تغییرات سطح پلاسمایی هورمون‌های استروئیدی (۱۷بتا استرادیول، ۱۷ آلفا ۲۰ بتا هیدروکسی پروژسترون و کورتیزول) و الکترولیت‌ها (کلسیم، سدیم و پتاسیم) طی مراحل مختلف چرخه‌ی تولیدمثلی ماهی کلمه خزری (*Rutilus rutilus caspicus*) در بندر ترکمن (جنوب دریای خزر)

مریم آخوندیان[۱،۲]*، احمد سواری[۳]، نگین سلامات[۴]، عبدالعلی موحدی‌نیا[۵]، محمدعلی سالاری[۶]

۱- دانشجوی دکتری زیست‌شناسی جانوران دریا، گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

۲- استادیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه مازندران، استان مازندران، پست الکترونیکی: m.akhoundian@umz.ac.ir

۳- استاد گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، استان خوزستان، خرمشهر، پست الکترونیکی: savari53@yahoo.com

۴- استادیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، استان خوزستان، خرمشهر، پست الکترونیکی: salamatnegin@yahoo.com

۵- استادیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، استان خوزستان، خرمشهر، پست الکترونیکی: amovahedinia@yahoo.com

۶- استادیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، استان خوزستان، خرمشهر، پست الکترونیکی: salari@kmsu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۲/۸/۱۵ ** نویسنده مسوول* *تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۱۶*

© نشریه علمی ـ پژوهشی اقیانوس‌شناسی ۱۳۹۴، تمامی حقوق این اثر متعلق به نشریه اقیانوس‌شناسی است.

چکیده

در این مطالعه تغییرات پلاسمایی استروئیدهای جنسی (۱۷بتا استرادیول، ۱۷ آلفا ۲۰ بتا هیدروکسی پروژسترون) و کورتیزول و الکترولیت‌های کلسیم، پتاسیم و سدیم در جنس ماده ماهی کلمه خزری *R. rutilus caspicus* طی یک چرخه‌ی تولیدمثلی در جنوب شرقی دریای خزر بررسی گردید. استروئیدهای جنسی یا تکنیک رادیو ایمونو اسی (RIA)، کورتیزول به روش الایزا و الکترولیت‌ها با روش شعله سنجی اندازه‌گیری شدند. حداکثر غلظت پلاسمایی E2 در مرحله زرده‌سازی اووسیت‌ها (۹/۰۱ ng/ml ±۱۴۷/۱۶) و حداکثر سطح پلاسمایی هیدروکسی پروژسترون (۰/۶۴ ng/ml±۴/۷۱) و کورتیزول (۲/۲۵ ng/ml ± ۱۲/۶۷) پیش از تخم‌ریزی، مشاهده شد. یون کلسیم در مرحله زرده‌سازی به حداکثر مقدار خود رسید و با پیشرفت فرآیند زرده‌سازی به‌شدت کاهش یافت. یون پتاسیم نیز کاهش شدیدی را در مرحله‌ی رسیدگی اووسیت‌ها نشان داد (P>۰/۰۵).

کلمات کلیدی: *Rutilus rutilus caspicus*، چرخه‌ی تولیدمثلی، استروئیدهای جنسی، کورتیزول، الکترولیت، دریای خزر.

۱. مقدمه

در فرآیند تکامل و پیشرفت اقتصادی هر کشور، توجه به منابع آبزی و افزایش ذخایر آن‌ها در آب‌های داخلی از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. یکی از مسایل مهم مدیریت ذخایر، تعیین ویژگی‌های زیست‌شناختی گونه‌های مهم ماهیان صنعتی است که امکان بازده بیشتر منابع غذایی زیست‌بوم‌های آبی و افزایش تولیدات دریایی با کیفیت بهتر را فراهم می‌نماید. از آنجایی که شناخت ویژگی‌های زیستی و تعیین زمان تخم‌ریزی ماهی، در ارزیابی، مدیریت و بازسازی ذخایر آن تأثیر به‌سزایی دارد، لذا موفقیت در دست‌یابی به این اهداف مستلزم انجام مطالعات در زمینه‌ی شناخت فیزیولوژیک چرخه‌ی تولیدمثلی ماهی است. مطالعه‌ی فرآیند تولیدمثل صرف نظر از کاربرد در علم ارزیابی ذخایر، بهره‌برداری از الگوهای طبیعی در تکثیر و پرورش آبزیان را نیز فراهم می‌سازد. مطالعه تغییرات هورمونی و بیوشیمیایی نظیر تغییر در سطوح هورمون‌های جنسی و الکترولیت‌های سرم خون از جمله موارد مرتبط با فیزیولوژی تولیدمثل است که نقش مهمی در مطالعات پایه و کاربردی در این زمینه دارد. سنجش هورمون‌ها و بررسی‌های فیزیولوژیک سرم خون و نیز بررسی تاثیر عوامل محیطی بر چرخه‌ی تولیدمثلی ماهیان به‌عنوان شاخصی در جهت تعیین وضعیت تولیدمثلی و مراحل جنسی، در کنار استفاده از شاخص‌های بافت‌شناختی در بررسی چرخه تولیدمثلی ماهی‌ها بسیار حائز اهمیت است (حسین‌زاده صحافی، ۱۳۸۰)

ماهی کلمه از ماهیان با ارزش اقتصادی – شیلاتی دریای خزر و غذای ماهیان خاویاری و دیگر ماهیان گوشت‌خوار است (حسین زاده صحافی، ۱۳۸۰). همچنین جایگاه ویژه‌ای در سبد غذایی مردم حاشیه دریای خزر دارد. اما متاسفانه در سال‌های اخیر به‌دلایل مختلفی از جمله آلودگی آب‌ها، تخریب رودخانه‌ها، ایجاد سد در مسیر مهاجرت و همچنین صید قاچاق، میزان ذخایر آن به‌شدت کاهش یافته، به‌طوری‌که این ماهی جزء گونه‌های در معرض تهدید منطقه محسوب می‌گردد (Kiabi et al., 1999). حفاظت و بازسازی ذخایر این ماهی ارزشمند در ایران از طریق تکثیر مصنوعی و رهاسازی لاروها در آب‌های طبیعی صورت می‌گیرد (کشیری و همکاران، ۱۳۹۱). همچنین از آنجا که هدف عینی تمام مراکز تکثیر، تولید مناسب تخم و لارو با کیفیت بالا در زمان‌های مورد نیاز برای پرورش‌دهندگان است، لذا آبزی‌پروری زمانی بیشترین بازده را دارد که پرورش‌دهنده قادر باشد محصولی در اندازه‌ی مناسب و با کیفیت خوب در تمام سال تولید نماید و این هدف عینی نیز تنها زمانی تحقق می‌یابد که کنترل کاملی بر میزان رسیدگی جنسی و زمان‌های تخم‌ریزی و به تبع آن تولید تخم و لارو ماهیان وجود داشته باشد. در این راستا، در این تحقیق مطالعه‌ی چرخه‌ی تولید مثلی سالانه‌ی این ماهی با تاکید بر الگوی تغییرات هورمون‌های جنسی و الکترولیت‌های سرم خون مورد بررسی قرار گرفت تا به کمک این اطلاعات و با شناخت کامل‌تر از الگوی تولیدمثلی این ماهی بتوان نسبت به ارایه راهکارهای لازم و مناسب جهت بهره‌برداری بهینه و نیز حفظ ذخایر این گونه‌ی ارزشمند گام برداشت.

۲. مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی تغییرات استروئیدهای جنسی و الکترولیت‌ها در پلاسمای خون جنس ماده‌ی ماهی کلمه‌ی خزری در محیط طبیعی، از مهرماه سال ۱۳۹۰ (فعال شدن چرخه‌ی جنسی ماهی) تا پایان فروردین‌ماه ۱۳۹۱ (پایان دوره تخم‌ریزی)، نمونه‌برداری از ماهیان بالغ ماده کلمه در ۸ نوبت (۲۰ مهر، ۲۰ آبان، ۲۱ آذر، ۲۰ بهمن، ۱۰ و ۲۸ اسفند، ۱۵ و ۳۰ فروردین) انجام گردید. نمونه‌برداری از ماهی کلمه‌ی ترکمنی در ایستگاه بندر ترکمن و رودخانه قره سو انجام شد و در هر نوبت نمونه‌برداری، ۱۰–۷ نمونه ماهی با کمک صیادان بومی با استفاده از تور پره تهیه گردید.

در هر نوبت نمونه‌برداری، بلافاصله پس از صید، ماهیان با استفاده از عصاره‌ی میخک با غلظت ppm ۱۵۰، بیهوش شدند (شریف‌پور و همکاران، ۱۳۸۱) و خون‌گیری با استفاده از سرنگ هپارینه از ناحیه سیاهرگ دمی ماهیان، انجام شد (Seale et al., 2002). پس از خون‌گیری، سرسرنگ جدا شده و محتویات آن به آرامی به میکروتیوب منتقل شده و روی پودر یخ به آزمایشگاه انتقال یافت. سپس نمونه‌های خون جهت جداسازی سرم، با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۲۵ دقیقه، سانتریفیوژ گردید. سرم جدا شده به داخل ویال منتقل شده و تا زمان

بررسی‌های بیوشیمیایی در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد، نگهداری شد (Fontaine et al., 2006).

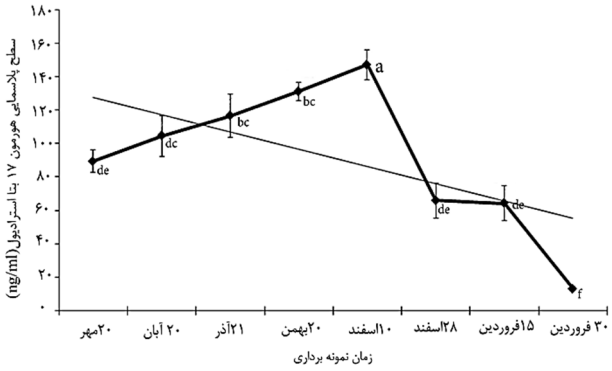
اندازه‌گیری استروئیدهای پلاسما، با تکنیک رادیوایمونو اسی (RIA) انجام شد. غلظت هورمون ۱۷ بتا استرادیول با کیت Specteria، ساخت کشور فنلاند و هورمون ۱۷ آلفا ۲۰ بتا هیدروکسی پروژسترون با استفاده از کیت Immunotech ساخت کشور فرانسه اندازه‌گیری گردید. مقادیر هورمون کورتیزول نیز با استفاده از کیت دیاپلاس ساخت کشور آمریکا و با تکنیک الایزا انجام شد (Burtis and Ashweed, 1994). اندازه‌گیری غلظت یون های سدیم و پتاسیم در سرم خون، با روش شعله‌سنجی و با دستگاه Flame Photometer Jenway مدل PFP7 و یون کلسیم نیز با روش رنگ‌سنجی و با استفاده از کیت پارس آزمون ساخت کشور ایران به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی Varian مدل ۱۲۰۰ انجام شد.

برای تجزیه و تحلیل کلیه داده‌ها، از نرم‌افزار SPSS 18 Stats Direct و برای رسم نمودارها از برنامه Excel 2010 استفاده گردید. داده‌ها ابتدا جهت اطمینان از نرمال بودن با آزمون Shapiro-wilk بررسی شدند، سپس در صورت نرمال بودن توزیع داده‌های مورد بررسی، با استفاده از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (Oneway ANOVA) در سطح اطمینان ۹۵٪، ابتدا اختلاف کلی بین میانگین‌ها مشخص شده و سپس با آزمون دانکن (Duncan)، گروه‌ها از یکدیگر تفکیک گردیدند و در مواقعی که داده‌ها نرمال نبودند، از آزمون ناپارامتری کروسکال – والیس (Kruskal-Wallis) جهت مقایسه داده‌ها استفاده شد.

۳. نتایج

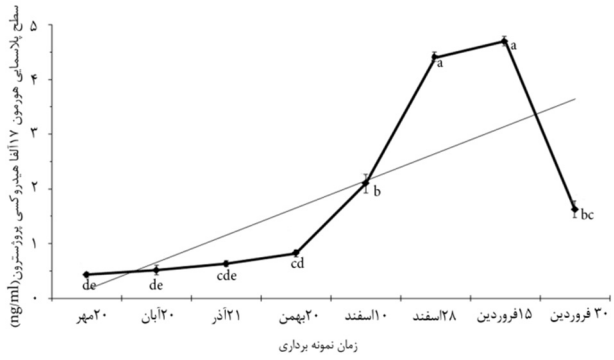
۳- ۱. استروئیدهای جنسی و کورتیزول

میانگین غلظت پلاسمایی هورمون ۱۷ بتا استرادیول، از مهرماه به آهستگی شروع به افزایش نموده و در ۱۰ اسفند ماه به بیشترین مقدار خود (۹/۰۱ ± ۱۴۷/۱۶ نانوگرم در میلی‌لیتر) رسید و سپس مقدار آن کاهش یافت. با تخم‌ریزی و تخلیه گنادها در ۳۰ فروردین ماه، سطح پلاسمایی این هورمون در ماهیان به حداقل مقدار خود (۱/۲۷±۱۳/۱۲ نانوگرم در میلی‌لیتر) کاهش یافت (شکل ۱). میانگین غلظت پلاسمایی هورمون ۱۷ بتا استرادیول در ۱۰ اسفند ماه به‌طور معنی‌داری بالاتر از سایر زمان‌های نمونه‌برداری بود (P<۰/۰۵).



شکل ۱: میانگین غلظت پلاسمایی هورمون ۱۷ بتا استرادیول در یک چرخه‌ی تولیدمثلی ماهی کلمه

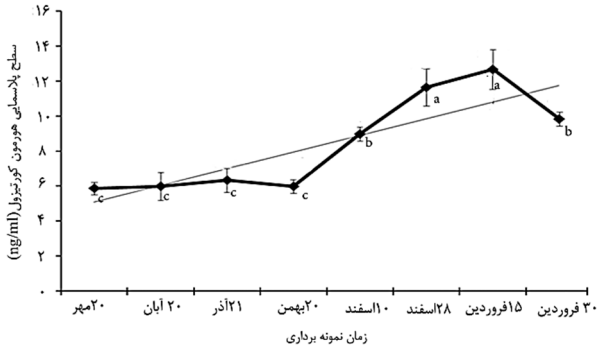
میانگین غلظت پلاسمایی هورمون ۱۷ آلفا۲۰ بتا هیدروکسی پروژسترون (17OHP) در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری اختلاف معنی‌دار آماری نشان داد (P<۰/۰۵). حداقل سطح پلاسمایی این هورمون (۰/۰۵± ۰/۴۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر) در ماهیان صید شده در اواسط مهر ماه مشاهده گردید. مقدار این هورمون از ۲۰ بهمن افزایش تدریجی یافته و در اواخر اسفند ماه افزایش شدیدی نشان داد. در نیمه‌ی فروردین ماه، به حداکثر مقدار خود (۰/۶۴±۴/۷۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر) رسید و در زمان تخم‌ریزی (اواخر فروردین ماه)، به‌شدت کاهش یافت (شکل ۲).



شکل ۲: میانگین غلظت پلاسمایی هورمون ۱۷ آلفا۲۰ بتا هیدروکسی پروژسترون در یک چرخه‌ی تولید مثلی ماهی کلمه

حداقل غلظت پلاسمایی هورمون کورتیزول در ماهیان مورد مطالعه، در مهرماه (۰/۳۷±۵/۸۸ نانوگرم بر میلی‌لیتر) مشاهده گردید و مقدار این هورمون تا اواخر بهمن ماه تغییرات معنی‌داری

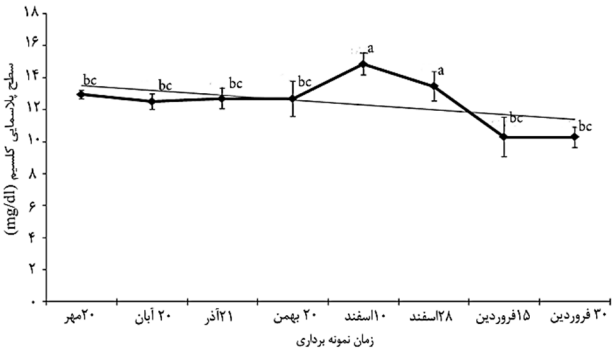
را نشان نداد، اما پس از آن از ۲۰ بهمن تا ۱۵ فروردین ماه، به تدریج غلظت این هورمون در سرم خون ماهی افزایش یافت و در اواسط فروردین‌ماه دقیقا پیش از تخم‌ریزی ماهی، به حداکثر مقدار خود (۲/۲۵ ± ۱۲/۶۷ نانوگرم بر میلی‌لیتر) رسیده و سپس هم‌زمان با آغاز تخم‌ریزی ماهیان، مقدار این هورمون نیز کاهش یافت (شکل ۳).



شکل ۳: میانگین غلظت پلاسمایی هورمون کورتیزول در یک چرخه‌ی تولید مثلی ماهی کلمه

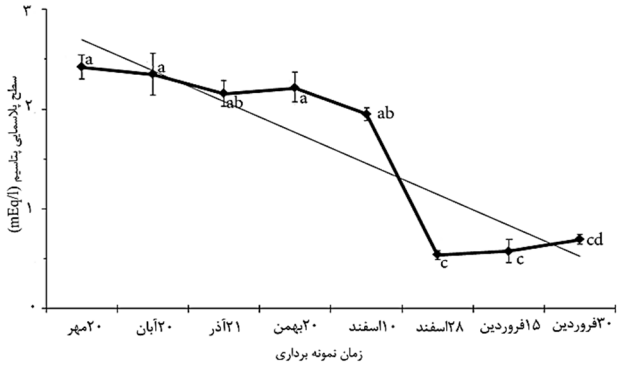
۳-۲. سنجش الکترولیت‌های سرم خون

میانگین غلظت پلاسمایی یون کلسیم از مهرماه تا آذرماه نسبتا ثابت بوده و پس از آن افزایش معنی‌داری را در ۱۰ و ۲۸ اسفند ماه نشان داد (P<۰/۰۵) و سپس در مراحل نهایی تکامل اووسیت‌ها (اواخر اسفندماه تا اواسط فروردین‌ماه) روندی نزولی در پیش گرفت (شکل ۴). حداقل مقدار این یون (۱۰/۲۸±۰/۶۴ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) در ۳۰ فروردین‌ماه و حداکثر مقدار آن (۱۲/۸۴±۰/۶۸ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) در ۱۰ اسفند ماه مشاهده گردید.



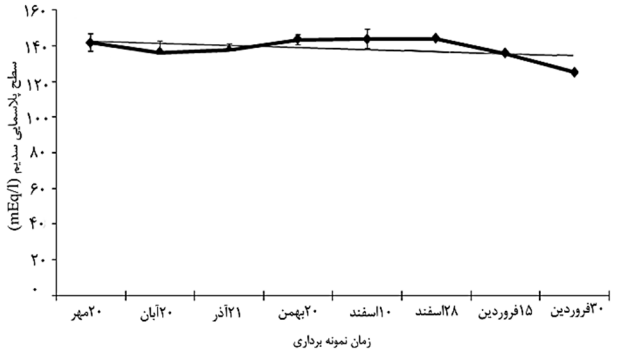
شکل ۴: میانگین تغییرات غلظت یون کلسیم در پلاسمای خون ماهی کلمه در یک چرخه‌ی تولید مثلی

نتایج به‌دست آمده هم‌چنین نشان داد که غلظت یون پتاسیم در پلاسمای خون ماهی کلمه خزری، از مهرماه تا ۱۰ اسفندماه تقریبا ثابت بوده، اما در اواخر اسفند ماه به حداقل مقدار خود (۰/۵۴±۰/۰۴ میلی اکی والان بر لیتر) رسید و از آن پس تا زمان تخم‌ریزی ماهیان (۳۰ فروردین)، میانگین غلظت این یون در پلاسما تغییرات معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵) (شکل ۵). مقدار این یون در ۲۸ اسفند، ۱۵ و ۳۰ فروردین به طور معنی‌داری کمتر از سایر زمان‌های نمونه‌برداری بود.



شکل ۵: میانگین تغییرات غلظت یون پتاسیم در پلاسمای خون ماهی کلمه در یک چرخه‌ی تولید مثلی

غلظت پلاسمایی یون سدیم در هیچ یک از زمان‌های نمونه‌برداری، اختلاف معنی‌دار آماری نشان نداد (P>۰/۰۵) (شکل ۶).

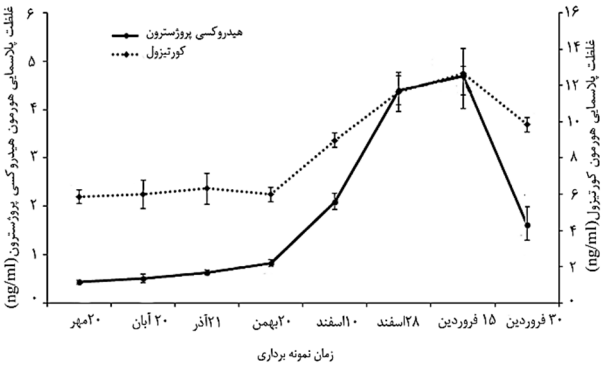


شکل ۶: میانگین تغییرات غلظت یون سدیم در پلاسمای خون ماهی کلمه در یک چرخه‌ی تولید مثلی

۳-۳. همبستگی بین هورمون‌ها و الکترولیت‌ها

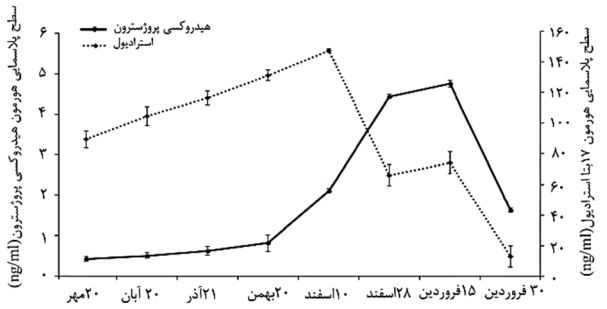
غلظت پلاسمایی هورمون‌های هیدروکسی پروژسترون و کورتیزول از ۲۰ بهمن‌ماه تا ۱۵ فروردین‌ماه، افزایش هم‌زمانی

داشته و همبستگی مثبت معنی‌داری با یکدیگر نشان داد (P<۰/۰۵) (شکل ۷) و پس از این زمان نیز تا زمان تخم‌ریزی ماهی (۳۰ فروردین‌ماه) کاهش معنی‌دار هم‌زمانی در مقدار این دو فاکتور مشاهده گردید.



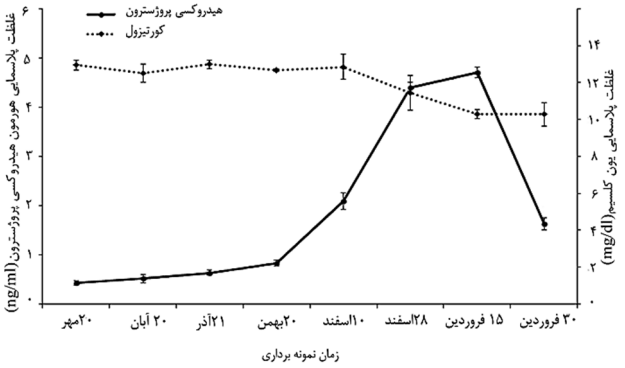
شکل ۷: همبستگی بین کورتیزول و ۱۷ آلفا هیدروکسی پروژسترون در مراحل مختلف چرخه‌ی تولیدمثلی ماهی کلمه

غلظت هورمون‌های استرادیول و هیدروکسی پروژسترون، در همه‌ی زمان‌های نمونه‌برداری به جز ۲۸ اسفندماه، همبستگی مثبت معنی‌داری با یکدیگر نشان داد (P<۰/۰۵). از ۲۰ مهرماه تا ۱۰ اسفندماه، میانگین غلظت این دو هورمون به طور هم زمان افزایش یافت، اما از تاریخ ۲۸ اسفندماه، همبستگی منفی معنی‌داری بین آنها مشاهده گردید (P>۰/۰۵)، به‌طوری‌که غلظت هورمون هیدروکسی پروژسترون به‌شدت افزایش یافت و برعکس، غلظت هورمون استرادیول در این زمان، کاهش شدیدی را نشان داد (شکل ۸).



شکل ۸: همبستگی بین غلظت E2 و 17OHP در مراحل مختلف چرخه‌ی تولید مثلی ماهی کلمه

غلظت یون کلسیم و هورمون هیدروکسی پروژسترون، در ۲۸ اسفندماه و ۱۵ فروردین‌ماه همبستگی منفی معنی‌داری با یکدیگر نشان داد، به‌طوری‌که با افزایش غلظت هیدورکسی پروژسترون، کاهش معنی‌داری در یون کلسیم پلاسما مشاهده گردید (P<۰/۰۵) (شکل ۹).



شکل ۹: همبستگی بین غلظت پلاسمایی یون کلسیم و ۱۷ آلفا هیدروکسی پروژسترون در مراحل مختلف چرخه‌ی تولیدمثلی ماهی کلمه

۴. بحث و نتیجه‌گیری

تولیدمثل مکانیسمی کلیدی برای بقای گونه‌ها است؛ با این وجود، مدل‌ها و رفتارهای تولیدمثلی بسیار متنوعی در انواع گونه‌های ماهیان استخوانی در آب‌های مختلف دنیا، وجود دارد (Geraudie et al., 2010). در این تحقیق به تغییرات هورمون‌های استروئیدی و الکترولیت‌ها در پلاسمای خون ماهی *Rutilus rutilus caspicus* یا "کلمه خزری" در طول یک چرخه‌ی تولیدمثلی سالانه پرداخته شده است.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در مراحل اولیه تکامل اووسیت‌ها، غلظت پلاسمایی E2 پایین بوده است ولی غلظت این هورمون در مرحله‌ی زرده‌سازی اووسیت‌ها، افزایش یافته و سپس با آغاز مرحله‌ی رسیدگی اووسیت‌ها، کاهش شدیدی در مقدار این هورمون مشاهده گردید (شکل ۱). در ماهیان استخوانی، مراحل رشد و رسیدگی اووسیت‌ها تحت کنترل هورمون‌های مختلفی از جمله گنادوتروپین‌های هیپوفیزی، پروژسترون، استرادیول و تستسترون است (Lee and Yang, 2002). گنادوتروپین‌های هیپوفیز، باعث تحریک ترشح E2 توسط سلول-های لایه‌ی فولیکولی اووسیت می‌شوند، که خود محرک سنتز و تیلوژنین (پیش ساز زرده) در هپاتوسیت‌های کبدی است (Tyler, 1996). لذا افزایش سطح پلاسمائی E2، موجب تشدید فرآیند زرده‌سازی و تجمع پروتئین‌های زرده در اووسیت‌ها می‌گردد. نتایجی مشابه با تحقیق حاضر در گونه‌های متعددی از

ماهیان استخوانی عالی، مشاهده گردیده است که در همه‌ی آن‌ها، سطح پلاسمایی E2 در طول مرحله زرده‌سازی اووسیت‌ها به‌شدت افزایش یافته و درست قبل از ورود به مرحله‌ی رسیدگی، مقدار آن کاهش یافته است (Nagahama, 1994; Jobling et al., 2002; Thomas, 2003; Mehrpoosh et al., 2013).

همچنین در ماهی مورد مطالعه افزایش معنی‌داری در مقدار هورمون 17OHP در مرحله‌ی رسیدگی مشاهده گردید، درحالی که درست قبل از تخم‌ریزی مقدار این هورمون نیز کاهش شدیدی نشان داد (شکل۲). بعد از مرحله‌ی زرده‌سازی، توانایی لایه‌های فولیکولی برای تولید E2 کاهش یافته و از فعالیت آنزیم آروماتاز (که تستسترون را به E2 تبدیل می‌کند) در سلول‌های گرانولوزای لایه فولیکولی به‌طور چشم‌گیری کاسته می‌شود. در این زمان، توانایی سلول‌های تکا در پاسخ به افزایش گنادوتروپین برای تولید تستوسترون افزایش یافته و با آغاز مرحله‌ی رسیدگی اووسیت‌ها، تولید ۱۷ آلفا۲۰ بتا هیدروکسی پروژسترون (17OHP) توسط سلول‌های لایه‌ی تکا افزایش می‌یابد (حیدری، ۱۳۸۸).

Poortenaar و همکاران (۲۰۰۱) گزارش نمودند که غلظت پروژسترون در ماهی *S. lalandi lalandi* در مراحل نهایی رسیدگی اووسیت[1] و در ماهی *S. quinqueradiata* در زمان رسیدگی اووسیت‌ها افزایش می‌یابد، که این امر مشابه نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر است. تحقیقات نشان داده است که در گونه‌هایی که دارای تکامل هم زمان گامت‌ها[2] هستند (مانند ماهی کلمه)، یعنی یک یا دو بار در سال تخم‌ریزی انجام می‌دهند، سطوح استروئیدهای جنسی در پلاسما قبل از زرده‌سازی کم یا غیر قابل تشخیص است و هنگام زرده‌سازی افزایش تدریجی در سطح E2 در ماهیان ماده رخ می‌دهد و با آغاز مرحله‌ی رسیدگی اووسیت‌ها مقدار E2 به سرعت کاهش می‌یابد، در حالی که غلظت هورمون 17OHP، در فاز رسیدگی اووسیت افزایش می‌یابد (Rocha et al., 2009). روند مشابهی از نوسانات این دو هورمون در گرگ ماهی *Anarhichas lupus*، (Tveiten et al., 2001) و ماهی کلمه تالاب انزلی (Naddafi et al., 2005) نیز گزارش شده است.

نتایج تحقیق حاضر افزایش غلظت پلاسمایی هورمون کورتیزول را در ماهی کلمه ماده، با نزدیک شدن به زمان تخم-ریزی نشان داد (شکل ۳). از آنجایی که مهاجرت تولیدمثلی از آب شور به شیرین و نیز فعالیت‌های تولیدمثلی، نوعی تنش برای ماهی محسوب می گردند؛ لذا افزایش غلظت پلاسمایی کورتیزول در ماهی در زمان مهاجرت می‌تواند ناشی از تنش وارده به ماهی باشد. اگرچه در آزمایشات متعددی ثابت شده است که کورتیزول رها شده در خون در نتیجه تنش، با کاهش سطح استرادیول و ویتلوژنین در پلاسمای خون و همچنین کاهش سایز گنادها می تواند اثرات نامطلوبی بر روی تولیدمثل ماهیان اعمال نماید (Pankhurst and Van Der Kraak, 1997) اما، نتایج آزمایشات بر روی ماهیان قزل آلا و تیلاپیا با کاشت کورتیزول یا تزریق آن در بدن ماهی نشان داد که اثر منفی کورتیزول بر چرخه‌ی تولیدمثلی، عموماً در مراحل اولیه رشد اووسیت‌ها اعمال می‌گردد و در مراحل بلوغ نهائی نقش منفی چندان مؤثری ایفا نمی‌کند و برعکس می‌تواند اثر تحریک کننده‌ای بر رسیدگی گنادها و تخم‌ریزی داشته باشد (Pottinger and Carrick, 1999; Myszkowski et al., 2003).

از سوی‌دیگر، کورتیزول علاوه بر دخالت در فرآیند تنظیم اسمزی در ماهیان استخوانی، فعالیت‌های متابولیکی دیگری را نیز در بدن ماهی به عهده دارد که از آن جمله می‌توان به تحریک گلوکونئوژنز، به‌منظور تأمین انرژی برای مهاجرت و تخم‌ریزی، به‌دلیل کاهش تغذیه و افزایش فعالیت‌های متابولیکی ماهی در زمان مهاجرت، اشاره نمود (Mommsen et al., 1999). لذا، افزایش کورتیزول در زمان تخم‌ریزی ماهی کلمه، ممکن است در ارتباط با فعالیت‌های فیزیولوژیک ماهی مانند تنظیم اسمزی[3] و فرآیندهای تأمین انرژی که هم زمان با مهاجرت تولیدمثلی در ماهی رخ می‌دهد، باشد. مطالعات مشابهی مؤید افزایش سطح پلاسمایی هورمون کورتیزول هم‌زمان با مهاجرت تولیدمثلی در ماهیان استخوانی است (Scott and Pankhurst, 1992; Suzuki et al., 2000).

اگرچه میانگین غلظت پلاسمایی یون کلسیم در ابتدای چرخه‌ی تولیدمثلی ماهی مقدار نسبتا ثابتی بود، اما افزایش معنی‌داری را مقارن با مرحله زرده‌سازی اووسیت‌ها نشان داد و سپس در مراحل نهایی تکامل اووسیت‌ها کاهش یافت (شکل ۴). مولکول ویتلوژنین که پیش ساز زرده است به لحاظ ساختاری، یک پروتئین غنی شده با فسفولیپید و کلسیم است و در هنگام القای سنتز ویتلوژنین توسط E2، مقدار زیادی یون کلسیم در

[1] FOM
[2] Synchronous gamete development
[3] Osmoregulation

ساختار این پروتئین شرکت می‌کند، که به گروه‌های منفی فسفات موجود در واحدهای اسیدآمینه سازنده این مولکول، به‌صورت یونی باند می‌شود (Mommsen and Walsh, 1988) و این عمل تا زمان رسیدگی اووسیت‌ها ادامه می‌یابد تا مواد معدنی مورد نیاز برای رشد اولیه جنین، در مولکول زرده ذخیره گردد (Patino and Sullivan, 2002). براین اساس، به نظر می‌رسد که افزایش غلظت یون کلسیم در پلاسمای خون ماهی کلمه‌ی خزری در مرحله‌ی زرده‌سازی نیز، ناشی از حضور پیش ساز زرده یعنی ویتلوژنین در پلاسما بوده است. در مطالعات مشابهی افزایش یون کلسیم در پلاسمای ماهی قزل آلای رنگین کمان به‌دلیل اتصال آن به ویتلوژنین در مرحله‌ی زرده‌سازی گزارش شده است (Bjornsson and Haux, 1985؛ حیدری، ۱۳۸۸). هم چنین در ماهی طلایی *C. auratus* نیز میزان کلسیم باند شده با ویتلوژنین تقریبا برابر با ۱۵/۴ میکروگرم در میلی‌گرم ویتلوژنین یا ۰/۲٪ از وزن آن است (Hori et al., 1979). وجود همبستگی منفی بین غلظت یون کلسیم و هورمون 17OHP در مرحله‌ی رسیدگی اووسیت‌ها نیز این نظریه را تأیید می‌نماید (شکل ۹)، زیرا با افزایش ترشح هورمون پروژسترون که شاخص پایان مرحله زرده‌سازی و آغاز مرحله رسیدگی جنسی در اووسیت‌ها است، غلظت کلسیم در پلاسما افت چشم‌گیری را نشان داد.

از سوی دیگر، حضور یون کلسیم و ایجاد پیام کلسیمی[1]، یکی از مسیرهای متابولیکی مهم جهت وقوع فرآیندهایی چون آغاز مجدد تقسیم میوز، آبگیری سلول، یکپارچه شدن زرده و GVBD[2] در مرحله رسیدگی است. ارتباط بین یون کلسیم و وقوع GVBD در مطالعات متعددی به اثبات رسیده است، به گونه‌ای که در صورت عدم حضور کلسیم، GVBD در اووسیت متوقف می‌گردد (Tosti, 2006). لذا، کاهش میزان کلسیم پلاسمای ماهی کلمه در مرحله رسیدگی نهایی، را می‌توان به‌دلیل ورود این یون به داخل سلول از طریق کانال‌های یونی و نقش آن در رسیدگی نهایی اووسیت دانست. نتایج مشابهی در این زمینه در مطالعات انجام شده روی *Danio rerio* (Tsai et al., 2009) و *Salmo girdneri* (Heidari et al., 2010) به‌دست آمده است.

بر اساس نتایج به‌دست آمده، غلظت پلاسمایی یون پتاسیم کاهش شدیدی را مقارن با زرده‌سازی اووسیت‌ها نشان داده و در پایان زرده‌سازی به حداقل مقدار خود در پلاسمای خون ماهی کلمه رسید (شکل ۵). پدیده آبگیری اووسیت‌ها که آخرین مرحله در بلوغ اووسیت محسوب می‌شود، در نتیجه برآیند تغییرات در غلظت ترکیبات آلی و غیر آلی (همچون سدیم، پتاسیم و کلر) در درون اووسیت رخ می‌دهد و نقش اجزای غیر آلی درون سلولی نیز در این فرآیند بسیار با اهمیت است (Heidari et al., 2010). نیروی لازم جهت اسمز آب به درون اووسیت‌های رسیده، ناشی ازهیپراسمولاریتی داخل سلول نسبت به بیرون آن است (Finn et al., 2002) که رابطه‌ی مستقیمی با غلظت پلاسمایی یون‌های غیرآلی هم چون پتاسیم و سدیم دارد. لذا کاهش شدید یون پتاسیم در پلاسمای خون ماهی مورد مطالعه در مرحله‌ی رسیدگی گنادها، می‌تواند ناشی از ورود این یون از خون به درون اووسیت‌ها به‌منظور ایجاد اسمز اجباری آب و وقوع فرایند آبگیری اووسیت‌ها باشد. این روند کاهش غلظت پلاسمایی یون پتاسیم که موجب اسمز آب به داخل اووسیت‌ها می‌گردد، در ماهی هرینگ آتلانتیک *Clupea harengus*، نیز گزارش شده است (Kristoffersen and Finn, 2008). همچنین Chen و همکاران (۲۰۰۳) به بالاتر بودن میزان پتاسیم اووسیت نسبت به پتاسیم پلاسمای ماهی *Plecoglossus altivelis* در مرحله‌ی پیش از تخم‌ریزی اشاره نموده اند که با نتایج به‌دست آمده در پژوهش اخیر مطابقت دارد.

در یک جمع بندی کلی، بررسی نتایج و تجزیه و تحلیل آن‌ها نشان‌دهنده‌ی ارتباط مستقیم بین مقادیر استروئیدهای جنسی و مراحل تکامل و رسیدگی اووسیت‌ها در ماهی کلمه خزری بود. در مراحل اولیه تکامل تخمدان، مقادیر پلاسمایی استروئیدهای جنسی در سطح پایینی قرار داشت. ولی در مرحله‌ی زرده‌سازی اووسیت‌ها، غلظت پلاسمایی E2 در ماهی مورد مطالعه به‌صورت معنی‌داری افزایش یافته و سپس در مرحله‌ی رسیدگی اووسیت‌ها، کاهش معنی‌دار در مقدار این هورمون مشاهده گردید. در مقابل، افزایش معنی‌داری در مقدار هورمون 17OHP در مرحله‌ی رسیدگی مشاهده گردید، درحالی که درست قبل از تخم‌ریزی مقدار این هورمون نیز کاهش شدیدی نشان داد. مشاهده‌ی همبستگی مثبت در روند تغییرات این دو هورمون در زمان پیش از رسیدگی و همبستگی منفی بین آن دو در زمان رسیدگی تخمدان‌ها مؤید مطالب فوق‌الذکر است. مقدار هورمون کورتیزول در پلاسمای خون ماهی قبل از تخم‌ریزی به حداکثر مقدار خود رسید که می‌تواند ناشی از بروز تنش‌های ناشی از انجام تنظیم اسمزی به‌دلیل مهاجرت ماهی به آب شیرین و نیز

[1] Calcum signaling pathway
[2] Germinal Vesicle Break Down

افزایش فعالیت‌های متابولیکی ناشی از مهاجرت و تخم‌ریزی ماهی باشد. کاهش غلظت پلاسمایی یون های پتاسیم و کلسیم در مرحله‌ی رسیدگی اووسیت‌ها، بیانگر ورود این یون‌ها به داخل اووسیت‌ها جهت ایجاد اسمز اجباری آب از محیط بیرون به سمت داخل سلول و در نتیجه آب‌گیری اووسیت رسیده است. از آنجا که میزان یون سدیم در هیچ یک از مراحل تکامل تخمدانی تفاوت معنی‌داری را با سایر زمان‌های نمونه‌برداری نشان نداد، لذا می‌توان نتیجه گرفت که نقش این یون در روند آب‌گیری اووسیت‌ها در ماهی مورد مطالعه، بسیار کم رنگ است.

در پایان، از آنجا که جمعیت این ماهی با ارزش در دریای خزر تحت تأثیر عوامل متعدد زیست محیطی و فشار بی‌رویه‌ی صیادی به‌شدت کاهش یافته است، لذا پیشنهاد می‌گردد مطالعات تکمیلی بافت‌شناسی در زمینه‌ی روند تکاملی تخمدان و رسیدگی جنسی این ماهی صورت گیرد تا راهکارهای جدید و مؤثر در ارزیابی و بازسازی ذخایر این گونه‌ی اقتصادی - بوم‌شناختی در دریای خزر ارائه گردد.

منابع

حسین‌زاده صحافی، ه.، ۱۳۸۰. بیولوژی تولیدمثل ماهی با تأکید بر ماهیان ایران. انتشارات معاونت توسعه آبزی پروری. اداره کل ترویج. مؤسسه نشرجهاد وابسته به دانشگاه تهران. ۲۷۲ صفحه.

حیدری، ب.، ۱۳۸۸. مطالعه اکوفیزیولوژیک و اکومورفولوژیک اووسیت ماهی سفید دریای خزر. پایان نامه دوره دکتری. دانشکده علوم دریایی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر. ۱۶۳ صفحه.

شریف‌پور، ع.؛ سلطانی، م.؛ عبدالحی، ح.؛ قیومی، ر.، ۱۳۸۱. اثر بیهوش کنندگی اسانس گل میخک (*Eugenia caryophyllata*) در شرایط مختلف pH و درجه حرارت در بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). مجله علمی شیلات ایران. شماره ۴. سال یازدهم. صفحات ۷۴ ـ ۵۹.

کشیری، ح.؛ شعبانی، ع.؛ شعبانپور، ب.، ۱۳۹۱. بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کلمه خزر *Rutilus rutilus caspicus* در مناطق قره سو و گمیشان به روش مایکروستلایت. مجله زیست شناسی ایران. شماره ۲۵ (۱). صفحات ۱۴۷-۱۳۹.

Bjornsson, B.T.; Haux, C., 1985. Distribution of calcium, magnesium and inorganic phosphate in plasma of estradiol-17β treated rainbow trout. Journal of Comparative Physiology B, 155: 347-352.

Burtis, C.A.; Ashweed, E.R., 1994. Tietz text book of clinical chemistry 2nd ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia, 1825-27.

Chen, J.f.; Staub, J.; Qian,C.; Jiang, J.; Luo, X.; Zhuang, F., 2003. Reproduction and cytogenetic characterization of interspecific hybrids derived from *Cucumis hystrix* Chakr × *Cucumis sativus* L. Theoretical and Applied Genetics, 106: 688-695.

Finn, R.N.; Østby, G.C.; Norberg, B.; Fyhn, H.J., 2002. In vivo oocyte hydration in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*); proteolytic liberation of free amino acids and ion transport, are driving forces for osmotic water influx. Journal of experimental biology, 205: 211-224.

Fontaine, P.; Pereira, C.; Wang, N.; Marie, M., 2006. Influence of pre-inductive photoperiod variations on Eurasian perch *Perca fluviatilis* broodstock response to an inductive photothermal program. Aquaculture, 255: 410-416.

Geraudie, P.; Gerbron, M.; Hill, E.M.; Minier, C., 2010. Roach (*Rutilus rutilus*) reproductive cycle: a study of biochemical and histological parameters in a low contaminated site. Fish physiology and biochemistry, 36: 767-777.

Heidari, B.; Roozati, S.; Yavari, L., 2010. Changes in plasma levels of steroid hormones during oocyte development of Caspian Kutum (*Rutilus frisii kutum*) Kamensky1901. Animal Reproduction, 7: 373-381.

Hori, S.H.; Kodama, T.; Tanahashi, K., 1979. Induction of vitellogenin synthesis in goldfish by massive doses of androgens. General and comparative endocrinology, 37: 306-320.

Jobling, S.; Beresford, N.; Nolan, M.; Rodgers-Gray, T.; Brighty, G.C.; Sumpter, J.P.; Tyler, C.R., 2002. Altered sexual maturation and gamete production in wild roach

Nagahama, Y., 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. International Journal of Biology, 38: 217-229.

Pankhurst, N.; Van Der Kraak, G., 1997. Effects of stress on reproduction and growth of fish. Fish Stress and Health in Aquaculture, 73-93.

Patino, R.; Sullivan, C.V., 2002. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. Fish Physiology and Biochemistry, 26: 57-70.

Poortenaar, C.; Hooker, S.; Sharp, N., 2001. Assessment of yellow tail kingfish (*Seriola lalandi lalandi*) reproductive physiology, as a basis for aquaculture development. Aquaculture, 201: 271-286.

Pottinger, T.; Carrick, T., 1999. Modification of the plasma cortisol response to stress in rainbow trout by selective breeding. General and Comparative Endocrinology, 116: 122-132.

Rocha, A.; Zanuy, S.; Carrillo, M.; Gómez, A., 2009. Seasonal changes in gonadal expression of gonadotropin receptors, steroidogenic acute regulatory protein and steroidogenic enzymes in the European sea bass. General and Comparative Endocrinology, 162: 265-275.

Scott, S.G.; Pankhurst, N.W., 1992. Interannual variation in the reproductive cycle of the New Zealand snapper *Pagrus auratus* (Bloch & Schneider), (Sparidae). Journal of Fish Biology, 41: 685-696.

Seale, A.P.; Riley, L.G.; Leedom, T.A.; Kajimura, S.; Dores, R.M.; Hirano, T.; Grau, E.G., 2002. Effects of environmental osmolality on release of prolactin, growth hormone and ACTH from the tilapia pituitary. General and Comparative Endocrinology, 128: 91-101.

Suzuki, H.I.; Agostinho, A.A.; Winemiller, K.O., 2000. Relationship between oocyte morphology and reproductive strategy in loricariid catfishes of the Paraná River. Brazilian Journal of Fish Biology, 57(3): 791-807.

(*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents. Biology of reproduction, 66: 272-281.

Kiabi, B.; Abdoli, A.; Naderi, M., 1999. Status of the fish fauna in the south Caspian Basin of Iran. Zoology in the Middle East, 18: 57-65.

Kristoffersen, B.A.; Finn, R.N., 2008. Major osmolyte changes during oocyte hydration of a clupeocephalan marine benthophil: Atlantic herring (*Clupea harengus*). Marine Biology, 154: 683-692.

Lee, W.K.; Yang, S.W., 2002. Relationship between ovarian development and serum levels of gonadal steroid hormones, and Induction of oocyte maturation and ovulation in the cultured female korean spotted sea bass *Lateolabrax maculatus*. Aquaculture, 207: 169-183.

Mehrpoosh, M.; Akhoundian, M.; Khara, H.; Kabir, M.; Hajirezaee, S., 2013. Serum biochemical parameters of endangered Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius*, Kessler 1870. Comparative Clinical Pathology, 22: 899-901.

Mommsen, T.P.; Vijayan, M.M.; Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 9: 211-268.

Mommsen, T.P.; Walsh, P.J., 1988. Vitellogenesis and oocyte assembly. Fish Physiology, 11: 347-406.

Myszkowski, L.; Kamiński, R.; Wolnicki, J., 2003. Response of juvenile tench *Tinca tinca* L. to the anaesthetic 2-phenoxyethanol. Journal of Applied Ichthyology, 19: 142-145.

Naddafi, R.; Abdoli, A.; Hassanzadeh Kiabi, B.; Mojazi Amiri, B.; Karami, M., 2005. Age, growth and reproduction of the Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) in the Anzali and Gomishan wetlands, North Iran. Journal of Applied Ichthyolog, 21: 492-497.

Tveiten, H.; Solevåg, S.; Johnsen, H., 2001. Holding temperature during the breeding season influences final maturation and egg quality in common wolf fish. Journal of Fish Biology, 58: 374-385.

Tyler, C.R., 1996. Oocyte growth and development in teleosts. Fish Biology and Fisheries, 6: 318-287.

Thomas, P., 2003. Breeding and seed production of fin fish and shell fish. Daya Publishing House, 402 p.

Tosti, E., 2006. Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. Reproductive Biology and Endocrinology, 4: 26-35.

Tsai, S.; Rawson, D.; Zhang, T., 2009. Studies on chilling sensitivity of early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles. Cryobiology, 58: 279-286.