

مقاله پژوهشی

اثر عصاره غده هیپوفیز بر هورمون‌های استروئیدی، عملکرد تولیدمثلی،
بافت‌شناسی و بیان ژن‌های Cyp19a1، ZP2 و SF-1 تخمدان ماهی مولد روهو
(*Labeo rohita*)

احسان اسلامی‌زاده^۱، حدیده معبودی^{۲*}، لاله رومیانی^۳، مهران جواهری بابلی^۴، مژده چله‌مال دزفول‌نژاد^۴

DOI: 10.22124/japb.2024.27317.1537

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۳

چکیده

مطالعه سازوکارهای فعالیت تولیدمثلی در ماهیان که باعث تنظیم دوره‌های جنسی می‌شود، دارای اهمیت است و به طور فزاینده‌ای به سمت فناوری‌های کمک باروری معطوف می‌شود. در این مطالعه ۹۰ قطعه مولد ماده روهو (*Labeo rohita*) با وزن متوسط 31 ± 3 کیلوگرم مورد استفاده قرار گرفت و تاثیر دو غلظت عصاره غده هیپوفیز بر عملکرد تخم‌ریزی، میزان استروئیدهای جنسی، بیان ژن‌های مربوط به استروئیدزایی و بافت‌شناسی تخمدان ماهی بررسی شد. این مطالعه نشان داد که بیشترین موفقیت تخم‌ریزی با غلظت عصاره ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم مشاهده شد، دوره نهفتگی ماده با افزایش غلظت کاهش یافت و باروری این تیمار به طور قابل توجهی بالاتر از گروه‌های دیگر بود. تیمار با عصاره غده هیپوفیز در هر دو غلظت به کار رفته باعث افزایش معنی‌دار شاخص گنادوسوماتیک، درصد لقاح، تخم‌گذاری و بازماندگی لارو نسبت به گروه‌های شاهد و شم شد ($P < 0.05$). در ۱۲ ساعت پس از تزریق، تیمارهای عصاره هیپوفیز افزایش معنی‌داری را در سطوح هورمون‌های استروئیدی و بیان ژن‌های بررسی شده در بافت تخمدان در مقایسه با تیمارهای شاهد و شم نشان دادند. بررسی‌های میکروسکوپی فولیکول‌های بافت تخمدان ضمن وجود تخمدان ناهمزمان در این گونه ماهی، یک تغییر استروئیدوژن را نشان داد که در آن بلوغ تخمک با تزریق عصاره هیپوفیز، بویژه غلظت ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم، تسریع شد. یافته‌ها نشان دادند که فقط مولدینی که با عصاره هیپوفیز تحت تیمار قرار گرفته بودند، تخمک‌گذاری کردند و عصاره هیپوفیز دارای اثرات مثبت هم‌افزایی بر بافت تخمدان و برخی عوامل هورمونی است و باعث افزایش باروری و بازماندگی لارو ماهی روهو می‌شود.

واژگان کلیدی: استروئید، بافت‌شناسی، بیان ژن، تخم‌ریزی، روهو.

۱- دکتری تکتیر و پرورش آبزیان، گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران.

۲- استادیار گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران.

۳- دانشیار گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران.

۴- دانشیار مرکز تحقیقات تکتیر و پرورش آبزیان، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران.

* نویسنده مسئول: mikhak1311@yahoo.com

مقدمه

ماهی در سطح جهانی به عنوان یک منبع اقتصادی مهم و یک منبع پروتئین قابل توجه در بسیاری از کشورها شناخته شده است و معمولاً به عنوان یک غذای اصلی مصرف می‌شود (Elakkanai et al., 2015). برای افزایش بهره‌وری ماهیان آب شیرین، بهینه‌سازی فرایند تولیدمثل ماهیان مولد ضروری است. تولیدمثل ماهی تحت تاثیر عوامل محیطی و داخلی مانند دوره نوری، دما و هورمون‌ها است (Muchlisin, 2014). تجویز هورمون‌های محرک تولیدمثل در صنعت شیلات دو هدف اصلی همزمان‌سازی تخم‌ریزی به دلیل محدودیت‌های زمانی و مکانی و تسریع روند گامت‌زایی را دنبال می‌کند (Kho et al., 2023). القای تخمک‌گذاری در ماهی‌های تجاری اغلب از طریق تجویز مشابه هورمون آزاد کننده گنادوتروپین (GnRH-a) انجام می‌شود که ترشح گنادوتروپین از غده هیپوفیز را تحریک می‌کند و در نتیجه بر نارسایی غدد درون‌ریز در مولدین غلبه می‌کند (Soyano et al., 2022). عصاره غده هیپوفیز در القای تخم‌ریزی مولدین نر و ماده موثر بوده و با وجود کاربرد انواع هورمون‌ها هنوز هم در بسیاری از گونه‌های مختلف ماهی تنها گزینه مورد استفاده است

(Mohammadian et al., 2014). مطالعات انجام شده در دو دهه گذشته به طور گسترده نقش عصاره غده هیپوفیز را در محور فیزیولوژیکی هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد (HPG) ثبت کرده است (Eales, 2006) و نشان دهنده اثرات تحریکی آن بر هورمون‌های استروئیدی، بافت مغز، کبد و تخمدان، گامت‌ها و لارو ماهی به طور گسترده است (Mylonas et al., 2010). مطالعات صورت گرفته عمدتاً شامل اطلاعاتی در مورد انواع و غلظت‌های خاص هورمون‌های مورد استفاده است (Kucharczyk et al., 2021) هورمون‌هایی مانند GnRH، LHRHa، اوپریم، HCG و غیره با غلظت‌های در سطح نانوگرم تا میلی‌گرم در هر کیلوگرم وزن بدن (Ahmadnezhad et al., 2013) که بسته به گونه مورد استفاده متفاوت است (Mohammadian et al., 2014). آروماتاز که سازنده استروژن نیز نامیده می‌شود، آنزیمی است که مسئول یک مرحله کلیدی در تولید استروژن است. این آنزیم Cyp19a1، عضوی از ابرخانواده سیتوکروم P450 است که آنزیم‌هایی هستند که بسیاری از واکنش‌های دخیل در استروئیدزایی را تسریع می‌کنند (Rasheeda et al., 2010). به طور

خاص، آروماتاز مسئول حلقوی شدن ساختار شیمیایی آندروژن‌ها به استروژن‌ها است. آنزیم آروماتاز در بسیاری از بافت‌ها از جمله غدد جنسی (سلول‌های Granulosa)، بافت چربی، جفت جنین، عروق خونی، پوست و استخوان یافت می‌شود (Uno et al., 2012). این آنزیم عامل مهمی در رشد غدد جنسی است. آروماتاز در شبکه آندوپلاسمی بافت قرار دارد و آخرین مراحل ساخت استروژن از آندروژن‌ها را کاتالیز می‌کند (به طور خاص، آندروستندیون را به استرون و تستوسترون را به استرادیول تبدیل می‌کند). آروماتاز در غدد جنسی، جفت، مغز، بافت چربی، استخوان و بافت‌های دیگر فعالیت دارد (Tang et al., 2010). در پاسخ به تحریک گنادوتروپین، فاکتور استروئیدزایی ۱ (SF-1)، به عنوان یک کلید اصلی برای شروع رونویسی ژن‌های استروئیدزا، از جمله Cyp19a1، در سلول‌های گرانولوزای تخمدان پستانداران و ماهی‌ها عمل می‌کند. نشان داده شده است که SF-1 شروع رونویسی ژن‌های Cyp19a1 را در تخمدان‌های ماهی تنظیم می‌کند (Tang et al., 2010) و این نشان دهنده یک سازوکار مشارکتی برای تنظیم تولید استرادیول تخمدان (E2) توسط SF-1، Cyp19a1 و فعالیت آروماتاز در تخمدان ماهی بالغ است (Moulik et al., 2016). همان طور که فولیکول تخمدان رشد می‌کند، تخم ماهی توسط یک ماتریکس خارج سلولی متشکل از ۲-۴ گلیکوپروتئین اصلی معروف به پروتئین Zona Pellucida (ZP) (Mold et al., 2009) پوشانده می‌شود، این گلیکوپروتئین‌ها به طور انحصاری در تخمدان‌های ماهیان بالغ ساخته می‌شوند و سبب تسهیل تولیدمثل و مقاومت در برابر نفوذ بیماری دارند (Das et al., 2014).

کپورماهی هندی (*Labeo rohita*) که معمولاً به عنوان روهور شناخته می‌شود، یک گونه آبی‌پروری آب شیرین است که به صورت‌های متنوعی در جهان پرورش می‌یابد. پرورش کپورماهیان هندی همانند کپورماهیان چینی به سبب طعم ممتاز و وزن‌گیری مناسب، در سراسر دنیا طرفداران بسیاری دارد (Eslamizadeh et al., 2024). به علت غیربومی بودن، تکثیر این گونه‌ها برای تکمیل چرخه رسیدگی جنسی به تحریک هورمونی نیاز دارد (Al Zaidy et al., 2017). تقریباً تمام ماهیان در محیط استخرهای پرورشی، عملکرد تولیدمثلی ضعیفی را از خود نشان می‌دهند (Rahman et al., 2021). تعیین بهترین هورمون و نیز بهترین میزان هورمونی علاوه بر تولید تخم بالاتر، امکان تولید لارو و بچه‌ماهیانی

با قابلیت زیست بالاتر را نیز فراهم می‌سازد (Barrero et al., 2011). در نتیجه مطالعه بیشتر سازوکارهای کنترل فعالیت تولیدمثلی در ماهیان از اهمیت و ضرورت ویژه‌ای برخوردار است که امکان تنظیم دوره‌های جنسی را مطرح می‌سازد.

در حال حاضر، کنترل هورمونی به عنوان ابزاری در جهت تکثیر و پرورش آبزیان به کار گرفته می‌شود. یکی از روش‌های کنترل تولیدمثل و رشد ماهی‌ها در آبی‌پروری استفاده از هورمون‌ها است که در برنامه‌های کاری بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است (Zulkifile et al., 2021). اولین بار در سال ۱۹۳۴ در کشور برزیل با تزریق عصاره غده هیپوفیز، زمینه کار برای القای تخم‌ریزی، فراهم آمد. بعدها این روش در کشورهایی مانند روسیه، آمریکای شمالی، هند، چین و بسیاری از کشورهای دیگر از جمله ایران جایگزین شد (Farahani and Jamili, 2010). مطالعاتی در این زمینه انجام گرفته است و عصاره غده هیپوفیز در بسیاری از خانواده‌ها و گونه‌های مختلف از جمله گونه‌های خانواده کپورماهیان مانند کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، ماهی طلایی کوی (*Cyprinus rubrofasciatus*)، کاتلا (*Catla catla*)، کپور علف‌خوار

(*Ctenopharyngodon idella*)، ماهیان بومی خوزستان، باریوس ماهیان (Malik et al., 2023)، گونه‌های آزادماهیان مانند قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و دیگر خانواده‌ها و گونه‌های ماهی‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (Naeem et al., 2013; Mohammadian et al., 2014).

این مطالعه با هدف بررسی تاثیر دو غلظت عصاره غده هیپوفیز بر مولدین ماهیان روهو با توجه به استروئیدزایی، رشد تخمک و تغییرات هورمونی انجام شد. به طور خاص، این مطالعه چگونگی اثر این عصاره را بر روی ژن‌های Cyp19a1 و SF-1 درگیر در استروئیدزایی و همچنین ژن ZP مربوط به رشد فولیکول تخمدان بررسی کرد. علاوه بر این، تغییرات شیمیایی بافت، هیستومتری تخمدان و تغییرات هورمونی بررسی شد. زیرا با وجود تاثیر قابل توجه دستکاری‌های هورمونی بر تولیدمثل در ماهی‌های ماده، سازوکارهای سلولی و مولکولی زیربنایی و بررسی‌های بافتی هنوز به خوبی شناخته نشده است و درک سازوکار مهم این عوامل خارجی در تصمیم‌گیری در مورد اثربخشی آنها برای مولدین ماهی بسیار است.

مواد و روش‌ها

تهیه و نگهداری ماهیان

برای این مطالعه ۹۰ قطعه مولد ماده روهور (*Labeo rohita*) به صورت تصادفی در اردیبهشت ماه با شرایط سالم و آماده برای تکثیر بدون آسیب یا ناهنجاری قابل مشاهده (با وزن متوسط 3 ± 0.41 کیلوگرم) از مزرعه خصوصی آبی‌پروری شهرستان دزفول، استان خوزستان تهیه شد. شرایط فیزیکیوشیمیایی آب شامل pH 7.4 ، سطح اکسیژن محلول 8.3 ± 0.1 میلی‌گرم در لیتر و دمای آب در محدوده 25 تا 31 درجه سانتی‌گراد بود. ماهی‌ها دو بار در روز با جیره تجاری (جیره، ایران) تغذیه می‌شدند.

ارزیابی وضعیت باروری از طریق بیوپسی تخمدان

برای ارزیابی وضعیت باروری ابتدا ماهیان روهور مورد مطالعه با استفاده از متان سولفونات اتیل ۳- آمینوبنزوات (Sigma، آمریکا) به روش غوطه‌وری بیهوش شدند. بیوپسی تخمدان در داخل بدن، بر روی ماهی‌های بیهوش با استفاده از یک کاتتر انعطاف‌پذیر و استریل با تنفس ملایم انجام شد (Eslamizadeh et al., 2022). بخشی از نمونه تخمدان برداشته شد و پس از ثبوت در محلول بوئن و انجام شفاف‌سازی

سیتوپلاسم، مراحل بلوغ بر اساس موقعیت وزیکول ژرمینال (GV) با توجه به روش Das و همکاران در سال ۲۰۱۴ تعیین شد. واجد شرایط بودن برای القای تخم‌ریزی بر اساس حضور بیش از ۶۰ درصد تخمک‌ها در مرحله مهاجرت GV (قطر $1/4$ میکرومتر تا $650-670$ میکرومتر) تعیین شد که نشان دهنده وجود تخمک‌های بالغ با سیتوپلاسم کاملاً پر از زرده بود (Deal and Volkoff, 2020). ماهی‌های انتخاب شده برای شناسایی با پلاک‌های مخصوص برچسب‌گذاری شدند و قبل از تزریق وزن شدند.

طراحی تجربی آزمایش

در این مطالعه ماهیان به پنج گروه، شامل یک گروه شاهد و چهار گروه دریافت‌کننده عصاره هیپوفیز تقسیم شدند. هر گروه شامل شش نمونه در هر استخر با سه تکرار بود. برای تزریق ابتدا ماهی‌ها بیهوش شدند و سپس با ترکیبات زیر تیمار شدند:

- تیمار اول (شم ۱): تزریق 0.1 درصد (100 میکرولیتر در لیتر) دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) به عنوان شاهد مثبت
- تیمار دوم (شم ۲): تزریق سرم نمکی با غلظت 0.9 درصد به عنوان شاهد مثبت

در میکروسکوپ نوری (Olympus, CX23)، ژاپن)، قطر بیش از ۱۲-۸ عدد تخم بارور نشده اندازه‌گیری شد. برای هر تیمار، موفقیت تخم‌ریزی (نسبت تعداد ماهی‌های تخم‌گذاری کرده به تعداد کل ماهی‌های تیمار شده) و دوره نهفتگی (زمان بین تزریق و تخم‌گذاری) تعیین شد (Zadmajid and Butts, 2018). برای انجام لقاح، نرها جدا شده و با اعمال فشار ملایم به شکم، اسپرم آنها جمع‌آوری شد و لقاح خشک با نمونه تخمک هر تیمار (۱۵۰-۱۰۰ تخمک در هر نمونه) انجام شد. چسبندگی تخم‌ها با استفاده از محلول وایناروویچ (۴ گرم نمک طعام + ۳ گرم اوره در ۱ لیتر آب مقطر) گرفته شد. سپس تخم‌ها به طور جداگانه در آب با دمای مناسب قرار داده شدند (Siddique et al., 2016). برای تعیین درصد لقاح به دو صورت مطلق یا نسبی (نسبت تعداد تخم به گرم وزن بدن ماهی مولد)، حداقل ۵۰ تخم از هر تیمار در زیر میکروسکوپ بررسی شد. درصد تخم‌گشایی و بازماندگی لاروها ۶ و ۱۲ روز پس از تخم‌گشایی بر اساس روش‌های توصیف شده قبلی محاسبه شد (Zadmajid and Butts, 2018).

- تیمار سوم (شاهد): بدون تزریق به عنوان شاهد منفی
- تیمار چهارم: تزریق عصاره غده هیپوفیز ماهی کپور با غلظت ۳ میلی گرم در کیلوگرم وزن بدن (در دو مرحله)
- تیمار پنجم: تزریق عصاره غده هیپوفیز ماهی کپور با غلظت ۵ میلی گرم در کیلوگرم وزن بدن (در دو مرحله)
تزریق عصاره غده هیپوفیز در دو مرحله (مرحله اول شامل ۱۰ درصد و مرحله دوم شامل ۹۰ درصد غلظت تعیین شده ۱۲ ساعت بعد از مرحله اول) در عضله باله سینه‌ای انجام شد (Teimuri et al., 2018; Eslamizadeh et al., 2022, 2024).

کیفیت گامت، لقاح مصنوعی و رشد جنینی

پس از یک دوره ۱۲ ساعته پس از تزریق نهایی، پاسخ تخم‌گذاری ماهی ماده هر ۳-۴ ساعت با ماساژ حسی شکمی ارزیابی شد. تخمک‌های آزاد شده ماهی بلافاصله در یک ظرف پلاستیکی خشک قرار داده شدند و باروری مطلق به طور غیرمستقیم از وزن آنها با شمارش ۰/۱ گرم نمونه تخم از هر تخم‌ریزی در هر تیمار برآورد شد. با استفاده از عدسی چشمی مدرج

نمونه‌برداری

ماهی‌ها تشریح و تخمدان‌ها برای محاسبه شاخص گنادوسوماتیک (GSI) وزن شدند. ناحیه میانی تخمدان به مدت ۲۴ ساعت در تثبیت کننده بوئن قرار داده شد و قسمت دیگری از بافت آن در نیتروژن مایع منجمد شد و برای بررسی‌های بعدی در دمای -80°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Shirali et al., 2011).

اندازه‌گیری هورمون

قبل از تزریق و ۱۲ ساعت بعد از تزریق مرحله دوم، ماهی‌ها بیهوش شدند و نمونه‌های خون با استفاده از سرنگ‌های هپارینه از سیاهرگ ساقه دمی جمع‌آوری شد. پلاسما با سانتریفیوژ (PIT140، سهند، ایران) کردن خون در $18000 \times g$ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در دمای 4°C درجه سانتی‌گراد به دست آمد و تا آزمایش‌های هورمونی در دمای -80°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. از کیت الایزا (IBL International GmbH، آلمان) برای اندازه‌گیری سطح پلاسما هورمون دی‌هیدروکسی پروژسترون (DHP) استفاده شد (Zadmajid and Butts, 2018).

تجزیه و تحلیل بیان ژن

بافت‌های تخمدان به صورت مکانیکی همگن‌سازی شدند و RNA با استفاده از کیت خالص‌سازی (RNA GeneJET، سیناکلون، ایران) طبق پروتکل شرکت سازنده استخراج شد. سپس ۱ میکروگرم از RNA کل با DNase I بدون RNase تیمار شد تا هر گونه DNA باقیمانده حذف شود و با استفاده از کیت سنتز (Thermo Fisher Scientific، آمریکا) به cDNA رونویسی شد. cDNA به دست آمده در دمای -80°C درجه سانتی‌گراد برای استفاده در آینده ذخیره شد. RT-qPCR طبق دستور العمل شرکت سازنده انجام شد. در این مطالعه بیان ژن‌های مرتبط با رشد فولیکول و تولید استروئید، یعنی ZP، Cyp19a1 و SF-1 بررسی شد (جدول ۱) و ژن کنترل داخلی $\beta 2\text{microglubulib}$ ($\beta 2\text{m}$) به عنوان ژن مرجع مورد استفاده قرار گرفت. این ژن به دلیل حضور در بدن تمامی موجودات یوکاریوت و تغییرپذیری بسیار ناچیز، عدم عملکرد فوق تخصصی، طراحی آسان و در دسترس بودن به عنوان آغازگر انتخاب شد (Moulik et al., 2016). تغییرات نسبی بیان ژن با استفاده از روش CT مقایسه‌ای $2^{-\Delta\Delta CT}$ تعیین شد (Pfaffl, 2001).

جدول ۱: طراحی آغازگر ژن‌های مرتبط با رشد فولیکول و استروئیدزایی مولدین ماهی روهو (*Labeo rohita*)

منبع	دما (°C)	توالی (5'-3')	آغازگر
Kar et al., 2013	۵۵/۳	F-TGGCAATGAGAGGTTTCAGGT R-TGGCATAACAGGTCCTTACGG	β2m
Moulik et al., 2016	۵۵/۲	F-TGACAGATGCTCAGGGACAG R-CTGTGAAGCCAGTCCAGTCT	Cyp19a1a
Moulik et al., 2016	۶۶/۱	F-TCACGTGCGAGAGCTGCAAGG R-CCGCATTTCGATCAGCACGCA	SF-1
Das et al., 2014	۵۸/۳	F-GAATGAGATGTTCTTCAGGTGAGTGTCT R-CAGAGGTGTGCCATCCCTCTT	ZP2

بافت‌شناسی تخمدان

نمونه‌های تخمدان برای بررسی بافت‌شناسی با آب‌گیری در اتانول، پاک‌سازی در متیل بنزوات و جاسازی در موم پارافین آماده شدند. سپس مقاطع طولی و عرضی به ضخامت ۵ میکرومتر به دست آمد. برای مشاهده هسته، سیتوپلاسم و تجمع مواد کربوهیدراتی و لیپیدی به ترتیب از رنگ‌آمیزی‌های هماتوکسیلین-ئوزین (H&E)، پرئودیک اسید شیف (Schiff's Periodic Acid: PAS) و سودان سیاه (SB) طبق روش‌های استاندارد بافت‌شناسی آبزیان (Farahani and Jamili, 2010)، استفاده شد. اندازه‌گیری‌های بافتی به کمک عدسی چشمی مدرج و لام مدرج

بر حسب واحد میکرومتر و کالیبراسیون میکروسکوپ مورد استفاده، انجام شد.

تجزیه و تحلیل‌های آماری

داده‌ها در نرم‌افزار SPSS 26 با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و دوطرفه در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0.05$) برای بررسی اثرات اصلی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای ارزیابی تفاوت میانگین بین تیمارها از پس‌آزمون توکی استفاده شد. برای مقایسه داده‌های غیرپارامتری از آزمون کروسکال-والیس استفاده شد و نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شدند. از نرم‌افزار OriginPro 2022 (نسخه ۹.۹.۰.۲۲۵) برای رسم نمودارها استفاده شد.

نتایج

غلظت ۳ میلی‌گرم در کیلوگرم بود ($P < 0.05$).

تخم‌ها به صورت دستی پس از اعمال فشار بر روی شکم برداشت شدند. در حالی که تفاوت معنی‌داری در مقادیر GSI در بین گروه‌های شاهد و شم وجود نداشت، در دو تیمار عصاره غده هیپوفیز (۳ و ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم) به طور معنی‌داری بیشتر از گروه‌های شاهد و شم بود ($P < 0.05$ ؛ جدول ۲).

اثرات تیمارهای هورمونی بر کیفیت تخم و تخم‌گذاری در گروه‌های شم و شاهد مولدین ماده روهو، تخم‌ریزی رخ نداد. اما تزریق عصاره غده هیپوفیز در هر دو غلظت، بلوغ نهایی تخمک را تسریع و تخم‌ریزی را القا کرد. اثربخشی غلظت ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره غده هیپوفیز در القای تخم‌ریزی به طور معنی‌داری بیشتر از

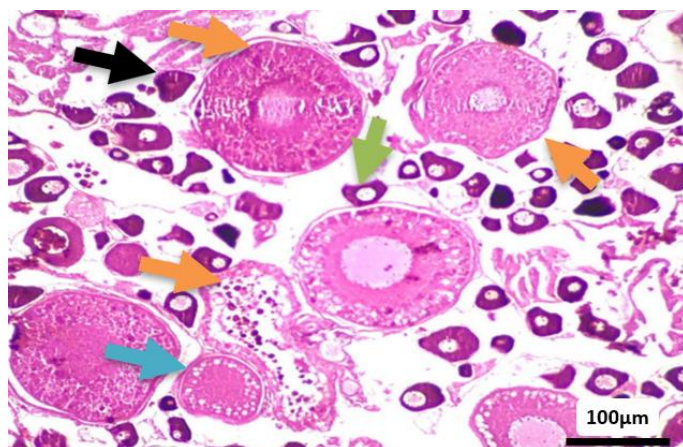
جدول ۲: شاخص‌های تولید در مولدین روهو تحت تاثیر تزریق عضلانی عصاره غده هیپوفیز (میانگین $\pm$ انحراف معیار)

شاخص	تیمارها			
	شاهد	شم ۱ (نمک طعام)	شم ۲ (دی‌متیل سولفوکساید)	عصاره هیپوفیز (۳mg/kg)
وزن کل (کیلوگرم)	۳/۱ $\pm$ ۰/۱۰ ^a	۳/۱ $\pm$ ۰/۲۲ ^a	۳/۰ $\pm$ ۰/۲۵ ^a	۴/۱ $\pm$ ۰/۱۹ ^a
شاخص گنادوسوماتیک (%)	۱۷/۲ $\pm$ ۱/۱ ^a	۱۷/۱ $\pm$ ۰/۹ ^a	۱۷/۲ $\pm$ ۱/۳ ^a	۲۰/۹ $\pm$ ۱/۲ ^b
دوره نهفته (ساعت)	-	-	-	۱۸/۲ $\pm$ ۱/۳ ^a
هماوری مطلق	-	-	-	۷۷۳۴/۲
هماوری نسبی	-	-	-	۹۸۵۱/۹
درصد لقاح	-	-	-	۴۳/۲ $\pm$ ۱۰/۴ ^a
درصد تخم‌گذاری	-	-	-	۹۵/۵ $\pm$ ۰/۳ ^a
درصد بازماندگی لارو (۶ روز پس از تخم‌گذاری)	-	-	-	۸۰/۶ $\pm$ ۱/۱ ^a
درصد بازماندگی لارو (۱۲ روز پس از تخم‌گذاری)	-	-	-	۹۵/۴ $\pm$ ۰/۴ ^a

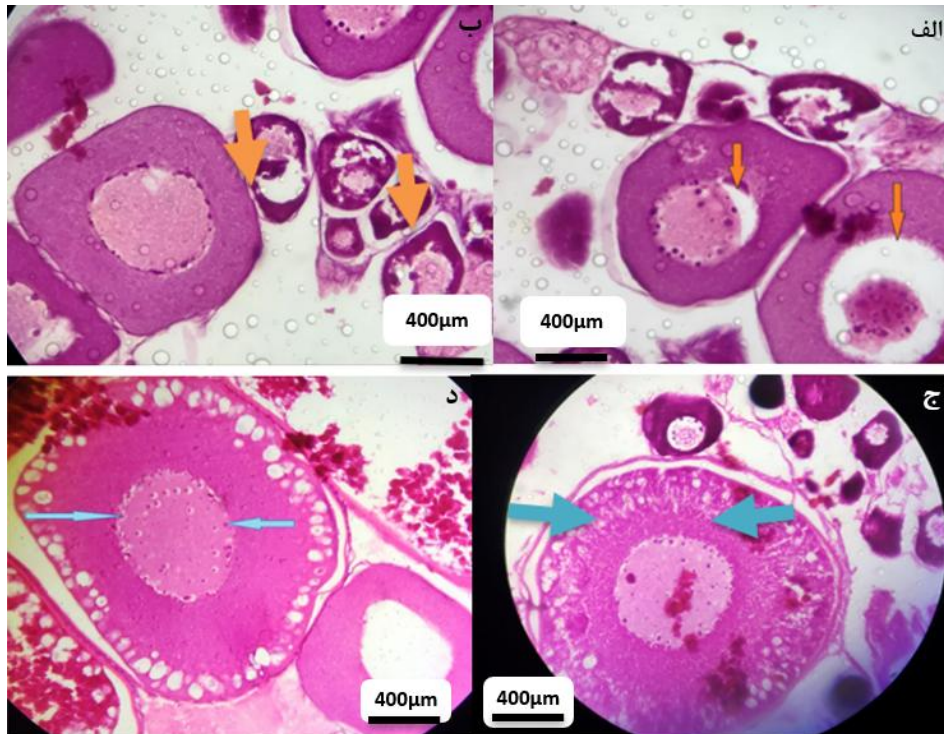
اختلاف معنی‌داری بین مقادیر با استفاده از حروف متفاوت در هر ردیف نشان داده شده است ($P < 0.05$).

بررسی بافت‌شناسی فولیکول‌های تخمدان مولدین روهو بلوغ تخمک ناهمزمان را با مراحل مختلف رشد نشان داد که در تصاویر بافت تخمدان دیده می‌شود (شکل‌های ۱ تا ۷). در مقاطع میکروسکوپی، شش مرحله رشد تخمک مشاهده شد. این مراحل شامل تخمک‌های رشد اولیه (کروماتین نوکلئوس CN، پری نوکلئولوس PN، کورتیکال آلونولوس CA)، تخمک‌های مرحله زرده‌سازی (اولیه و ثانویه V) و تخمک با بلوغ نهایی بود (شکل ۱). وضعیت میکروسکوپی تخمدان تیمارهای شاهد، شم ۱ و شم ۲ در شکل‌های ۱، ۲، ۴ و ۶ نشان داده شده است.

ماهیانی که با غلظت ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره غده هیپوفیز تیمار شده بودند نسبت به ماهیانی که با غلظت ۳ میلی‌گرم در کیلوگرم تیمار شده بودند دوره نهفته کوتاه‌تری داشتند ($P < 0/05$ ؛ جدول ۲). میانگین وزن ماهی (وزن کل) بین گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی‌داری نداشت ($P > 0/05$). نرخ باروری مطلق، باروری نسبی، لقاح و تخم‌گذاری در ماهی‌های دریافت‌کننده عصاره غده هیپوفیز به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد و شم بود ($P < 0/05$). تفاوت معنی‌داری در بازماندگی لاروهایی که مولدین آنها عصاره غده هیپوفیز دریافت کرده بودند وجود نداشت ($P > 0/05$ ؛ جدول ۲).



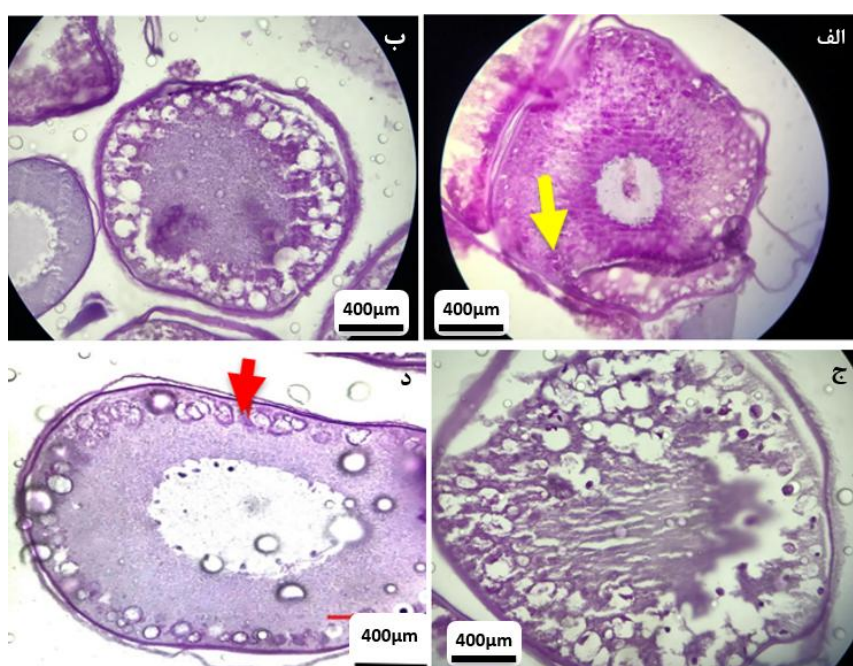
شکل ۱: تخمدان ماهی مولد روهو تیمار شاهد (H&E). تخمدان ناهمزمان که مراحل مختلف رشد فولیکول‌های تخمدانی قابل مشاهده هستند: مرحله کروماتین نوکلئوس (CN، پیکان مشکی)، مرحله پری‌نوکلئولوس (PN، پیکان سبز)، مرحله کورتیکال آلونولوس (CA، پیکان آبی)، مرحله تخمک ویتلوژنیک V (پیکان‌های نارنجی).



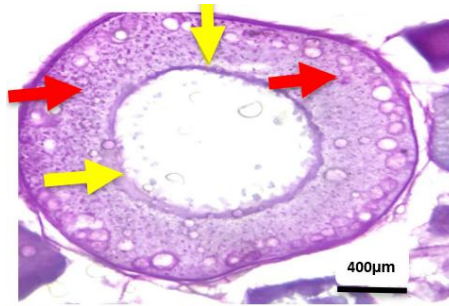
شکل ۲: تخمدان ماهی مولد روهو (H&E). الف) تیمار شاهد؛ چروکیدگی اطراف اووسیت و فاصله گرفتن اووسیت از پرده شفاف اطراف و تشکیل حفره (پیکان نارنجی). ب) تیمار شم ۱؛ فولیکول‌های نابالغ بیشتر و قطر کمتر. ج) غلظت ۳ میلی گرم در کیلوگرم عصاره هیپوفیز؛ افزایش تعداد و قطر فولیکول‌های بالغ در مراحل اولیه زرده‌سازی و جداشدگی اووسیت از پرده شفاف (پیکان آبی). د) تیمار شم ۲؛ فولیکول‌های نابالغ بیشتر و قطر کمتر فولیکول‌های بالغ در مراحل اولیه زرده‌سازی. هستک‌ها با پیکان‌های آبی نمایش داده شده‌اند.



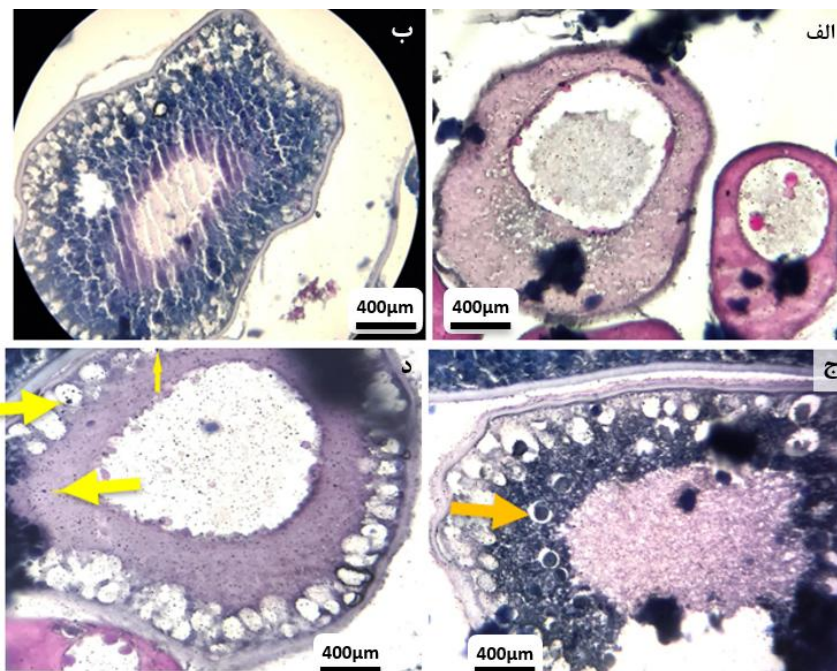
شکل ۳: تخمدان ماهی مولد روهو تحت تاثیر غلظت ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره هیپوفیز (H&E): افزایش تعداد و قطر فولیکول‌های بالغ در مراحل اولیه و ثانویه زرده‌سازی و وجود آئول‌های چربی در اطراف فولیکول در حال رشد (پیکان آبی).



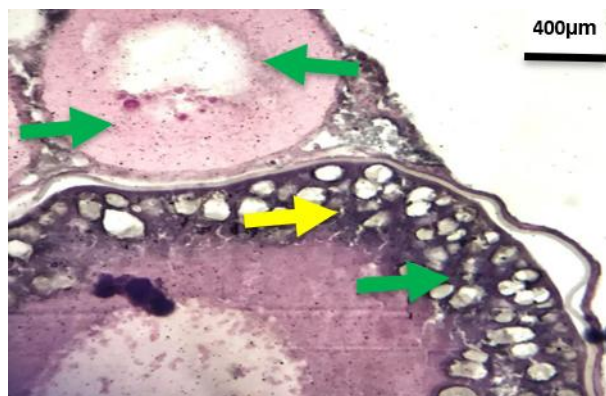
شکل ۴: تخمدان ماهی مولد روهو (PAS). الف) تیمار شاهد؛ دانه‌های گلیکوژن درون فولیکول قابل مشاهده است (پیکان زرد). ب) تیمار شم ۱؛ وجود دانه‌های گلیکوژن به مقدار کم. ج) تیمار شم ۲؛ وجود دانه‌های گلیکوژن به مقدار کم درون فولیکول‌ها. د) غلظت ۳ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره هیپوفیز؛ چروکیدگی و جدا شدن اووسیت از پرده شفاف، همراه با تشکیل حفره در بین سلول‌های گرانولوزا، دانه‌های گلیکوژن به تعداد کم دیده می‌شود (پیکان قرمز).



شکل ۵: تخمدان ماهی مولد روهو تحت تاثیر غلظت ۵ میلی گرم در کیلوگرم عصاره هیپوفیز (PAS): افزایش واضح دانه‌های گلیکوژن در بین سلول‌های تکا و گرانولوزا (پیکان قرمز). پرده شفاف بدون چروکیدگی در اطراف اووسیت (پیکان زرد).



شکل ۶: تخمدان ماهی مولد روهو (SB): (الف) تیمار شاهد؛ دانه‌های چربی و فسفولیپید قابل مشاهده نیست. (ب) تیمار شم ۱؛ دانه‌های چربی و فسفولیپید قابل مشاهده نیست. (ج) تیمار شم ۲؛ دانه‌های چربی در برخی فولیکول‌ها دیده می‌شود (پیکان نارنجی). (د) غلظت ۳ میلی گرم در کیلوگرم عصاره هیپوفیز دانه‌های چربی درون و اطراف سلول‌های گرانولوزا (پیکان زرد).



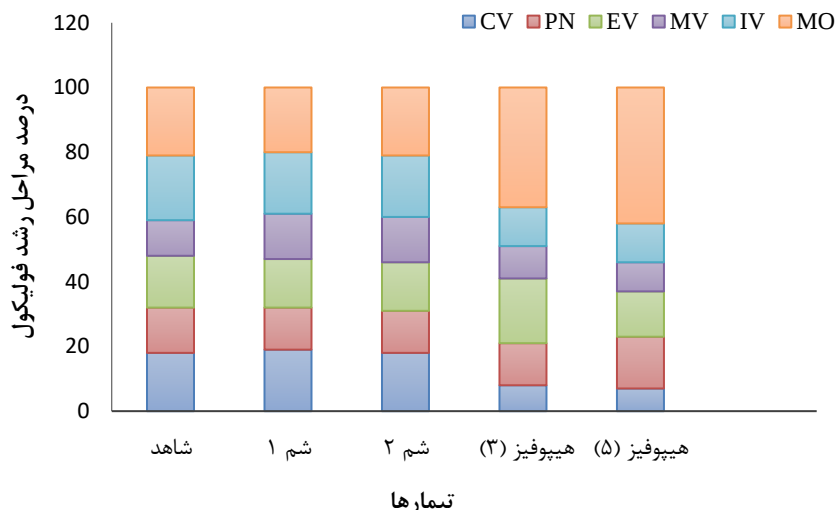
شکل ۷: تخمدان ماهی مولد روهو تحت تاثیر غلظت ۵ میلی گرم در کیلوگرم عصاره هیپوفیز (SB): افزایش دانه‌های چربی اطراف سلول‌های گرانولوزا (پیکان زرد) در فولیکول‌های نابالغ افزایش اندک دانه‌های چربی دیده می‌شود (پیکان سبز).

دانه‌های کربوهیدراتی در لایه‌های سلولی تکا و گرانولوزا فولیکول‌ها دیده شد (شکل‌های ۴ و ۵). نتایج به دست آمده از بررسی شیمیایی بافت با رنگ‌آمیزی سودان بلک در بافت تخمدان روهوهای ماده نشان می‌دهد که تجمعات لیپیدی در بافت تخمدان به رنگ آبی مایل به سیاه هستند و در تیمار دریافت کننده عصاره هیپوفیز پاسخ به رنگ‌آمیزی مثبت بود و افزایش گرانول‌های لیپیدی دیده شد (شکل‌های ۶ و ۷). در بررسی‌های اندازه‌گیری بافتی، نتایج شمارش فولیکول‌ها، اختلاف معنی‌داری را در تعداد فولیکول‌های مرحله کروماتین نوکلئوس (CN) و مرحله پری‌نوکلئولوس (PN) نشان نداد ($P > 0.05$; شکل ۸). در تیمارهای تزریق

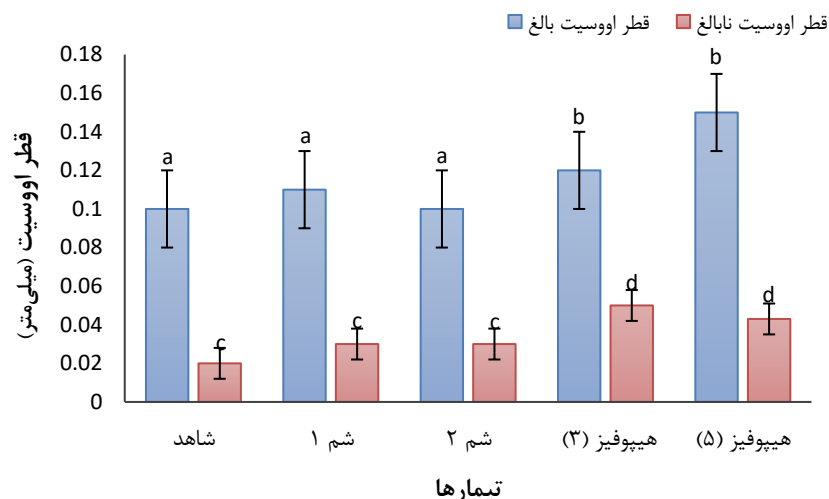
بررسی میکروسکوپی مقاطع رنگ‌آمیزی شده با همتوکسیلین-اُوزین تخمدان مولدین ماهی روهو نشان دهنده تاثیر مثبت عصاره هیپوفیز بر بافت تخمدان، تغییرات سلولی و افزایش تعداد و قطر فولیکول‌های بالغ بویژه مرحله زرده‌سازی است (شکل‌های ۲، ۳، ۸ و ۹) که در تیمارهای شاهد، شم ۱ و شم ۲ این تغییرات مشاهده نشد.

بررسی شیمیایی بافتی تخمدان تیمارهای مورد مطالعه در رنگ‌آمیزی اختصاصی PAS نشان داد فولیکول‌های تخمدانی بالغ با افزایش تعداد دانه‌های گلیکوژن بالغ می‌شوند و پاسخ دو تیمار دریافت کننده عصاره هیپوفیز نسبت به این رنگ‌آمیزی مثبت بود و افزایش واضح

شده با دو غلظت عصاره هیپوفیز اختلاف معنی‌داری در تعداد فولیکول‌های مراحل زرده‌سازی دیررس (IV)، زرده‌سازی میانی (MV) و زرده‌سازی اولیه (EV) و فولیکول‌های مرحله بلوغ نهایی (MO) در مقایسه با تیمارهای شاهد و شم دیده شد ($P < 0.05$; شکل ۸). اندازه‌گیری قطر اووسیت در تیمارهای مورد بررسی نشان داد اووسیت‌های نابالغ در تیمار ۳ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره هیپوفیز ۰/۰۵ میلی‌متر و در تیمار ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم هیپوفیز ۰/۰۴۳ میلی‌متر بود که اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند، اما در مقایسه با تیمارهای شاهد و شم (به ترتیب ۰/۰۳، ۰/۰۲ و ۰/۳۰ میلی‌متر) افزایش معنی‌داری را نشان دادند ($P < 0.05$; شکل ۹). اووسیت‌های بالغ در تیمار ۳ میلی‌گرم در کیلوگرم هیپوفیز ۰/۱۲ میلی‌متر و در تیمار ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم هیپوفیز ۰/۱۵ میلی‌متر بود و اختلاف معنی‌داری نداشتند، اما با تیمارهای شاهد و شم (۰/۱، ۰/۱۱ و ۰/۱ میلی‌متر) افزایش معنی‌داری را نشان دادند ($P < 0.05$; شکل ۹).



شکل ۸: توزیع مرحله نمو تخمک‌های مولد روهو در گروه‌های آزمایشی مختلف. مراحل و ساختارهای تخمک شامل CN: تخمک هسته کروماتین، PN: تخمک پری‌نوکلئولوس، EV: تخمک ویتلوژنیک اولیه، MV: اووسیت ویتلوژنیک میانی، IV: تخمک ویتلوژنیک دیررس و MO: تخمک در مرحله بلوغ نهایی است.



شکل ۹: مقایسه قطر اوسیت‌های نابالغ و بالغ تخمدان ماهی مولد روهو در تیمارهای مورد بررسی (میانگین $\pm$ انحراف معیار). در هر شاخص حروف متفاوت به معنی وجود اختلاف معنی‌دار در تیمارهای مختلف است (a و b برای قطر اووسیت‌های بالغ و c و d برای قطر اووسیت‌های نابالغ: $P < 0.05$).

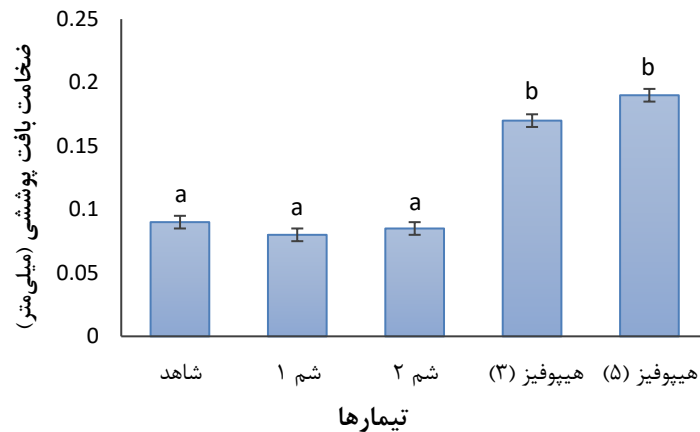
($P > 0.05$). تیمار شم ۱ با ضخامت 0.08 میلی‌متر کمترین قطر بافت پوششی را داشت (شکل ۱۰).

اثر تیمارهای هورمونی بر استروئید جنسی دی‌هیدروکسی پروژسترون

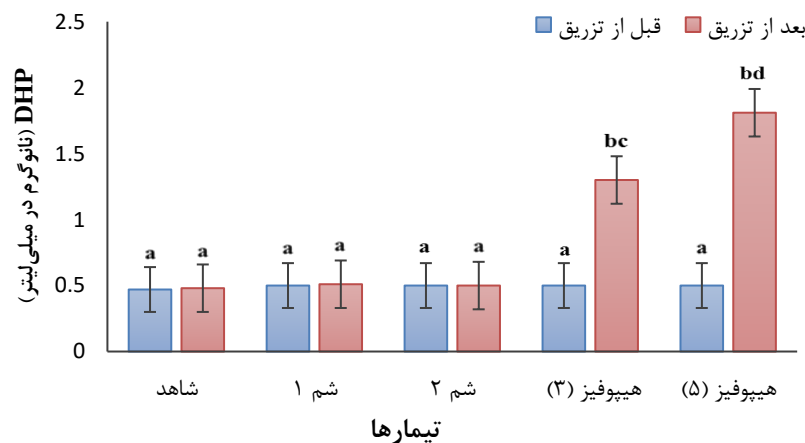
سطح DHP (دی‌هیدروکسی پروژسترون) در وضعیت قبل از تزریق در تمام گروه‌های آزمایشی یکسان بود. پس از تزریق، گروه‌هایی که غلظت ۳ و ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره غده هیپوفیز را دریافت کرده بودند، در مقایسه با گروه‌های شم و شاهد و در مقایسه با سطح

بررسی‌های تکمیلی مقاطع میکروسکوپی تیمارهای مختلف افزایش ضخامت کپسول تخمدانی و بافت همبند را نشان داد. اندازه‌گیری ضخامت بافت پوششی تخمدان در گروه‌های مورد بررسی نشان داد تیمار ۳ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره هیپوفیز با 0.17 میلی‌متر و تیمار ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم با 0.19 میلی‌متر بالاترین ضخامت را داشتند و با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌دار نشان دادند ($P < 0.05$). ضخامت بافت پوششی بین سه تیمار شاهد (0.09 میلی‌متر)، شم ۱ (0.08 میلی‌متر) و شم ۲ (0.085 میلی‌متر) اختلاف معنی‌داری نداشت.

پلازما قبل از تزریق افزایش معنی‌دار نشان دادند ($P < 0.05$). قابل ذکر است که بیشترین افزایش سطح پلاسمایی DHP در گروه‌های دریافت کننده هیپوفیز مشاهده شد ($P < 0.05$ ؛ شکل ۱۱).



شکل ۱۰: مقایسه ضخامت بافت پوششی تخمدان ماهی مولد روهو در تیمارهای مورد بررسی (میانگین $\pm$ انحراف معیار). حروف کوچک متفاوت به معنی اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف است ($P < 0.05$).



شکل ۱۱: سطح سرمی $\beta 17,20$ -دی هیدروکسی ۴-پروگنن-۳-وان (DHP) در مولدین روهو قبل و بعد از دریافت تزریق (میانگین $\pm$ انحراف معیار). تفاوت آماری معنی‌دار بین سطوح قبل و بعد از تزریق با حروف a و b و تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های تیمار با حروف c و d نشان داده شده است ($P < 0.05$).

اثرات تیمار هورمونی بر بیان ژن‌های مربوط به استروئیدزایی و رشد فولیکول تخمدان

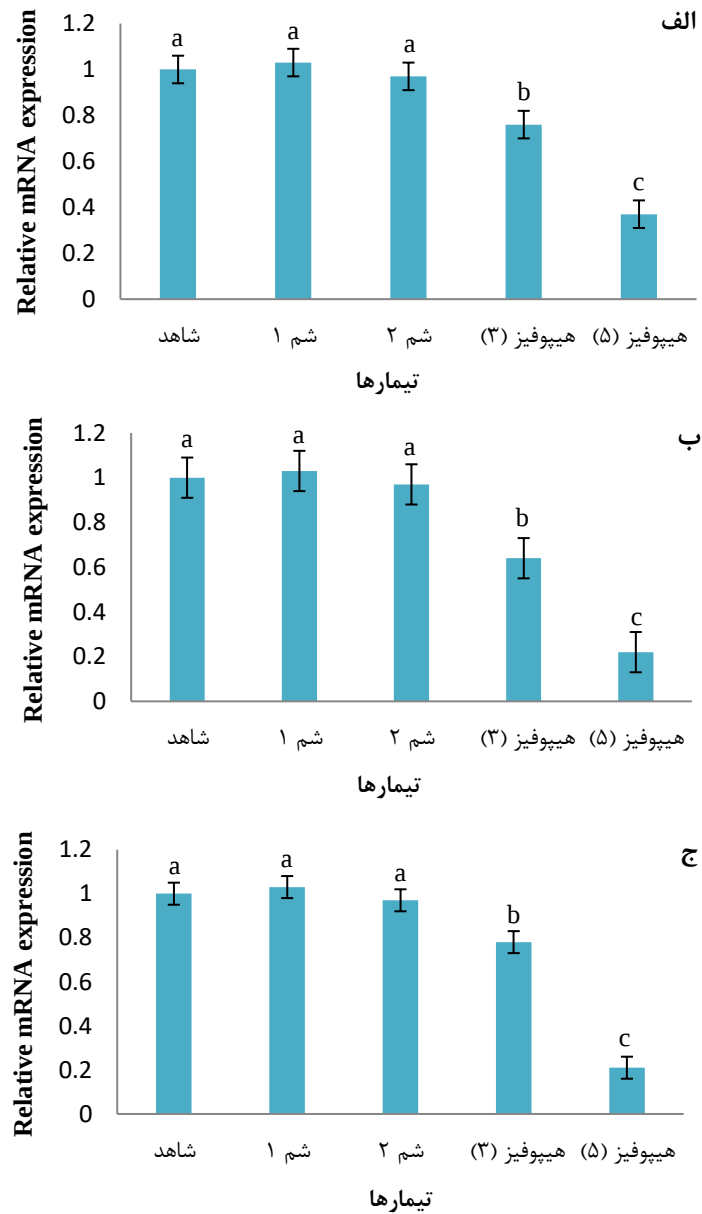
یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که بیان ژن‌های Cyp19a1، SF-1 و ZP2 در تخمدان‌های ماهی‌های تیمار شده با غلظت ۳ و ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن عصاره غده هیپوفیز در مقایسه با گروه‌های شاهد و شم به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.05$) و کمترین بیان مشاهده شده در گروه‌های تحت درمان با هیپوفیز مشاهده شد (شکل ۱۲).

بحث

در ماهی ترشح هورمون‌های GTHI و GTHII که برای رسیدگی جنسی ضروری هستند، با هماهنگی بین محرک‌های محیطی و گنادوتروپین‌ها تحریک می‌شود. تنظیم این پاسخ‌های هورمونی به تعامل بین اندام‌های حسی و غدد تولید کننده هورمون‌های استروئیدی بستگی دارد. در نتیجه، دستکاری این پاسخ‌ها می‌تواند به عنوان عوامل قابل اعتماد وضعیت تولیدمثل عمل کند (Pham et al., 2010). از این رو، تعیین قابل اعتمادترین

هورمون و غلظت هورمونی ضروری است. در این مطالعه، تاثیر عصاره غده هیپوفیز بر کیفیت تخم، تخم‌ریزی و ژن‌های مرتبط در مولدین ماده ماهی رهو بررسی شده است. استفاده از تحریک هورمونی برای القای تولیدمثل ماهی نشان دهنده پیشرفت قابل توجهی در آبی‌پروری است.

یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که قرارگیری در معرض عصاره هیپوفیز عملکرد تولیدمثلی را افزایش می‌دهد، به طوری که افزایش نرخ لقاح، تخم‌گذاری و میزان تخم‌ریزی بالاتری مشهود است. همچنین هیچ اثر منفی بر کیفیت گامت در مقایسه با گروه‌های شاهد و شم مشاهده نشد. قابل ذکر است که هیچ یک از ماهیان در گروه‌های شاهد یا شم تخم‌ریزی نکردند. تزریق عصاره هیپوفیز منجر به افزایش باروری، تخم‌گذاری و نرخ بقای قابل توجهی در مقایسه با گروه‌های شاهد و شم شد. علاوه بر این، زمان تاخیر در گروه‌های تحت تیمار با عصاره هیپوفیز به طور قابل توجهی کوتاه‌تر از گروه شاهد و شم بود.



شکل ۱۲: بیان ژن‌های Cyp191a1 (الف)، SF-1 (ب) و ZP2 (ج) در مولدین روهو پس از تزریق عصاره غده هیپوفیز (میانگین $\pm$ انحراف معیار). حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌داری بین تیمارها است ($P < 0.05$).

این هورمون در زرده‌سازی و افزایش میزان زرده در تخمک (Tovo-Neto et al., 2018) قابل توجه است. زرده در ماهیان، گلیکوفسفولیپوپرنتینی است که مولکولی با ۲۰ درصد لیپید و درصد بالایی کربوهیدرات است (Mohammadzadeh et al., 2021).

بررسی حاضر نشان داد که علایم تخمک‌گذاری ۱۲ ساعت پس از تیمار با هر دو غلظت عصاره هیپوفیز در مولدین ماده ظاهر شد که نشان دهنده حرکت به زیرفاز تخم‌ریزی است. زیرفاز تخم‌ریزی فعال می‌تواند برای شناسایی ماهی‌هایی که از طریق بلوغ و تخمک‌گذاری در حال پیشرفت هستند، استفاده شود که نشان دهنده نزدیکی به تخمک‌گذاری است. در طی زیرفاز تخم‌ریزی فعال، تخمدان‌ها حاوی تخمک‌های زرده‌ساز در مراحل مختلف رشد هستند (Brown et al., 2014). تخمدان‌های گروه‌های شاهد و شم در طول آزمایش بدون تغییر باقی ماندند و طبق بررسی‌های بافتی حاوی تمام مراحل سلول‌های زاینده، عمدتاً با کروماتین نوکلئوس (CN)، پری‌نوکلئولوس (PV) و زرده‌سازی اولیه (EV) با تعداد بسیار کمی از تخمک‌های بالغ (MO) بودند. نتایج به دست آمده، پاسخ وابسته به

مطابق با یافته‌های مطالعه حاضر، Pham و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که قرار گرفتن گونه *Psammoperca waigiensis* در معرض عصاره هیپوفیز باعث بهبود بیشتر در تولیدمثل و تخم‌ریزی در مقایسه با گروه‌های شاهد و شم شد (Pham et al., 2010) که با توجه به تشابه هورمون به کار رفته در این مطالعه با پژوهش یاد شده، نتیجه به دست آمده از مطالعه حاضر قابل تایید است.

شاخص گنادوسوماتیک (GSI) گروه‌های شاهد و شم مشابه بود. با این حال، تزریق عصاره هیپوفیز به ماده‌ها منجر به افزایش قابل توجهی در شاخص GSI شد. افزایش در GSI معمولاً می‌تواند به جذب بیشتر آب ناشی از افزایش غلظت یون‌های معدنی در تخمک در طول بلوغ نهایی تخمدان نسبت داده شود (Abubakar and Miftahu, 2023; Ismail et al., 2023) که با اندازه تخمک بزرگ‌تر همراه است. چنین افزایش‌هایی ممکن است در مراحل اولیه زندگی ماهی مزایای رشدی را به همراه داشته باشد، زیرا اغلب منجر به ذخایر زرده تخم بیشتر و لاروهای مناسب‌تر می‌شود (Zadmajid and Butts, 2018). قطر بالاتر تخمک تولیدی در تیمارهای عصاره غده هیپوفیز با توجه به میزان بالاتر هورمون استروئیدی این تیمارها و نقش

غلظت تزریق عصاره هیپوفیز را در القای تخم‌گذاری و تخم‌ریزی نشان داد. تجزیه و تحلیل بافت‌شناسی تخمدان از تغییر استروئیدی ایجاد شده در فولیکول‌های تخمدان گونه مورد مطالعه پشتیبانی می‌کند. تخمدان‌ها در ماهی ماده روهو کرم رنگ بود و با توجه به نتایج بافت‌شناسی، هورمون دریافتی بر تغییرات بافتی تخمدان تاثیر معنی‌داری داشت ($P < 0.05$)، به این ترتیب که هورمون موجود در عصاره هیپوفیز با تاثیر بر ذخیره گلیکوژنی تخمدان، باعث افزایش تعداد فولیکول‌های بالغ در مقایسه با تیمار شاهد شد. در تیمار با عصاره هیپوفیز، افزایش شدید تخم‌زایی همراه با افزایش بارز رسیدگی جنسی و بلوغ فولیکول‌ها و افزایش چربی و فسفولیپیدها در اطراف اووگونی‌ها قابل مشاهده بود. مشابه این نتیجه توسط Eslamizadeh و همکاران در سال ۲۰۲۲ که روی تاثیرات شیمیایی عصاره غده هیپوفیز بر ترکیبات شیمیایی و اسیدهای چرب بافت تخمدان ماهی ماده روهو مطالعه کرده بودند، به دست آمد که افزایش معنی‌دار ترکیبات شیمیایی یاد شده در تیمار دریافت کننده عصاره غده هیپوفیز مشاهده شد. در تیمارهای شاهد و شم به عنوان تیماری که هورمون القا کننده دریافت نکرده بودند، افزایش واضح دانه‌های گلیکوژن در بین سلول‌های تکا و گرانولوزا که نشان دهنده مرحله زرده‌سازی یا مرحله III رسیدگی جنسی است و عقب افتادگی مراحل رسیدگی جنسی در مقایسه با تیمار هیپوفیز دیده شد. قطر و تعداد اووسیت‌های بالغ و نابالغ در تیمارهای شاهد و شم در مقایسه با تیمارهای عصاره هیپوفیز کمتر بود که تأیید کننده کارایی بالای غلظت عصاره تزریقی در این تیمارها است. افزایش قطر و تعداد اووسیت‌های بالغ در نتیجه تزریق عصاره هیپوفیز، LHRH-A2 و HCG در ماهی کفال *Mugil cephalus* توسط Yousefian و همکاران (۲۰۰۹) نیز گزارش شده است که با نتایج مطالعه حاضر تطبیق دارد. Abbasi و همکاران (۲۰۰۳) نیز در مطالعه تغییرات هورمون‌های جنسی در طی مراحل رشد تخمدان ماهی *Epinephelus coioides* مرحله III رسیدگی جنسی را به عنوان مرحله تجمع دانه‌های گلیکوژن ذکر کردند. طبق نتایج بررسی میکروسکوپی مقاطع در مطالعه حاضر، افزایش دانه‌های لیپید در تیمارهای عصاره غده هیپوفیز مشاهده شد که نشان دهنده رشد گناد است (Farahani and Jamili, 2010). Farahani و Jamili (۲۰۱۰) حضور واکوئل‌های کوچک لیپیدی در سیتوپلاسم و

تشکیل لایه فولیکولی در اطراف اووسیت‌ها را در تخمدان ماهی شانک زردباله (*Acanthopagrus latus*) نشان دهنده حضور ماهی در مرحله دوم رسیدگی دانستند که نتایج آنها با نتایج مطالعه حاضر در تیمارهای شاهد و هیپوفیز هم‌خوانی دارد. از این رو، در بررسی شیمیایی بافت تخمدان، دانه‌های گلیکوژن و لیپید در تخمدان ماهی‌های مولد در کلیه تیمارهای شاهد، شم و عصاره هیپوفیز قابل شناسایی بود، اما در تیمارهای عصاره غده هیپوفیز افزایش قابل توجهی یافت که نشان دهنده اهمیت لیپید و گلیکوژن در بلوغ گناد ماهی مولد است (Abd-Elhakim et al., 2021). حضور این ماکرومولکول‌ها در بافت تخمدان بالغ سبب افزایش کیفیت تخم‌ریزی، سرعت بخشیدن به لقاح و تخم‌گشایی خواهد شد (Abbasi et al., 2003). Mabudi و همکاران (۲۰۱۱) در بررسی تاثیر گرلین بر روی بافت‌شناسی ماهی بنی (*Barbus sharpeyi*) افزایش درصد فولیکول‌های بالغ را در تیمار گرلین در مقایسه با شاهد گزارش کردند و در مطالعه Alcantar-Vazquez و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی تاثیر هورمون ۱۷ بتا استرادیول بر روی ساختار تخمدان تیلاپای نیل (*Oreochromis niloticus*)، افزایش ضخامت بافت پوششی تخمدان را نشان دهنده رسیدگی جنسی در مولدین ماده دانستند که تأییدی بر نتایج بافتی پژوهش حاضر است. در مطالعه Tamaru و همکاران (۱۹۹۱) افزایش قطر تخمک و در نتیجه رسیدن قطر تخمک ماهی کفال به اندازه ۶۰۰ میکرومتر را نشان دهنده رسیدگی این ماهی گزارش کردند. همچنین، Mabudi و همکاران (۲۰۱۱) روی ماهی بنی افزایش قطر اووسیت را در تیمارهایی با رسیدگی بالاتر گزارش کردند که با قطر بالاتر تخمک در ماهیانی با رسیدگی بالاتر (تیمارهای عصاره غده هیپوفیز) هم‌خوانی دارد. Al Zaidy و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه‌ای بر روی تغییرات تخمدان کپور معمولی و ماهی قرمز (*Carassius auratus*) تحت تاثیر تزریق با سه نوبت هورمون LHRH، افزایش قطر فولیکول‌ها را در جریان بلوغ تخمدان با استفاده از رنگ‌آمیزی H&E گزارش کردند.

در مطالعه حاضر به دنبال تزریق عصاره هیپوفیز، تیمارهای دریافت کننده عصاره افزایش معنی‌داری در سطح پلاسمایی DHP نسبت به تیمارهای شاهد و شم نشان دادند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که عصاره هیپوفیز می‌تواند استروئیدهای جنسی را در غدد جنسی تعدیل کند و در نتیجه باعث افزایش ترشح DHP

توسط فولیکول‌های تخمدان می‌شود. DHP به عنوان یک استروئید القاء کننده بلوغ (MIS) در بیشتر ماهی‌های استخوانی عمل می‌کند (Yu et al., 2022)، به این صورت که به گیرنده‌های خاصی روی غشای پلاسمایی تخمک متصل می‌شود و مستقیماً بر فرایندهای تخمک‌گذاری تاثیر می‌گذارد (Mokhtar, 2019). در حالی که شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد تجویز عصاره هیپوفیز به ماهی می‌تواند سطوح DHP/MIS را تغییر دهد و باعث ایجاد بلوغ نهایی اووسیت شود (Pham et al., 2010; Mohammadzadeh et al., 2021). نتایج نشان می‌دهد که DHP به عنوان یک MIS طبیعی حیاتی در گونه مورد بررسی عمل می‌کند و تخمک‌گذاری را تنظیم می‌کند. یافته‌های حاضر با مطالعات قبلی روی ماهی *Tinca tinca* (Podhorec et al., 2016) و گربه‌ماهی *Heteropneustes fossilis* (Acharjee et al., 2017) مطابقت دارد که همگی نقش DHP را در استروئیدزایی نشان می‌دهند.

در این مطالعه، بیان ژن‌های ZP2، Cyp19a1 و SF-1 در گروه‌های دریافت کننده هیپوفیز به طور معنی‌داری کاهش یافت. در حالی که تنظیم بیان ZP2 در سلول‌های تخمدان ماهی به خوبی شناخته نشده است، مطالعات روی ماهی‌ها نشان داده‌اند که رونوشت‌های ژن ZP2 در اووسیت‌ها در مراحل اولیه تخمک‌زایی فراوان هستند، اما در طول رشد فولیکولی به طور چشمگیری کاهش می‌یابند (Kinoshta et al., 2010). کاهش بیان ژن‌های آروماتاز (Cyp19a1)، SF-1 و Zp2 طبیعی بودن تخمک‌گذاری ناشی از تزریق عصاره هیپوفیز در روهور را تایید می‌کند (Kocmarek et al., 2014). تغییر استروئیدزایی در ماهی‌های استخوانی به کاهش فعالیت آروماتاز نسبت داده می‌شود (Omidian et al., 2022) که به فولیکول اجازه می‌دهد به گنادوتروپین‌های هیپوفیز پاسخ دهد، همان طور که با استفاده از پروب cDNA آروماتاز نشان داده شد (Malcolm et al., 2019). با این حال، این جابه‌جایی به طور کلی در همه ماهی‌های استخوانی اتفاق نمی‌افتد (Pereira et al., 2017). کاهش همزمان بیان ZP2 و افزایش فولیکول‌ها بعد از تزریق هیپوفیز، نقش این هورمون‌ها را در تسریع بلوغ تخمک تایید می‌کند، اگرچه بیان ZP2 ممکن است بسته به گونه و مرحله رشد تخمدان متفاوت باشد (Mold et al., 2009). SF-1 یک گیرنده ویژه بافت واقع در هسته است که به عنوان یک عامل

رونویسی که بیان پروتئین StAR و آنزیم‌های مهم استروئیدزا مانند P450 آروماتاز را در گناد تقویت می‌کند، عمل می‌کند. mRNA SF-1 در غدد جنسی کپور معمولی بالغ شناسایی شده است و می‌تواند ترجمه پروتئین SF-1 را تنظیم کند (Tang et al., 2010). کاهش همزمان مشاهده شده در سطوح Cyp19a1a، SF-1 و افزایش DHP در این مطالعه از فعال‌سازی Cyp19a1a با واسطه SF-1 پشتیبانی می‌کند و در نتیجه سنتز استروژن را در این گونه مهار می‌کند.

در مجموع، نتایج این مطالعه هیچ عارضه جانبی را قبل یا پس از تخم‌ریزی نشان نداد که با تزریق عصاره هیپوفیز مرتبط باشد، همان‌طور که با عدم وجود مرگ و میر ماهیان ماده در تمام تیمارها مشهود است. این یافته‌ها نشان می‌دهد

که تزریق عصاره غده هیپوفیز، بویژه در غلظت ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم، بر اساس معیارهایی مانند عملکرد تخم‌ریزی ماده، استروئیدهای جنسی پلازما، بافت‌شناسی تخمدان، تولید استروئیدهای جنسی و ژن رشد فولیکول روشی مطمئن برای القای تخم‌ریزی روهو است و افزایش معنی‌داری در شاخص گنادوسوماتیک، همآوری، درصد لقاح و تخم‌گشایی مشاهده شد. بافت تخمدان، میزان هورمون استروئیدی و عملکرد استروئیدزایی افزایش معنی‌داری در تیمارهای دریافت‌کننده عصاره غده هیپوفیز نشان داد. در نهایت، می‌توان امیدوار بود که این نتایج تلاش‌های پرورش در اسارت را برای این گونه مهم تسهیل کند و به دانش ما در مورد فیزیولوژی تولیدمثل در کپورماهیان کمک کند.

منابع

- Abbasi F., Oryan S. and Matinfar A. 2003.** Histology and morphology of common grouper (*Epinephelus coioides*) ovary in Khuzestan waters of Persian Gulf [In Persian]. Journal of Research and Development in Livestock and Aquatic Affairs, 66(1): 68–74.
- Abd-Elhakim E., Gamal E., El-Sayyad H., Mohamed A., Rania S. and Barakat O. 2021.** Histological and histochemical studies on the ovarian development of the grass carp, *Ctenopharyngodon idella* with special references to atretic phenomena. Egypt Journal of Aquaculture Biology and Fisheries, 25(1): 477–492. doi: 10.21608/ejabf.2021.145443
- Abubakar M.Y. and Miftahu M.Y. 2023.** Effect of pituitary gland from spent and unspent female brood fish spawning performance of African catfish (*Clarias gariepinus*). Journal of Agriculture and Environment, 19(2): 135–142. doi: 10.4314/jagrenv.v19i2.14
- Acharjee A., Chaube R. and Joy K.J.G. 2017.** Ovaprim, a commercial spawning inducer, stimulates gonadotropin subunit gene transcriptional activity: A study correlated with plasma steroid profile, ovulation and fertilization in the catfish *Heteropneustes fossilis*. General Comparative Endocrinology, 251: 66–73. doi: 10.1016/j.ygcen.2016.10.001
- Ahmadnezhad M., Oryan S., Hosseinzadeh Sahafi H. and Khara H. 2013.** Effect of synthetic luteinizing hormone releasing hormone (LHRH-A2) plus pimozide and chlorpromazine on ovarian development and levels of gonad steroid hormones in female kutum *Rutilus frisii kutum*. Turkish Journal of Fisheries and Aquaculture Science, 13: 95–100. doi: 10.4194/1303-2712-v13_1_12
- Al Zaidy F., Al-Noorm S. and Jasim B.M. 2017.** The effect of hormone type and amount of dose on gonadotropin hormones levels in blood plasma of common carp (*Cyprinus carpio*) during artificial spawning processes. Iraqi Journal Aquaculture, 41(1): 28–41. doi: 10.58629/ijaq.v14i1.81
- Alcantar-Vazquez J.P., Rueda-Curiel P., Calzada-Ruiz D., Antonio-Estrada C. and Moreno De La Torre R. 2015.** Feminization of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* by estradiol 17- β effects on growth, gonadal development and body composition. Hidrobiologica, 5(2): 275–283.
- Barrero M., Small C.B.D., Abramo L.R., Waldbeiser G.C., Hanson L.A. and Kelly A.M. 2011.** Effect

- of carp pituitary extract and luteinizing hormone releasing analog hormone on reproductive indices and spawning of 3-year-old channel catfish. *North American Journal of Aquaculture*, 70(2): 138–146. doi: 10.1577/A06-072.1
- Brown C.L., Urbinati E.C., Weimin Zhang W., Brown S.B. and Michelle McComb-Kobza M. 2014.** Maternal thyroid and glucocorticoid hormone interactions in larval fish development, and their applications in aquaculture. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 22: 207–220. doi: 10.1080/23308249.2014.918086
- Das S., Chhotaray C., Das Mahapatra K., Saha J.N., Baranski M. and Robinson N. 2014.** Analysis of immune-related ESTs and differential expression analysis of few important genes in lines of rohu (*Labeo rohita*) selected for resistance and susceptibility to *Aeromonas hydrophila* infection. *Molecular Biology Report*, 41: 7361–7371. doi: 10.1007/s11033-014-3625
- Deal C.K. and Volkoff H. 2020.** The role of the thyroid axis in fish. *Frontiers in Endocrinology*, 11: 1–25. doi: 10.3389/fendo.2020.596585
- Eales J.G. 2006.** Modes of action and physiological effects of thyroid hormones in fish. *Fish Endocrinology*, 2: 767–808. doi: 10.1139/z04-099
- Elakkanai P., Francis T., Ahilan B., Jawahar P., Padmavathy P. and Jayakumar N. 2015.** Role of GnRH, HCG and kisspeptin on reproduction of fishes. *Indian Journal of Science and Technology*, 8(17): 1–10. doi: 10.17485/ijst/2015/v8i17/65166
- Eslamizadeh E., Mabudi H., Roomiani L., Javaheri Baboli M. and Chelema Dezfulezhad M. 2022.** Comparative study of pituitary extract, LHRH and thyroxine on sex steroids, histochemistry and (*Labeo rohita*) producing fatty acids [In Persian]. *Animal Biology*, 14(4): 135–152. doi: 10.22034/ascij.2022.1934909.1269
- Eslamizadeh E., Mabudi H., Roomiani L., Javaheri Baboli M. and Chelema Dezfulezhad M. 2024.** Effects of thyroxine and luteinizing hormone releasing hormone on reproductive physiology of rohu (*Labeo rohita*): Insights into spawning performance, oocyte maturation, steroidogenesis, and follicular development genes. *Animal Reproduction Science*, 267: 1–13 (107542). doi: 10.1016/j.anireprosci.2024.107542
- Farahani S. and Jamili S. 2010.** The histochemical survey of lipid and protein of female mullie liver and ovary (*Pocilia sphenops*) and histological study of calcium and lipid on three groups (adult,

- preadult and immature) [In Persian]. Journal of Marine Science and Technology Research, 3: 20–30.
- Ismail R.F., Assem S.S., Sharaf H.E.R., Zeitoun A.A.M. and Srour T.M.A. 2023.** The effect of thyroxine (T4) and goitrogen on growth, liver, thyroid and gonadal development of red tilapia (*O. mossambicus* × *O. urolepis hornorum*). Aqua Inter: 1–18. doi: 10.1007/s10499-023-01210-8
- Kar B., Mohanty J., Hemaprasanth K.P. and Sahoo P.K. 2013.** The immune response in rohu, *Labeo rohita* (Actinopterygii: Cyprinidae) to *Argulus siamensis* (Branchiura: Argulidae) infection: Kinetics of immune gene expression and innate immune response. Aquaculture Research, 2013: 1–17. doi: 10.1111/are.12279
- Kho K.H., Sukhan Z.P., Yang S., Hwang N. and Lee W. 2023.** Gonadotropins and sex steroid hormones in captive-reared small yellow croaker (*Larimichthys polyactis*) and their role in female reproduction dysfunction. International Journal of Molecular Sciences, 24(10): 1–20 (8919). doi: 10.3390/ijms24108919
- Kinoshita M., Rodler D., Sugiura K., Matsushima K., Kansaku N., Tahara K., Tsukada A., Ono H., Yoshimura T., Yoshizaki N., Tanaka R., Kohsaka T. and Sasanami T. 2010.** Zona pellucida protein ZP2 is expressed in the oocyte of Japanese quail (*Coturnix japonica*). Reproduction, 139(2): 359–371. doi: 10.1530/REP-09-0222
- Kocmarek A.L., Ferguson M. and Danzmann R.G. 2014.** Differential gene expression in small and large rainbow trout derived from two seasonal spawning groups. BMC Genomics, 15: 1–19. doi: 10.1186/1471-2164-15-57
- Kucharczyk D., Malinovskyi O., Nowosad J., Kowalska A. and Cejko B.I. 2021.** Comparison of responses to artificial spawning of ruffe (*Gymnocephalus cernua*) specimens captured from their natural habitat to those produced in cultured conditions. Animal Reproduction Science, 225: 124–139. doi: 10.1016/j.anireprosci.2020.106684
- Mabudi H., Jamili S., Erfani Majd N., Vosoughi G., Fatemi M.R. and Rashed S. 2011.** The effects of ghrelin on ovary histology in *Barbus sharpeyi*. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 95: 599–601. doi: 10.1111/j.1439-0396.2010.01089.x
- Malcolm D.C., Donaldson J.W., Gregory G.V. and Joseph I.W. 2019.** Practical endocrinology and diabetes in children. Reproduction, 15(2): 282–328. doi: 10.4183/aeb.2019.282
- Malik M.A., Gupta S., Varghese T., Jahageerda S., Nayak S.K.,**

- Reang D., Bhat I.A., Mahadevaswamy C.G., Chuphal N., Dar S.A. and Prabhakaran A. 2023.** Chitosan-hypothalamic hormonal analogue nanoconjugates enhanced in Indian major carp, *Labeo rohita*. *Frontiers in Marine Science*, 10: 1–15. doi: 10.3389/fmars.2023.1311158
- Mohammadian T., Silavi M., Hosseini A., Rouhani S., Mohammadi A. and Heidari B. 2014.** Comparison of the effect of 3-stage injection of LHRH- α 2+PG with 2-stage injection of pituitary extract on the reproductive performance of benny fish [In Persian]. *Iranian Veterinary Journal*, 10(1): 85–96.
- Mohammadzadeh S., Yeganeh S., Moradian F., Milla S. and Falahatkar B. 2021.** Spawning induction in sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*) with recombinant GnRH: Analysis of hormone profiles and spawning indices. *Aquaculture*, 533: 165–179. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.736108
- Mokhtar D.M. 2019.** Characterization of the fish ovarian stroma during the spawning season: Cytochemical, immunohistochemical and ultrastructural studies. *Fish and Shellfish Immunology*, 94: 566–579. doi: 10.1016/j.fsi.2019.09.050
- Mold D.E., Dinitz A.E. and Sambandan D.R. 2009.** Regulation of zebrafish zona pellucida gene activity in developing oocytes. *Biology Reproduction*, 81(1): 101–110. doi: 10.1095/biolreprod.108.071720
- Moulik S.R., Pal P., Majumder S., Mallick B., Gupta S. and Guha P. 2016.** Gonadotropin and sf-1 regulation of Cyp19a1a gene and aromatase activity during oocyte development in the Rohu, *L. rohita*. *Comparative Biochemistry and Physiology (A)*, 196: 1–10. doi: 10.1016/j.cbpa.2016.02.004
- Muchlisin Z.A. 2014.** A general overview on some aspects of fish reproduction. *Aceh International Journal of Science and Technology*, 3(1): 43–52. doi: 10.13170/AIJST.0301.05
- Mylonas C.C., Fostier A. and Zanuy S. 2010.** Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General Comparative Endocrinology*, 165(3): 516–534. doi: 10.1016/j.ygcen.2009.03.007
- Naeem M., Zuberi A., Ashraf M., Ahmad W., Ishtiaq A. and Hasan N. 2013.** Induced breeding of *Labeo rohita* through single application of ovaprim-C at Faisalabad Hatchery, Pakistan. *African Journal of Biotechnology*, 12(19): 2122–2126. doi: 10.5897/AJB12.1037
- Omidian N., Asghari M., Heidari B., Valipour A. and Rabouti H. 2022.** Investigating the biological

- activity of red fish case peptin after adding an acetyl group to the amino terminal tyrosine residue [In Persian]. *Journal of Fisheries Science and Techniques*, 12(1): 81–99.
- Pereira T., Boscolo C., Moreira R.G. and Batlouni S.R. 2017.** The use of mGnRHa provokes ovulation but not viable embryos in *Leporinus macrocephalus*. *Aquaculture International*, 25: 515–529. doi: 10.1007/s10499-016-0049-2
- Pfaffl M.W. 2001.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9): 45–62. doi: 10.1093/nar/29.9.e45
- Pham H.Q., Nguyen A.T., Nguyen M.D. and Arukwe A. 2010.** Sex steroid levels, oocyte maturation and spawning performance in Waigieu seaperch (*Psammoperca waigiensis*) exposed to thyroxin, human chorionic gonadotropin, luteinizing hormone releasing hormone and carp pituitary extract. *Comparative Biochemistry Physiology (A)*, 55(2): 223–230. doi: 10.1016/j.cbpa.2009.10.044
- Podhorec P., Socha M., Ammar I.B., Sokolowska-Mikolajczyk M., Brzuska E. and Milla S. 2016.** The effects of GnRHa with and without dopamine antagonist on reproductive hormone levels and ovum viability in *tench Tinca tinca*. *Aquaculture*, 465: 158–163. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.09.012
- Rahman M.M., Kundu S., Biswas P., Parvez M.S., Rouf M.A. and Asaduzzaman S. 2021.** Influence of maternal weight, age, larval feeding and their interactions on the hatchery outcomes of an Indian major carp (*Labeo rohita*, Hamilton 1822). *Aquaculture Reports*, 19: 135–156. doi: 10.1016/j.aqrep.2021.100633
- Rasheeda M., Sridevi P. and Senthilkumaran B. 2010.** Cytochrome P450 aromatases: Impact on gonadal development, recrudescence and effect of hCG in the catfish, *Clarias gariepinus*. *General Comparative Endocrinology*, 167(2): 234–245. doi: 10.1016/j.ygcen.2010.03.009
- Shirali S., Erfani Majd N., Mesbah M. and Seifiabad Shapoori M.R. 2011.** Histological and histometrical study of common carp ovarian development during breeding season in Khouzestan province in Iran. *International Journal of Veterinary Research*, 5(4): 260–268. doi: 10.22059/ijvm.2011.23583
- Siddique M.A.M., Linhart O., Krejszeff S., Zarski D., Krol J. and Butts I. 2016.** Effects of preincubation of eggs and activation medium on the percentage of eyed embryos in ide (*Leuciscus idus*), an externally fertilizing fish. *Theriogenology*,

- 85(5): 849–455. doi: 10.1016/j.therio genology
- Soyano K., Amagai T., Yamaguchi T., Mushirobira Y., Xu W.G. and Pham N.T. 2022.** Endocrine regulation of maturation and sex change in groupers. *Cells*, 11(5): 825–834. doi: 10.3390/cells11050825
- Tamaru C.S., Kelley C.D., Lee C.S., Aida K., Hanyu I. and Goetz F. 1991.** Steroid profiles during maturation and induced spawning of the striped mullet, *Mugil cephalus* L. *Aquaculture*, 95: 149–168. doi:10.1016/0044-8486(91)9008 2-I
- Tang B., Hu W., Hao J. and Zhu Z. 2010.** Developmental expression of steroidogenic factor-1, cyp19a1a and cyp19a1b from common carp (*Cyprinus carpio*). *General Comparative Endocrinology*, 167(3): 408–416. doi: 10.1016/j. ygcen.2010.03.017
- Teimuri M., Mohammadizadeh F. and Bahri A. 2018.** Artificial propagation of serum fish (*Cichlasomaseverum* sp.) using carp pituitary hormone extract (CPE) and synthetic hormone GnRHa [In Persian]. *Aquaculture Development Journal*, 12(3): 31–40.
- Tovo-Neto A., Rodrigues M., Habibi H. and Nobrega R. 2018.** Thyroid hormone actions on male reproductive system of teleost fish. Thyroid hormone actions on male reproductive system of teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 265: 230–236. doi: 10.1016/j.ygcen.2018.04.023
- Uno T., Ishizuka M. and Itakura T. 2012.** Cytochrome P450 (CYP) in fish. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34(1): 1–13. doi: 10.1016/j.etap.2012.02.004
- Yousefian M., Ghanei M., Pourgolam R. and Rostami H.K.H. 2009.** Gonad development and hormonal induction in artificial propagation of grey mullet, *Mugil cephalus* L. *Research Journal of Fisheries and Hydrobiology*, 4(2): 35–40.
- Yu J., Li D., Zhu J., Zou Z., Xiao W., Chen B. and Yang H. 2022.** Effects of defferent oxytocin and temperature on reproductive activity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Based on sex steroid hormone and GTHR gene expression. *Fishes*, 7(316): 1–14. doi: 10.3390/fishes7060316
- Zadmajid V. and Butts I. 2018.** Spawning performance, serum sex steroids, and ovarian histology in wild-caught Levantine scraper, *Capoeta damascina* (Valenciennes, 1842) treated with various doses of sGnRHa+ domperidone. *Journal of Animal Science*, 96(12): 5253–5264. doi: 10.1093/jas/sky348
- Zamri A.S., Zulperi Z., Esa Y. and Syukri F. 2022.** Hormone application for artificial breeding towards sustainable aquaculture- A

review. *Pertanika Journal of Social Sciences and Humanities*, 45(4): 97–118. doi: 10.47836/pjtas.45.4.11

Zulkifle M., Zulperi Z. and Christianus A. 2021. Effects of pH, feeding regime and thyroxine

on growth and survival of *Parosphromenus tweediei* (Kottelat and Ng, 2005) fry. *Journal of Survey in Fisheries Sciences*, 8: 89–105. doi: 10.17762/sfs.v8i1.71



Research Paper

The effect of pituitary gland extract on steroid hormones, reproductive performance, histology and expression of Cyp191a1, ZP2 and SF-1 genes in breeding *Labeo rohita* ovary

Ehsan Eslamizadeh¹, Hadideh Mabudi^{2*}, Laleh Roomiani³, Mehran Javaheri Baboli³,
Mojdeh Chelehmal Dezfulejad^{3,4}

DOI: 10.22124/japb.2024.27317.1537

Received: May 2024

Accepted: September 2024

Abstract

The study of reproductive activity mechanisms in fishes, which makes it possible to regulate sexual periods, is important and is increasingly directed towards assisted reproduction technologies. In this study, 90 breeding female rohu fish (*Labeo rohita*) with an average weight of 3 ± 0.41 kg were used and the effect of two doses of pituitary gland extract were investigated on fish spawning performance, the level of sex steroids, the expression of genes related to steroidogenesis and ovary histology. This study showed that the highest spawning success was observed with a pituitary dose of 5 mg/kg, the incubation period of the female decreased with increasing dose and the fertility of this treatment was significantly higher than other groups. Treatment with pituitary gland extract in both doses caused a significant increase in gonadosomatic index, percentage of fertilization, hatching and survival of larvae compared to the control and sham groups. At 12 hours after injection, pituitary treatments showed a significant increase in the levels of steroid hormones and the expression of related genes in the ovarian tissue compared to the control and sham treatments. Microscopic examinations of ovarian tissue follicles showed a steroidogenic change in the presence of asynchronous ovaries in this species, in which oocyte maturation was accelerated by injection of pituitary extract, especially a dose of 5 mg/kg. As a result, the findings showed that rohu females treated with pituitary extract did ovulate and the extract of the pituitary has synergistic effects on hormonal factors and increases the fertility and survival of the larvae of rohu.

Key words: Steroid, Histology, Gene Expression, Ovulation, Rohu.

1- Ph.D. in Aquaculture Reproduction and Breeding, Department of Fisheries, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran.

2- Assistant Professor in Department of Fisheries, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran.

3- Associate Professor in Department of Fisheries, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran.

4- Associate Professor in Aquaculture Research Center, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran.

*Corresponding Author: mikhak1311@yahoo.com