورش این ماهی در محیط آب شیرین و شور وجود دارد. پرورش این گونه عمدتاً بستگی به فراهم شدن لارو ماهی از محیط های طبیعی دارد. امروزه ماهی کفال خاکستری یکی از گونه های مهم پرورش در تایوان و سایر نقاط جهان محسوب می شود. در این بین جنس ماده این ماهی به لحاظ مصرف تخم آن بعنوان ماده غذایی بسیار ارزشمند محسوب می شود.

وقایع فیزیولوژیکی که منجر به بلوغ جنسی جاندار می گردند، پیچیده بوده و از توالی خاصی تبعیت می نمایند. هورمونهای جنسی استروئیدی در واقع یکی از چندین هورمونی هستند که فرآیند تولید مثلی را تحت تاثیر قرار می دهند (Mylonas *et al*,1997).

بنابراین مطالعه عوامل کنترل کننده تمایز غدد جنسی در ماهی کفال خاکستری امروزه مد نظر بسیاری از پرورش‌دهندگان است.

در خصوص رابطه بین چرخه سالیانه هورمونهای استروئیدی گنادی و سطوح لیپید ماهی کفال خاکستری مطالعات اندکی صورت گرفته است.

رئبررسی بافت شناختی و تغییرات متوالی اندام جنسی نر در ماهیان استخوانی متعددی صورت گرفته است (Balubid, 2003).

تغییرات فصلی غلظت هورمونهای جنسی در گردش خون و اهمیت و نقش آنها در تولید مثل گونه های متعددی از ماهیان استخوانی گزارش شده است.

امروزه حدود بیست گونه از خانواده کفال ماهیان در صنعت آبزی پروری معرفی شده است که کفال خاکستری مهمترین گونه پرورشی آنها می باشد. این ماهی یکی از انواع ماهیان استخوانی دریایی یوری هالین[۲] است که بصورت گسترده در آبهای شیرین، لب شور و شور و در استخرها به عنوان گونه توأم بصورت نیمه متراکم کشت می شود (Cardona *et al.*, 1996). کفال خاکستری به علت تغذیه از سطوح پایین زنجیره غذایی، قابلیت تحمل تغییرات گسترده دما و شوری، رشد سریع و مقاومت نسبت به بیماریها از معمولترین ماهیانی است که در اکثر نقاط جهان پرورش داده می شود.

پراکنش طبیعی ماهی کفال خاکستری بین عرضهای جغرافیائی ۴۰ درجه شمالی و جنوبی است (Kuo, 1995). زیستگاه این ماهی در کمربند گرم اقیانوسهای هند، آرام و دریاهای حاشیه ای، در آبهای ساحلی دریای مدیترانه، سیاه و آزوف قرار دارد (Oven, 1981). با توجه به ارزش اقتصادی و سازگاری نسبتاً گسترده ماهی کفال خاکستری، شرکت سهامی (سابق) شیلات ایران در سال ۱۳۷۲ تعداد ۲۰۰۰۰ بچه ماهی کفال خاکستری از کشور هنگ کنگ وارد نمود که پروژه های متعددی از جمله جهت تکثیر این ماهی در کشور صورت پذیرفته است. تولیدات آبزی پروری در مورد هرگونه، وابسته به توانایی بدست آوردن تخمک هایی با قابلیت بقاء است. برای انواع ماهیانی که برای اولین بار در منطقه جهت تکثیر و پرورش معرفی می شوند، در قدم اول بدست آوردن اطلاعات پایه ای در مورد فیزیولوژی تولیدمثل آنها ضروری است.

بسیاری از مطالعات انجام شده درباره فیزیولوژی تولیدمثل، معطوف به بررسی تغییرات فصلی میزان استروئیدهای جنسی پلاسمای ماهیان استخوانی و همچنین نوسانات استروئیدهای جنسی در طول اوولاسیون می باشد (Tamaru *et al.*, 1991)، ولی از آنجاییکه برخی از گونه های مهم پرورشی از جمله کفال خاکستری نمی توانند دوره تولیدمثل خود را تحت شرایط اسارت تکمیل کنند، اطلاعات پایه ای جهت دستیابی به روشهایی جهت مدیریت و کنترل تولیدمثل در شرایط فوق امری ضروری است.

---

[2] - Euryhaline

- **سابقه تحقیق**

– **تحقیقات انجام شده در ایران**

چندین پژوهش در رابطه با بافت‌شناسی غدد جنسی و اندازه‌گیری استروئیدهای جنسی طی سیکل سالانه انجام شده است.

قانعی تهرانی و همکاران (۱۳۷۵-۱۳۷۲)، پرورش ماهیان انگشت قد وارداتی ماهی کفال خاکستری را در دو محیط آب شور و شیرین در مرکز گمیشان را مورد مطالعه قرار دادند.

شعبانی‌پور (۱۳۷۴)، تحقیقی در رابطه با شکل و بافت‌شناسی تخمدان در ماهی کفال طلایی[3] انجام داد.

اسکندری و همکاران (۱۳۷۸)، زمان بلوغ و فصل تخم‌ریزی ماهی شوریده[4] را در آب‌های ساحلی استان خوزستان تعیین کرد.

قانعی تهرانی و همکاران (۱۳۸۰-۱۳۷۷)، مولد سازی و تکثیر مصنوعی ماهی کفال خاکستری در مرکز گمیشان استان گلستان را بررسی کردند.

قلیچی (۱۳۸۱)، روند رسیدگی جنسی ماهی کفال خاکستری را از طریق اندازه گیری هورمونهای جنسی و مطالعات هیستولوژیک مورد بررسی قرار دادند.

میرهاشمی و همکاران (۱۳۸۲)، در خصوص تکثیر ماهی کفال خاکستری در مرکز گمیشان تحقیقاتی را به انجام رساندند.

– **تحقیقات انجام شده در سایر کشورها**

تحقیقات متعددی در رابطه با فیزیولوژی تولیدمثل کفال خاکستری و ماهیان دیگر در سه دهه اخیر در خارج از کشور صورت پذیرفته است.

Shehadeh و همکاران (۱۹۷۳a)، تأثیر عصاره هیپوفیز ماهی آزاد در القای تخم‌ریزی کفال خاکستری را تحقیق کرده‌اند.

Kuo و Nash (۱۹۷۵)، پیشرفت‌های بدست آمده در کنترل تکوین تخمدان و تخم‌ریزی را پس از القای هورمونی در کفال خاکستری تشریح کرده‌اند.

---

[3] - *Liza auratus*
[4] - *Otolithes rubber*

Lee و همکاران (۱۹۷۸)، تخم‌ریزی کفال خاکستری را با استفاده از هورمون LHRH-a مطالعه کرده‌اند.

Lee و همکاران (۱۹۸۸)، تأثیر هورمون‌های CPE، HCG و LHRH-a را در القای تخم‌ریزی کفال خاکستری تعیین کردند.

Kuo (۱۹۹۵)، دست‌کاری تکوین تخمدان و تخم‌ریزی کفال خاکستری را در آب‌های هاوایی مورد مطالعه قرار داده است.

Chang و همکاران (۱۹۹۵)، بافت‌شناسی گناد و استروئیدهای جنسی پلاسما طی روند تمایز جنسی در کفال خاکستری را مورد پژوهش قرار دادند.

Zaki و همکاران (۱۹۹۵)، تغییرات فصلی هورمون‌های گنادوتروپیک و استروئیدهای جنسی در سرم خون ماهیان کفال خاکستری را در دریای مدیترانه مطالعه کردند.

Monbrison و همکاران (۱۹۹۷)، چگونگی تسریع تکوین گناد و القای تخم‌ریزی را در کفال خاکستری دریای مدیترانه بررسی کردند.

Haddy و Pankhurst (۲۰۰۰)، کارایی هورمون‌های خارجی را در ایجاد تغییرات در استروئیدهای پلاسما و اوولاسیون در سیم سیاه وحشی[5] مورد پژوهش قرار دادند.

Mylonas و Zohar (۲۰۰۱)، تنظیم اندوکرینی و القای مصنوعی بلوغ اووسیت و اسپرمیشن را در باس‌های جنس *Morone* مورد پژوهش قرار دادند.

Part و همکاران (۲۰۰۱)، اثرات شبه هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRHa) و پیموزاید را بر میزان استروئیدهای جنسی و تکوین تخمدان در باس دریایی[6] مطالعه نموده‌اند.

Lee و Yang (۲۰۰۲)، ارتباط بین تکوین تخمدان و مقادیر هورمون‌های استروئیدی گنادی سرم خون و القای بلوغ اووسیت و اوولاسیون را در باس دریایی کره‌ای ماده پرورشی[7] مطالعه کردند.

Wagner و همکاران (۲۰۰۲)، پاسخ‌های فیزیولوژیک به استرس، بقای تخم و مرگ و میر اسپرم برای مولدین قزل‌آلای رنگین‌کمان بیهوش شده با مواد مختلف را مورد بررسی قرار دادند.

---

5 - *Acanthopagrus butcheri*
6 - *Dicentrarchuc labrax*
7 - *Lateolabrax maculates*

۱-۱-کلیات

۲ ـ ۱ـ سیستماتیک کفال خاکستری

کفال خاکستری متعلق به فوق رده ماهیان[8]، رده ماهیان استخوانی[9]، زیر رده ماهیان استخوانی حقیقی[10]، راسته کفال ماهی شکلان[11]، خانواده کفال ماهیان[12] و جنس mugil[13] می‌باشد (Oven, 1981).

۳ـ۱ـ مشخصات عمومی خانواده کفال ماهیان

ماهیان این خانواده، دارای سر پهن، پوزه کند و بدنی استوانه‌ای یا کمی فشرده می‌باشند. دهان کوچک، انتهایی یا تحتانی بوده و پری ماگزیلا حالت امتدادپذیر دارد. دارای دندان‌های کوچک، سست یا فاقد دندان می‌باشند. قسمتی از چشم‌ها اغلب به وسیله‌ی بافت چربی پوشیده شده است. این ماهیان فاقد خط جانبی، دارای دو باله پشتی کوتاه، باله پشتی اول با ۴ شعاع سخت، باله سینه‌ای در قسمت بالایی پهلوها و پایه باله شکمی تقریباً در بین امتداد باله سینه‌ای و باله پشتی اول می‌باشد. باله‌ی خروجی دارای سه شعاع سخت، باله دمی تقریباً به صورت دو شاخه، فلس‌ها بزرگ یا متوسط است. در زیر باله پشتی اول و روی باله‌های سینه‌ای و شکمی، فلس‌های تغییر شکل یافته وجود دارد. رنگ بدن این ماهیان، آبی ـ سبز، قسمت پشتی سبز یا زیتونی، پهلوها و شکم نقره‌ای بوده و اغلب ۹ـ۳ نوار تیره در امتداد طولی بدن در پشت، پهلوها و شکم وجود دارد (Oven, 1981).

٤ـ۱ـ بیولوژی تولیدمثل جنس ماده کفال خاکستری

۱ـ٤ـ۱ـ تمایز جنسی

تمایز جنسی کفال خاکستری از هفت ماهگی آغاز می‌شود، ولی اکثریت بچه ماهیان در این سن، هنوز تمایز جنسی حاصل نکرده‌اند. اغلب ماهیان کفال خاکستری از یک سالگی به بعد به جنس نر و ماده تمایز می‌یابند (Chang *et al*, 1995).

---

[8] - Pisces
[9] - Osteichthys
[10] - Teleostei
[11] - Mugiliforms
[12] - Mugilidae
[13] - *Mugil sp.*

۲ـ٤ـ۱ـ سن بلوغ

بین اندازه بلوغ و دمای محل زندگی ارتباط نزدیکی وجود دارد، به طوری که کفال خاکستری در آب‌های گرم زودتر به سن بلوغ می‌رسد، ولی در آب‌های سرد، سن بلوغ بیشتر بوده و ماهیان بالغ درشت‌تر می‌گردند.

کفال خاکستری در سواحل مدیترانه در سال سوم زندگی، هنگامی که به طول ۲۷۰ میلی‌متر رسید و در آب‌های گرم‌تر دریاچه تیبریاس[۱۴]، ماهیان قبل از پایان سال دوم و با طول ۵۷۰ میلی‌متر بالغ می‌شوند. کفال خاکستری در استخرهای پرورشی با دمای بالا و تغذیه‌ی کافی حتی در سال اول زندگی و با طول استاندارد ۱۶۰ میلی‌متر می‌تواند بالغ گردد (Oven, 1981).

۳ـ٤ـ۱ـ مهاجرت‌های تخم‌ریزی

کفال خاکستری در دریاچه‌ها، تالاب‌ها و استخرهای پرورشی تا اندازه‌ی زیادی رشد می‌کند و گاهی اوقات به مرحله‌ی پیش بلوغ[۱۵] می‌رسد، ولی تخم‌ریزی در این آب‌ها صورت نمی‌گیرد. در طبیعت، کفال خاکستری برای تخم‌ریزی از مصب‌ها و خورها به دریا مهاجرت می‌نماید، زیرا لقاح فقط در آب شور دریا صورت می‌گیرد. از سویی، تخم‌ها و لاروها جهت تکوین به این شرایط نیاز دارند، بنابراین مهاجرت تخم‌ریزی به حرکت ماهی بالغ رسیده، از مکان‌های تغذیه در دریاچه‌ها و مصب‌ها به مکان‌های تخم‌ریزی در دریا اطلاق می‌شود.

ماهیان کفال خاکستری به شکل گروهی حرکت کرده و به دریا مهاجرت می‌نمایند. در این گروه‌ها، ممکن است ماهیان نابالغ نیز مشاهده شوند، ولی معمولاً اکثریت گروه را ماهیان بالغ تقریباً رسیده تشکیل می‌دهند. مهاجرت ممکن است در داخل دریا نیز صورت گیرد. دمای مطلوب جهت مهاجرت تخم‌ریزی این ماهی در آب‌های ژاپن ۲۰/۶ـ۱۷/۱ درجه سانتی‌گراد و در آب‌های تایوان ۲۳ـ۲۱ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. با افزایش دما بر تحرک ماهیان افزوده می‌گردد. مهاجرت‌های تخم‌ریزی وابسته به مکانیسم‌های اندوکرینولوژی بوده و به نظر می‌رسد که با فعالیت غدد تیروئید و هیپوفیز و همچنین با مکانیسم تنظیم اسمزی مرتبط باشد. نمونه‌ای پیش بالغ تحت فعالیت تیروئید از آب شیرین به آب دریا مهاجرت می‌نمایند. ناحیه‌ی تحت اشغال گنادوترپین‌ها در

---

[14] - Tiberias Lake
[15] - Sub mature

هیپوفیز ماهیان نگهداری شده در آب شیرین کوچک‌تر از ماهیان نگهداری شده در آب لب شور و شور می‌باشد. در فصل تخم‌ریزی، تولید گنادوتروپین‌های هیپوفیز افزایش می‌یابد. اگر مهاجرت به دریا امکان‌پذیر نباشد، تکوین غدد جنسی انجام نشده و شاخص غده جنسی (GSI) در حد پایین باقی خواهد ماند. در ضمن، مراحل بازجذب تخمک ها در ماهیانی که مراحل اوولاسیون را طی نمی‌نمایند، مشاهده می‌شود. همچنین در برخی موارد، بیماری و مرگ و میر نیز رخ می‌دهد، بنابراین کفال ماهیان از لحاظ تولیدمثل، دریایی ولی از لحاظ تغذیه‌ای، مربوط به آب لب شور یا شیرین می‌باشند (Oven, 1981).

٤ـ٤ـ١ـ مکان‌های تخم‌ریزی

مکان‌های تخم‌ریزی در مناطق ساحلی می‌باشد. کفال خاکستری معمولاً در خلیج‌ها و در مکان‌های شنی تخم‌ریزی می‌کند. این ماهی در برخی مناطق در قسمت‌های دور از ساحل و در لبه فلات قاره تخم‌ریزی می‌کند (Oven, 1981).

٥ـ٤ـ١ـ دوره تخم‌ریزی

کفال خاکستری در مناطق مختلف جغرافیایی در زمان‌های مختلفی از سال تخم‌ریزی می‌نماید، ولی تخم‌ریزی در تمامی مناطق، در ماه‌های سرد سال صورت می‌گیرد. معمولاً تخم‌ریزی، وقتی که دمای آب به میزان مطلوبی برسد، انجام می‌شود. دمای مطلوب تخم‌ریزی در مناطق مختلف جغرافیایی متفاوت است. به طور مثال در آب‌های کره، کفال خاکستری هنگامی که دمای آب به ۲۲ـ ۱۹/۵ درجه سانتی‌گراد رسید، تخم‌ریزی می‌نماید. دوره نوری نیز در زمان تخم‌ریزی مؤثر است. معمولاً تخم‌ریزی در شب و درست قبل از طلوع آفتاب انجام می‌شود (Oven, 1981).

٦ـ٤ـ١ـ هم‌آوری

میزان هم‌آوری کفال خاکستری در مکان‌های مختلف، متفاوت است، به طوری که میزان آن در ۳۴۰/۰۰۰ عدد تا ۷/۰۰۰/۰۰۰ عدد متغیر می‌باشد (Oven, 1981).

۷ـ٤ـ۱ـ رفتار تخم‌ریزی

هنگام تخم‌ریزی، حدود ۵ ـ ۴ عدد ماهی نر، یک ماهی ماده که از آن‌ها بزرگ‌تر است را احاطه می‌نمایند. ماهیان نر در پهلوی ماده ماهی در کنار باله‌ی دمی قرار گرفته و به محض تخم‌ریزی ماهی ماده، اسپرم‌ریزی کرده و تخم‌ها را بارور می‌سازند (Oven, 1981).

۸ـ٤ـ۱ـ تخم

تخم کفال خاکستری کروی و شفاف بوده و پوسته تخم نرم و فاقد نقوش می‌باشد. میانگین قطر تخم این ماهی، ۹۳۰ میکرون بوده و تخم‌ها دارای یک قطره روغن به قطر حدود ۳۳۰ میکرون می‌باشند. تخم‌های کفال خاکستری به صورت شناور در روی سطح آب قرار می‌گیرند(Oven, 1981).

۹ـ٤ـ۱ـ انکوباسیون

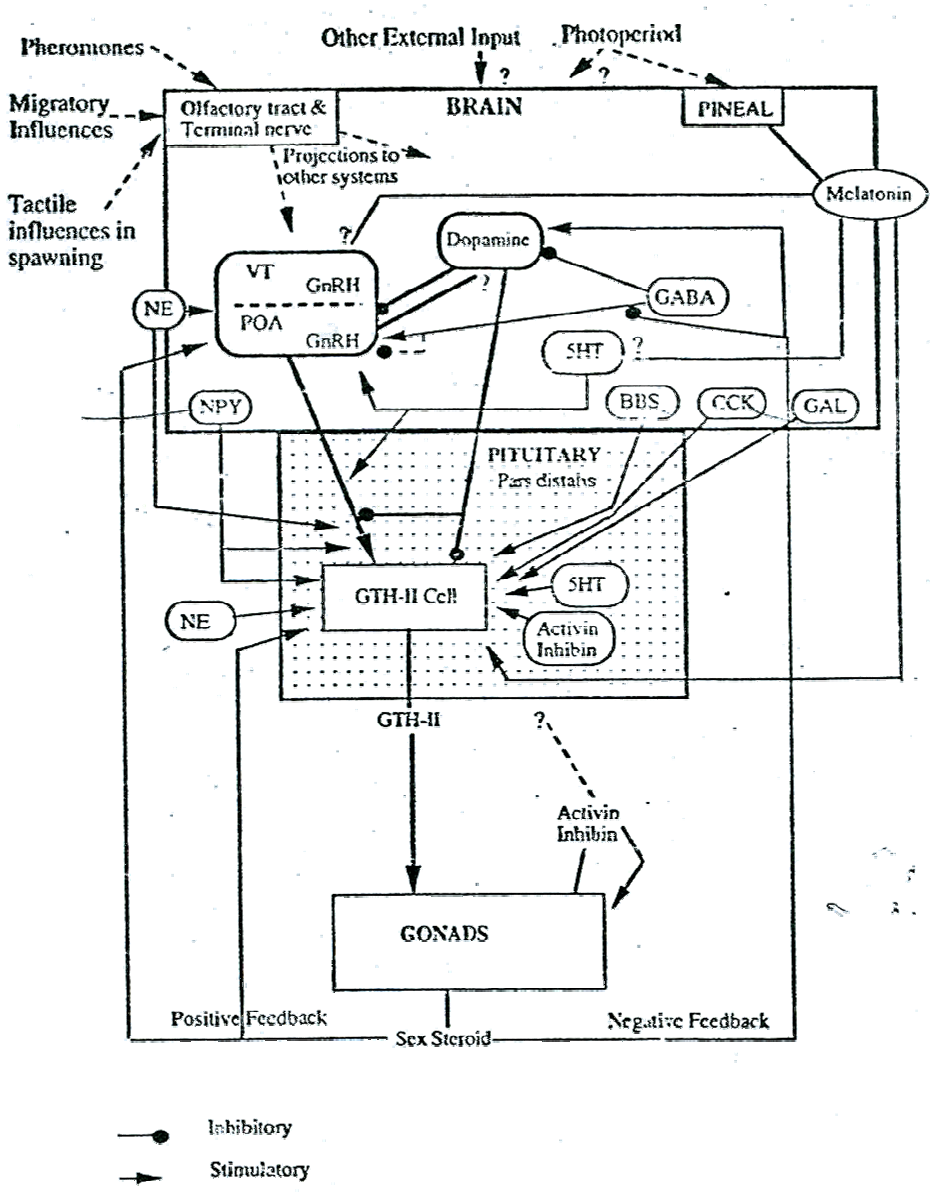
انکوباسیون تخم‌های کفال خاکستری در دمای ۲۴ـ۲۲ درجه سانتی‌گراد و شوری ۳۲ قسمت در هزار در آب دریا با هوادهی مناسب، به سهولت انجام می‌شود. دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و بالاتر باعث مرگ و میر تخم‌ها می‌گردد (Oven, 1981).

۱۰ـ٤ـ۱ـ تفریخ

تخم‌های کفال خاکستری تحت شرایط آزمایشگاهی، بعد از ۴۴ ـ ۳۶ ساعت در دمای ۲۳-۲۲ درجه سانتی‌گراد تفریخ می‌شوند. اولین لاروها ۳۸ ـ ۳۶ ساعت بعد از لقاح و اکثریت آن‌ها بعد از ۴۴ـ۴۰ ساعت تفریخ می‌شوند. در دماهای پایین‌تر، زمان تفریخ طولانی‌تر خواهد شد، به طوری که در دمای ۱۹/۵ـ۱۸/۲ درجه سانتی‌گراد، زمان تفریخ تا ۶۰ ساعت به طول می‌انجامد(Oven, 1981).

۵ـ۱ـ فیزیولوژی تولیدمثل

قسمت عمده مراحل تولید مثل در ماهیان استخوانی حقیقی تحت کنترل سیستم نورواندوکرینی قرار دارد. محور مغز ـ هیپوتالاموس ـ هیپوفیز ـ گناد نقش اصلی را در این مراحل بر عهده دارند.



شکل ۱-۱- طرح محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- گناد درماهیان استخوانی حقیقی
اقتباس از Evans (۱۹۹۸)

۱ـ۵ـ۱ـ محور مغز ـ هیپوتالاموس ـ هیپوفیز ـ گناد

۱ـ۱ـ۵ـ۱ـ مغز: مغز تحت تأثیر عوامل محیطی و داخلی، فعالیت‌های تولیدمثلی را تنظیم می‌نماید (Kah *et al*, 1993). محرک‌های محیطی نظیر دما و دوره‌های نوری باعث ایجاد تغییرات هورمونی می‌شود که تنظیم‌کننده‌های تولید گامت در ماهیان می‌باشد. جسم پینه‌آل و چشم در دریافت اطلاعات نوری و هدایت آن به صورت تغییرات هورمونی وابسته به تولیدمثل، نقش اساسی ایفا می‌کنند. جسم پینه‌آل در ماهیان نه تنها به عنوان عضو گیرنده نور، بلکه به عنوان غده‌ای با ترشحات درون‌ریز می‌باشد. سلول‌های گیرنده نور در جسم پینه‌آل گونه‌های مختلف ماهیان وجود دارد. نور باعث بروز تغییراتی در فعالیت الکتریکی سلول‌های گیرنده‌ی نور در پینه‌آل می‌شود (Tabata *et al*., 1975). سلول‌های گیرنده‌ی نور در جسم پینه‌آل تغییرات مورفولوژیک وابسته به دوره‌های نوری دارند. پینه‌آل ماهی همانند مهره‌داران عالی‌تر در متابولیسم ایندول آمین‌ها دخیل بوده و هورمون پینه‌آل یا ملاتونین را ترشح می‌نماید (Fenwick, 1970).

آنزیم هیدروکسی ایندول ـ اُ ـ متیل ترانسفراز باعث تبدیل اِن استیل سروتونین به ملاتونین می‌شود. مقادیر در گردش ملاتونین در برخی ماهیان در طول شبانه‌روز متفاوت بوده و در اوقات شب به حداکثر می‌رسد. بنابراین جسم پینه‌آل در ماهی، در اندازه‌گیری دوره‌های نوری به وسیله‌ی علایم نوری و در هدایت آن به صورت تغییر در مقدار ترشح ملاتونین نقش دارد. همچنین تنظیم سیکل تولید مثلی در بسیاری از ماهیان توسط پینه‌آل صورت می‌گیرد و برداشتن پینه‌آل باعث کم شدن تکوین گنادی می‌شود. فعالیت پینه‌آل در ماهیانی که در بهار تخم‌ریزی می‌کنند، در مقایسه با ماهیانی که در زمستان تخم‌ریزی می‌نمایند، متفاوت است. اگر ماهیانی نظیر کفال خاکستری که تخم‌ریزی زمستانه دارند، در معرض دوره نوری کوتاه قرار گیرند، پینه‌آل موجب تکوین گنادی با تأثیر بر میزان گنادوتروپین مترشحه از هیپوفیز می‌شود، ولی اگر ماهیان در معرض دوره‌های نوری بلند قرار گیرند، پینه‌آل موجب جلوگیری از تکوین گناد خواهد شد، بنابراین پینه‌آل دارای اثر محرک هنگام دوره‌های نوری کوتاه و نیز دارای اثر جلوگیری‌کننده هنگام دوره‌های نوری بلند می‌باشد. عکس این حالت در ماهیانی که تخم‌ریزی بهاره دارند، صادق است(de Valaming, 1975). بنابراین ملاتونین مترشحه از پینه‌آل، بسته به اینکه تکوین گنادی ماهی در چه مرحله‌ای بوده و شرایطی که ماهی در معرض آن قرار دارد، ممکن است

فعالیت آنتی‌گنادی یا پروگنادی داشته باشد. ملاتونین می‌تواند به صورت مستقیم بر سلول‌های گنادوتروپ هیپوفیز اثر نموده و باعث آزادسازی GTH II گردد. همچنین ملاتونین از طریق GnRH نیز می‌تواند باعث تحریک ترشح GTH II شود (Evans, 1998).

از سیستم‌های نوروترانس میتری دیگری که در مغز فعال بوده و موجب آزادسازی GTH II می‌گردد، سرتونین (5HT) است.

فرومون‌های جنسی که به صورت اسیدهای فرار هستند، باعث ایجاد فعالیت‌های مهاجرتی، رفتارهای لانه‌گزینی و رفتارهای جنسی می‌گردند. فرومون‌های جنسی احتمالاً نورون‌های بویایی مستقر در مغز را تحریک نموده که این فرومون‌ها از طریق ناحیه VT هیپوتالاموس، باعث آزادسازی GnRH و سپس GTH II می‌گردند. GnRH که از سیستم انتهای عصبی (TN) آزاد می‌شود، علاوه بر فرومون‌ها، به محرک‌های لمسی[16] نیز پاسخ می‌دهند. در ماهی طلایی در زمان تخم‌ریزی، محتویات GnRH در منطقه‌ی پیاز بویایی افزایش می‌یابد. رفتارهای تخم‌ریزی باعث القای ترشح بیشتر GTH II در سرم خون ماهی طلایی نر می‌شود. در ماهی آزاد چام[17] محتوی mRNA نرون‌های حاوی GnRH که از TN ترشح می‌شود، هنگام مهاجرت این ماهی به سمت دریا افزایش می‌یابد، بنابراین سیستم TN ممکن است در واسطه‌گری اثرات خارجی فرومون‌ها از طریق تغییرات هورمونی، باعث مهاجرت ماهی گردد (Evans, 1998).

۲ـ۱ـ۵ـ۱ـ هیپوتالاموس

هیپوتالاموس قسمت مهم مغز را تشکیل می‌دهد و درست در قسمت فوقانی هیپوفیز قرار گرفته است. نرون‌هایی که منشاء آن‌ها در هیپوتالاموس و سایر مراکز مغز می‌باشد، ترشحات خود را مستقیماً به هیپوفیز یا داخل جریان خونی که وارد هیپوفیز می‌شود، می‌ریزند. هورمون رهاکننده گنادوتروپین (GnRH) نقش محوری را در تنظیم رهاسازی گنادوتروپین‌ها ایفا می‌کند. GnRH، هورمون پپتیدی کوچکی مشتمل بر ده اسیدآمینه است.

امروزه چهار شکل مولکولی GnRH در ماهیان شناسایی شده است که عبارتند از:

[Try7, Leu8]-GnRH: salmonGnRH (sGnRH)
[His5, Trp7, Tyr8]GnRH: chickengnRH (cGnRH)
[His5, Asn8]GnRH: catfishGnRH (cfGnRH)

[16] - Tactile stimuli
[17] - Chum salmon

[Ser8]GnRH: sea breamGnRH (sbGnRH)

تفاوت GnRH ماهیان در مقایسه با سایر مهره‌داران تنها در ترادف چند اسیدآمینه است. برای مثال تفاوت مولکول GnRH که از مغز ماهی آزاد چام به دست آمده است با LHRH پستانداران تنها در ۲ اسیدآمینه است (شکل ۲-۱).

mLHRH pGLU-HIS-TRP-SER-TYR-GLY-LEU-ARG-PRO-GLY-NH2
sGnRH PGLU-HIS-TRP-SER-TYR-GLY-TRP-LEU-PRO-GLY-NH2

در مغز ماهی کفال دو شکل GnRH وجود دارد (Sherwood *et al*, 1984).

اجسام سلولی نرون‌های GnRH در سه منطقه از مغز ماهیان استخوانی تجمع یافته و تشکیل سه سیستم مجزای نرونی را می‌دهند:

۱. سیستم نورونی تلن سفالن شکمی در ناحیه‌ی پری اپتیک هیپوتالاموس میانی (VT-POA)

۲. سیستم انتهای عصبی یا TN[۱۸]

۳. سیستم تگمنتوم مغز میانی[۱۹]

فقط GnRH آزاد شده از سیستم VT-POA هیپوتالاموس می‌تواند اثرات تنظیمی بر هیپوفیز داشته باشد و منشاء GnRH مؤثر بر GTH II در این سیستم قرار دارد.

در آزاد ماهیان اثر تقویت‌کننده GnRH جهت افزایش GTH I و GTH II بیشتر تمایل بر ترشح GTH I به هنگام مراحل اولیه و انتهایی زرده‌زایی در جنس ماده و اسپرماتوژنز در جنس نر دارد. با پیشرفت بلوغ گنادها و هم‌زمان با اتمام مرحله زرده‌زایی در ماده‌ها و شروع مرحله اسپرمیشن[۲۰] در نرها پاسخ GTH I به GnRH در مقایسه با پاسخ GTH II کاهش می‌یابد. بنابراین در آزاد ماهیان تأثیر GnRH بر ترشح GTH II با بلوغ گنادها افزایش می‌یابد (عریان، ۱۳۸۰).

Berton (۱۹۸۶)، گزارش کرد که در قزل‌آلای قهوه‌ای[۲۱]، GnRH مغز در انتهای مراحل زرده‌زایی و در دوران بلوغ و اوولاسیون افزایش می‌یابد. همچنین Yu (۱۹۸۷) دریافت که در ماهی طلایی، تکوین تخمدان توأم با کاهش میزان GnRH در هیپوتالاموس و هیپوفیز است. مقادیر GnRH در هیپوفیز نیز الگوی مشابهی را نشان داد.

---

[18] - Terminal nerve
[19] - Mid-brain Tegmentum System
[20] - Spermition
[21] - *Brown trout*

دوره پیش اوولاسیونی[۲۲] در ماهی طلایی توأم با کاهش شدید غلظت GnRH در پیاز بویایی، مغز جلویی، هیپوتالاموس و هیپوفیز و افزایش مقادیر گنادوتروپین بود.

دو دسته گیرنده GnRH در مغز یا هیپوفیز ماهیان وجود دارد. دسته‌ای که دارای میل ترکیبی بالا و ظرفیت پایین و دسته دیگر دارای میل ترکیبی پایین و ظرفیت بالا می‌باشند. تمامی اشکال GnRH قادرند به این دو جایگاه اتصال یابند. هر دو نوع گیرنده‌ها دارای تغییرات فصلی هستند. بدین صورت که در یک فصل یک دسته گیرنده و در فصل دیگر تعداد گیرنده نوع دیگر افزایش می‌یابد. در برخی ماهیان نظیر کفشک‌ها، فقط گیرنده نوع اول وجود دارد (عریان، ۱۳۸۰).

مکانیسم عمل گیرنده‌های GnRH در هیپوفیز از طریق پیامبران ثانویه است که عبارتند از: کلسیم، بازسازی پلی‌فسفواینِدو پپتیدها (PIP) (آزادسازی Ca از منابع درون سلولی)، دی اسیل گلیسرول (DAG)، اینوزیتول تری فسفات (Ins P3)، فسفوکیناز C (PKC)، سنتز آراشیدونیک اسید (AA) و متابولیت‌های آن، c.AMP و فعالیت آدنیلات سیکلاز.

تحریک ترشح GTH II توسط GnRH در ماهیان مختلف بستگی به حضور کلسیم خارج سلولی دارد. ورود کلسیم به درون سلول، از طریق کانال‌های حساس به ولتاژ نوع L صورت می‌گیرد. حضور این کانال‌ها در سلول‌های گنادوتروپ ماهی طلایی به اثبات رسیده است. احتمالاً ورود کلسیم به درون سلول که به واسطه‌ی آنزیم‌های کالمودولین صورت می‌گیرد، باعث تحریکGTH II می‌شود.

توانایی GnRH در افزایش Ins P3 نشان می‌دهد که فرایند هیدرولیز ناشی از عمل فسفولیپاز C (PLC) که بر ترکیبی به نام فسفوپلی ایندوپپتیدها (PIP) اثر گذاشته و باعث آزاد شدن Ins P3 می‌شود. این مسیر علاوه بر تولید Ins P3 قادر به تولید DAG و PKC در میانجیگری تحریک GnRH جهت ترشح GTH II از طریق آزادسازی کلسیم از منابع درون سلولی می‌باشد.

مسیر دیگری که توسط GnRH وجود دارد، مسیر فسفولیپاز A (PLA) ـ آراشیدونیک اسید (AA) می‌باشد که این مسیر نیز باعث تحریک ترشح GTH II می‌گردد.

---

[22] - Pre ovulation

c.AMP نیز به عنوان پیامبر ثانویه عمومی در برخی ماهیان استخوانی حقیقی عمل می‌نماید.

سیستم پیامبر دیگری که در آزادسازی GTH II توسط GnRH وجود دارد، پروتئین کینازC (PKC) است که یا با آزادسازی کلسیم از منابع درون سلولی و یا از طریق ورود سدیم خارج سلولی و خارج نمودن فعال یون هیدروژن باعث تغییر در میزان pH درون سلول شده که این عامل باعث تحریک ترشح GTH II می‌گردد. شکل (۳-۱) مسیرهای تنظیم ترشحGTH II را در هیپوفیز ماهیان استخوانی از طریق پیامبران ثانویه نشان می‌دهد.

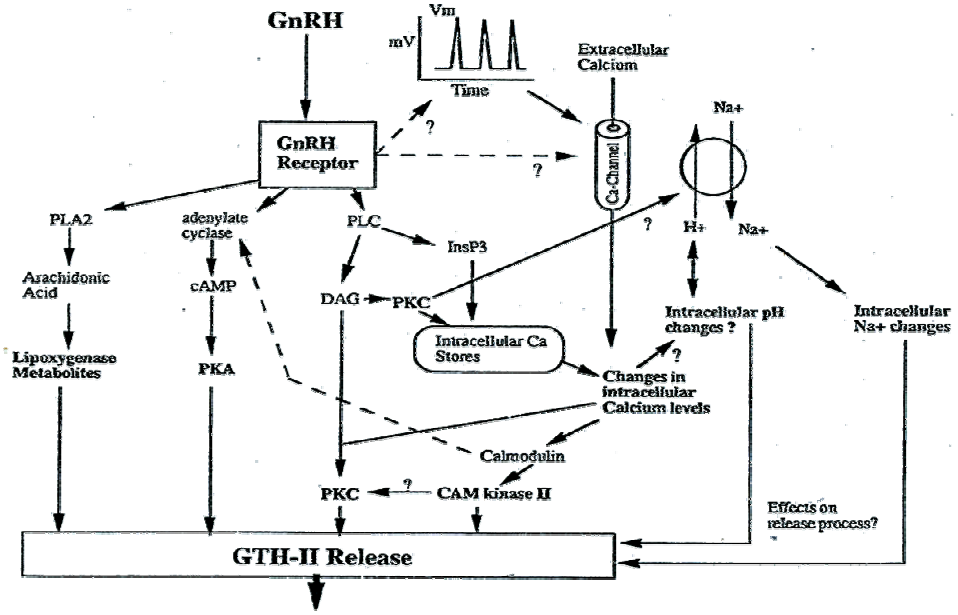
علاوه بر عامل نرواندوکرینی هیپوتالامیک تحریک‌کننده، عوامل مهارکننده هیپوتالامیک نیز ترشح گنادوتروپین II را کنترل می‌نمایند. دوپامین (DA) مستقیماً ترشح گنادوتروپین II القاء شده توسط GnRH را از طریق گیرنده‌های D روی گنادوتروپ‌ها در اکثر ماهیان استخوانی مهار می‌کند. در برخی از این ماهیان دوپامین، ترشح گنادوتروپین II از سلول‌های هیپوفیزی را مستقیماً کاهش می‌دهد. همچنین دوپامین ممکن است در طولانی مدت حساسیت گنادوتروپ‌های هیپوفیز را به GnRH با کم نمودن تعداد گیرنده‌های GnRH در هیپوفیز کاهش دهد. در برخی موارد نیز دوپامین ورودی GnRH به گنادوتروپ‌ها را از طریق واکنش متقابل با نرون‌های محتوی GnRH که به هیپوفیز وارد می‌شود، تغییر می‌دهد (Evans, 1998).

۳ـ۱ـ۵ـ۱ـ هیپوفیز: تکوین گناد در ماهیان استخوانی، تحت کنترل هیپوفیز است. برداشتن هیپوفیز در گونه‌های مختلف نشان داد که تکثیر اووگونی‌ها، زرده‌زایی، بلوغ اووسیت و اوولاسیون در ماهیان ماده متوقف می‌شود (Silo & Shemul, 1989). غده هیپوفیز در ماهی کفال خاکستری همانند سایر ماهیان استخوانی حقیقی است. شکل آن مخروطی و به رنگ صورتی کمرنگ و در حفره استخوان پروانه‌ای قرار گرفته است. هیپوفیز ماهیان مانند سایر مهره‌داران، شامل دو بخش نوروهیپوفیز و آدنوهیپوفیز است. آدنوهیپوفیز بر اساس توزیع انواع مختلف سلول‌ها از سه بخش Rostral pars distalis، Proximal pars distalis و Pars Intermedia تشکیل شده است. سلول‌های هیپوفیزی که در تنظیم رشد گنادها نقش دارند (گنادوتروپ‌ها) بیشتر در قسمت Proximal pars distalis پراکنده‌اند. نورون‌های حاوی GnRH از هیپوتالاموس به قسمت پروکسیمال پارس دیستالیس هیپوفیز وارد می‌شوند. دو نوع گنادوتروپین I و II (GTH II, GTH I) که از لحاظ شیمیایی با هم متفاوت هستند، در گونه‌های مختلف ماهیان شناسایی شده است (Kawauchi *et al*., 1989). این دو نوع گنادوتروپین در ماهیان معمولاً از دو نوع

سلول مختلف ترشح شده و مقادیر آن‌ها در هیپوفیز و پلاسمای خون در مراحل مختلف تولیدمثل در هر دو جنس متغیر بوده و دارای فعالیت فیزیولوژیکی مجزا از هم، ولی هماهنگ با یکدیگر می‌باشند (Harrel, 1997). بیوشیمی و فیزیولوژی این دو نوع گنادوتروپین دارای همولوژی ساختمانی و آنالوژی کارکردی با گنادوتروپین‌های پستانداران (FSH, LH) می‌باشند. گنادوتروپین‌های ماهیان دارای ساختمان گلیکوپروتئینی بوده و از دو زیرواحد α و β تشکیل شده است. زیرواحد α در هر دو گنادوتروپین یکسان، ولی زیرواحد β از لحاظ اسیدهای آمینه با یکدیگر متفاوت می‌باشند. زیرواحدهای α در خون گیرنده‌ها را شناسایی می‌کند. وظیفه‌ی زیرواحدهای β جایگزینی روی گیرنده‌های سلول‌های هدف می‌باشد. زیرواحد β باعث ایجاد خصوصیات بیولوژیکی خاصی می‌شود (Pierce & Parsons., 1981).

وجود کربوهیدارت در ساختمان گنادوتروپین‌ها دوگانگی به اعمال GTH I و GTH II می‌دهد. گنادوتروپین I ورود وتیلوژنین را به داخل اووسیت القا می‌نماید. میزان این گنادوتروپین در ماهیان ماده در طول مراحل زرده‌زایی بیشتر است. گنادوتروپین II در تولید استروژن از گنادها، سنتز ویتلوژنین کبدی و تا حدودی نیز در زرده‌زایی نقش دارد.

این گنادوتروپین بعد از اتمام مرحله‌ی زرده‌زایی، باعث تحریک تولید استروئیدهای القاء کننده بلوغ (MIS)، بلوغ و اوولاسیون می‌شود. میزان گنادوتروپین II هنگام بلوغ نهایی افزایش می‌یابد (Burzava-Gerard, 1982).



شکل ۳-۱- مسیرهای تنظیم ترشح GTH II در هیپوفیز ماهیان
استخوانی اقتباس از Evans(۱۹۹۸)

در ماهیان استخوانی حقیقی، چندین عامل بر آزاسازی GTH II مؤثر می‌باشند. نتایج حاصل از محیط کشت *In vitro* نشان داد که هورمورن‌های GnRH، نوراپی نفرین (NE) و نوروپپتید Y (NPY) مستقیماً آزادسازی GTH II را تحریک می‌کنند، همچنین نوروترانس میترهایی نظیر سرتونین (5HT)، Activin inhibin و نیز نیکوتین، بومبزین (BBS)، کوله سیستوکینین (CCK) و گالانین (GAL) نیز اثرات تحریکی بر آزادسازی GTH II دارند (شکل ۱). مطالعات ایمونوهیستو شیمیایی در ماهیان استخوانی حقیقی نشان داد که GnRH، NPY، BBS، CCK و GAL مستقیماً به سلول‌های گنادوتروپ هیپوفیزی از طریق نورون‌های هیپوتالامیکی وارد می‌شوند، در حالی که Activin inhibin و سرتونین احتمالاً از منابع پاراکرینی درون هیپوفیز ترشح می‌شوند. نوراپی نفرین و ملاتونین نیز احتمالاً از منابع اندوکرینی منشاء گرفته و روی گنادوتروپ‌ها تأثیر می‌گذارند (عریان، ۱۳۸۰).

٤ـ۱ـ۵ـ۱ـ گناد: تخمدان در اکثر ماهیان استخوانی به صورت جفت و توخالی است. در طول مراحل تخمک‌زایی[۲۳] زوائد تخمدانی توسعه یافته و به سمت داخل حفره تخمدانی می‌یابند. این تیغه‌ها دارای

[23] - Oogenesis

اووسیت‌های در حال رشد می‌باشند. اووگونی‌ها سلول‌های کوچک و مدوری هستند که نسبت هسته به سیتوپلاسم در آن زیاد است. معمولاً این سلول‌ها در جایگاه[۲۴] قرار گرفته‌اند. برخی نیز به صورت انفرادی در استرومای چین‌های تخمدانی قرار می‌گیرند. اووگونی‌ها از طریق میتوز تکثیر می‌کنند. اووسیت‌های اولیه حاصل تقسیم میوزی اووگونی‌ها می‌باشند. در این مرحله کروموزوم‌ها در پروفاز تقسیم اول میوز قرار دارند. اووسیت‌های اولیه در یک مدت طولانی که شامل چند مرحله است، رشد می‌نمایند. در مراحل پیش از دانه‌های زرده، هم رشد سیتوپلاسمی و هم رشد هسته‌ای صورت می‌گیرد. اووسیت‌های اولیه را در این مرحله می‌توان با یک هسته بزرگ که دارای تعدادی هستک در حاشیه‌ی غشای آن است، تشخیص داد. رشته‌های کروماتینی به صورت توده‌ای در مرکز اووسیت قابل مشاهده است (مرحله I و II). در طول مرحله‌ی هستک‌های کناری، مواد قلیادوست شامل ریبونوکلئوپروتئین‌ها احتمالاً از طریق منافذ موجود در غشای هسته به سیتوپلاسم اووسیت راه می‌یابند. به تدریج دو لایه سلولی مجزا در پیرامون اووسیت شکل می‌گیرد که فولیکول نامیده می‌شود. لایه‌های فولیکول در اووسیت‌های در حال رشد شامل کوریون، لایه گرانولوزا، غشای پایه و لایه تکا می‌باشد . در مراحل اولیه رشد اووسیت، لایه کوریون وجود نداشته و سلول‌های گرانولوزا در مجاورت اووسیت قرار گرفته است. هم‌زمان با رشد اووسیت، سلول‌های گرانولوزا از نظر تعداد افزایش یافته و لایه‌ای را در محیط خارجی اووسیت تشکیل می‌دهند. سلول‌های گرانولوزا توانایی تولید استروئید را دارند. بین سلول‌های گرانولوزا یا هر دو نسبت داده شده است. احتمالاً کوریون دارای ساختمانی با منشاء دوگانه است. لایه اول به وسیله اووسیت و لایه دوم به وسیله گرانولوزا ایجاد می‌گردد. این دو لایه در طول تکوین اووسیت در هم می‌آمیزند.

در لایه کوریون منافذ ریزی وجود دارد که ارتباط بین سلول‌های گرانولوزا و اووسیت را برقرار می‌نمایند (Wallace & Selman, 1981). سلول‌های تکا خارجی‌ترین لایه فولیکولی را تشکیل می‌دهند. این لایه دارای شبکه مویرگی وسیعی است. سلول‌های تکا نیز در تولید استروئید نقش دارند. با شکل‌گیری کامل فولیکول مرحله دانه‌های زرده (مرحله IV) شروع می‌شود، بنابراین شکل‌گیری فولیکول از مرحله دو آغاز و در مرحله چهار کامل می‌شود. در طول این مرحله، مواد زرده‌ای با فرمول‌های مختلف شیمیایی در اووسیت تجمع می‌یابند. این

[24] - Nest

مواد بعدها منبع غذایی لاروهای در حال رشد می‌باشد. مواد زرده‌ای در داخل اووسیت تولید می‌شود یا منشاء خارجی دارند. مواد زرده با منشاء درونی به صورت وزیکول‌های زرده اولین ساختمانی هستند که در اووسیت‌های اولیه ظاهر می‌شوند. این وزیکول‌ها که حاوی موکوپلی ساکاریدها یا گلیکوپروتئین‌ها هستند، ابتدا در حاشیه اووسیت و سپس به آرامی در داخل اووسیت پراکنده می‌شوند. این اعضا در لقاح دخالت دارند، به این صورت که محتویاتشان را هنگام لقاح به داخل فضای پری ویتلین رهاسازی می‌سازند. بنابراین آن‌ها زرده‌ای حقیقی نیستند. این مرحله را می‌توان مرحله پیش زرده‌ای[۲۵] نامید (Tamaru *et al*, 1991). مهم‌ترین اجزایی که در مرحله پیش از بلوغ ظاهر می‌شود، دانه‌های زرده می‌باشند که در مرحله چهار ظاهر شده و در پایان این مرحله، بیشتر حجم سیتوپلاسم را اشغال می‌کنند. این دانه‌ها منشاء خارجی داشته و از طریق پینوسیتوز به داخل اووسیت راه می‌یابند. دانه‌های زرده محتوی پروتئین‌های زرده می‌باشند که از فسفولیپوپروتئین‌ها منشاء می‌گیرند. این مواد در پاسخ به ترشح ۱۷ بتا ـ استرادیول از فولیکول به خون، توسط سلول‌های کبدی به داخل جریان خون راه یافته و در نهایت از طریق مویرگ‌هایی که در بین سلول‌های لایه فولیکول وجود دارند، وارد اووسیت می‌شوند. بنابراین مرحله اصلی دانه‌های زرده، مربوط به موادی است که از خارج اووسیت وارد آن می‌شوند. در طول مراحل یاد شده نسبت هسته به سیتوپلاسم به تدریج کاهش یافته و حجم اووسیت چند برابر می‌شود. طی مراحل زرده‌زایی، قطرات چربی نیز ظاهر می‌شوند که ابتدا در حاشیه هسته و سپس داخل اووپلاسم پراکنده می‌شوند. قطرات چربی در داخل اووسیت تولید می‌شوند. به محض پایان یافتن مرحله زرده‌زایی، اوولاسیون تخمک (مرحله رها شدن اووسیت‌ها از فولیکول) صورت می‌گیرد. این مرحله با مهاجرت هسته (که در این حال وزیکول زاینده نامیده می‌شود)، از مرکز به قطب حیوانی شروع می‌شود، سپس غشای وزیکول زاینده شکسته شده و تقسیم میوزی که در مراحل اولیه تخمک‌زایی متوقف شده بود، پیگیری می‌شود. در طول بلوغ اووسیت، اولین تقسیم میوز پایان یافته و اولین جسم قطبی حذف می‌شود. در این هنگام، تغییراتی چون ترکیب دانه‌های زرده و قطرات چربی صورت می‌گیرد و حجم سیتوپلاسم به علت آبگیری افزایش می‌یابد که به موجب آن، اووسیت شفاف‌تر شده و قطر آن افزایش می‌یابد (مرحله IV). پس از اوولاسیون، تخمک‌های اوله تقسیمات میوز را تا

[25] - Perivitellogenesis

متافاز دوم ادامه می‌دهند. در این هنگام، آن‌ها آماده لقاح می‌باشند. فقط بعد از وارد شدن اسپرم، تقسیمات میوز کامل شده و دومین جسم قطبی حذف می گردد (Zohar, 1989).

استروئیدهای گنادی باعث تنظیم تولید گامت القاء شده توسط گنادوتروپین‌ها می‌شوند. مکان اصلی تولید استروئیدهای جنسی، گنادها می‌باشند. تخمدان‌های ماهی قادر به سنتز اندروژن‌ها، استروژن‌ها، پروژستین‌ها و کورتیکواستروئیدها می‌باشند (Shilo & Shemul, 1989). هورمون‌های استروئیدی که توسط گناد ماهیان استخوانی حقیقی ترشح می‌شود، عمل مغز و محور هیپوتالاموس هیپوفیز، بلوغ، کسب صفات و رفتارهای ثانویه جنسی، تولید گامت، رشد و متابولیسم عمومی بدن را بر عهده دارند. گنادوتروپین‌ها دارای نقش اساسی در تنظیم تولید استروئید از گناد می‌باشند (Naghama, 1987; Yan *et al*., 1992). عوامل گنادی یا خارج از گنادی بجز از گنادوتروپین‌ها نیز می‌توانند در کنترل فعالیت استروئیدهای ماهیان نقش داشته باشند. مکان اصلی تولید استروئیدها در ماهیان ماده، سلول‌های تکا (theca) و گرانولوزا (granulose) در فولیکول تخمدان است. گناد ماهیان استخوانی قادر به تولید انواع مختلفی از پیش‌سازهای هورمون‌های استروئیدی، هورمون‌های استروئیدی و متابولیت‌های هورمون می‌باشد. مهم‌ترین تولیدات گنادها، استروژن‌ها، آندروژن‌ها و پروژستین‌ها است. این هورمون‌ها، از طریق اتصال به گیرنده‌های ویژه‌ای در سیتوپلاسم یا هسته سلول‌های هدف، نقش فیزیولوژیک خود را ایفا می‌نمایند. اگرچه در تنظیم بلوغ نهایی اووسیت، گیرنده‌ها در غشای اووسیت قرار گرفته‌اند. واکنش مغز به علایم محیطی، ترشح GnRH در هیپوتالاموس، حساسیت گنادوتروپین‌ها به GnRH و ترشح گنادوتروپین‌ها ناشی از مکانیسم‌های فیدبکی مثبت و منفی هورمون‌های استروئیدی می‌باشد (Harrel, 1997).

استروژن‌ها در ماهیان استخوانی ماده، نقش اصلی را در تنظیم زرده‌زایی کبد بر عهده دارند. این استروئیدها موجب سنتز و ترشح پیش‌ساز زرده تخم‌مرغ (ویتلوژنین) می‌شود. ویتلوژنین به داخل اووسیت جذب شده و موجب رشد آن می گردد (Selman & Wallace, 1989).

وجود ویتلوژنین در خون ماهیان ماده می‌تواند به عنوان شاخصی برای شروع مراحل بلوغ باشد.

۱۷ بتا ـ استرادیول به عنوان مهم‌ترین استروژن کنترل‌کننده تولید زرده در اکثر ماهیان استخوانی حقیقی است. اگرچه ممکن است دیگر استروژن‌ها (استرون) به خصوص در اوایل دوره تولیدمثلی نیز در این عمل نقش داشته باشند (Harrel, 1997).

سلول‌های تکای فولیکول که در مرحله‌ی جذب زرده هستند، قادر به تولید آندروژن‌ها می‌باشند که به استروژن‌ها آروماتیز می‌شوند. ترشح آندروژن در مراحل اولیه‌ی زرده‌زایی به علت فعالیت آروماتیز خیلی کم است (Kagawa *et al*, 1982; Young *et al*, 1983). مهم‌ترین آندروژن در ماهیان تستوسترون است که به عنوان پیش‌ساز جهت سنتز ۱۷ بتا ـ استرادیول می‌باشد (Kagawa *et al*, 1983b).

هر دو استروئید فوق دارای اثرات مستقیم مهمی بر عمل محور هیپوتالاموس ـ هیپوفیز و همچنین رفتارهای تولیدمثلی می‌باشند (Harrel, 1997). از دیگر آندروژن‌های مهم می‌توان به ۱۱ ـ کتوتستوسترون اشاره نموده که به وسیله‌ی تخمدان برخی ماهیان از جمله کفال ماهیان سنتز می‌شود (Eckstein & Eylath, 1980; Azoury & Eckstein, 1980).

از آن‌جاییکه ۱۱ ـ کتوتستوسترون نمی‌تواند به استروژن‌ها آروماتیزه شود، نقش آن در ماهیان ماده باید مورد بررسی قرار گیرد. پروژستین‌ها به خصوص استروئیدهای C_{21} از لحاظ ساختمانی، وابسته به پروژسترون می‌باشند. این استروئیدها در بلوغ نهایی تخمدان در ماهیان استخوانی نقش اساسی دارند. تأثیر گنادوتروپین روی بلوغ اووسیت احتمالاً از طریق استروئیدهای ۱۷ آلفا ـ هیدروکسی ـ ۲۰ بتا ـ دی هیدروکسی پروژسترون و ۱۷ آلفا ـ هیدروکسی پروژسترون تنظیم می‌شود (Scott *et al*, 1983).

مدل دو نوع سلولی جهت تولید ۱۷ آلفا ـ هیدروکسی ـ ۲۰ بتا ـ دی هیدروکسی پروژسترون پیشنهاد شده است. طبق این مدل، ۱۷ آلفا ـ هیدروکسی پروژسترون که به وسیله‌ی سلول‌های تکا تولید می‌شود، به وسیله‌ی آنزیم ۲۰ بتا ـ هیدروکسی استروئید دهیدروژناز (20βـ HSDH) به ۱۷ آلفا ـ هیدروکسی ـ ۲۰ بتا ـ دی هیدروکسی پروژسترون در سلول‌های گرانولوزا تبدیل می‌شود (Young *et al*, 1984). در برخی از گونه‌های ماهیان، میزان ۱۷ آلفا ـ هیدروکسی ـ ۲۰ بتا ـ دی هیدروکسی پروژسترون به وسیله‌ی گنادوتروپین افزایش می‌یابد. در حقیقت، گنادوتروپین فعالیت 20βـ HSDH را به تدریج القاء می‌کند. از سایر پروژستین‌هایی که در القای بلوغ نهایی اووسیت در ماهیان نقش دارند، می‌توان به ۱۷ آلفا ـ ۲۰ بتا ـ دی هیدروکسی ـ ۴ ـ پرگنن ـ ۳ ـ وان (DHP) و ۱۷

آلفا ـ ۲۰ بتا ـ ۲۱ ـ تری هیدروکسی ـ ۴ ـ پرگنن ـ ۳ ـ وان (S ـβ20) اشاره کرد که در بلوغ نهایی اووسیت‌های بسیاری از ماهیان، نقش اصلی را ایفا می‌کنند (Patino & Thomas, 1990; Tamaru *et al*., 1991).

هر سه گروه استروئیدهای جنسی در ارتباط نزدیک با یکدیگر بوده و در واقع، نسل‌های مختلف یک خانواده محسوب می‌شوند. پروژستین‌ها در مسیر بیوسنتز، قبل از آندروژن‌ها قرار دارند و استروژن‌ها نیز از آندروژن‌ها حاصل می‌شوند. تبدیل یک گروه از استروئیدها به گروه دیگر توسط چندین آنزیم صورت می‌گیرد. به نظر می‌رسد که کل آنزیم‌های لازم جهت سنتز یک استروئید خاص در درون سلول به شکل یک واحد بیوسنتزی در کنار یکدیگر و به حالتی قرار گرفته‌اند که سوبسترا پس از ورود به سلول در مسیر یک خط تولید آنزیمی قرار می‌گیرد و این آنزیم‌ها نظیر ۱۷ ـ آلفا هیدروکسیلاز، ۱۷ و ۲۰ ـ دسمولاز، ۱۷ ـ کتوستروئید ردوکتاز و ۳ ـ بتا هیدروکسی استروئید دهیدروژناز مانع از خروج مواد حد واسط تولید شده در سلول می‌گردند. شباهت‌های عملکردی بین اعضای یک گروه از استروئیدها نیز بیانگر توانایی آن‌ها در اتصال با گیرنده‌های بافتی و به عبارتی با گیرنده‌هایی با درجه‌ی اختصاصی یکسان است. از آن‌جاییکه تداخل استروئید و گیرنده بستگی به تطابق مناسب استروشیمیایی بین دو مولکول دارد، لذا پروژستین‌های طبیعی ۲۱ کربنه بوده که بین کربن ۴ و ۵ آن‌ها یک پیوند دوگانه قرار داشته، روی کربن ۱۷ یک گروه بتا ـ اسیل و روی کربن شماره ۱۳، یک گروه بتا- متیل دارند. استروژن‌های طبیعی نیز ۱۸ کربنه و با یک حلقه آروماتیک بوده که کربن شماره ۳ آن‌ها هیدروکسیله و در کربن شماره ۱۷، یک گروه بتا- هیدروکسیل قرار گرفته است. برخی از استروئیدها بهتر از سایر استروئیدها با یک گیرنده‌ی معین وارد واکنش می‌شوند. از این رو، می‌توان تصور نمود که ۱۷ ـ بتا استرادیول از هورمون استرون قوی‌تر است (عریان، ۱۳۷۳).

استروئیدهای جنسی به وسیله‌ی فیدبک‌های مثبت و منفی، آزادسازی GTH II را تنظیم می‌کنند.

بدین صورت که در مراحل اولیه زرده‌زایی خارجی[۲۶]، سطوح GTH II و استرادیول نسبتاً پایین و ثابت است. در طول مرحله زرده‌زایی، نوسانات GTH II مشاهده می‌شود که به دلیل افزایش سطوح استرادیول (و احتمالاً استرون) می‌باشد. بنابراین استروئیدهای جنسی قادرند که آزادسازی GTH II را توسط GnRH در ماهیان

[26] - Exogenous vitellogenesis

استخوانی حقیقی نابالغ القاء نمایند. اگرچه چندین فیدبک مثبت در برخی از ماهیان استخوانی حقیقی بالغ نظیر گربه ماهی آفریقایی نیز مشاهده شده است. همچنین فیدبک مثبت استروئیدها ممکن است به صورت مستقیم بر روی هیپوفیز عمل نموده و باعث آزادسازی GTH II گردند (شکل ۱-۱) (عریان، ۱۳۸۰).

کاهش پیوسته سطوح ۱۷ ـ بتا استرادیول در خون از مراحل نهایی زردەزایی آغاز می‌شود. در برخی مواقع، افزایش میزان تستوسترون نیز مشاهده می‌شود که به علت کاهش فعالیت آروماتیزی می‌باشد. کاهش ۱۷ ـ بتا استرادیول، فیدبک منفی آن را بر روی ترشح گنادوتروپین کاهش داده که در نتیجه، میزان GTH II در پاسخ به ترشح بیشتر GnRH افزایش می‌یابد. افزایش GTH II کاملاً از فعالیت آروماتیزی جلوگیری می‌نماید. در عوض، القای تولید و فعالیت 20β-HSDH به طور تصاعدی افزایش یافته و مقادیر تستوسترون کاهش می‌یابد. تولید ۱۷ آلفا ـ هیدروکسی پروژسترون باید به علت کاهش فعالیت ۲۰ ـ C ـ ۱۷ ـ C لیاز (C-17-C-20-lyase) باشد که با تولید ۱۷ آلفا ـ ۲۰ بتا ـ هیدروکسی پروژسترون هم‌زمان است. سطوح این استروئید بلافاصله بعد از بلوغ و اوولاسیون کاهش می‌یابد که این کاهش، فیدبک منفی آن را بر ترشح GTH II از بین برده و در نتیجه، سطوح GTH II به شدت افزایش می‌یابد. فیدبک منفی استروئید جهت ممانعت از آزادسازی GTH II از طریق کاهش در تولید GABA و افزایش تون مهاری دوپامین صورت می‌گیرد که در نتیجه، آزادسازی GnRH کاهش می‌یابد. کنترل فیدبک منفی استروئیدهای جنسی منحصر به نورون‌های حاوی GnRH در ناحیه‌ی VT هیپوتالاموس می‌باشد (شکل ۱-۱) (عریان، ۱۳۸۰).

۲- مواد و روش کار

۲-۱- محل اجرای پروژه

این پروژه در مرکز آموزش و ترویج پرورش میگو وسایر آبزیان گمیشان واقع در کیلومتر ۱۱ شهر گمیشان (با مختصات جغرافیایی عرض:۳۷ درجه، ۹ دقیقه و ۱/۹۷ ثانیه شمالی و طول: ۵۴ درجه، ۰ دقیقه و ۴۵/۲۶ ثانیه شرقی) در مجاورت تالاب گمیشان انجام شد. مساحت این مرکز ۲۶ هکتار است و از سال ۱۳۷۳ بهره برداری از آن آغاز شده است.

۲-۲ – اندازه گیری دمای آب

با توجه به حضور دائمی نیروی تحقیقاتی و همچنین انجام و اجرای مستمر فعالیتهای تحقیقاتی در مرکز گمیشان دمای آب و هوا در تمامی ایام سال اندازه گیری و ثبت می گردد.

۲-۳- بیومتری ماهیان و نمونه برداری از گناد

در این تحقیق به منظور بررسی روند رسیدگی جنسی غدد تناسلی ماهی کفال خاکستری، تعداد ۶۱ قطعه ماهی از مهر ماه ۱۳۸۲ لغایت خرداد ۱۳۸۴ از استخرهای خاکی محل نگهداری این ماهیان صید و بلافاصله بعد از انتقال به صیدگاه، طول کل، چنگالی و استاندارد آنها با دقت ۱ سانتی متر و وزن کل و وزن غدد جنسی به ترتیب با دقت ۰/۰۱ کیلوگرم و ۰/۰۰۱ گرم اندازه گیری و ثبت گردید (شکل های ۱-۲و۲-۲). به منظور تعیین مرحله رسیدگی جنسی، از سه بخش قدامی، میانی و خلفی گناد ماهیان ماده تکه برداری با استفاده از تیغ اسکالپل انجام و نمونه ها جهت اقدامات بعدی در محلول بافر فسفات تثبیت شدند. قطر اووگونی، اووسیت و تخمک نیز با استفاده از لوپ مدرج روسی با بزرگ نمایی X ۱۰ اندازه گیری گردید.

تصویر ۱-۲ - زیست سنجی ماهیان

٤-۲- خون گیری از ماهیان

از ماهیان صید شده بصورت زنده، بلافاصله پس از انتقال به بیرون از آب و پس از خشک نمودن سطح بدن با استفاده از سرنگ ۵ سی سی از سیاهرگ ناحیه ساقه دمی خون گیری بعمل آمد (شکل ۲-۲) و با دستگاه سانتریفوژ (مدل ۴۲۰۶ ALC ساخت کشور ایتالیا) با دور ۴۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سرم خون جداسازی و در لوله های اپندورف ذخیره و در آزمایشگاه مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آبهای داخلی - گرگان در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

تصویر ۲-۲- خونگیری

۵ـ۲ـ بررسی بافت‌شناسی

نمونه های تخمدان جهت تعیین مراحل تکاملی تخمک از تخمدان ماهی جدا (شکل ۳-۲) و پس از انجام آماده سازی های لازم و معمول (آبگیری، شفاف سازی، آغشتگی با پارافین، قالب گیری و برش و تهیه مقاطع) با استفاده از ائوزین- هماتوکسیلین رنگ آمیزی شدند (پوستی، ۱۳۶۸).

تصویر ۳-۲- نمونه برداری از گناد

یکی از روشهای معمولی جهت آماده سازی بافتها روش پارافین می باشد که مراحل کار به شرح ذیل انجام گردید:

۱- آبگیری ۲- شفاف کردن ۳- آغشتگی با پارافین ۴- قالبگیری ۵- برش بافت

۶- چسبانیدن برش ها بر روی لام ۷- رنگ آمیزی ۸-چسبانیدن لامل

٦-۲-اندازه گیری فاکتورهای بیوشیمیایی پلاسمای خون

۱-٦-۲- اندازه گیری هورمونهای جنسی استروئیدی به روش RIA

اندازه گیری هورمونهای تستوسترون، ۱۷ بتا - استرادایول، ۱۷ آلفا - هیدروکسی پروژسترون با استفاده از کیت های رادیو ایمونواسی و به وسیله دستگاه گاما شمار، از نوع ال.کا.بی[۲۷] ساخت فنلاند و به صورت تمام اتوماتیک، سنجیده شد.

[27]- LKB

برای همه این هورمونها از واحد نانو گرم در میلی لیتر استفاده شده است. برای اندازه گیری تستوسترون از کیت دی.پی.سی۲۸ ساخت آمریکا، استرادایول از کیت ار.ا.دی. ام۲۹ ساخت ایتالیا و ۱۷ آلفا هیدروکسی پروژسترون از کیت بیوسورس ۳۰ ساخت بلژیک استفاده شده است.

۱ -۱-٦-۲- اندازه گیری ۱۷ آلفا- هیدروکسی پروژسترون (17α-OHP)

جهت اندازه گیری ۱۷ آلفا - هیدروکسی پروژسترون از کیت بیوسورس[۳۱] ساخت بلژیک استفاده گردید. به این صورت که یک میلی لیتر از ردیاب حاوی ید نشاندار و مقدار یک میلی لیتر از آنتی سرم را به ۵۰ میکرولیتر نمونه مورد آزمایش، استاندارد و کنترل افزوده و به مدت سه ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد. پس از دو دقیقه، مقادیر هورمون اندازه گیری گردید. جهت افزایش ضریب اطمینان، هر تست سه بار تکرار گردید. محاسبات نهایی توسط سیستم کامپیوتری بر حسب نانوگرم بر میلی لیتر صورت گرفت.

۲ -۱-٦-۲- اندازه گیری ۱۷ بتا- استرادیول (E_2)

برای اندازه گیری مقادیر ۱۷ بتا- استرادیول در نمونه های سرم، از کیت RADIM ساخت کشور ایتالیا استفاده شد. بدین صورت که ۵۰۰ میکرو لیتر از ردیاب حاوی ید نشاندار و مقدار ۵۰۰ میکرو لیتر از آنتی سرم را به ۱۰۰ میکرو لیتر از نمونه سرم مورد آزمایش، استاندارد و کنترل افزوده و به مدت سه ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری نموده و پس از دو دقیقه، مقادیر اندازه گیری شد. جهت حصول اطمینان بیشتر، هر تست سه بار تکرار گردید. محاسبات نهایی بر حسب نانوگرم در میلی لیتر و توسط سیستم کامپیوتری انجام شد .

---

[28]- DPC
[29]-RADIM
[30]- Biosource
[31]- Biosource

۳ -۱-٦-۲- اندازه گیری هورمون تستوتسترون (T)

برای اندازه گیری تستوسترون از کیت DPC ساخت امریکا استفاده شد. ۵۰۰ میکرو لیتر از ردیاب حاوی ید نشاندار (ید ۱۲۵) و مقدار ۵۰۰ میکرو لیتر از آنتی سرم را به ۵۰ میکرولیتر نمونه سرم مورد آزمایش، استاندارد و کنترل افزوده و به مدت سه ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری و پس از دو دقیقه، مقادیر اندازه گیری شد. برای بالا بردن میزان اطمینان، هر تست سه بار تکرار گردید. محاسبات نهایی توسط سیستم کامپیوتری بر حسب نانوگرم بر میلی لیتر صورت گرفت.

۲-٦-۲- اندازه گیری کلسیم پلاسمای خون

اندازه گیری کلسیم با روش رنگ سنجی[۳۲] و با استفاده از دستگاه ار.آ.۱۰۰۰ تکنیکون[۳۳] انجام شد.

۳-٦-۲- اندازه گیری تری گلیسرید و کلسترول پلاسمای خون

این متابولیت ها با استفاده از روش رنگ سنجی آنزیمی[۳۴] در آزمایشگاه پاتوفیزیولوژی دکتر فدایی رشت اندازه گیری شد.

۷-۲- تجزیه و تحلیل آماری

جهت مقایسه میانگین پارامترهای زیستی بین دو جنس نر و ماده از آزمون T-test و مقادیر فاکتورهای بیوشیمیایی پلاسمای خون ماهی در مراحل مختلف رسیدگی جنسی از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه[۳۵] و آزمون دانکن در سطح معنی دار P < ۰/۰۵ با استفاده از برنامه کامپیوتری SPSS، و جهت رسم نمودارها از برنامه Excel استفاده گردید.

---

[32]-Colorometric

[33]- RA-1000 Technicon

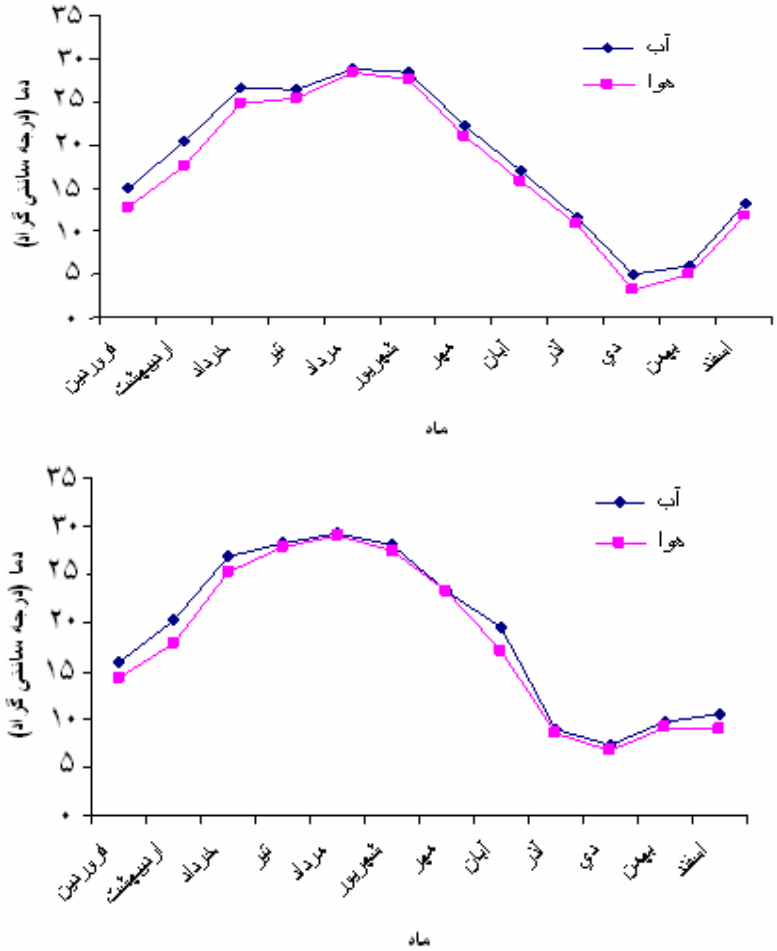
[34] - Enzymatic calorimetry

[35]- One - Way ANOVA -www.medu.ir

۳- نتایج

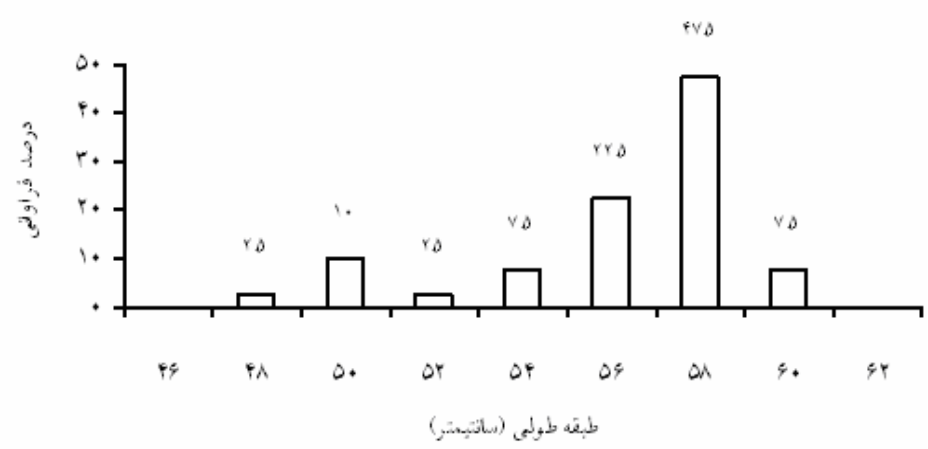
۱-۳- دمای آب: تغییرات دمای آب در استخر های نگهداری ماهیان مورد بررسی در طی ایام نمونه برداری در سالهای ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷ مطابق نمودارهای ۱-۳و ۲-۳ انجام شد.

در هر دو سال متوسط بیشترین دما مربوط به مرداد ماه (۱± ۲۹ درجه سانتی گراد) و متوسط کمترین میزان در ماه دی (۵ درجه سانتی گراد) بود. خاطر نشان می گردد که در ماه دی سال ۱۳۸۶ در دو روز دمای آب به کمتر صفر تنزل یافته که موجب تلفات تعدادی از مولدین کفال گردید.

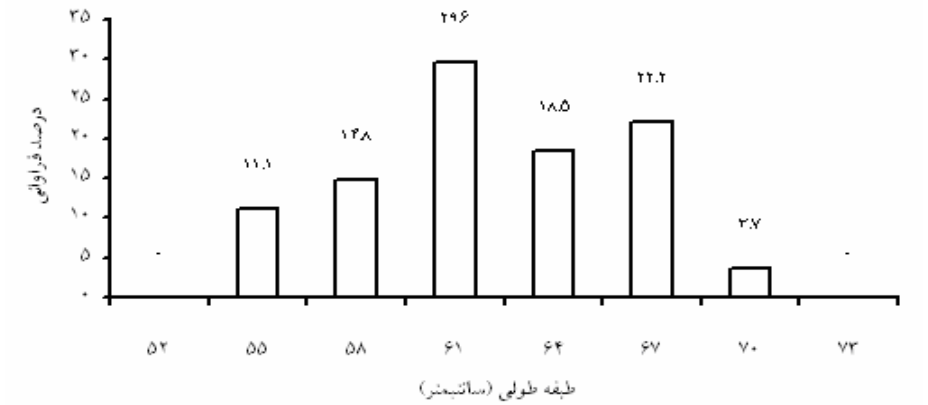


نمودارهای ۱-۳ و ۲-۳: به ترتیب تغییرات میانگین دمای ماهیانه سالهای ۱۳۸۷ و ۱۳۷۶

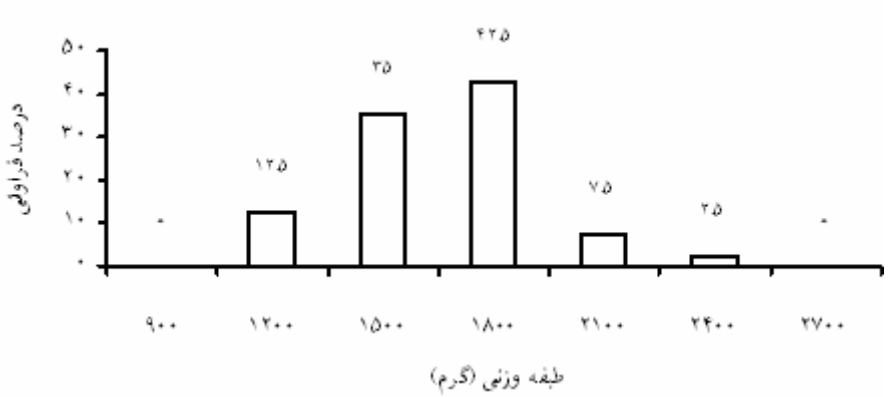
۲-۳- زیست سنجی مولدین کفال خاکستری



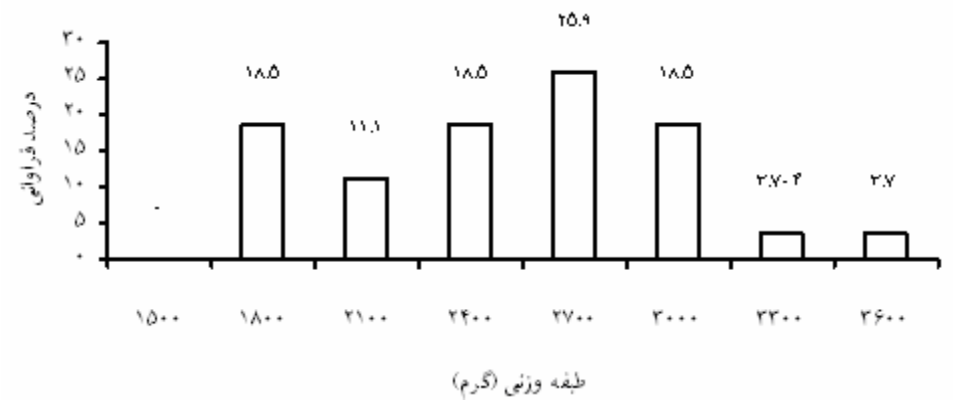
نمودار ۳-۳- توزیع درصد فراوانی طولی مولدین نر کفال خاکستری



نمودار ٤-۳- توزیع درصد فراوانی طولی مولدین ماده کفال خاکستری



نمودار ۵-۳ - توزیع درصد فراوانی وزنی مولدین نر کفال خاکستری



نمودار ٦-۳- توزیع درصد فراوانی وزنی مولدین ماده کفال خاکستری

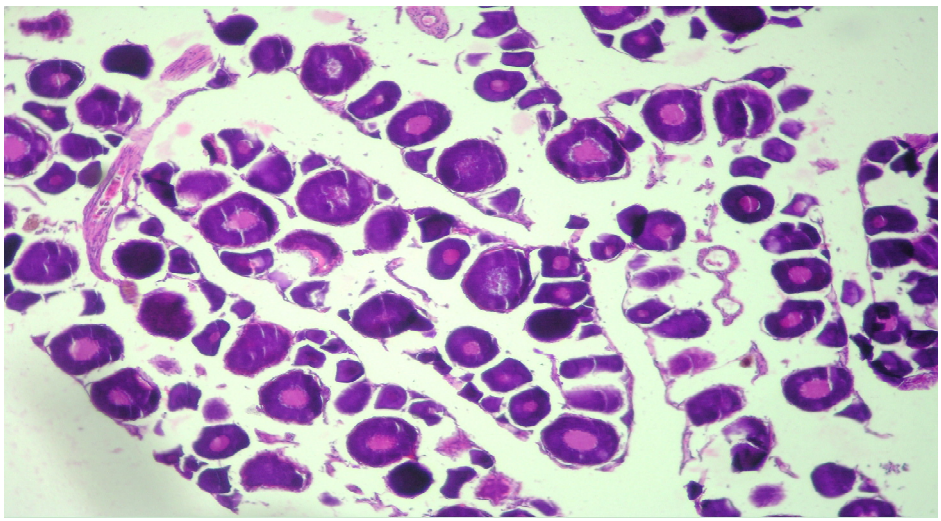
نمودار ۷-۳ - تغییرات قطر تخمک مولدین کفال خاکستری طی ماه های شهریور تا بهمن در منطقه گمیشان

۳-۳- بررسی بافت‌شناسی

بررسی بافت‌شناسی تخمدان کفال خاکستری در مراحل مختلف نمونه‌برداری حاکی از آن بود که پنج مرحله ذیل را می‌توان در زمان‌های مختلف مشاهده کرد.

۱ـ۳ـ۳ـ مرحله هستک‌های کروماتینی[۳۶] (مرحله I)

میانگین قطر اووگونی در این مرحله ۶/۳۷ ± ۲۰/۱۷ میکرون بود. از مشخصات این مرحله، وجود هسته بزرگ در قسمت مرکز اووگونی و همچنین مقدار کمی اووپلاسم بود. در این مرحله، هسته دارای چند هستک کوچک و رشته‌های کروماتینی مرتبط با هستک‌ها بود. سیتوپلاسم به شدت قلیادوست بوده و با هماتوکسیلین به رنگ آبی تیره درآمد.

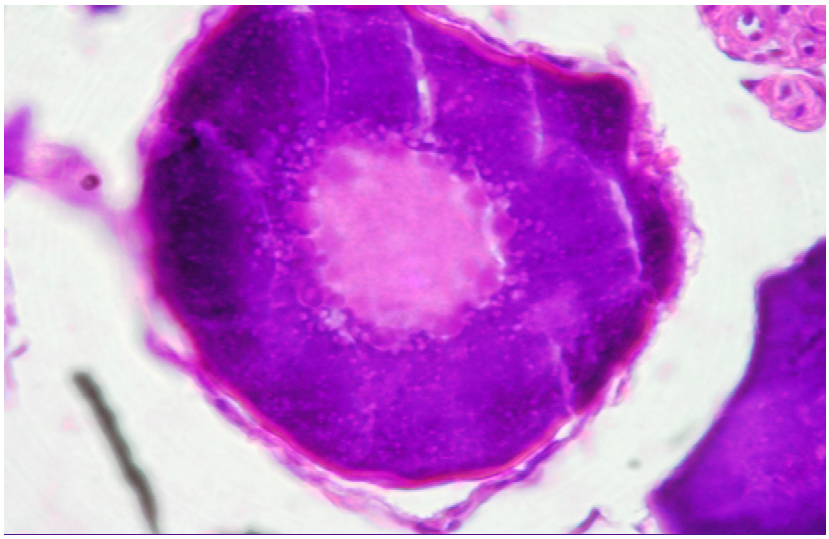


تصویر ۱-۳ - اووگونی ماهی کفال خاکستری مرحله I

۲ـ۳ـ۳ـ مرحله هستک‌های کناری[۳۷] (مرحله II)

میانگین قطر اووسیت‌ها در این مرحله، ۹/۱۴ ± ۸۷/۸۳ میکرون بود. اندازه‌ی هسته و تعداد هستک‌ها افزایش یافت. اووسیت‌ها در این مرحله به وسیله‌ی لایه نازکی از فولیکول احاطه گردید. از میزان قلیادوستی سیتوپلاسم به تدریج کاسته شد. ماده کروماتینی در مرکز هسته قرار گرفته و هستک‌ها در مجاورت غشای داخلی هسته قرار گرفتند.

[36] - Chromatin-nucleolus stage
[37] - Perinuleolus stage

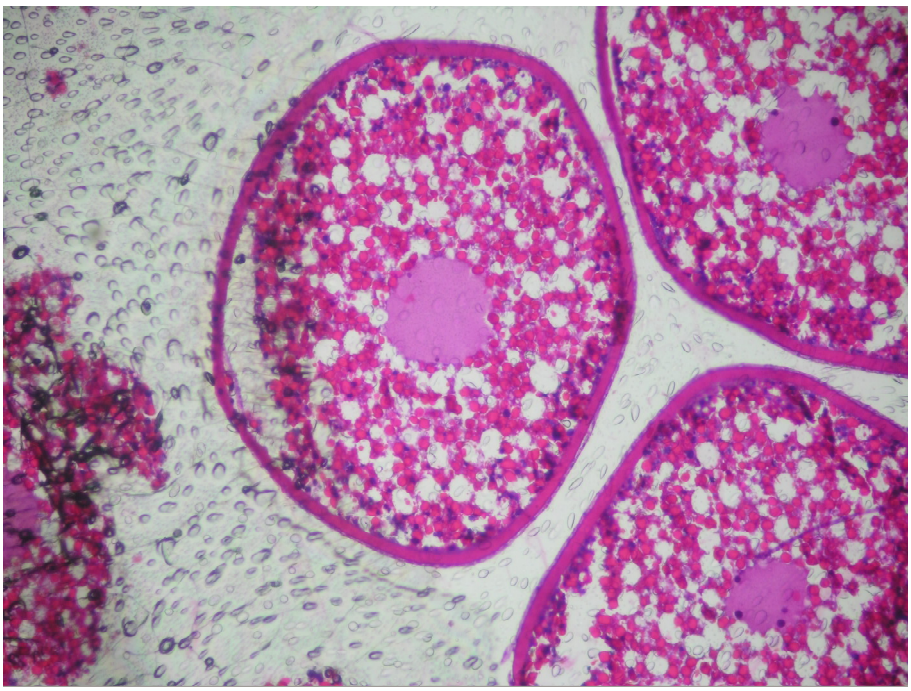


تصویر ۲-۳- اووسیت ماهی کفال خاکستری در مرحله II رسیدگی جنسی

۳ـ۳ـ۳ـ مرحله وزیکول‌های زرده[۳۸] (مرحله III)

میانگین قطر اووسیت‌ها در این مرحله، ۲۰۰ ـ۷۰ میکرون بود. مهم‌ترین اتفاقی که در این مرحله رخ داد، ظهور وزیکول‌های زرده در حاشیه اووسیت بود. تعدادی از هستک‌ها به سمت داخل اووپلاسم رانده شدند. تعداد هستک‌های موجود در مجاورت غشای هسته افزایش یافته و غشای هسته به صورت غیرمنظم درآمد. با پیشرفت این مرحله، تعداد وزیکول‌های زرده و اندازه‌ی آن‌ها افزایش یافت. همچنین در این مرحله، واکوئل‌های چربی به دور هسته نمایان شد. واکوئل‌های بزرگ از به هم پیوستن واکوئل‌های چربی کوچک پدید آمدند. خاصیت اسید دوستی اووپلاسم و همچنین ضخامت لایه فولیکولی افزایش یافت.

[38] - **Yolk vesicle stage**

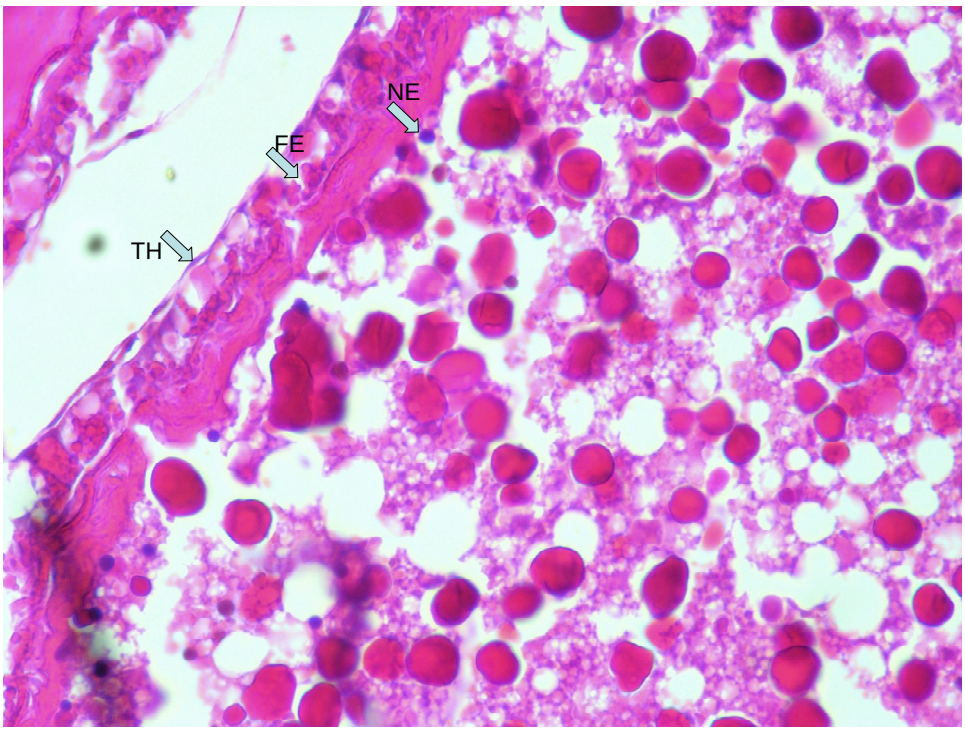


تصویر ۳-۳- اووسیت ماهی کفال خاکستری در مرحله III رسیدگی جنسی

٤ـ۳ـ۳ـ مرحله دانه‌های زرده[۳۹] (مرحله IV)

میانگین قطر تخمک ها در این مرحله، ۹/۱۶ ± ۴۸۹/۹۲ میکرون بود. به طور کل، قطر تخمک ها در این مرحله، ۶۵۰ ـ ۱۸۰ میکرون بود. لایه‌ی شعاعی مابین لایه‌ی فولیکولی و غشای اووسیت پدیدار شد. دانه‌های زرده در ابتدای این مرحله به تدریج نمایان شده و در انتهای این مرحله، کاملاً حجم اووپلاسم را پر نمودند. هسته در این مرحله توسط دانه‌های زرده و واکوئل‌های چربی احاطه شده و در نتیجه، شکل آن نامنظم شد. سیتوپلاسم کاملاً اسید دوست بوده و به ائوزین حساسیت زیاد داشت. افزایش دانه‌های زرده باعث رشد زیاد اووسیت‌ها گردید. دانه‌های زرده ابتدا در اطراف هسته و سپس در تمام نقاط سیتوپلاسم پراکنده شدند. اووسیت به وسیله‌ی لایه ضخیمی از فولیکول احاطه و لایه شعاعی کاملاً مشخص شد. لایه‌های فولیکولی و لایه شعاعی را نشان می‌دهد. همچنین شکل ۴-۳ تخمک کفال خاکستری را در اواسط و انتهای مرحله IV نشان می‌دهد.

[39] - **Yolk globule stage**



تصویر ٤-۳ - تخمک ماهی کفال خاکستری در مرحله IV رسیدگی جنسی

۵ـ۳ـ۳ـ مرحله بلوغ[40] (مرحله V)

این مرحله، مرحله نهایی تکامل تخمک می‌باشد. در این هنگام، تخمک به حداکثر اندازه خود (حدود ۹۳۰ میکرون) رسیدند. غشای پروتئینی دانه‌های زرده حل شده و بدین صورت دانه‌های زرده با یکدیگر ترکیب شدند. واکوئل‌های چربی نیز با یکدیگر متحد شده و در انتهای این مرحله تنها یک واکوئل در قسمت مرکزی نمایان بود. آبگیری تخمک در این مرحله صورت گرفت. در مرحله فوق، هسته کوچک شده و به سمت قطب حیوانی مهاجرت کرده و سپس غشای خود را از دست داد و در نهایت از بین رفت. اووسیت مرحله بلوغ را هنگامی که جوانه زاینده به سمت قطب حیوانی در حال مهاجرت است، نشان می‌دهد. همچنین اووسیت را در انتهای مرحله IV نشان می‌دهد. در این شکل، واکوئل‌های چربی با هم یکی شده‌اند و تنها یک واکوئل بزرگ دیده می‌شود.

[40] - **Mature stage**

جدول ۱-۳- سطوح شاخص های خونی در سرم کفال سفالوس ماده در ارتباط با مرحله رسیدگی جنسی

مرحله رسیدگی جنسی	I	III	IV
طبقه بندی	کورتیکول آلوئولار	مرحله پایان زرده سازی	رسیدگی نهایی
قطر اووسیت (میکرومتر)	۱۳۲	۵۶۶	۷۲۰/۲۵
شاخص گنادوسوماتیک	۰/۰۷	۰/۱	۰/۱۷
پروتیئن (گرم/دسی لیتر)	۶	۲/۸	۴
تستوسترون (نانوگرم/میلی لیتر)	۰/۰۱۱	۰/۰۷	۰/۳۷
استرادیول (نانوگرم/میلی لیتر)	۲/۶	۲/۲۶	۴/۲
پروژسترون (نانوگرم/میلی لیتر)	۰/۰۱	۰/۰۵	۰/۵۲
کلسیم (میلی گرم/دسی لیتر)	۱۲/۳	۱۰/۶	۱۱/۳۹
کلسترول (میلی گرم/دسی لیتر)	۷۴۳	۲۱۰/۶	۳۱۴/۲
تری گلسیرید (میلی گرم/دسی لیتر)	۵۲۲	۲۵۴	۳۰۱/۲۵

٤-۳- تغییرات میزان هورمون تستوسترون (T)در جنس نر ماهی کفال خاکستری

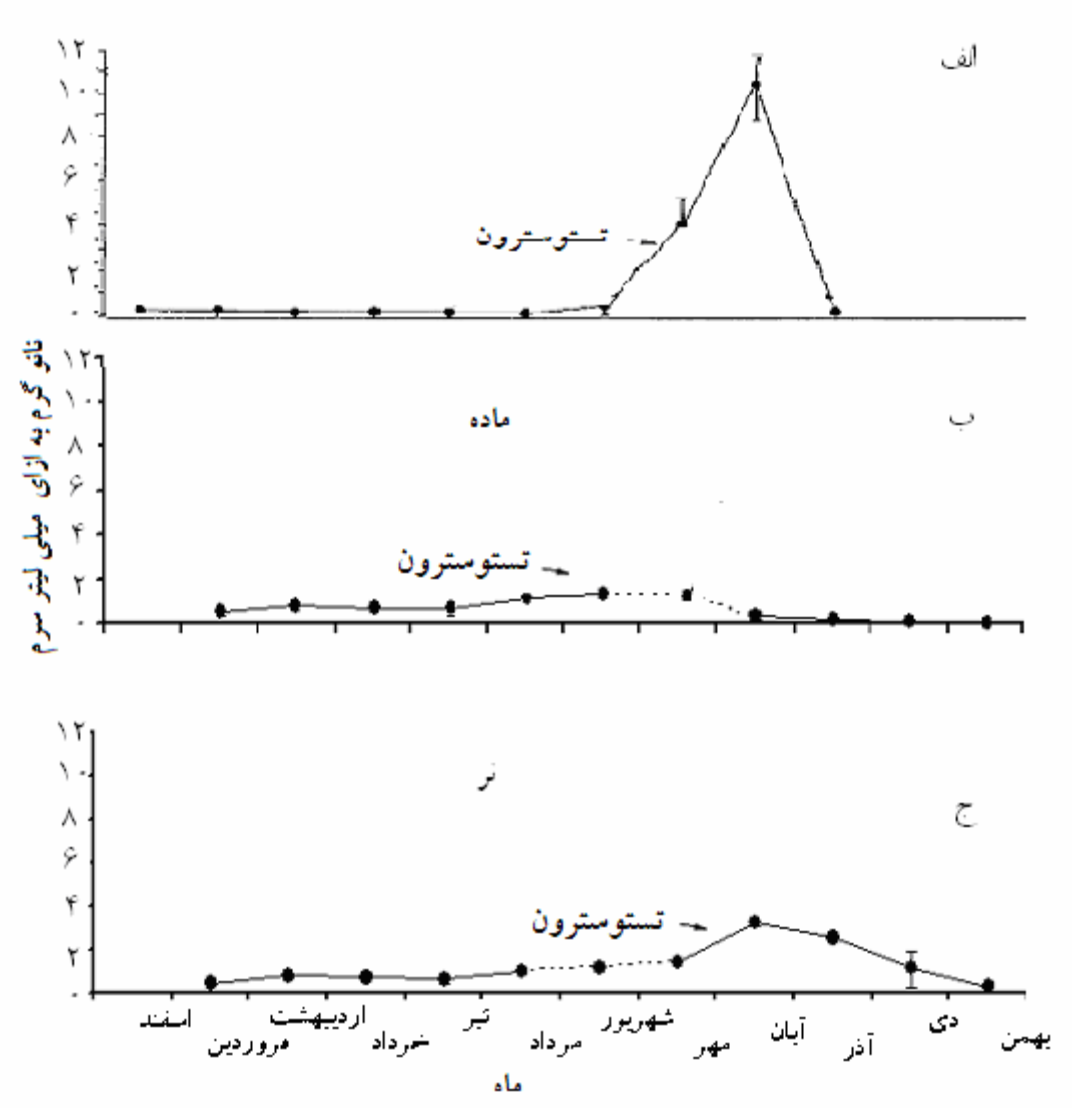
پژوهش حاصل نشان داد که میانگین سطوح تستوسترون پلاسمای خون جنس نر ماهی کفال خاکستری تقریباً ۱/۰۸نانوگرم در میلی لیتر است.

و در ماهی نر رسیده میزان این هورمون تا ۳/۲۵ نانوگرم در میلی لیتر نیز افزایش و شاخص گنادی نیز به ۰/۱۸۵ نیز افزایش یافت.

این نتایج با روند مشاهده شده در مطالعات پارت و همکاران (۱۹۹۹) مطابقت دارد. این محققین اظهار داشتند که هورمون تستوسترون نقش مهمی در روند تکاملی آغازین اندام بضیه ایفاء می نماید. میانگین مقدار GIS یا شاخص گنادی در جنس نر تا میزان ۰/۳۸۱ افزایش یافت ولی میزان تستوسترون نر بالغ به حداقل میزان خود ۰/۶ ± 0/8 نانوگرم در میلی لیتر تنزل یافت. این تغییرات شدید سطح تستوسترون که در طی مراحل بلوغ مشاهده گردید، ممکن است نشانگر کاهش فعالیت تولید مثلی و دفرمه شدن یا تغییر شکل مسیر اسپرم دهی باشد که این پدیده می تواند ناشی از نامناسب بودن شرایط محیطی مورد نیاز برای اسپرم دهی جنسی نر باشد.

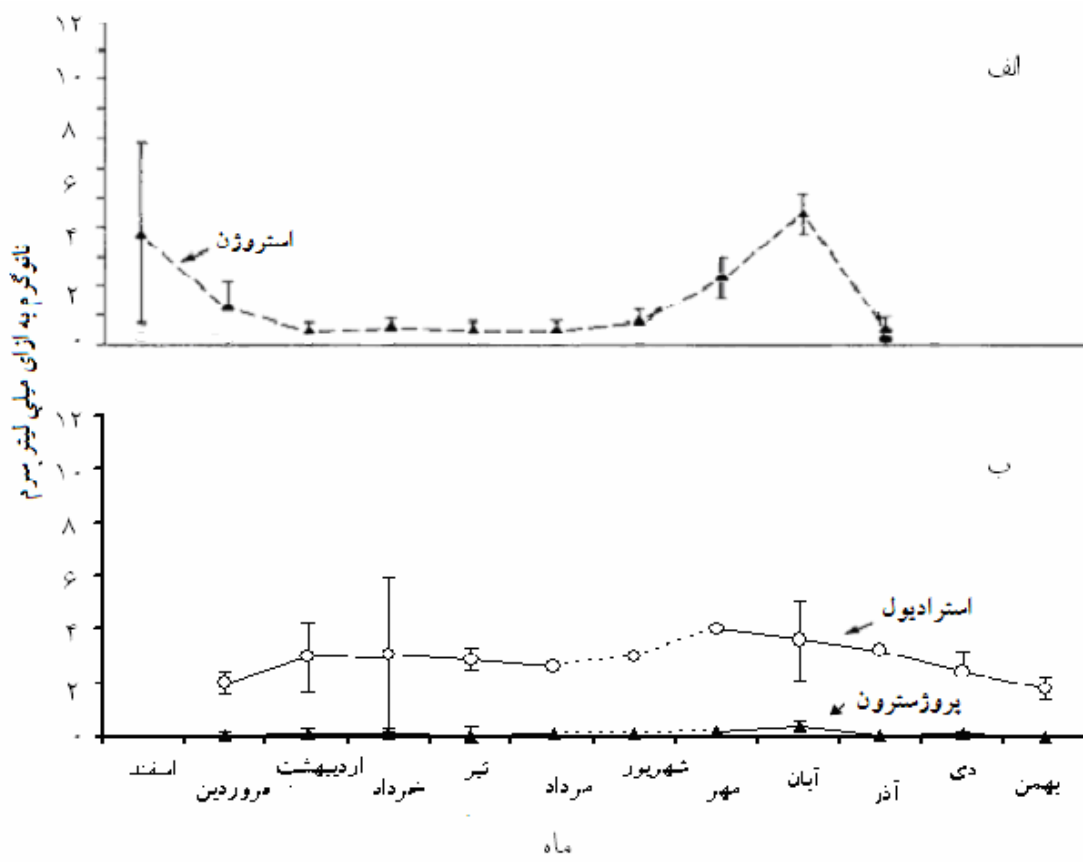
ثابت شده است که نقش هورمون های جنسی استروئیدی در کنترل چرخه رسیدگی جنسی ماهیان استخوانی بویژه در زمان تخمریزی و تکثیر تحت تأثیر تغییرات محیطی قرار می گیرد و این ادعا از مبنای تئوریک و عملی برخوردار می باشد.

اسکات و همکاران (۱۹۸۰) و فوستیر و همکاران (۱۹۸۶)، نتیجه گیری کردند که رشد و تکامل اندام بیضه در جنس نر تابع افزایش مقادیر T، 11 KT (یازده – کتوتستوسترون) است. امیری و همکاران (۱۹۹۶)، دریافتند که طی فرآیند اسپرماتوژنیزیس (مرحله III) مقادیر و سطوح گنادوتروپین و تستوسترون افزایش می یابد و امّا میزان تستوسترون به میزان زیادی در مرحله بلوغ افزایش یافته بود و میزان هورمون های گنادوتروپین بعلت مکانیزم عمل فیدبکی (بازخورد) به حداقل میزان خود تنزل یافته بود. احتمال دارد که هورمون تستوسترون از طریق مکانیزم فیدبکی در تنظیم ترشح و آزاد سازی هورمونهای گنادوتروپینی ایفای نقش نماید.



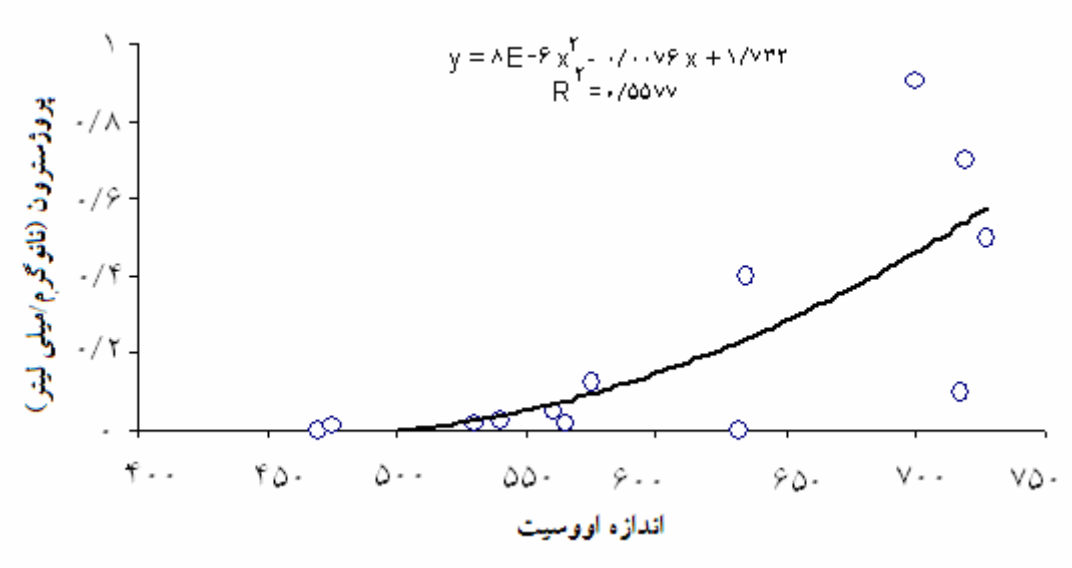
نمودار۸-۳- نوسانات سطوح هورمونهای استروئیدی در مولدین نر و ماده در ماههای مختلف سال

با توجه به نمودار ۸-۳ الف بنظر می رسد ماهی کفال در آبان ماه دارای بیشترین میزان تستوسترون بود، ولی در این تحقیق مشاهده گردید که تا آبان در میزان تستوسترون خون یک روند افزایشی مشاهده گردید، درحالیکه احتمالاً بخاطر بروز پدیده ی یخبندان در سال ۱۳۸۶، غلظت تستوسترون روند طبیعی صعودی خود را نپیمود. پس از آبان نیز همانند ماهیان مولد در شکل الف روند نزولی در مقادیر آن مشاهده گردید.



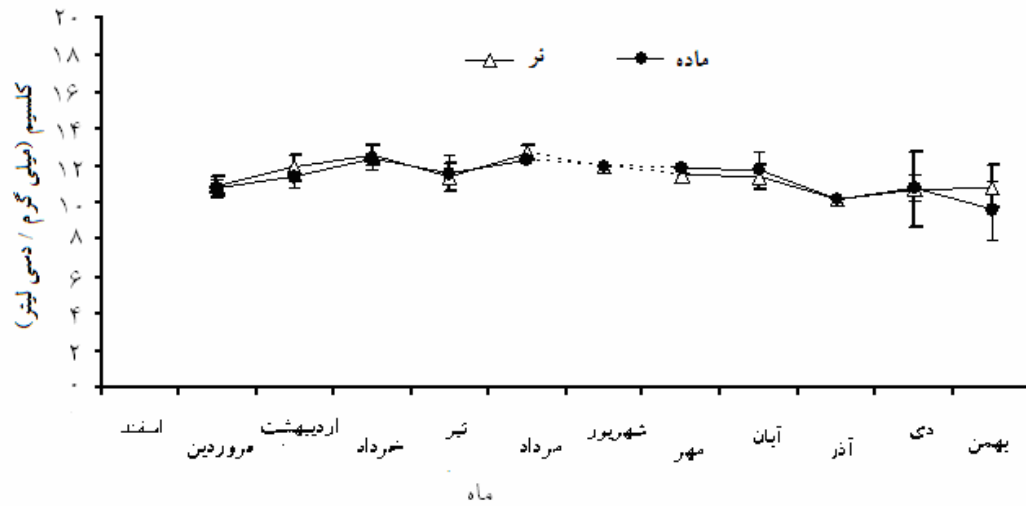
نمودار ۹-۳ - نوسانات سطوح هورمونهای استروئیدی در ماههای مختلف

با توجه نمودار۹-۳ الف مشاهده می شود که در آبان ماه در جنس ماده همانند جنس نر مقادیر استروژن در آبان ماه به بیشترین مقدار خود می رسد. در این تحقیق مقادیر استرادیول در مهر ماه و پروژسترون در آبان ماه در بالاترین میزان خود مشاهده گردید.



نمودار ۱۰-۳- ارتباط نوسانات سطوح هورمون پروژسترون متناسب با اندازه اووسیت

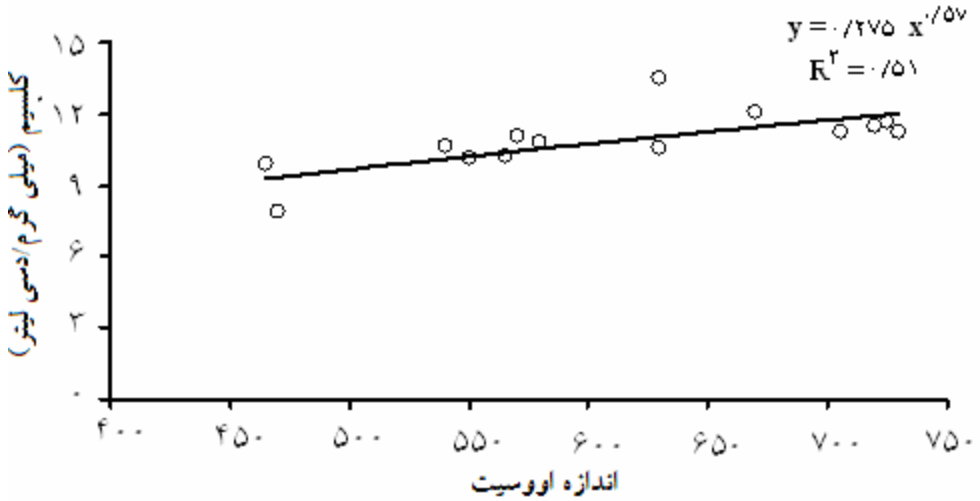
همانطور که انتظار می رود با افزایش قطر اووسیت، میزان هورمون پروژسترون نیز افزایش می یابد، ولی این افزایش از اندازه قطر حدود ۶۰۰ میکرون روند صعودی شدیدی داشت. بنظر می رسد که برای انجام تکثیر مصنوعی حداقل قطر ۶۰۰ تا ۶۵۰ میکرون مناسب باشد.



نمودار ۱۱-۳- نوسانات سطوح کلیسم در مولدین نر و ماده کفال خاکستری در ماههای مختلف سال

طی روند رسیدگی جنسی در طول سال مقادیر کلسیم تا آذر ماه نوسان چندانی نداشته و در ماه های دی و بهمن میانگین آن نسبت به دیگر ماهها تغییر چندانی نداشت، ولی نوسان آن در بین نمونه ها زیاد بود (نمودار ۱۱-۳).

با افزایش قطر تخمک مقادیر کلسیم خون افزایش داشت. می توان ادعا کرد که در جنس ماده با افزایش روند رسیدگی جنسی قطر تخمک افزایش و به همان نسبت میزان کلسیم نیز افزایش می یابد. لذا از روی میزان کلسیم می توان تا حدودی مرحله رسیدگی را تخمین زد.



نمودار ۱۲-۳ - ارتباط نوسانات کلسیم متناسب با رشد اووسیت

جدول ۲-۳ - سطوح استرادیول و تستوسترون در ارتباط با مدل قطر اووسیت

مدل رگرسیونی	ضریب همبستگی	ضریب تعیین	مدل
۱	۰/۷۴	۰/۸۷	قطر تخمک = ۵۳۰/۱+۴۷۹/۷[T]
۲	۰/۸۷	۰/۹۴	قطر تخمک = ۲۳۱/۳۱+۴۰۰/۲[T]+۲۹[Ca]
۳	۰/۹۲	۰/۹۷	قطر تخمک = ۲۳۸/۹+۳۰۲/۴[T]+۲۸/۱[Ca]+۹۰/۱ [Pro]

بر اساس مدل ۱ با داشتن غلظت تستوسترون می توان با ۸۷ درصد، در مدل ۲ با داشتن غلظت تستوسترون و کلسیم پلاسمای خون می توان با ۹۴ درصد، و با داشتن مقادیر غلظت تستوسترون، کلسیم و پروژسترون پلاسمای خون می توان با ۹۷ درصد (مدل ۳) قطر تخمک را محاسبه کرد.

هورمونهای استروئیدی گنادی موجب تحریک و تکامل گنادها می شود و لیپید نقش اساسی را در تأمین نیازهای انرژی طی دورهٔ بلوغ جنسی ایفاء می نماید. تغییرات فصلی در میزان لیپید و هورمونهای استروئیدی گنادی سرم خون ماهیان با تغییرات فصلی گنادی بستگی دارد

٤- بحث و نتیجه گیری

تغییرات فصلی در رشد گنادی، سطوح استروئیدها، تری گلیسرید و کلسترول سرم خون هر دو جنس *Capoeta capoeta umbula* و *Guldenstaedti*, 1772 ثابت نمود که ذخیرهٔ لیپیدی وابسته به چرخهٔ تولید مثلی است و محققین متعددی گزارش نمودند که ماهیان منابع غذائی را در اندام کبد و بافت بدن ذخیره می نمایند و سپس این منابع غذایی ذخیره شده به مصرف تولید مثلی و سایر فعالیتها می رسند.

الگوی فصلی همبستگی بین استروئیدهای سرم خون و بلوغ گنادها قبلاً توسط محققین فراوانی گزارش شده است. غلظت لیپید و کلسترول برای هر دو جنس در طول سال مشابه بوده است.

Mac Gregor,Dindo گزارش نمودند که غلظت لیپید تام سرم خون در جنس ماده بطور معنی داری بیش از جنس نر است و اما روند تغییرات فصلی آنها مشابه است. آنها همچنین اعلام نمودند که غلظت کلسترول برای هر دو جنس کفال مخطط در طول سال مشابه می باشد.

کلسترول بعنوان ماده پیش ساز[41] هورمونهای استروئیدی عمل می نماید. میزان تری گلیسیرید و کلسترول با آغاز فعالیتهای تولید مثلی کاهش می یابد. برآورده شده است که انرژی ذخیره شده به مصرف فعالیتهای تولید مثلی رسیده است.

سطوح پایین تری گلیسرید و کلسترول سرم خون ماهیان در ایام تخمریزی توسط Dino و Mac gregor (۱۹۸۱)، Cerda و همکاران (۱۹۹۵) و Smith (۱۹۸۲) تأیید شده است.

مطالعه کفال خاکستری و سایر ماهیان که در فصل پاییز تخمریزی می نمایند نشان داد که کوتاه شدن طول روز[42] محرک کلیدی در تکامل تولیدمثلی و مهاجرت این ماهیان است (de Valming 1974, Mc Quarrie *et al.* 1978, Whitehead *et al.* 1978).

یافته های این تحقیق نیز با نتایج فوق مطابقت دارد بطوری که با کوتاه شدن طول روز، قطر تخمک با شتاب بیشتری افزایش می یابد و همچنین مقادیر هورمونهای جنسی استروئیدی نظیر استرادیول و پروژسترون و میزان غلظت کلسیم پلاسمای خون نیز افزایش می یابد.

---

41 - Precursor
42 - Shortening day length

تغییرات فصلی استروژن پلاسمای خون قزل آلای قهوه ای با تکامل تخمدان ارتباط دارد و نیز نتایج حاصله از این مطالعه روند مشابهی برخوردار بود.

Kuo و همکاران (۱۹۷۴)، گزارش کرد که دوره کوتاه نوری (۶ ساعت روشنایی : ۱۸ ساعت تاریکی) موجب تحریک تکامل تخمدانی در ماهی کفال خاکستری نواری می شود در حالیکه تغییرات دمای آب نرخ نیز زرده سازی را تنظیم می نماید.

یافته های این تحقیق نیز منطبق بر نتایج فوق می باشد. آغاز تکوین صعودی گنادها با کاهش نور طبیعی (تنزل به کمتر از ۱۲ ساعت دوره روشنایی) و افت دمای آب همزمانی دارد بطوری که در این بررسی با کاهش دمای آب به کمتر از ۲۰ درجه سانتیگراد که مصادف با روزهای پایانی آبان ماه می باشد قطر تخمک به بالای ۵۰۰ میکرون ارتقاء یافته است و این پدیده در فاصله زمانی کوتاهی بوقوع پیوسته است و تأییدی بر ادعای فوق می باشد.

در جنس ماده ماهیان استخوانی، گردش فصلی استروژن سرم خونی با افزایش کلسیم و فسفوپروتئین همبستگی دارد (Plack *et al* 1971, Whitehead *et al* 1978)، در حالیکه در جنس نر چنین رابطه ای دیده نمی شود (Whitehead *et al*. 1978)

بنابراین، افزایش سریع استروژن سرم خون ماهی کفال خاکستری موجب رشد سریع فولیکول تخمدانی می شود که این وضعیت احتمالاً ناشی از کنترل تحریک گنادی توسط دوره نوری طبیعی باشد.

تغییرات فصلی کلسترول و تری گلیسیرید نشانگر ذخیره سازی سریع در طی تابستان و مصرف آن در طی مهاجرت پاییزه است. Broad head (1956) و Anderson (1957) خاطرنشان کردند که کفال ماهیان قبل از مهاجرت تغذیه شدیدی دارند. مقادیر اندازه گیری شده کلسترول و تری گلیسیرید پلاسمای خون ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) مؤید این حقیقت است.

ماهی کفال خاکستری راه راه همانند ماهی آزاد در طی مدت مهاجرت تولیدمثلی تغذیه نمی کند (De silva and perera 1978). بنابراین نیازمند تجمیع حجم زیادی چربی قبل از تخمریزی و مهاجرت است (Hoar 1960, Wood head 1975).

Perera (1978) و De silva ثابت کردند که ماهی کفال خاکستری راه راه قادر به ذخیره سازی کربوهیدراتها بعنوان تامین انرژی نمی باشند. لذا در تعیین جیره و تامین نیازهای غذایی ماهی کفال خاکستری با اهداف پرورش مولد

در شرایط کنترل شده به این نکته باید توجه کافی داشت که اطلاعات حاصله در این تحقیق از این فرضیه که کوتاه شدن دوره نوری در پاییز منتج به تولید استروئیدهای گنادی و به همین ترتیب استروژن ها در جنس ماده موجب مصرف لیپید برای تکوین و رشد گنادی می گردد حمایت می نماید.

در مطالعاتی که Jeffry و همکاران در سال ۱۹۹۵ تحت عنوان تکامل تولیدمثل ماهی کفال خاکستری راه راه در آبهای مصبی Louisiana انجام دادند دریافتند که بلوغ اووسیت اولیه از ماه سپتامبر (شهریور) هر سال آغاز و به ماه اکتبر ادامه می یابد، این یافته با روند مشاهده شده در رشد اووسیت مولدین ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) هماهنگی دارد.

کنترل اندوکرینی در فقدان فاکتورهای مناسب محیطی که لازمه تحریک تولیدمثلی می باشد، نمی تواند ادامه یابد. تغییرات عوامل محیطی می تواند درصد سالیانه بلوغ که مربوط به نرخ جنسیت و ساختار سنتی جمعیت تخمریزی کننده ماهی قزل آلا است را تحت تأثیر قرار دهند(Tilzey, 1999).

Cleary و همکاران (۲۰۰۰)، گزارش دادند که هرگونه استرس محیطی می تواند سیستم اندوکرینی ماهیان استخوانی را تحت تأثیر قرار دهند و یکی از این اثرات روی پاسخ گنادی مربوط به افزایش کورتیزول پلاسمای خون است که منجر به کاهش سطوح هورمونهای استروئیدی گنادی می شود.

بنابراین می توان تغییرات مشاهده شده در سطوح هورمونهای استروئیدی در هر دو جنس نر و ماده ماهی کفال خاکستری را به تنزل شدید دما آب و هوا و بروز یخبندان در استخرهای خاکی محل نگهداری ماهیان بعنوان یک عامل محیطی قلمداد نمود.

منابع

۱. اسکندری، غ.، امیری‌نیا، س.، سواری، ا. و یاوری، و. ۱۳۷۸. تعیین زمان بلوغ و فصل تخم‌ریزی ماهی شوریده *(Otolithes rubber)* در آب‌های ساحلی استان خوزستان، مجله علمی شیلات ایران، شماره اول، سال هشتم.

۲. شعبانی‌پور، ن. ۱۳۷۴. بررسی شکل و بافت‌شناسی تخمدان در ماهی کفال دریای خزر *(Liza auratus)*، مجله علمی شیلات ایران، شماره ۲، سال چهارم.

۳. عریان، ش. ۱۳۸۰. فیزیولوژی پیشرفته آبزیان، جزوه دکترای دوره عالی تحقیقات و تحصیلات تکمیلی دانشگاه آزاد اسلامی تهران، ۹۰ ص.

۴. قلیچی، ا. ۱۳۷۹. بیولوژی و روش‌های تکثیر ماهی کفال خاکستری *(Mugil cephalus L.)*، سمینار دکترای دوره عالی تحقیقات و تحصیلات تکمیلی دانشگاه آزاد اسلامی تهران، ۶۸. ص.

5. Anderson, W.W. 1957. Early development, growth, and occurrence of the striped mullet *Mugil cephalus* along the south Atlantic coast of the United States. United States Fish and Wildlife Service Fishery Bulletin 58: 501-519.
6. Balubid, S.O.2003. Histological aspects of oocyte development in *Oreochromis spilurus* (Gunther) reared in Jeddah Fish farms, Saudi Arabia. Bull. Net. Of Oceanogn and Fish, A.R.E, vol. 29: 137-152.
7. Broadhead, G.C. 1956. Growth of the black mullet *Mugil cephalus* in west and northwest Florida. Florida Board of Conservation Marine Laboratory Technical Series 25: 1-20.
8. Burzawa-Gerard, E. 1982. Chemical data on pituitary gonadotropin and their implication to evolution. Can. J. Fish Aquaculture. Sci. 39: 80-89.
9. Cardona, L.„ Torras, X., Gisbert, E. and Castell, F. 1996. The effect of striped grey mullet (*Mugil cephalus*) on freshwater ecosystem. Israeli. G. Aquaculture. Bamidgeh. 48: 179-185.
10. Cerda. J., Zanuy. S., Carrillo. M., Ramos. J., Serrano, R. 1995. Short and long term dietary effects on female sea bass (*Dicentrarchus labrax*): seasonal change in plasma profiles of lipids and sex steroids in relation to reproduction. Comp. Biochem. Physiol. 111: 83-91.
11. Chang, C-E., Lan, C-E. and Chou, H-Y. 1995. Gonadal histology and plasma sex steroids during sex differentiation in grey mullet (*Mugil cephalus*). J. Exp. ZOOL. 395-406.
12. Cleary, J.J., Pankhurst, N.W. and Battaglene, S.C. 2000. The effect of capture and handling stress on plasma steroid levels and gonadal condition in wild and farmed snapper, *Pagrus auratus* (Sparidae). Journal of the World Aquaculture Society. In press.
13. De-Vlaming, V. L., Wiley, H-S., Delehunty, G. and Wallece, R. A. 1980. Gold fish vitellogenin: Induction, isolation, properties and relationship to yolk proteins. J. Comp. Bioch. Physiol. 673: 613-623.
14. DE Vlaming, V.L. 1974. Environmental and endocrine control of teleost reproduction. Pages 13-83 in C.B. Schreck, editor. Control of sex in fish. Virginia Polytechnic Instiute Sea Grant, 74-101, Blacksburg, Virginia, USA.
15. Dindo, J.J. and MacGregor. R. 1981. Annual cycle of serum gonadal steroids and serum lipids in striped mullet. Trans. Am. Fish. Soc. 110: 403-409.
16. Eckstein, B. and Eylath, U. 1980. The occurrence and biosynthesis in vitro of 11-ketotestosterone in ovarian tissue of the mullet (*Mugil capito*) derived from two biotops. J. Gen. Comp. Endocrinol. 14: 396-408.
17. Evans, D. H. 1998. The Physiology of fishes. CRC Press. 518p.

18. Fenwick, J. C. 1970. Demonstration and effect of melatonin in fish. J. Gen. Comp. Endocrinol. 14: 56-92.
19. Fostier, A. and Jalabert, B. 1986. Seroidogenesis in rainbow trout at various preovulatory stage, changes in plasma hormone levels and *in vivo* and *in vitro* responses of the ovary to gonadotropin. J. Fish Physiol. Biohem. 2: 87-92.
20. Haddy, J. A. and Pankhurst, N. W. 2000. The efficacy of exogenous hormones in stimulating changes in plasma steroids and ovulation in wild black bream (*Acanthopagrus butcheri*) is improved by treatment at capture. Aquaculture. 191: 51-366.
21. Harrel, R. M. 1997. Striped bass and other morone culture.
22. Hoar, W.S. 1960. Endocrine factors in the ecological adaptation of fish. In A. Gorbman, editor. Comparative endocrinology. John Wiley and Sons, New York, New York, USA. PP: 1-23
23. Jeffrey Render, H., .Bruce Thompson, A. and Robert Allen, L. 1995. Reproductive development of striped mullet in the Louisiana estuarine waters with notes on the applicability of reproductive assessment methods for isochronal species. Transactions of the American Fisheries Society 1995; 124: 26-36
24. Kagawa, H., Young, G. and Naghama, Y. 1983b. Relationship between seasonal plasma esteradiol-17β and testosterone levels and in vitro production by ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). J.Biol.Reprod. 29: 301-309.
25. Kagawa, H., Young, G., Adachi, S. and Naghama, Y. 1982. Estradiol-17B production in amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) ovarian follicle; role of the theca and granulose cells. J. Gen. Comp. Endocrinol. 47: 440-448.
26. Kah, O., Anglade, I., Leprete, E., Dubouty, P. and Monbrison, D, de. 1993. The reproductive brain in fish. J. Fish physiol. Biochem. 11: 85-98.
27. Kawauchi, H., Suzuki, K., Itoh, H., Swansom, P. 1989. The duality of teleost gonadotropin. J. Fish physiol. Biochem. 7: 29-38.
28. Kuo, C-M. 1995. Manipulation of ovarian development and spawning in grey mullet (*Mugil cephalus*). Journal of Aquaculture. Bamidgeh. 47: 43-58.
29. Kuo, C.M., Nash C.E. and Shehadeh, Z. H. 1974. The effects of temperature and photoperiod on ovarian development in captive grey mullet *Mugil cephalus* L. Aquaculture 3: 25-43.
30. Kuo, C. M. and Nash, C. E. 1975. Recent progress on the control of ovarian development and induced spawning of the grey mullet (*Mugil cephalus L.*). Aquaculture. 5: 19-29.
31. Lee, W, K. and Yang, S. W. 2002. Relationship between ovarian development and serum levels of gonadal steroid hormones and induction of oocyte maturation and Aquaculture. 207: 169-183.
32. Macquarrie, D. W., Markert, J. R. and Vanstone. W.E. 1978. Photoperiod induced off season spawning of coho salmo *Oncorhynchus kisutch*. Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique 18: 1051-1058.
33. B. Mojazi Amiri, M., Maebayashi, S. and Adachi1 Yamauchi, K.1996. Testicular development and serum sex steroid profiles during the annual sexual cycle of the male sturgeon hybrid the bester. Journal of Fish Biology, 48: 1039–1050.
34. Monbrison, D., Tzchori, I., Holland, M. C., Zohar, Y., Yaron, Z. and Elizur, A. 1997. Acceleration of gonadal development and spawning induced in the Mediterranean grey mullet (*Mugil cephalus L.*)*:* Preliminary studies Israeli J. Aquaculture. Bamidgih. 49: 214-221.
35. Mylonas, C. C., Magnus, Y., Klebanov, Y., Gissis, A. and Zohar, Y. 1997. Reproductive biology and endocrine regulation of final oocyte maturation of captive white bass. J. Fish. Biol. 51: 234-250.
36. Mylonas, C. C. and Zohar, Y. 2001. Endocrine regulation and artificial induction of oocyte maturation and spermiation in basses of the genus morone Aquaculture. 202: 205-220.
37. Oven, O. H. 1981. Aquaculture of grey mullets. Cambridge University Press. London. 507p.
38. Part, F., Zanuy, S. and Carrillo, M. 2001. Effect of gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRHa) and pimozide on plasma levels of sex steroids and ovarian development in sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). Aquaculture. 198: 325-338.
39. Part, F., Carrillo, M., Zanuy, S. and Bromage, N, R. 1999. Effects of constant short and long photoperiod regimes on the spawning performance and sex steroid levels of female and male sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). J. Fish Biol. 4:125-137.
40. Parino, R. and Thomas, P. 1990. Gonadotropin stimulates 17 α , 20 β , 21-trihydroxy-4-pregnen-3-one production from endogenous substrates in Atlantic croaker ovarian follicles undergoing final maturation in vitro. J. Gen. Comp. Endocrinol. 78: 474-478.

41. Perera, P. A. B. and S. S. De Silva. 1978. Studies on the chemical biology of the young grey mullet, *Mugil cephalus* L. Journal of Fish Biology 13: 297-304.
42. Pierce, J. G., Parsons, T. F. 1981. Glycoprotein hormones: Structure and function. J. Annual Rev. Biochem. 50: 465-495.
43. Plack, P.A. Prichard, A. J. and Fraser, N. W. 1971. Egg proteins in cod serum: natural occurrence and induction by injections of oestradiol-3 benzoate. Journal of Biochemistry 121: 847-852.
44. Scott, A. P., Bye, V. S. and Baynes, S. M. 1980. Seasonal variations in sex steroids of female rainbow trout. J. Fish Biol. 17: 587-592.
45. Scott, A. P., Sumpter, J. P., Hardiman, P. A. 1983. Hormone changes during ovulation in the rainbow trout. J. Gen. Comp. Endoctinol. 49: 128-134.
46. Shehadeh, Z. H., Kuo, C. M. and Milisen, K. K, 1973a. Induced spawning of the grey mullet (*Mugil cephalus L.*) with fractionated salmon pituitary extract. J. Fish Biol. 5: 471-478.
47. Sherwood, N, M., Harvey; Browstein, M. J. and Eilden, L. E. 1984. Gonadotropin-releasing hormone srtiped-mullet (*Mugil cephalus L.*), milk fish (*Chanos chanos*) and rainbow trout comparison with salmon GnRH. J. Gen. Comp. Endocrinol. 55: 174-182.
48. Shilo, M. and Shemul, S. 1989. Fish culture in warm water systems. CRC press. 259p.
49. Smith. L.S. 1982. Introduction to Fish Physiology. T.F.H. Publication. The British Crown Colony of Hong kong.: p.352.
50. Tabata, M., Tamaru, T. and Niwa, H. 1975. Origin of the slow potential in the pineal organ of the rainbow trout. J. Vision Res. 15: 737-742.
51. Tamaru, C. S., Kelley, C. D., Lee, C. S., Aida, K., Hanyu, I. and Goets, F. 1991. Steroid profiles during maturation and spawning of the striped mullet (*Mugil cephalus L.*) Aquaculture. 95: 149-168.
52. Tilzey, R.D.J. 1999. Environmental cues in the reproductive migrations of brown trout (*Salmo trutta*) in Lake Eucumbene, New South Wales. In HANCOCK, DA., SMITH, DC. and KOEHN, JD. (Eds.). Fish Movement and Migration. Bendigo: Fisheries Research & Development Corporation, p. 112-122.
53. Wagner, E., Aradt, R. and Hilton, B. 2002. Physiolegical stress responses egg survival and sperm motility rainbow trout broodstock anestherized with clove oil, tricaine methanesulfonate of carbon dioxide. Aquaculture. 211: 353-366.
54. Wallace, R. A. and Selman, K. 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. J. American Zoologist.
55. Whitehead Bromage, C. N. R. and Forster, J. R. M. 1978. Seasonal changes in reproductive function of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Journal of fish Biology 12: 601-608.
56. Whitehead. Bromage, C., N. R. Forster J. R. M., and A. J. Matty. 1978. The effects of alterations in photoperiod on ovarian development and spawning time in the rainbow trout *Salmo gairdneri*. Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique 18: 1035-1043.
57. Yan, L., Swanson, P., Eickhoff, W. W. 1992. A two - receptor model for salmon gonadotrpins. J. Biol. Rep. 47: 418-427.
58. Young, G., Kagawa, H. and Naghama, Y. 1983. Evidence for a decrease in aromatase activity in the ovarian granulose cells of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) associated with final oocye maturation. J. Biol. Rep. 29: 310-318.
59. Young, G., Kagawa, H., and Naghama, Y. 1984. Role of the theca and granulose cells in the production of maturation - inducing steroid (MIS) by ovarian follicles of salmonid fishes. J. Gen. Comp. Endocrinol. 53: 455-465.
60. Yu, K. L., Nahorniak, C. S., Peter, R. E. Corrigan, A., Rivier, J. E. and Vale, W. W. 1987. Brain distribution of radioimmunoassay able gonadotropin - releasing hormone in female gold fish: seasonal variation and preovulatory changes. J. Gen. Comp. Endocrinol. 67: 234-242.
61. Zaki, M. I., El-Gharabawy, M. M. and Kamil, S. A. 1995. Seasonal changes in the gonadotropic and sex steroid hormones in the blood serum of the grey mullet (*Mugil cephalus L.*). J. Ichthyology. 35: 7pp.
62. Zohar, Y.1989. Fish reproduction: its physiology and artificial manipulation. Pp 65-119. In: M. Shilo & s. Sarig (eds) Fishculture in Warm Water System: Problems and Trends. CRS Press, Florida.

Abstract
Grey mullet, *Mugil cephalus* is one of the most famous and valuable fish on the fisheries and aquaculture industry. This species is the most suitable to introducing the southern, northern and central regions of our country due to high resistant to large variation of water salinity and temperature. On the monthly sampling period biometric data including total length and total weight recorded and length and weight classes for every sex were determined. To understanding of physiological functions and sexual development of reproductive organs, this investigation carried out with Grey mullet imported from Hong Kong by 1993. Findings of this research can be used for management of artificial breeding of this species. Daily variation of pond water temperature was recorded. Sex steroid hormones and other plasma metabolites such as Ca^{2+}, cholesterol, triglycerides and total proteins were measured by blood sampling. Gonad samples were prepared in order to histological studies. Oocyte growth was studied by measurement of egg diameters. Measured values of cholesterol, triglycerides of blood plasma revealed that these metabolites have seasonal variation and severely deposited on the summer and mobilized on the spawning seasons. Findings of this research suggested that egg diameters, values of sex steroid hormones (estradiol and progesterone) and Calcium concentrations of fish blood plasma shortening increased a long with day length shortening.
Key words: *Mugil cephalus*, sex steroid hormones, plasma metabolites

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION – Inland Waters Aquatics Stocks Research Center

---

Title : The study of annual cycle of gonads develompents and sexsteroids of gray mullet, *Mugil cephalus* in Golestan province
Apprpved Number: 2-12-77-86080
Author: Saeed Yelghi
Executor *:* Saeed Yelghi
Collaborator(s)*:*H.A.Rostamikhoshbavar,M.Jorjani,A.M.Hajimoradloo,A.Gh.Shafei,A.Mokarami.M.Mazloomi,Y.Eri,N.Hesam
Advisor(s): H.Hosseinzadeh,Sh.Oryan
Supervisor: -
Location of execution : Gorgan province
Date of Beginning : 2008
Period of execution : *2 Years & 6 Months*
Publisher : ***Iranian Fisheries Research Organization***
Circulation : ***20***
Date of publishing : ***2012***
All Right Reserved . No PSart of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference.

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE

AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION

IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION- Inland Waters Aquatics Stocks Research Center

Title:

The study of annual cycle of gonads develompents and sex steroids of gray mullet, *Mugil cephalus* in Golestan province

Executor :

Saeed Yelghi

Registration Number

39671