بررسی رسیدگی جنسی و مورفوهیستولوژی گناد در مولدین ماهی زبرا *Danio rerio* تحت تأثیر پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum*

زهره سعیدی[۱]، علیرضا میرواقفی*[۱]، امیر رضا عابد علم دوست[۱]، حمید فرحمند[۱]، رقیه صفری[۲]

*avaghefi@ut.ac.ir

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی, دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲- گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۸

چکیده

به منظور افزایش شناخت اثرات پروبیوتیک‌ها بر شاخص‌های تولیدمثلی ماهی زبرا (*Danio rerio*)، این تحقیق به بررسی تأثیرات سطوح متفاوت پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* بر روند تکامل گناد و رسیدگی جنسی در ماهی زبرا پرداخته است. بدین منظور، تعداد۷۲۰ ماهی زبرا در چهار تیمار با جیره‌های آزمایشی (۰٪، ۰/۵٪، ۱/۵٪ و ۳٪ پروبیوتیک) به مدت ۴۰ روز تغذیه شدند. براساس اندازه‌گیری شاخص‌های تولیدمثلی در این گونه، بالاترین میزان هماوری مطلق در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۳٪ پروبیوتیک مشاهده شد که این میزان دارای تفاوت معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد و نیز تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۵٪ پروبیوتیک بود. بر مبنای شاخص هماوری نسبی، تیمار شاهد پایین‌ترین میزان هماوری را نسبت به سایر تیمارها نشان داد. داده‌های حاصل از شاخص گنادوسوماتیک در بین تیمارها نشان دهنده بالاترین میزان شاخص گنادی در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۳٪ پروبیوتیک نسبت به سایر تیمارها بود که نسبت به تیمار شاهد و تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۵٪ پروبیوتیک معنی‌دار بود اما نسبت به تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۱/۵٪ پروبیوتیک تفاوت معنی‌داری نشان نداد. همچنین بررسی‌های هیستولوژیک گناد در جنس نر و ماده نشان دهنده تکامل گنادها و رسیدگی کامل جنسی در تیمارهای تغذیه شده با سطوح ۳٪ و ۱/۵٪ پروبیوتیک بود. تحقیق حاضر نشان‌دهنده این امر می‌باشد که استفاده از پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* در سطح ۳ درصد بهترین تأثیرگذاری را بر شاخص‌های تولیدمثلی و تکامل گنادی در مولدین ماهی زبرا دارد.

لغات کلیدی: پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، هماوری، شاخص گنادوسوماتیک، ماهی زبرا

*نویسنده مسئول

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-07]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.2.7.7]

مقدمه

فرآیند تولیدمثل در صنعت آبزی‌پروری جایگاهی درخور توجه دارد که با توجه به عملکرد تولیدمثلی متغیر و غیر قابل پیش‌بینی بسیاری از گونه‌های پرورشی همواره به عنوان یک عامل محدودکننده در این صنعت مطرح می‌باشد. تحقیقات بسیاری در رابطه با عوامل تأثیرگذار بر فرآیند تولیدمثل در آبزیان انجام شده است. عوامل متعددی در امر تولیدمثل دخیل می‌باشند که از آن بین می‌توان به تغذیه، به عنوان یک عامل مهم و تأثیرگذار اشاره کرد. با توجه به تحقیقات صورت گرفته در رابطه با تغذیه مولدین می‌توان بوضوح دریافت که تغذیه بر تمامی مراحل تولیدمثلی تأثیرگذار است. رسیدن به سایز مورد نیاز به منظور شروع فرآیند تولیدمثل که معمولاً به بلوغ و گامتوژنز اشاره دارد، در ارتباط نزدیک با میزان انرژی قابل دسترس در هر دو جنس نر و ماده می‌باشد. بنابراین، تغذیه مولدین به طور مستقیم بر فرآیندهای مختلف تولیدمثلی، کیفیت تخمک و متعاقباً لاروهای حاصل تأثیر می‌گذارد (Tveiten *et al.*, 2004; Schulz *et al.*, 2005). استفاده از مکمل‌ها در جیره غذایی مولدین به منظور تأمین نیازهای تغذیه‌ای و نیز مقاومت در برابر بیماری‌ها همواره مورد توجه بوده است. مکمل‌های غذایی طیف گسترده‌ای از ترکیبات را دربرمی‌گیرند که هر یک دارای ویژگی‌های مخصوص بخود می‌باشند. از جمله مکمل‌های غذایی که تأثیرات سودمند آنها در صنایع مختلف از جمله صنعت آبزی‌پروری مشاهده شده است، مکمل‌های غذایی میکروبی یا پروبیوتیک‌ها هستند. تحقیقات و آزمایش‌های صورت گرفته در این خصوص عمدتاً متمرکز بر تعیین اثرات و مکانیسم اثر پروبیوتیک‌ها بر شاخص‌های رشد (Hernandez *et al.*, 2010; Rahiman *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2012)، مهار پاتوژن‌ها (Abdullah *et al.*, 2011; Moreira *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012) و نیز کنترل استرس (Varela *et al.*, 2010; Tapia *et al.*, 2012) بوده است. حضور پروبیوتیک‌ها در جیره غذایی مولدین سبب بازسازی و توازن جمعیت میکروبی روده شده و از طریق افزایش مواد معدنی در دسترس، ویتامین‌ها و تولید آنزیم‌های‌گوارشی مهم و متابولیت‌ها بر تولیدمثل ماهیان تأثیر می‌گذارد (Holzapfel *et al.*, 1998). باکتری‌های اسیدلاکتیک (LAB) بخش بزرگی از میکروبیوتای مهره‌داران و ماهیان را تشکیل می‌دهند و Gioacchini (۲۰۱۰ و ۲۰۱۲) اثرات مفید آنها را بر تولیدمثل ماهی زبرا (*D. rerio*) گزارش کردند. در این مطالعات بر اساس بررسی‌های هیستولوژیک انجام شده بر تخمدان ماهی زبرا (*D. rerio*) به نقش تحریک‌کننده *Lactobacillus rhamnosus* بر رسیدگی‌جنسی و بلوغ فولیکولی در این‌گونه تأکید شده است. سویه باکتریایی انتخابی در این تحقیق (*L. plantarum*)، یک باکتری گرم مثبت، هتروفرمنتاتیو، غیر اسپورزا، غیرمتحرک و تولیدکننده اسیدلاکتیک بود که استفاده از آن به عنوان مکمل غذایی سبب القاء ایمنی، افزایش رشد و نیز افزایش مقاومت نسبت به بیماری در چندین گونه از ماهیان شده است (Son *et al.*, 2009; Giri *et al.*, 2013; Dawood *et al.*, 2015). در مقایسه با بسیاری از گونه‌های پرورشی، ماهی زبرا (*D. rerio*) چرخه زندگی کوتاهی دارد و پس از طی سه ماه از شروع حیات خود قادر به تولیدمثل می‌باشد. ماهی زبرا (*D. rerio*) از لحاظ تولیدمثلی غیرهمزمان است (Asynchronous) و فولیکول‌ها در مراحل مختلف تکامل، در تخمدان مشاهده می‌شوند (Clelland and Peng, 2009). در طبیعت این ماهی عمدتاً چندین مرتبه در فصل تخمریزی (ماه آگوست) تولیدمثل می‌نماید، اما در شرایط آزمایشگاهی، ماهیان در تمام طول سال قادر به تخمریزی می‌باشند (Clelland and Peng, 2009). با توجه به موارد مذکور و نیز با توجه به اختلالات تولیدمثلی موجود در گونه‌های ارزشمند اقتصادی در شرایط اسارت، در این تحقیق ماهی زبرا (*D. rerio*) به عنوان یک گونه مدل به منظور بررسی تأثیرات لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*L. plantarum*) بر توسعه گنادی و تولیدمثل در ماهیان مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ماهی و شرایط آزمایشگاهی

برای انجام این تحقیق از پیش مولدین ماهی زبرا (*D. rerio*) با سن ۶۰ روز استفاده شد. ماهیان زبرا از مزرعه خصوصی تکثیر و پرورش ماهیان زینتی تهیه و با استفاده از کیسه‌های پلی‌اتیلنی مخصوص حمل ماهی، حاوی آب و اکسیژن با نسبت ۱ به ۲ و عایق‌بندی شده در محفظه‌های مجزا به آزمایشگاه آبزی‌پروری منتقل شدند. سپس با محلول آب نمک (۳ درصد) ضدعفونی و به مدت ۱۴ روز جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاهی قرنطینه شدند. پس از گذراندن دوره سازگاری جنس نر و ماده به منظور جلوگیری از تخمریزی، با توجه به ویژگی‌های مورفولوژیک از یکدیگر جدا شدند. جنس نر این گونه معمولاً کوچکتر بوده و بدن باریکتر با نوارهای آبی- طلایی دارد اما جنس ماده دارای جثه بزرگتر و پهن‌تر بوده و نوارهای بدن در آن به رنگ آبی – نقره‌ای مشاهده می‌شود (Parichy *et al.*, 2009). تعداد ۷۲۰

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-07]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.2.7.7]

ماهی نر و ماده با میانگین وزن ۰/۲۸۳±۰/۰۱۵ گرم و طول ۲/۹۰۰±۰/۱۰۰ سانتی‌متر، به طور کاملاً تصادفی در قالب ۴ تیمار (۳۰ ماهی در هر مخزن) و در بین ۲۴ مخزن با حجم ۴۰ لیتر به صورت مجزا توزیع شدند. شرایط پرورش همواره ثابت بوده و هوادهی مداوم و تعویض آب به میزان ۷۰ درصد و به صورت روزانه انجام پذیرفت. در طول دوره پرورش عوامل فیزیکی و شیمیایی آب شامل دما، pH و اکسیژن محلول به صورت روزانه اندازه‌گیری و به میزان ۰/۵±۲۷/۵، ۰/۴ ±۷/۴، ۰/۴۰ ±۷/۴۳ به صورت ثابت حفظ شدند (جدول۱). در طول دوره سازگاری، ماهیان با جیره غذایی پایه (BioMar, France) تغذیه شدند (جدول۲) و پس از طی این دوره هر یک از تیمارها به مدت ۴۰ روز تحت تغذیه با جیره حاوی سطوح متفاوت (۰، ۰/۵٪، ۱/۵٪، ۳٪) پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*L. plantarum*) قرار گرفتند (جدول۳).

جدول۱: عوامل فیزیکی و شیمیایی آب در طول دوره پرورش ماهی زبرا (*Danio rerio*)

Rearing. Table 1: Physicochemical Factors of Water During the culture period *Danio rerio*

عوامل فیزیکی و شیمیایی	مقادیر ثبت شده در طول دوره آزمایش
دما (درجه سانتی‌گراد)	۲۷/۵±۰/۵
pH	۷/۴ ±۰/۴
اکسیژن محلول (mg/L)	۷/۴۳ ±۰/۴۰
نیتریت (mg/L)	۰/۱۲۳ ±۰/۰۲
دی اکسید کربن (mg/L)	۱۷/۷±۰/۴
سختی کل (ppm)	۱۹۵/۳۳۳ ±۴/۵۰۹

جدول۲: ترکیبات جیره پایه (BioMar, France) ماهی زبرا (*Danio rerio*) براساس درصد وزن تر

Table 2: Zebra fish (*Danio rerio*) Basic dietary compounds (BioMar, France) based on fresh weight percentage

مقادیر	ترکیبات جیره ٪
۵۵	پروتئین
۲۱	کربوهیدرات
۱۲	چربی
۸	خاکستر
۴	رطوبت

سویه باکتریایی

لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*L. plantarum*) مورد استفاده در این تحقیق، از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (IBRC-M 10817) به صورت لیوفیلیزه تهیه و کشت اولیه آن در محیط اختصاصی MRS (Man, Rogosa and Sharpe) در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. بعد از رشد ابتدا تأیید باکتری با استفاده از خصوصیات مورفولوژیک و تست‌های بیوشیمیایی انجام و تا زمان استفاده در حضور ۱۵٪ (vol/vol) گلیسرول در دمای۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Perez-Sanchez *et al*., 2011).

جیره آزمایشی

باکتری نگهداری شده در فریزر در محیط کشت MRS به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد و در انکوباتور شیکردار کشت داده شد. پس از حصول رشد، به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۲۵۰۰g سانتریفیوژ شده و رسوب حاصل سه مرتبه با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شد. در نهایت رسوب حاصل در سرم فیزیولوژی استریل به صورت سوسپانسیون درآمده و به منظور استانداردکردن تعداد باکتری‌ها (10^8colony-forming units (CFU)/ml) میزان جذب ۰/۲۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر ارزیابی شد (Balcazar *et al*., 2006). جهت آماده‌سازی جیره‌ی آزمایشی تیمارهای T_2، T_3 و T_4 سه سطح افزایشی ۰/۵٪، ۱/۵٪ و ۳٪ از باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*L. plantarum*) با محلول ژلاتین (۳٪) مخلوط و سپس به جیره پایه (BioMar, France) اسپری گردید. همچنین جیره آزمایشی تیمار T_1 تنها از طریق اسپری محلول ژلاتین (۳٪) به جیره پایه (BioMar, France) آماده شد. تا انتهای دوره آزمایش ماهیان به صورت روزانه به میزان ۳ درصد وزن خود و در سه نوبت تغذیه شدند.

جمع‌آوری نمونه‌ها

پس از طی۴۰ روز از انجام آزمایش نمونه‌برداری از مولدین ماهی زبرا (*D. rerio*) صورت گرفت. تعداد ۳ ماهی به ازاء هر تیمار به منظور بیهوشی در تانک حاوی عصاره گل میخک با دوز ppm ۱۰۰ به مدت ۶ دقیقه به صورت غوطه‌ور قرار گرفتند (Grush *et al*., 2004). سپس طول کل با دقت ۰/۱ سانتی‌متر، وزن کل با دقت ۰/۰۱ گرم و وزن گناد با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم در آنها اندازه‌گیری شد.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-07]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.2.7.7]

جدول۳: شاخص‌های تولیدمثلی در مولدین ماهی زبرا (*Danio rerio*) پس از تغذیه با سطوح متفاوت لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*Lactobacillus plantarum*) به مدت ۴۰ روز

Table 3: Reproductive indices in *Danio rerio* brooders after feeding with different levels of *Lactobacillus plantarum* for 40 days

تیمارها	لاکتوباسیلوس پلانتاروم ٪	هماوری مطلق	هماوری نسبی	شاخص گنادوسوماتیک
T_1	۰/۰	۶۵۰/۰۰۰±۴۳/۵۸۸^a	۱۶۴۵/۳۸۶±۱۳/۴۶۲^a	۲/۴۴۶±۰/۰۱۵^a
T_2	۰/۵	۷۱۶/۶۶۶±۲۰/۸۱۶^b	۱۷۱۰/۳۷۰±۹/۸۸۷^b	۲/۹۲۳±۰/۱۰۷^b
T_3	۱/۵	۷۸۹ /۰۰۰±۱/۰۰۰ ^{c}	۱۷۸۰/۵۱۳±۱۶/۸۲۲^c	۳/۳۷۳±۰/۰۵۵^c
T_4	۳/۰	۷۹۶ /۳۳۳±۴/۰۴۱^c	۱۸۱۲/۹۶۶ ±۱۱/۳۰۱^c	۳/۵۲۰ ±۰/۰۲۰^c

داده ها به صورت mean±SD بیان شده‌اند. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار از لحاظ آماری می‌باشد (p<۰/۰۵)

Data are expressed as mean ± SD. The different letters represent a statistically significant difference (p<0.05)

به منظور ارزیابی هماوری و نیز مشخص نمودن زمان اوج تخمریزی از تخمدان مولدین ماده تحت شرایط استریل نمونه‌برداری صورت گرفت و سپس تخمدان‌ها در محلول گیلسون قرار گرفتند (Holden and Raitt, 1974; Smalas *et al.*, 2016;). برای انجام مطالعات هیستولوژیک از گناد نر و ماده نمونه‌برداری صورت گرفت و گنادها به مدت ۲۴ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفتند و سپس به الکل ۷۰ درصد منتقل گردیدند. نمونه‌های گناد آبگیری، شفاف سازی، پارافینه، قالب‌گیری، برش و رنگ آمیزی شدند. مراحل آبگیری با استفاده از الکل ۹۰، ۹۵، ۱۰۰٪ و در نهایت با الکل بوتیلیک به مدت ۱۲ ساعت انجام شد. شفاف سازی نمونه‌ها با استفاده از تولوئن انجام شد. نمونه‌ها پس از ۹ ساعت نگهداری در داخل پارافین مایع در داخل آون با دمای۶۰ درجه سانتی‌گراد قالب‌گیری شدند. سپس با استفاده از میکروتوم از گناد نر و ماده مقاطع ۵ µm تهیه شد. برش‌های تهیه شده با روش هماتوکسیلن-ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ مجهز به دوربین عکاسی بررسی و تصویربرداری شدند (Drury and Wallington, 1980). مراحل باروری در مولدین نر و ماده به روش میکروسکوپی و بر مبنای کلید پنج مرحله‌ای (Grandcourt *et al.*, 2004) بررسی شد.

شاخص‌های تولیدمثلی

در ابتدا و پایان دوره آزمایش تمام ماهیان موجود در هر تانک پس از بیهوشی از طریق عصاره گل میخک با دوز ۱۰۰ ppm و به مدت ۶ دقیقه (Grush *et al.*, 2004) به صورت مجزا وزن شدند. هماوری مطلق، هماوری نسبی و شاخص گنادوسوماتیک برای هر تیمار با استفاده از فرمول‌های ذیل تعیین شدند (Biswas, 1993):

$GSI = (GW/TW)\times 100$

$AF= (n\times G)/g$

$RF= AF/TW$

GSI= شاخص گنادی، GW= وزن گناد، TW= وزن کل، AF= هم آوری مطلق، n =میانگین تعداد تخمک در زیر نمونه‌ها، G= وزن تخمدان، g= وزن زیر نمونه و RF= هماوری نسبی.

تجزیه و تحلیل آماری

به منظور انجام بررسی‌های آماری در این تحقیق نرم افزار SPSS 23 مورد استفاده قرارگرفت و داده‌های آماری به صورت میانگین ± انحراف از معیار ارائه گردیدند. نرمال بودن داده‌های حاصل از هماوری مطلق، هماوری نسبی و نیز شاخص گنادوسوماتیک با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov بررسی شدند و پس از تأیید نرمال بودن نتایج، آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) به منظور بررسی معنی‌دار بودن اختلافات انجام شد (Pham *et al.*, 2010). سپس تست توکی جهت تعیین اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها اجرا و نتایج بدست آمده با سطح اطمینان ۹۵٪ (p≤۰/۰۵) بیان گردید (Avella *et al.*, 2012).

نتایج

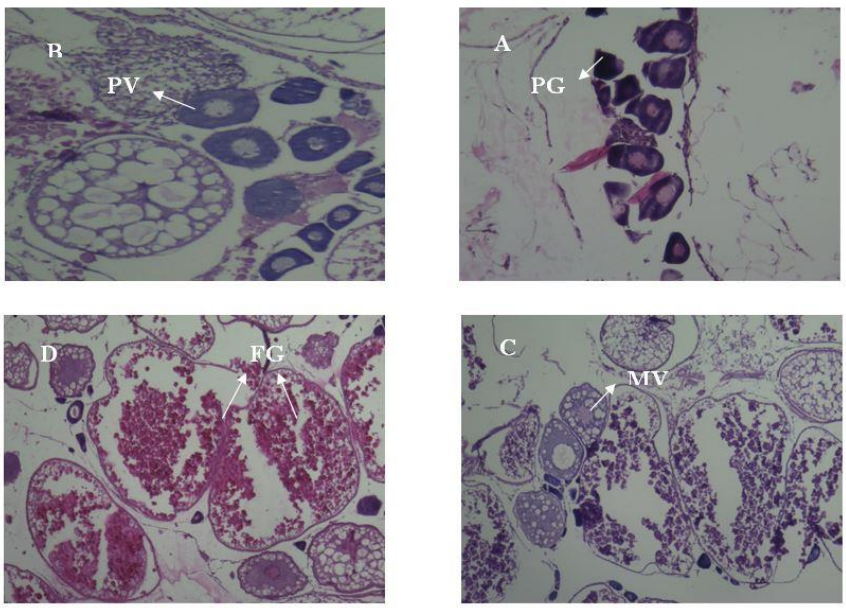
به منظور ارزیابی اثرات پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*L. plantarum*) بر میزان هماوری در مولدین ماهی زبرا (*D. rerio*) تعداد تخمک‌های موجود در تخمدان مورد سنجش قرار گرفت. هماوری مطلق و نیز هماوری نسبی در ۱۲ ماهی ماده

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-07]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.2.7.7]

بالغ محاسبه گردید. بر این اساس بالاترین میزان هماوری مطلق در تیمار T_4 (۴/۰۴۱±۳۳۳/ ۷۹۶) مشاهده شد که این میزان به طور معنی‌داری نسبت به تیمار T_1 و T_2 ($p<$ ۰/۰۵) بیشتر بود. همچنین پایین‌ترین میزان هماوری مطلق در تیمار T_1 (۴۳/۵۸۸±۶۵۰/۰۰۰) مشاهده شد. نتایج حاصل از محاسبه هماوری نسبی نشان دهنده بالاترین میزان هماوری نسبی در تیمار T_4 (۱۱/۳۰۱± ۱۸۱۲/۹۶۶) بود که این میزان تفاوت معنی‌داری را با تیمار T_1 و T_2 ($p<$ ۰/۰۵) نشان داد. بر مبنای این شاخص تیمار T_1 (۱۳/۴۶۲±۱۶۴۵/۳۸۶) پایین‌ترین میزان هماوری نسبی را نسبت به سایر تیمارها نشان داد ($p<$ ۰/۰۵). تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از شاخص گنادوسوماتیک در بین تیمارها نشان دهنده بالاترین میزان شاخص گنادی در تیمار T_4 (۰/۰۲۰±۳/۵۲۰) نسبت به سایر تیمارها بود که این میزان تفاوت نسبت به تیمارهای T_1 و T_2 ($p<$ ۰/۰۵) معنی‌دار بود اما نسبت به تیمار T_3 (۰/۰۵۵±۳/۳۷۳) تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($p<$ ۰/۰۵). این داده‌ها نشان دهنده تأثیر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*L. plantarum*) بر بهبود و نیز افزایش کارایی تولیدمثل در مولدین ماده ماهی زبرا (*D. rerio*) می‌باشد (جدول۳).

بررسی‌های بافت‌شناسی گناد در مولدین نر و ماده ماهی زبرا (*D. rerio*) نشان دهنده چهار مرحله‌ی رسیدگی جنسی در بین تیمارها بود. بدین منظور گنادهای جنسی۱۲ ماهی نر با میانگین وزن (۰/۰۳۳±۰/۴۱۸) و نیز ۱۲ ماهی ماده بالغ با میانگین وزن (۰/۰۸۱±۰/۵۴۰) بررسی شدند. بررسی‌های میکروسکوپی گناد در جنس ماده نشان دهنده‌ی تغییرات و تفاوت بارز در میزان رسیدگی جنسی در تیمارهای مختلف بود بطوریکه مراحل رسیدگی جنسی بالاتر در تیمارهای T_3 و T_4 (شکل۱) نسبت به تیمار شاهد و همچنین نسبت به تیمار T_1 (شکل۱) مشاهده شد. در تیمار T_1، تخمدان به طور غالب حاوی اووسیت‌های نابالغ بود که در لایه‌های نگهدارنده تخم به اشکال کروی، بیضوی یا چند ضلعی مشاهده شدند. اووسیت‌های نابالغ حاوی هسته‌ی بزرگ بودند که بخش زیادی از اووسیت را در برگرفته و اطراف این هسته بزرگ را مقدار کمی سیتوپلاسم احاطه نموده است (شکل۱). همچنین سیتوپلاسم فاقد زرده بود و به همین دلیل این مرحله پیش زرده‌سازی (Previtellogenesis) یا مرحله نابالغ (Stage I:Immature) نامیده می‌شود.



شکل۱: میکروگراف بافت تخمدان ماهی زبرا (*Danio rerio*) در مراحل مختلف رسیدگی‌جنسی در تیمارهای T_1 (A: مرحله I، PG: سلول‌های جرمیک اولیه، بزرگنمایی۴۰×)، T_2 (B: مرحله II، PV: اووسیت‌های مرحله پیش از زرده‌سازی، بزرگنمایی۴۰×)، T_3 (C: مرحله III، MV: اووسیت‌های اواسط مرحله زرده‌سازی، بزرگنمایی ۴×) و T_4 (D: مرحله IV، FG: اووسیت‌های تکامل یافته، بزرگنمایی ۴×)

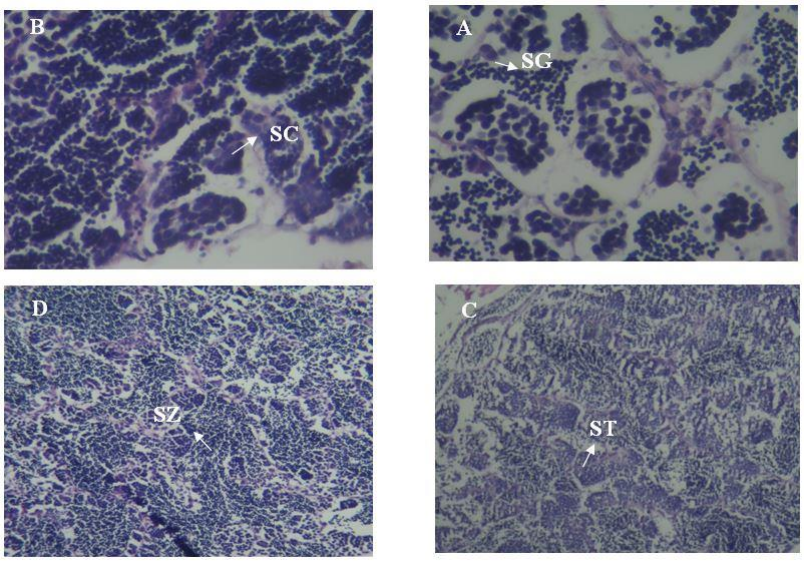
Figure 1: ovarian micrograph of zebrafish (*Danio rerio*) at different stages of sexual maturation in T1 (A: stage I, PG: primary germ cells, x40 magnification), T2 (B: stage II, PV: pre vitellogenic oocytes, x40 magnification), T3 (C: stage III, MV: mid vitellogenic oocytes, x4 magnification) and T4 (D: stage IV, FG: full grown oocytes, x4 magnification) treatments

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-07]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.2.7.7]

در تیمار T_2، تخمدان به طور غالب دارای اووسیت‌های مرحله‌ی کروماتین- هستک و اووسیت‌های مرحله پیش هستکی در اندازه‌های مختلف بود که بیشتر به شکل چندضلعی دیده می‌شدند (شکل۱). اووسیت‌ها در این مرحله رشد کرده و هسته بزرگتر تقریباً در مرکز آنها مشاهده می‌شد. اندازه هسته و اندازه سیتوپلاسم نسبت به مرحله قبل افزایش یافته بود و به طور کلی، اووسیت‌های بزرگتر و در حال بلوغ و توسعه (Stage II:Early developing) غالبیت اووسیت‌های موجود در تخمدان را در تیمار T_2 تشکیل دادند. در تیمار T_3 اووسیت‌ها غالباً کروی شکل یا بیضوی بودند (شکل۱). گرانول‌های زرده که نشانه آغاز زرده‌سازی هستند، در این مرحله در اووسیت‌ها مشاهده شدند که بتدریج جایگزین وزیکول‌های زرده می‌شوند. همچنین ازدیاد وزیکول‌های زرده در یک یا دو ردیف در اطراف هسته مشاهده شد. غالب اووسیت‌های تخمدان در تیمار T_3 مرحله (Stage III) رسیدگی جنسی را نشان دادند. در تیمار T_4 تخمدان به طور غالب حاوی اووسیت‌های ویتلوژنیک در مراحل مختلف زرده‌گیری بود. قطر اغلب اووسیت‌ها به علت آبگیری و نیز زرده‌سازی افزایش یافته بود و سلول‌های فولیکولی اطراف آن از اووسیت فاصله گرفته بودند (شکل۱). این موارد بیانگر تکامل اووسیت‌ها و رسیدگی کامل تخمدان می‌باشد (Stage IV: Ripe) که غالبیت اووسیت‌های موجود در تخمدان را در تیمار T_4 تشکیل دادند. با ادامه این روند تخمک‌ها به داخل لومن تخمدانی رها می‌شوند.

بررسی‌های میکروسکوپی گناد نر ماهی زبرا (*D. rerio*)، تغییرات در میزان رسیدگی جنسی را در میان تیمارهای مختلف نشان داد که این میزان رسیدگی در تیمارهای T_3 و T_4 در مقایسه با تیمار شاهد بالاتر بود (شکل۲). در تیمار T_1 بیضه به طور غالب حاوی اسپرماتوسیت‌های اولیه و ثانویه بود و در بعضی از لوبول‌های بیضه اسپرماتید مشاهده شد. اسپرماتوسیت‌های ثانویه از اسپرماتوسیت‌های اولیه کوچکتر و تیره‌تر می‌باشند. بیشتر حفرات بیضه شامل اسپرماتوسیت ثانویه و اسپرماتید بود و میزان کمی اسپرماتوزوئید نیز در لوبول‌های بیضه و مجرای اسپرم‌بر مشاهده شد (Stage II). در تیمار T_2، تعداد اسپرماتیدها و اسپرماتوزوئیدها در لوبول‌های بیضه افزایش و میزان اسپرماتوسیت‌های اولیه و ثانویه، کاهش نشان دادند (Stage III). در تیمارهای T_3 و T_4 اسپرماتوزوئیدها بوضوح در حفرات بیضه و مجرای اسپرم‌بر مشاهده شدند. همچنین حجم بالاتر اسپرم نسبت به بافت پیوندی و رسیدگی جنسی کامل در این تیمارها مشاهده شد (Stage IV).



شکل ۲: میکروگراف بافت بیضه ماهی زبرا (*Danio rerio*) در مراحل مختلف رسیدگی جنسی در تیمارهای T_1 (A: مرحله II، SG: اسپرماتوگونی، بزرگنمایی۴۰×)، T_2 (B: مرحله III، SC: اسپرماتوسیت، بزرگنمایی۴۰×)، T_3 (C: مرحله IV، ST: اسپرماتید، بزرگنمایی ۴×) و T_4 (D: مرحله IV ، SZ :اسپرماتوزوئید، بزرگنمایی ۴×)

Figure 2: Testis micrograph of Zebrafish (*Danio rerio*) at different stages of sexual maturation in T1 (A: stage II,: SG spermatogonia, x40 magnification), T2 (B: stage III, SC: spermatocytes, x40 magnification), T3 (C: Stage IV: ST spermatid, x4 magnification) and T4 (D: stage IV, SZ: spermatozoid, x4 magnification) treatments

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-07]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.2.7.7]

بحث

لاکتوباسیلوس‌ها مواد بسیاری را تولید و ترشح می‌کنند. آنها ممکن است در گروه موادی قرار گیرند که به غشاء لیپیدی، دیواره سلولی یا غشاء سلولی ملحق یا به محیط خارج سلولی آزاد شوند (Lebeer *et al.*, 2008). در مطالعات ترنس کریپتومیک و پروتئومیک، ترشح تعداد زیادی از پروتئین‌های جدید را لاکتوباسیلوس‌ها تأیید کرده است که این مولکول‌ها در سطوح مختلف از قبیل: یکپارچگی مخاط (Yan *et al.*, 2007; Seth and Yan., 2008)، تعاملات متابولیک (Marco *et al.*, 2006; Semova *et al.*, 2012)، رشد سلول (Schlee *et al.*, 2008) و تولیدمثل بر ارگانیزم میزبان تأثیر می‌گذارند (Gioacchini *et al.*, 2010a,b,c; Giorgini *et al.*, 2010; Gioacchini *et al.*, 2011; Gioacchini *et al.*, 2012; Gioacchini *et al.*, 2013). تولیدمثل در ماهیان تحت تأثیر عوامل متعددی از قبیل ذخایر انرژی بدن بوده و نسبت به تغییرات متابولیک حساس است. در رابطه با وابستگی مواد مغذی و تولیدمثل آنچه مهم است این است که وقوع فرآیند تولیدمثل و در واقع آغاز این فرآیند، همزمان با دسترسی مناسب به مواد مغذی می‌باشد تا این فرآیند بدرستی انجام پذیرد و بقاء نسل بعدی تضمین گردد (Scaramuzzi *et al.*, 2006). باکتری‌های پروبیوتیک ایجاد شده در روده، مواد مغذی مورد نیاز مولدین را از طریق سنتز مواد مغذی ضروری از قبیل پروتئین‌ها، اسیدهای چرب و نیز آنزیم‌های آمیلاز، پروتئاز و لیپاز افزایش می‌دهند (Irianto and Austin., 2002). پروتئین‌ها و اسیدهای چرب از جمله ترکیبات اصلی تشکیل دهنده زرده می‌باشند که توسعه تکاملی تخمک و نیز افزایش زرده‌سازی را بدنبال دارند. بنابراین، حضور پروبیوتیک‌ها در جیره غذایی مولدین از طریق تولید ترکیباتی از قبیل پروتئین‌ها، اسیدهای چرب و نیز ویتامین‌های گروه B بر بهبود رسیدگی‌جنسی مولدین تأثیر می‌گذارد و تعداد فولیکول‌های ویتلوژنیک و همچنین شاخص گنادوسوماتیک را بهبود می‌بخشد که در نهایت سبب افزایش تعداد تخم‌های اوله شده می‌شود. نتایج حاصل از بررسی حاضر نشان داد که افزودن پروبیوتیک (*L. plantarum*) به جیره غذایی به نحو مطلوبی بر کارایی و شاخص‌های تولیدمثلی مولدین ماهی زبرا (*D. rerio*) تأثیر می‌گذارد بطوریکه در مولدین ماده تغذیه شده با پروبیوتیک (*L. plantarum*)، افزایش بارز و معنی‌داری در میزان هماوری مطلق، هماوری نسبی و نیز شاخص‌گنادوسوماتیک نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد. همچنین Gioacchini و همکاران (۲۰۱۱) مشارکت پروبیوتیک‌ها را در تقویت فاز رشد فولیکولی همراه با افزایش شاخص‌گنادوسوماتیک تأیید کردند و طی مطالعات هیستولوژیک تخمدان، افزایش فولیکول‌های ویتلوژنیک در تخمدان ماهیان تحت تیمار با پروبیوتیک مشاهده شد (Gioacchini *et al.*, 2010a; Gioacchini *et al.*, 2011). مکانیسمی که پروبیوتیک‌ها از طریق آن بر اووژنز و نیز هماوری تأثیر می‌گذارند شامل چندین عامل می‌باشد. مکانیسم‌های نوروآندوکراینی مسئول برقراری ارتباط بین هومئوستازی انرژی و هماوری هستند و از طریق نوروپپتایدها و هورمون‌های متابولیک سبب ایجاد تعامل و هماهنگی در سطوح مختلف محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد (HPG) به عنوان کنترل‌کننده فرآیند تولیدمثل می‌شوند (Fernandez-Fernandez *et al.*, 2006; Castellano *et al.*, 2009; Kitahashi *et al.*, 2009; Zohar *et al.*, 2010). وضعیت و سطح انرژی موجود در ارگانیسم‌ها از جمله ماهیان از طریق هورمون‌های نوروپپتیدی از قبیلKiss1، Kiss2، لپتین و نیز سیگنال‌های متابولیک محیطی بر محور تولیدمثل (HPG) تأثیر می‌گذارد (Fernandez-Fernandez *et al.*, 2006; Carnevali *et al.*, 2009; Castellano *et al.*, 2009; Kitahashi *et al.*, 2009). در واقع، ارگانیسم‌ها از طریق سطوح متفاوت لپتین، دسترسی به انرژی را کنترل کرده و با فعال کردن تولید نوروپپتایدهای Kisspeptin در سیستم عصبی مرکزی، تولیدمثل را القاء می‌کنند. براین اساس، مکانیسم اثر پروبیوتیک‌ها بر تولیدمثل ماهی زبرا از طریق افزایش سطح بیان لپتین در روده و مغز مولدین این گونه می‌باشد که این امر در ادامه سبب افزایش Kisspeptin ها و Gnrh3 می‌شود و در نهایت القا تولیدمثل در سیستم عصبی مرکزی را بدنبال خواهد داشت (Gioacchini *et al.*, 2011). نتایج حاصل از تحقیق Hajibeglou و Sudagar (۲۰۱۰) بهبود و افزایش هماوری در مولدین ماده Southern platyfish تغذیه شده با ترکیب پروبیوتیک متشکل از میزان برابر *Lactobacillus acidoplolus*، *Lactobacillus casei*، *Enterococcus faecium* و *Bifidobacterium thermophilus* را نشان داد. همچنین Gosh و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند، پروبیوتیک*Bacillus Subtilis* سبب بهبود کارایی تولیدمثل، افزایش شاخص‌گنادوسوماتیک و نیز هماوری بالاتر در ۴ گونه از ماهیان زینتی شامل Guppy، Mexican molly، Green swordtail و Southern

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-07]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.2.7.7]

platyfish شده است که موارد مذکور با نتایج حاصل از تحقیق حاضر بر ماهی زبرا (*D. rerio*) مطابقت دارد. مطالعات هیستولوژیک تحقیق حاضر به منظور بررسی میزان تأثیر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*L. plantarum*) بر رسیدگی‌جنسی مولدین ماهی زبرا (*D. rerio*) حاکی از تأثیر مثبت لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر این فرآیند در مولدین نر و ماده بود بطوریکه میزان رسیدگی‌جنسی و تکامل‌گنادی در تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*L. plantarum*) به طور معنی‌داری الگوی افزایشی را نسبت به تیمار شاهد در زمان مشابه نشان داد. در رابطه با تأثیر پروبیوتیک‌ها بر تولیدمثل ماهی زبرا (*D. rerio*) مطالعات بسیاری وجود دارد (Gioacchini *et al.*, 2010a,b,c; Giorgini *et al.*, 2010; Gioacchini *et al.*, 2011; Gioacchini *et al.*, 2012; Gioacchini *et al.*, 2013) که افزایش قابل ملاحظه تعداد تخمک‌های رسیده و اوله شده در تخمدان مولدین این گونه را تحت تأثیر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسس نشان می‌دهد. تعداد بالاتر تخمک‌های اوله شده در جنس ماده را می‌توان به کیفیت بالاتر گامت مرتبط دانست که بیشترین میزان هچ و نیز تکامل جنینی سریعتر را بدنبال دارد (Gioacchini *et al.*, 2010a) همانطوریکه در تحقیق حاضر تعداد بیشتر تخمک‌های اوله شده و نیز رسیدگی‌جنسی بیشتر، در تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*L. plantarum*) در زمان مشابه در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده شد. نقش پروبیوتیک‌ها در تقویت مرحله رشد فولیکولی از طریق افزایش شاخص گنادوسوماتیک (GSI) در مطالعات متعدد تأیید شده است. در تحقیق حاضر، بیشترین میزان شاخص گنادی در تیمار تغذیه شده با ۳ درصد پروبیوتیک (T_4) مشاهده شد و تفاوت معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان داد. براساس مطالعه Clelland و Peng (۲۰۰۹)، ماهی زبرا (*D. rerio*) از لحاظ تولیدمثلی غیرهمزمان (Asynchronous) و دارای فولیکول‌هایی در مراحل مختلف تکاملی می‌باشد که موارد مذکور با نتایج حاصل از بررسی‌های هیستولوژیک تحقیق حاضر مطابقت دارد. همچنین در مطالعات متعدد، افزایش تعداد فولیکول‌های ویتلوژنی در تخمدان ماهیان تحت تیمار با پروبیوتیک مشاهده شد (Gioacchini *et al.*, 2011; Gioacchini *et al.*, 2010a). در واقع، افزایش اتوفاژی در فولیکول‌ها قبل از فرآیند اوولاسیون در مولدین ماده تغذیه شده با پروبیوتیک، همزمان با کاهش روند آپوپتوزیس در تخمدان می‌باشد که این موضوع بیانگر نقش پروبیوتیک‌ها در برقراری تعادل بین آپوپتوزیس و اتوفاژی، تنظیم فیزیولوژی تخمدان، بهبود بقاء فولیکولی و نیز مهار آپوپتوزیس فولیکولی می‌باشد. به عبارت دیگر، فرآیند اتوفاژی با حفظ هموستازی سلول به بقاء سلول در شرایط پر فشار (کمبود مواد غذایی) کمک می‌کند و از طریق تولید ATP سبب صرفه جویی در انرژی می‌شود. از اینرو، در مقایسه با آپوپتوزیس، اتوفاژی عمدتاً فرآیند بقاء محسوب می‌شود. در این تحقیق به رغم تأثیر مثبت پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*L. plantarum*) بر شاخص‌های تولیدمثلی و نیز تکامل‌جنسی مولدین ماده ماهی زبرا (*D. rerio*)، تأثیر قابل توجه این پروبیوتیک بر تغییرات و تمایزات گنادی در مولدین نر این گونه و همزمان افزایش تمایزات بیضه و نیز رسیدگی‌جنسی بالاتر در مولدین نر تحت تیمار با پروبیوتیک (*L. plantarum*) در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده شد. ماهی زبرا (*D. rerio*) یک گونه هرمافرودیت و پروتوجینوس است که ابتدا گنادهای شبه تخمدان در آن تکامل می‌یابد (Takahashi, 1977). تمایزات دوجنسی در این گونه زمانی رخ می‌دهد که تخمدان‌ها دستخوش تغییرات شوند و در ابتدا وارد مرحله حد واسط به نام تخمدان تغییر یافته (altered ovary) شده و سرانجام به بیضه تبدیل می‌شوند (Maack and Segner, 2003). این فرضیه وجود دارد که حضور پروبیوتیک‌ها در گنادها بر ژن Sox9 تأثیرگذارند و در نتیجه سبب افزایش تمایزات بیضه و نیز رسیدگی‌جنسی را در مولدین نر می‌شود (Avella *et al.*, 2012). نتایج حاصل از این تحقیق نشان‌دهنده نقش تقویت‌کننده پروبیوتیک لاکتوباسیلوس‌پلانتاروم (*L. plantarum*) بر شاخص‌های تولیدمثلی و نیز رسیدگی جنسی در مولدین نر و ماده ماهی زبرا (*D. rerio*) و همچنین گامی در راستای بیان مکانیسم‌های مرتبط با چگونگی تأثیرگذاری پروبیوتیک‌ها بر فرآیند تولیدمثل می‌باشد. در این تحقیق سطوح متفاوت پروبیوتیک مورد بررسی قرار گرفت و براساس نتایج بدست آمده، پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*L. plantarum*) در سطح ۳ درصد دارای بهترین تأثیرگذاری بر شاخص‌های تولیدمثلی و تکامل گنادی در مولدین ماهی زبرا (*D. rerio*) بود.

منابع

Abdullah, A.M., Hashim, R. and Aliyu, P.M., 2011. Evaluating the use of *Lactobacillus acidophilus* as a biocontrol agent against

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-07]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.2.7.7]

common pathogenic bacteria and the effects on the haematology parameters and histopathology in African catfish *Clarias gariepinus* juveniles, *Aquaculture Research*, 42: 196–209.

Avella, M.A., Place, A., Du, S.J., Williams, E., Silvi, S., Zohar, Y. and Carnevali, O., 2012. *Lactobacillus rhamnosus* accelerates zebrafish backbone calcification and gonadal differentiation through effects on the GnRH and IGF systems. *PLoS One*. 7(9): e45572.

Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D. and Múzquiz, J.L., 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiol*ogy. 114: 173-186.

Biswas, S.P., 1993. Manual of methods in fish biology.South Asian Publishers, New Delhi, India. 157 P.

Carnevali, O., Conti, C., Ferraris, P., Garavaglia, M.G., Gioacchini, G., Giorgini, E., Rubini, C., Sabbatini, S. and Tosi, G., 2009. FT-IR microspectroscopy on molecular building of zebrafish oocytes. *Journal of Molecular Structure*, 938: 207–213.

Castellano, J.M., Roa, J., Luque, R.M., Dieguez, C., Aguilar, E., Pinilla, L. and Tena-Sempere, M., 2009. KiSS-1/kisspeptins and the metabolic control of reproduction: physiologic roles and putative physiopathological implications. *Peptides*, 30: 57–66.

Clelland, E. and Peng, C., 2009. Endocrine/paracrine control of zebrafish ovarian development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 312: 42–52.

Dawood, M.A.O., Koshio, S., Ishikawa, M. and Yokoyama, S., 2015. Effects of heat killed *Lactobacillus plantarum* (LP20) supplemental diets on growth performance,stress resistance and immune response of red sea bream, *Pagrus major*, *Aquaculture*, 442: 29-36.

Drury, R.A. and Wallington, E.A., 1980. Carleton's Histological Techniques, fifth ed. Oxford University Press, Oxford.

Fernandez-Fernandez, R., Martini, A.C., Navarro, V.M., Castellano, J.M., Dieguez, C., Aguilar, E., Pinilla, L. and Tena-Sempere, M., 2006. Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 254: 127–132.

Ghosh, S., Sinha, A. and Sahu, C., 2007. Effect of probiotic on reproductive performance in female livebearing ornamental fish, *Aquaculture Research*. 38: 518–526.

Giorgini, E., Conti, C., Ferraris, P., Sabbatini, S., Tosi, G., Rubini, C., Vaccari, L., Gioacchini, G. and Carnevali, O., 2010. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* on zebrafish oocytes maturation: An FT-IR imaging and biochemical analysis. *Analytical and Bioanalytical Chem*istry, 398: 3063–3072.

Gioacchini, G., Maradonna, F., Lombardo, F., Bizzaro, D., Olivotto, I. and Carnevali, C., 2010a. Increase of fecundity by probiotic administration in zebrafish (*Danio rerio*). *Reproduction*, 140: 953–959.

Gioacchini, G., Bizzaro, D., Giorgini, E., Ferraris, P., Sabbatini, S. and Carnevali, O., 2010b. Oocytes maturation induction by *Lactobacillus rhamnosus* in *Danio rerio*: *in vivo* and *in vitro* studies. *Human Reproduction*, 25: i205–i206.

Gioacchini, G., Giorgini, E., Ferraris, P., Tosi, G., Bizzarro, D., Silvi, S. and Carnevali, O., 2010c. Could probiotics improve fecundity? *Danio rerio* as case of study. *Journal of Biotechnol*ogy, 150: 59–60.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-07]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.2.7.7]

Gioacchini, G., Lombardo, F., Merrifield, D.L., Silvi, S., Cresci, A., Avella, M.A. and Carnevali, O., 2011. Effects of probiotic on zebrafish reproduction. *Journal of Aquaculture Research & Development*, S1. Doi: 10.4172/2155-9546, S1–002.

Gioacchini, G., Giorgini, E., Merrifield, D.L., Hardiman, G., Borini, A., Vaccari, L. and Carnevali, O., 2012. Probiotics can induce follicle maturational competence: the *Danio rerio* case. *Biology of Reproduction*, 86: 65, 1-11.

Gioacchini, G., Dalla Valle, L., Benato, F., Fimia, G.M., Nardacci, R., Ciccosanti, F., Piacentini, M., Borini, A. and Carnevali, O., 2013. Interplay between autophagy and apoptosis in the development of *Danio rerio* follicles and the effects of a probiotic. 25: 1115-1125. *Reproduction, Fertility and Development*, Doi: 10.1071/RD12187.

Giri, S.S., Sukumaran, V. and Oviya, M., 2013. Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* VSG3 improves the growth, immunity, and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. *Fish & Shellfish Immunol*ogy, 34: 660-666.

Grandcourt, E.M.A., Abdessalaam, T.Z., Francis, F. and AlShamsi, A.T., 2004. Biology and stock assessment of the Sparids, *Acanthopagrus bifasciatus* and *Argyrops spinifer* (Forsskål, 1775), in the Southern Arabian Gulf. *Fisheries Research*, 69: 7–20. DOI: 10.1016/j.fishres.

Grush, J., Noakes, D.L.G. and Moccia, R.D., 2004. The efficacy of clove oil as an anesthetic for the zebrafish, *Danio rerio*, *Zebrafish*, 1(1).

Hajibeglou, A. and Sudagar, M., 2010. Effect of dietry supplementation with probiotic on reproductive performance of female livebearing ornamental fish. *Journal of Aquaculture Feed Science and Nutrition*, 2: 11-15.

Hernandez, L.H.H., Barrera, T.C., Mejia. J.C., 2010. Effects of the commercial probiotic *Lactobacillus casei* on the growth, protein content of skin mucus and stress resistance of juveniles of the Porthole livebearer *Poecilopsis gracilis* (Poecilidae), *Aquaculture Nutrition*, 16: 407–411.

Holden, M.J. and Raitt, D.F.S., 1974. Manual of fisheries science. Part 2-Methods of resource investigation and their application. FAO Fisheries. Technical papers.

Holzapfel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U. and in't Veld, J.H.H., 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41: 85-101.

Irianto, A. and Austin, B., 2002. Probiotics in aquaculture," *Journal of Fish Diseases*, 25: 633–642.

Kitahashi, T., Ogawa, S. and Parhar, I. S., 2009. Cloning and expression of Kiss 2 in the zebrafish and Medaka. *Neuroendocrinology*, 150: 821-831.

Lebeer, S., Vanderleyden, J.D. and Keersmaecker, S.C.J., 2008. Genes and molecules of Lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiology and Molecular Biol*ogy Reviews. 72: 728–764**.**

Lin, Sh., Mao, Sh., Guan, Y., Luo, L. and Pan, Y., 2012. Effect of dietary chitosan oligosaccharides and *Bacillus coagulans* on the growth, innate immunity and resistanse of koi (*Cyprinus carpio* koi). *Aquaculture*, 342-343: 36-41.

Maack, G. and Segner, H., 2003. Morphological development of the gonads in zebrafish. *Journal of Fish Biology*. 62: 895–906.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-07]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.2.7.7]

Marco, M.L., Pavan, S. and Kleerebezem, M., 2006. Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Current Opinion in Biotechnology*, 17: 204–210.

Moreira, S.D., Medeiros, S.S., Pereira, L. L., Romano, L.A., Wasielesky, W. and Cupertino, B.E., 2011. The use of probiotics during the nursery rearing or the pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) in a zero exchange system. *Aquaculture Research*, 43:1828-1837.

Parichy, D.M., Elizondo, M.R., Mills, M.G., Gordon, T.N. and Engeszer, R.E., 2009. Normal table of postembryonic zebrafish development: Staging by externally visible anatomy of the living fish. *Developmental Dynamics*, 238: 2975–3015.

Perez-Sanchez, T., Balcazar, J.L., Merrifield, D.L., Carnevali, Q., Gioacchini, G., Blas, I.D. and Ruiz-Zarzuela, I., 2011. Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during (*Lactococcus garvieae*) infection. *Fish and Shellfish*, 31: 291-236.

Pham, H.Q., Kjorsvik, E., Nguyen, A.T., Nguyen, M.D. and Arukwe, A., 2010. Reproductive cycle in female Waigieu seaperch (*Psammopera waigiensis*) reared under different salinity levels and the effects of dopamine antagonist on steroid hormone levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 283: 137-145.

Rahiman, M., Yousuf, J., Ambat, T. and Hatha, M., 2010. Probiotic effect of *Bacillus* NL110 and *Vibrio* NE17 on the survival, growth performance and immune response of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), *Aquaculture Research*, 41: 120–134.

Scaramuzzi, R.J., Campbell, B.K., Downing, J.A., Kendall, N.R., Khalid, M., Munoz-Gutierrez, M. and Somchit, A., 2006. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reproduction Nutrition Development*, 46: 339–354.

Schlee, M., Harder, J., Koten, B., Stange, E.F., Wehkamp, J. and Fellermann, K., 2008. Probiotic Lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte beta-defensin 2. *Clinical & Experimental Immunology*, 151: 528–535.

Schulz, R.W., Menting, S., Boggerd, J., Franca, L.R., Vilela, A.A.R. and Godinho, H.P., 2005. Sertoli cell proliferation in the adult testis Evidence frome to fish species belonging to different orders. *Biology of Reproduction*, 73: 891-898.

Semova, I., Carten, J.D., Stombaugh, J., Mackey, L.C., Knight, R., Farber, S.A. and Rawls, J.F., 2012. Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the zebrafish. *Cell Host Microbe*, 12: 277–288.

Seth, A., Yan, F., Polk, D.B. and Rao, R.K., 2008. Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinasedependent mechanism. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 294: 1060–1069.

Smalas, A., Amundsen, P. and Knudsen, R., 2016. The trade-off between fecundity and egg size in a polymorphic population of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) in Skogsfjordvatn, subarctic Norway. *Ecology and Evolution*, 7: 2007-2460. Doi: 10.1002/ece3.2669.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-07]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.2.7.7]

Son, V.M., Chang, C.C., Wu, M. C., Guu, Y.K., Chiu, C.H. and Cheng, W., 2009. Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*, *Fish Shellfish Immunol*, 26 : 691-698.

Takahashi, H., 1977. Juvenile hermaphroditism in the zebrafish *Brachydanio rerio*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ*. 28: 57–65.

Tapia, P.A., D´ıaz, R.P. and Le´on, R.J., 2012. Use or the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11on the culture of Senegalenses sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) and gilthead seabream (*Sparaus aurata*), *Aquaculture International*, 21: 1–15.

Tveiten, H., Jobling, M. and Andreassen, I., 2004. Influence of egg lipid and fatty acids on egg viability and their utilization during embryonic development of spotted wolfish Anahichas minor Olafsen. *Aquaculture Research*, 35: 152-161.

Varela, J.L., Ru´ız, I. and Vargas, L., 2010. Dietary administration of probiotic Pdp11 promotes growth and improves stress tolerance to high stocking density in gilthead seabream *Sparus auratus*. *Aquaculture*, 309: 265–271.

Yan, F., Cao, H., Cover, T.L., Whitehead, R., Washington, M.K. and Polk, D.B., 2007. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal cell survival and growth. *Gastroenterology*, 132: 562–575.

Zhang, S., Sing, Y., Long, M. and Wei, Z., 2012. Does dietary administration of *Lactococcus lactis* modulate the gut microbiota of grouper, *Epinephelus coioides*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 43: 198–207.

Zohar, Y., Mun˜oz-Cueto, J.A., Elizur, A. and Kah, O., 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*. 165: 438–455, Doi:10.1016/j.ygcen.2009.04.017.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-07]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.2.7.7]

Investigation of sex maturity and morphohistology of gonad in the broodstock of (Hamilton, 1822) *Danio rerio* influenced by probiotic (*Lactobacillus plantarum*)

Saeidi Z.[1]; Mirvaghefi A.[1]; Elmdoust A.[1]; Farahmand H.[1]; Safari R.[2]

*avaghefi@ut.ac.ir

1- Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, Tehran University, Karaj, Iran

2- Fisheries Department, Faculty of Fisheries and Environmental, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Abstract

In order to increase the knowledge of the probiotic effects on reproductive indices of fish, this study was conducted to investigate the effects of different levels of probiotic *Lactobacillus plantarum* on gonadal development and sexual maturation in zebrafish (*Danio rerio*). Some 720 zebrafish were fed the experimental diets in four treatments such as: 0%, 0.5%, 1.5% and 3% probiotic diets for 40 days. Based on the measurement of reproductive indices in this species, the maximum absolute fecundity was observed in the diet containing 3% probiotic, which was significantly different from the control treatment and the diet containing 0.5% probiotic. Based on relative fecundity index, the control treatment showed the lowest fecundity rate compared to the other treatments. The gonadosomatic index data showed the utmost gonadal index in the diet containing 3% probiotic compared to the other treatments, which was significantly higher than the control and 0.5% probiotic treated diets, but it did not show any significant difference with the diet fed 1.5% probiotic. Histological examination of gonads in males and females showed gonads development and complete sexual maturity in treatments fed 3% and 1.5% probiotic levels. The present study indicates that probiotic *Lactobacillus plantarum* at 3% level will have the best effect on reproductive and gonadal development parameters in zebrafish.

Keywords: Probiotic, *Lactobacillus plantarum*, Fecundity, Gonadosomatic index, *Danio rerio*

*Corresponding author

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-07]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1399.29.2.7.7]