

Sex steroid levels in female koi (*Cyprinus carpio carpio*) broodstock injected with recombinant GnRH

Ramzani A.¹; Yeganeh S.^{1*}; Mohammadzadeh S.²

*skyeganeh@gmail.com; s.yeganeh@sanru.ac.ir

1-Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

2-Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technology, Amol, Iran

Received: June 2025

Accepted: November 2025

Published: July 2026



Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introduction

The control of fish reproduction in a captive setting can be achieved through the manipulation of various environmental elements, including photoperiod, water temperature, and the selection of spawning grounds (Yeganeh *et al.*, 2022). Given the limited understanding of the biological needs of certain species and the impracticability of replicating environmental conditions to achieve natural reproduction, one viable approach is to employ hormones. A problem in final maturity induction in the carp family is the high activity of dopamine as an inhibitor in the final maturity and spawning step. A recombinant GnRH combined with dopamine receptor antagonists was employed to facilitate the final maturation process in both goldfish (*Carassius auratus*) and koi carp. (Mohammadzadeh *et al.*, 2020b, 2021a; Yeganeh *et al.*, 2022). No study is so far available on the effects of recombinant GnRH (rGnRH) without anti-dopamine antagonist in koi carp. Therefore, this study aims to investigate the possible use of rGnRH without anti-dopamine antagonist in female koi carp.

Methodology

The investigation was conducted to examine the effects of recombinant gonadotropin-releasing hormone (rGnRH) administered alone or in combination with domperidone on the reproductive function and sex steroid levels in female koi carp (*Cyprinus carpio*). For the purpose of this study, female koi carps with an average weight of 415.25 ± 94.52 g were divided into four experimental groups. Each group was subjected to a specific injection procedure. The first group received a control injection of 0.9% NaCl. The second group was injected with 5 mg/kg body weight of domperidone (Dop). The third group received an injection of 25 µg/kg body weight of rGnRH (rGn). The fourth group was injected with 25 µg/kg body weight of rGnRH with 5 mg/kg of domperidone (rGnDop). To investigate the levels of sex steroids,

samples of blood were obtained prior to administration and at the time points of 6, 12, and 24 hours following the injection.

Result

All the female koi carp of rGn and rGnDop treatments spawned, but none of the females spawned in the NaCl and Dop treatments. There was notable difference among spawned fish during the latency period, with the rGn treatment yielding the longest latency compared to the shorter latency period in the rGnDop treatment. The hormonal treatments had an impact on the levels of sex steroids, namely 17β estradiol (E2), testosterone (T), and 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP). The level of E2 decreased in rGn and rGnDop 6, 12 and 24 h after injection. T and DHP levels increased in rGn and rGnDop treatments at 6 and 12 h after the injection and then decreased at 24 h post-injection.

Discussion and conclusion

The findings of the final induction of maturity in female koi breeders illustrate that the administration of rGnRH, both with and without anti-dopamine, exerts a natural influence on the physiological process of koi fish reproduction. Furthermore, it is noteworthy that these interventions do not lead to any abnormalities in the reproductive system at different stages of the artificial reproduction of this species. The elevation of DHP levels in breeders treated with rGnRH without domperidone exhibits a comparable pattern to those treated with rGnRH alongside domperidone. Consequently, it is advisable to utilize rGnRH without anti-dopamine for the purpose of inducing the final maturation of koi carp.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU).

مقاله علمی - پژوهشی:

سطوح استروئیدهای جنسی در مولدین ماده کوی (*Cyprinus carpio carpio*) تزریق شده با GnRH نو ترکیب

آرش رمضانی^۱، سکینه یگانه^{۱*}، صدیقه محمدزاده^۲

*skyeganeh@gmail.com s.yeganeh@sanru.ac.ir;

۱- گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۲- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین، آمل، ایران

تاریخ چاپ: تیر ۱۴۰۵

تاریخ پذیرش: آبان ۱۴۰۴

تاریخ دریافت: خرداد ۱۴۰۴

چکیده

در مطالعه حاضر، اثر تزریق GnRH نو ترکیب (rGnRH) با و بدون آنتی دوپامین بر سطوح استروئیدهای جنسی مولدین ماده ماهی کوی (*Cyprinus carpio carpio*) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، تعداد ۶۰ عدد ماهی مولد کوی آماده تکثیر با میانگین وزنی $94/52 \pm 415/25$ گرم به مدت دو هفته با شرایط نگهداری سازگار شدند. بعد از گذراندن دوره سازگاری و مناسب شدن دمای محیط، مولدین به چهار گروه آزمایشی تقسیم شدند. برای تیمارهای اول و دوم به عنوان گروه‌های شاهد مثبت و منفی به ترتیب سرم فیزیولوژی و آنتی دوپامین دامپریدون با دوز ۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن تزریق شد، در تیمار سوم هورمون GnRH نو ترکیب با دوز ۲۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن و در تیمار چهارم هورمون GnRH نو ترکیب با دوز ۲۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن به همراه آنتی دوپامین دامپریدون با دوز ۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت یک مرحله ای تزریق شد. از این مولدین برای بررسی استروئیدهای جنسی (۱۷ بتا استرادیول، تستوسترون و پروژسترون) در چهار نوبت (قبل از تزریق، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از تزریق)، خون گیری شد. نتایج نشان داد که از نظر تعداد مولدین تخم‌ریزی کرده تفاوت معنی داری بین تیمارها وجود نداشت. سطوح استروئیدهای جنسی تحت تاثیر تیمارهای هورمونی قرار گرفت ($p < 0/05$). سطح هورمون ۱۷ بتا استرادیول در گروه شاهد و تیمار تزریق شده با دامپریدون در مراحل نمونه‌برداری بدون تغییر باقی ماند ($p > 0/05$)، اما سطح این هورمون در تیمارهای دریافت کننده هورمون GnRH نو ترکیب با و بدون آنتی دوپامین (دامپریدون) ۶ ساعت بعد از تزریق افزایش و سپس ۱۲ ساعت بعد از تزریق کاهش یافت ($p < 0/05$). سطح هورمون پروژسترون و تستوسترون در گروه‌های شاهد مثبت و منفی بدون تغییر باقی ماند ($p > 0/05$)، اما در تیمارهای دریافت کننده هورمون GnRH نو ترکیب با و بدون آنتی دوپامین (دامپریدون) ۶ و ۱۲ ساعت بعد از تزریق افزایش و سپس در ۲۴ ساعت بعد از تزریق کاهش یافت ($p < 0/05$). نتایج نشان داد که هورمون GnRH نو ترکیب در دوز ۲۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن بدون آنتی دوپامین می‌تواند تخم‌ریزی را القاء کند.

لغات کلیدی: GnRH نو ترکیب، همزمانی تخم‌ریزی، ماهی کوی، تخم‌ریزی، آنتی دوپامین

*نویسنده مسئول



Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

مقدمه

در ماهیان همانند سایر مهره‌داران سیستم عصبی و سیستم اندوکرائینی تحت عنوان سیستم نورواندوکراین در کنترل تولیدمثل با هم همکاری می‌کنند. مکانیسم نورواندوکراین تولیدمثل را از طریق محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد (HPG) که به صورت تکاملی در مهره‌داران حفظ شده کنترل می‌کند (Prasad *et al.*, 2015). عوامل محیطی به همراه عوامل اجتماعی به‌وسیله ارگان‌های حسی دریافت شده و به قسمت مرکزی مغز یا هیپوتالاموس منتقل می‌شود و در هیپوتالاموس باعث تحریک ترشح هورمون آزاد کننده گنادوتروپین (GnRH) و هورمون دوپامین می‌گردد. رشته‌های عصبی هیپوتالاموسی این هورمون‌ها را در غیاب سیستم پورتال هیپوفیزی¹ به بخش پیشین هیپوفیز منتقل می‌کنند تا تولید و ترشح هورمون‌های گنادوتروپین (FSH) و LH را کنترل کنند. هورمون GnRH سبب تحریک ترشح هورمون‌های گنادوتروپین شده ولی هورمون دوپامین نقش بازدارندگی در ترشح این هورمون‌ها دارد (Yaron and Levavi-Sivan, 2011).

تولیدمثل ماهی در شرایط اسارت به‌وسیله دستکاری شاخص‌های محیطی (دوره نوری، دمای آب و یا بستر تخم‌ریزی)، قابل کنترل است (Mylonas and Zohar, 2001). با توجه به این که نیاز زیستی بعضی از گونه‌ها هنوز به‌خوبی شناخته شده نیست و با شبیه‌سازی شاخص‌های محیطی انجام تولیدمثل طبیعی غیر ممکن بوده، بنابراین، یکی از راهکارها استفاده از هورمون است (Sudagar *et al.*, 2016). یکی از مشکلات در القاء بلوغ نهایی در خانواده کپور ماهیان، فعالیت بالای دوپامین به عنوان بازدارنده در مرحله بلوغ نهایی و تخم‌ریزی است. دوپامین به عنوان انتقال دهنده عصبی هیپوتالاموسی مانع از تحریک ترشح GnRH می‌شود (Peter *et al.*, 1988).

دوپامین از ترشح گنادوتروپین پایه و گنادوتروپین القاء شده به‌وسیله GnRH در برخی از گونه‌ها از جمله کپور ماهیان جلوگیری می‌کند که در پایان مرحله زرده سازی به اوج خود می‌رسد (Peter and Yu, 1997; Podhorec *et al.*, 2016). در شرایط مصنوعی در مراکز تکثیر و پرورش

ماهیان، یک کاهش در میزان هورمون گنادوتروپین نوع دو (LH) که تنظیم مرحله نهایی از گامتوزنیز را بر عهده دارد، مشاهده می‌شود (Zohar and Mylonas, 2001; Podhorec *et al.*, 2016). در کپور ماهیان استفاده همزمان از آنالوگ‌های GnRH به همراه آنتی‌دوپامین سبب افزایش سطح هورمون LH و اوولاسیون می‌شود (Podhorec and Kouril, 2009). از مواد دارویی مهارکننده عمل دوپامین در تکثیر ماهی، می‌توان به بوتیروفنون‌ها (هالوپریدون)، فنوتیازین (کلروپرومازین و پیموزاید)، متوکلوپرامید، اسپری‌پرون، فلوفتازین و دامپریدون اشاره کرد. مطالعات بیانگر آن بود که دامپریدون، موثرترین و به صرفه‌ترین آنتاگونیست دوپامین است که در تکثیر ماهیان استفاده می‌شود (Treves-Brown, 2000) که اغلب در ترکیب با یک آنالوگ GnRH مورد استفاده قرار می‌گیرد. در چند گونه از کپور ماهیان مثل لای ماهی (*Catla catla*)، با وجود اثبات نقش بازدارندگی دوپامین، ترشح LH، بلوغ نهایی و تخم‌ریزی با تزریق GnRH بدون آنتی‌دوپامین اتفاق افتاد (Kouril *et al.*, 1986; Podhorec *et al.*, 2011; Podhorec *et al.*, 2016). در این گونه‌ها تزریق GnRH بدون آنتی‌دوپامین تاثیری بر نرخ تخم‌ریزی نداشته، اما منجر به آزادسازی تدریجی LH و افزایش زمان نهفته شده است درحالی‌که تزریق آن به همراه آنتی‌دوپامین سبب افزایش حاد LH و کاهش زمان نهفته می‌گردد (Podhorec *et al.*, 2011; Podhorec *et al.*, 2012). افزایش حاد LH که در تزریق همزمان GnRH و آنتی‌دوپامین اتفاق می‌افتد، سؤالاتی را در مورد تأثیر احتمالی پروفایل آزادسازی LH بر بلوغ نهایی بعدی و فرآیندهای تخمک‌گذاری ایجاد می‌کند (Podhorec *et al.*, 2016) که در نتیجه، ممکن است بر کیفیت گامت تأثیر بگذارد. تاکنون مطالعه‌ای در مورد بررسی اثرات GnRH نوترکیب بدون آنتی‌دوپامین در گونه‌های مختلف ماهیان انجام نشده است. بنابراین، هدف از پژوهش حاضر، بررسی امکان استفاده از GnRH نوترکیب بدون آنتی‌دوپامین در القاء بلوغ نهایی در مولدین ماده کوی است.

¹ Hypophyseal portal system

مواد و روش کار

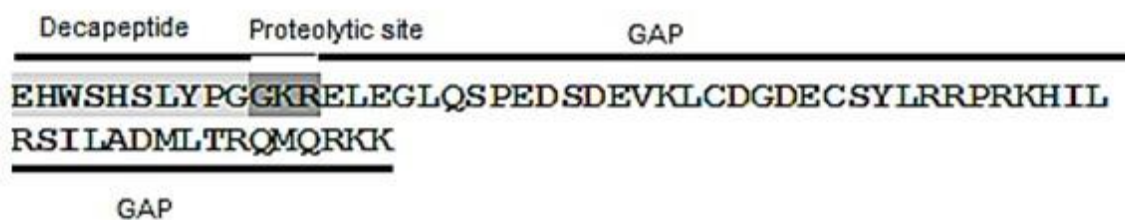
تهیه مولدین و شرایط آزمایش

تعداد ۶۰ عدد ماهی مولد کوی با میانگین وزنی $94/52 \pm$ گرم ($415/25 \pm$ میانگین $\pm$ انحراف معیار) آماده تکثیر از یکی از مراکز تکثیر و پرورش ماهی در استان البرز خریداری شد و پس از انتقال به سالن تکثیر و پرورش در یک مرکز خصوصی (مازندران، قائمشهر)، به مدت دو هفته به شرایط تکثیر و پرورش سازگار شدند. در طول این مدت با جیره تجاری تغذیه شدند. سپس در چهار گروه آزمایشی تقسیم گردیدند. هر گروه سه تکرار و در هر تکرار پنج ماهی وجود داشت. مولدین در تانک‌ها مجزا به صورت کاملاً تصادفی قرار داده شد. آب مورد استفاده برای نگهداری ماهیان با استفاده از هوادهی، کلرزدایی گردید و شرایط فیزیوشیمیایی آب در حد بهینه گونه شامل درجه حرارت 26 ± 1 درجه سانتی‌گراد، pH $8/5 \pm 0/3$ بود و میزان اکسیژن محلول به وسیله هوادهی مداوم در حد اشباع نگهداری شد و به میزان $11/0 \pm 5/8$ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد.

القاء مولدین و طراحی آزمایش

برای تکثیر مصنوعی این مولدین چهار تیمار آزمایشی در نظر گرفته شد. برای تیمارهای اول و دوم به عنوان گروه

شاهد مثبت و منفی به ترتیب سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد ($0/5$ میلی لیتر به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن) و آنتی دوپامین دومپریدون با دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن تزریق شد، در تیمار سوم هورمون GnRH نوترکیب تولیدی در آزمایشگاه زیست سلولی و مولکولی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری (شکل ۱، Mohammadzadeh *et al.*, 2020a) با دوز ۲۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن و در تیمار چهارم هورمون GnRH نوترکیب با دوز ۲۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن به همراه آنتی دوپامین دومپریدون با دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن تزریق شد. دوزهای مورد نظر با توجه به تحقیق گذشته در ماهی کوی انتخاب شد (Yeganeh *et al.*, 2022). تزریق هورمون به وسیله سرنگ ۲ میلی‌لیتر، در دمای $25/53 \pm$ درجه سانتی‌گراد، در زیر باله سینه‌ای مولدین نر و ماده در یک مرحله انجام شد. برای مطالعه حاضر، تعداد ۱۵ عدد مولد نر با میانگین وزنی $320 \pm 11/2$ گرم به طور تصادفی از بین مولدین خریداری شده انتخاب شد. مولدین نر ابتدا وزن گردید. سپس همزمان با مولدین ماده با هورمون اوپریم با دوز ۰/۳ میلی‌لیتر بر کیلوگرم وزن بدن تزریق شدند (Yeganeh *et al.*, 2022).



شکل ۱: توالی پپتید نوترکیب

Figure 1: The recombinant peptide sequence

بررسی عملکرد تولید مثلی مولدین ماهی کوی

در این آزمایش تخم‌کشی و اسپرم‌گیری به صورت دستی از مولدین انجام شد و تخم و اسپرم در ظرف استریل و خشک مخلوط شدند. تخمک‌های حاصل از مولدین هر تکرار (دو مولد ماده) پس از بررسی کیفیت و تحرک اسپرم‌ها با مخلوط اسپرم دو ماهی به روش خشک لقاح داده شدند (Lahnsteiner *et al.*, 2001) و با یک پر مرغ به آرامی به

هم زده شد و پس از چند دقیقه کم‌کم به آن آب اضافه شد. برای رفع چسبندگی تخم‌های لقاح یافته با محلول تانن ($0/5$ گرم تانن‌اسید در یک لیتر آب) به مدت ۳۰ ثانیه شستشو داده شد و بعد از رفع چسبندگی چندین بار آب اضافه و خارج گردید تا آبگیری تخم‌ها انجام شود (Yeganeh *et al.*, 2022). فاصله زمانی تزریق هورمون تا رسیدگی نهایی ماهی ماده (خروج تخم با فشار ملایم در ناحیه شکمی) برای

هر ماهی به طور جداگانه ثبت و به عنوان زمان پاسخ به تزریق هورمون در نظر گرفته شد. درصد لقاح ۲۴ ساعت بعد از لقاح با توجه به رابطه ذیل محاسبه گردید:
درصد لقاح = تعداد تخم لقاح یافته / تعداد کل تخمها $\times 100$

خون گیری و سنجش هورمون

نمونه برداری پس از بیهوش کردن ماهیان با پودر گل میخک با دوز ۲۵ میلی گرم بر لیتر (Ahmadifar *et al.*, 2016) از طریق سیاه رگ ساقه دمی از قاعده باله مخرجی در چهار زمان، پیش از تزریق، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تزریق انجام شد. در هر مرحله از خون گیری، با استفاده از سانتریفوژ خون با دور ۱۶۰۰ g در ۱۰ دقیقه، پلاسما از خون جدا گردید. نمونه ها به منظور مطالعات هورمونی تا زمان تجزیه و تحلیل در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سطح هورمون های ۱۷ بتا استرادیول (E2)، تستوسترون (T) و پروژسترون (DHP) سرم با استفاده از کیت تشخیص آزمایشگاهی (Monobind، کالیفرنیا آمریکا) با روش الایزا سنجیده شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده ها

این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام و برای تمام تجزیه و تحلیل ها سه تکرار در نظر گرفته شد. ابتدا وضعیت داده ها با استفاده از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف برای نرمال بودن و آزمون لون برای همگنی واریانس ها بررسی

شد. با توجه به برقراری شرایط مذکور، به منظور مقایسه معنی دار بودن تفاوت بین میانگین ها در شاخص های مربوط به عملکرد تولید مثلی از تجزیه و تحلیل تی تست، برای تجزیه و تحلیل داده های مربوط استروئیدهای جنسی، از تجزیه و تحلیل واریانس دوطرفه (Two-way ANOVA) و تجزیه و تحلیل توکی استفاده شد. کلیه آزمون ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام گرفت. داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده اند.

نتایج

بررسی عملکرد تولید مثلی مولدین کوی در جدول ۱ ارائه شده است. تمام مولدین تیمارهای سوم و چهارم به مرحله تخم ریزی رسیدند، اما در تیمارهای اول و دوم هیچ یک از مولدین به مرحله تخم ریزی نرسیدند. در تیمار دریافت کننده، هورمون GnRH نوترکیب بدون دریافت آنتی دوپامین (دومپریدون) با فشار ملایم در ناحیه شکمی مولدین ماده تخم رها شد. اختلاف معنی داری بین تیمارهای دریافت کننده هورمون در زمان نهفته مشاهده شد ($p < 0.05$) و بیشترین زمان نهفته (۲۳ ساعت بعد از تزریق هورمون) در تیمار سوم (تزریق با GnRH نوترکیب) به دست آمد ($p < 0.05$) و تیمار چهارم (GnRH نوترکیب به همراه دومپریدون) زمان نهفته کمتری (۱۸ ساعت بعد از تزریق هورمون) داشتند.

جدول ۱: عملکرد تولید مثلی مولدین ماده کوی

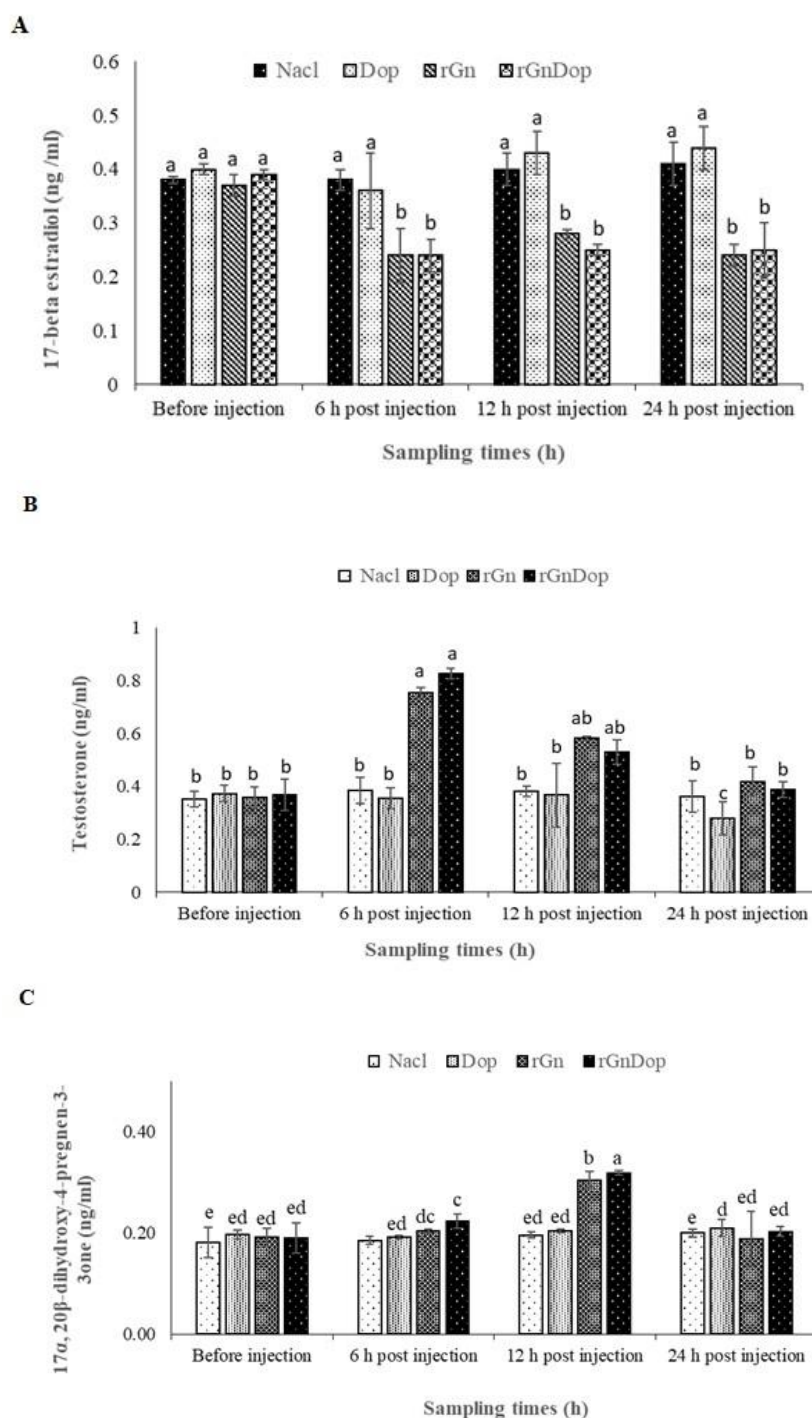
Table 1: Reproduction performance in female koi carp (*Cyprinus carpio*)

Treatment	No. of injected fish	No. of spawned fish	Spawning success (%)	Latency period (h)	Fertilization rate (%)
First treatment	15	0	0	-	-
Second treatment	15	0	0	-	-
Third treatment	15	15	100	23 $\pm$ 0.54 ^a	88.75 $\pm$ 4.8
Fourth treatment	15	15	100	18.8 $\pm$ 0.57 ^b	75.41 $\pm$ 2.3

تیمار اول سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد (۰/۵ میلی لیتر به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن)، تیمار دوم آنتی دوپامین دومپریدون با دوز ۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن، تیمار سوم هورمون GnRH نوترکیب با دوز ۲۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن و در تیمار چهارم هورمون GnRH نوترکیب با دوز ۲۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن به همراه آنتی دوپامین دومپریدون با دوز ۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن
0.9% NaCl (first treatment); 5 mg/kg BW domperidone (second treatment); 25 μ g/kg BW rGnRH (third treatment); 25 μ g/kg BW rGnRH with 5 mg/kg domperidone (fourth treatment). Mean $\pm$ SD

اختلاف معنی‌داری بین درصد لقاح در تیمارهای سوم و چهارم مشاهده نشد ($p > 0/05$). تجزیه و تحلیل واریانس دو طرفه نشان داد که اثر تیمار، زمان و اثر متقابل تیمار در زمان بر هورمون ۱۷ بتا استرادیول معنی‌دار بود (شکل A۱؛ $p < 0/05$). تجزیه و تحلیل نتایج در زمان صفر که نمونه‌برداری قبل از تزریق بود، اختلاف معنی‌داری بین تیمارها نشان نداد ($p > 0/05$). ۶ ساعت بعد از تزریق سطح این هورمون در تیمارهای دریافت‌کننده هورمون GnRH نو ترکیب (سوم و چهارم) افزایش یافت و مجدداً در ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد در این تیمارها کاهش یافت ($p < 0/05$). تجزیه و تحلیل نتایج هر تیمار در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری نشان داد که در تیمارهای کنترل سطح این هورمون در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری تفاوت معنی‌داری نداشت ($p > 0/05$). در تمام تیمارهای دریافت‌کننده هورمون GnRH نو ترکیب سطح این هورمون در زمان صفر و ۶ ساعت بعد از تزریق (به طور معنی‌داری بالاتر از زمان ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از تزریق بود ($p < 0/05$). تجزیه و تحلیل واریانس دو طرفه نشان داد که اثر تیمار، زمان و اثر متقابل تیمار در زمان بر هورمون تستوسترون معنی‌دار بود ($p < 0/05$). آنالیز نتایج در تیمارهای آزمایشی نشان داد که در زمان صفر که نمونه‌برداری قبل از تزریق بود، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای دیده نشده است (شکل B۱؛ $p > 0/05$). ۶ و ۱۲ ساعت بعد از تزریق افزایش معنی‌داری در تیمارهای تزریق شده با GnRH نو ترکیب دیده شد که با تیمار دریافت‌کننده سرم فیزیولوژی (تیمار اول) و آنتی‌دوپامین (دومپریدون) (تیمار دوم) اختلاف معنی‌داری داشتند ($p < 0/05$). در زمان ۲۴ ساعت بعد از تزریق بیشترین میزان این هورمون در

تیمار سوم و چهارم به دست آمد که به طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود ($p < 0/05$). تجزیه و تحلیل نتایج هر تیمار در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری نشان داد که در گروه‌های شاهد (اول و دوم) در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری اختلاف معنی‌داری دیده نشد ($p > 0/05$). در تیمار سوم و چهارم سطح این هورمون ۶ و ۱۲ ساعت بعد از تزریق به طور معنی‌داری افزایش یافت و مجدداً ۲۴ ساعت بعد از تزریق سطح این هورمون کاهش یافت ($p < 0/05$). تجزیه و تحلیل واریانس دو طرفه نشان داد که اثر تیمار، زمان و اثر متقابل تیمار در زمان بر هورمون پروژسترون معنی‌دار بود ($p < 0/05$). تجزیه و تحلیل نتایج در تیمارهای آزمایشی نشان داد که در مرحله اول (زمان صفر) که نمونه‌برداری قبل از تزریق بود، اختلاف معنی‌داری بین تیمارها دیده نشده است (شکل C۱؛ $p > 0/05$). اما ۶ و ۱۲ ساعت بعد از تزریق افزایش معنی‌داری در تیمارهای تزریق شده با هورمون دیده شد که با تیمار دریافت‌کننده سرم فیزیولوژی (تیمار اول) و آنتی‌دوپامین (دومپریدون) (تیمار دوم) اختلاف معنی‌داری داشتند ($p < 0/05$). ۲۴ ساعت بعد از تزریق اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد ($p > 0/05$). نتایج تجزیه و تحلیل هر تیمار در زمان‌های مختلف نشان داد که در تیمار اول و دوم (کنترل مثبت و منفی) تفاوت معنی‌داری در میزان هورمون در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری مشاهده نشد ($p > 0/05$). در تیمارهای سوم و چهارم بیشترین میزان هورمون به ترتیب در زمان ۶ و ۱۲ ساعت بعد از تزریق بود که اختلاف معنی‌داری در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری در این تیمارها وجود داشت ($p < 0/05$). در این تیمارها میزان هورمون پروژسترون ۲۴ ساعت پس از تزریق به میزان قبل از تزریق رسید ($p > 0/05$) (شکل ۲).



شکل ۲: سطح استروئیدهای جنسی شامل ۱۷ بتا استرادیول (A)، تستوسترون (B) و ۱۷ الفا، ۲۰ بتا، دی هیدروکسی ۴-پرگنون، ۳-اون در مولدین ماده کوی (c)

Figure 1: serum 17β-estradiol (A), Testosterone (B), and 17α, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one (C) levels in koi carp (*Cyprinus carpio carpio*) females. Mean ± SD; n = 15. Different letters designate significant differences as determined by Tukey's post-hoc tests

بحث

تکثیر مصنوعی کپورماهیان سخت است و نیاز به تحریکات هورمونی مناسب دارد (Brzuska, 2021). بسیاری از ماهی‌ها در زمان پرورش به دلیل کاهش هورمون‌های استروئیدی در روند تولید مثلی خود دچار نقصان می‌شوند، گاهی اوقات تنها راه کنترل تولیدمثل ماهیان پرورشی استفاده از هورمون‌ها به منظور افزایش سطح هورمون استروئیدی برای القاء تولید مثل است (Zohar and Mylonas, 2001). در مطالعه حاضر، قابلیت استفاده از هورمون GnRH نوترکیب با و بدون آنتی دوپامین به عنوان القاء کننده بلوغ نهایی در مولدین ماده کوی و اثر آن بر عملکرد تولید مثلی مورد ارزیابی قرار گرفت. اثر القاء کنندگی GnRH نوترکیب مشاهده شده در مطالعه حاضر، تأیید مطالعات قبلی بر مولدین استرلیاد *Acipenser ruthenus* (Mohammadzadeh et al., 2021b) و ماهی طلایی *Carassius auratus* (Mohammadzadeh et al., 2020b) است. همچنین در مطالعه Yeganeh و همکاران (۲۰۲۲) GnRH نوترکیب (۲۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن) به همراه آنتی دوپامین سبب القاء بلوغ نهایی و تخم‌ریزی شده است. در مطالعه حاضر، گروهی از مولدین که فقط GnRH نوترکیب دریافت کرده بودند نیز به مرحله تخم‌ریزی رسیدند. ماهی کوی از خانواده کپورماهیان است و در این خانواده فعالیت دوپامینی بالایی مشاهده شد (Podhorec et al., 2012). توانایی GnRH نوترکیب به‌تنهایی برای القاء تخم‌ریزی در مولدین کوی شبیه به باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*) و لای ماهی است که فاقد تنظیم دوپامینرژیک در آزادسازی LH هستند (Prat et al., 2001; Podhorec et al., 2016). به‌نظر می‌رسد که در این گونه‌ها، تزریق آنتی دوپامین به همراه GnRH در تحریک ترشح LH و اوولاسیون نقش سرکوب‌کنندگی بیشتری نسبت به نقش القایی دارد. در مولدین کوی ممکن است، نقش مهارکنندگی دوپامین مربوط به مرحله قبل از تخم‌ریزی^۱ به عنوان یک تنظیم‌کننده در رهایش طولانی مدت LH باشد و مانند سایر گونه‌های خانواده کپورماهیان به عنوان یک بازدارنده قوی عمل نکند. در مطالعه حاضر،

¹ Pre-ovulatory

زمان نهفته در تیمار دریافت کننده GnRH نوترکیب به‌تنهایی بیشتر از تیمار دریافت‌کننده GnRH نوترکیب به همراه دامپریدون بود. GnRH به همراه آنتی دوپامین موجب افزایش سریع و زودهنگام هورمون LH شده، اما هورمون GnRH به‌تنهایی سبب افزایش تدریجی این هورمون و افزایش مدت زمان نهفته می‌شود (Podhorec et al., 2016)، اما نتایج مربوط به درصد لقاح نشان داد که تیمار دریافت‌کننده GnRH نوترکیب به‌تنهایی درصد لقاح بالاتری نسبت به تیمار دریافت‌کننده GnRH نوترکیب به همراه دامپریدون داشت. Billard و همکاران (۱۹۸۴) پیشنهاد کردند که سطوح بالای LH قبل از تخم‌ریزی ناشی از آنتی دوپامین به همراه GnRH می‌تواند تأثیر مخربی بر کیفیت تخمک در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) داشته باشد. تأثیر منفی مشابهی از آنتی دوپامین به همراه GnRH بر کیفیت و بقاء تخمک در لای ماهی و ماهی آزاد (*Salvelinus alpinus*) مشاهده شده است که بر همبستگی منفی بین سطوح LH یا انتشار LH و بقای تخمک‌ها تأکید می‌کند (Gillet et al., 1996; Podhorec et al., 2016).

استروئیدهای جنسی (اندروژن و پروژسترون)، ترکیبات غیر آلی هستند که نقش ضروری در کنترل هورمونی تولید مثل در ماهیان ایفاء می‌کنند (Bayunova et al., 2007) به‌طوری‌که افزایش آنها در طول رسیدگی نهایی در هر دو جنس نر و ماده دیده شده است (Semenkova et al., 2002). بررسی هورمون E2 در تیمارهای آزمایشی نشان داد، در زمان صفر که نمونه‌برداری قبل از تزریق بود، اختلاف معنی‌داری بین تیمارها دیده نشد. ۶ ساعت بعد از تزریق سطح این هورمون به طور معنی‌داری در تیمار تزریق شده با هورمون GnRH نوترکیب با و بدون آنتی دوپامین (تیمار سوم و چهارم) افزایش و سپس ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از تزریق کاهش یافت، اما در تیمارهای تزریق شده با سرم فیزیولوژی و آنتی دوپامین (دامپریدون)، تغییری در سطح هورمون مشاهده نشد. هیچ تفاوتی بین تیمار تزریق شده با هورمون GnRH نوترکیب با و بدون آنتی دوپامین (تیمار سوم و چهارم) در سطح E2 یافت نشد. الگوهای ترشح برای این استروئیدها با تغییر مورد انتظار در مسیر بیوسنتزی از تولید

عمدتاً استروئیدهای C19 و C18 به C21 مطابقت دارد (Nagahama, 1994). کاهش قابل توجهی در مقادیر E2 از زمان تزریق تا پایان دوره آزمایشی برای هر دو تیمار سوم و چهارم مشاهده شد. یک الگوی سطح E2 مشابه در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و لای ماهی یافت شد (Levavi - Zermomsky and Yaron, 1986; Podhorec *et al.*, 2016) که منعکس کننده تغییر در آنزیمهای استروئیدوژن از شیوع آروماتاز P450 به $\beta 20$ هیدروکسی استروئید دهیدروژناز است که منجر به تولید استروئید القاء کننده بلوغ ($\alpha 17$, 20β ، دی هیدروکسی-4-پرگن-3-ون) می شود (Nagahama and Yamashita, 2008). هیچ کاهشی در مقادیر E2 در تیمارهای تزریق شده با سرم فیزیولوژی و آنتی دوپامین دامپریدون (تیمار اول و دوم) مشاهده نشد که نشان می دهد، دامپریدون به تنهایی نمی تواند سبب افزایش LH کافی برای القاء باشد. تیمارهای تزریق شده با هورمون GnRH نوترکیب با و بدون آنتی دوپامین (تیمار سوم و چهارم)، مقادیر T افزایش یافت و در ۱۲ ساعت بعد از تزریق به اوج رسید و در ۲۴ ساعت بعد از تزریق به سطح پایه کاهش یافت. یک الگوی ترشح T مشابه پس از تزریق هورمون GnRH در یک مطالعه با نمونه گیری خون مکرر در لای ماهی گزارش شد (Pinillos *et al.*, 2002, Podhorec *et al.*, 2016). تغییرات الگوی T احتمالاً به دلیل تغییر در مسیر استروئیدزایی است که منجر به تولید استروئید القاء کننده بلوغ ($\alpha 17$, 20β ، دی هیدروکسی-4-پرگن-3-وان) از پیش ساز $\alpha 17$ -هیدروکسی پروژسترون می شود (Pinillos *et al.*, 2002). بررسی هورمون پروژسترون در تیمارهای آزمایشی در مطالعه حاضر، نشان داد ۱۲ ساعت بعد از تزریق افزایش معنی داری در تیمارهای تزریق شده با هورمون GnRH نوترکیب با و بدون آنتی دوپامین (تیمار سوم و چهارم) دیده شد، اما در گروه های شاهد هیچ افزایشی مشاهده نشد. این یافته ها با نتایج مطالعه Podhorec و همکاران (۲۰۱۶) در مولدین لای ماهی و Aizen و همکاران (۲۰۱۷) در مولدین کپور معمولی مطابقت داشت به طوری که بیشترین میزان هورمون DHP در ۶ و ۱۲ ساعت بعد از تزریق مشاهده شد. افزایش DHP در یک دوره کوتاه می تواند بیانگر نقش غیر مستقیم

آن در رسیدگی نهایی تخمک ها از طریق دی هیدروکسی پروژسترون و $\alpha 17$ ، ۲۰ بتا پروژسترون در زمان اوولاسیون باشد (Semenkova *et al.*, 2006). در مطالعه حاضر، سطح هورمون DHP در تیمارهای تزریق شده با هورمون GnRH نوترکیب با و بدون آنتی دوپامین (تیمار سوم و چهارم) افزایش یافته، اما هورمون E2 در این تیمارها همزمان با افزایش DHP کاهش یافت. این نتایج مطابق با یافته های گزارش شده Levavi-Zermomsky و Yaron (۱۹۸۶) و Aizen و همکاران (۲۰۱۷) در ماهی کپور معمولی بود. کاهش در سطوح E2 به همراه افزایش در سطوح P، تغییر در مسیر استروئیدسازی از تشکیل استروژن ها به سمت تشکیل پروژسترون ها را ثابت می کند. این فرایند ممکن است به علت کاهش فعالیت 20β -۱۷ لیاز و افزایش فعالیت ۲۰ بتا هیدروکسی استروئید دی هیدروژناز باشد (Aizen *et al.*, 2012; 2017). در شمار زیادی از ماهیان استخوانی، دو ژن کد کننده $\alpha 17$ هیدروکسیلاز (P450c17) شناسایی شده است. یکی از آنها P450c17-I بوده و بیان آن نشان دهنده فعالیت لیاز است که استروئیدهای ۱۹ کربنه را تولید می کند که ممکن است به عنوان پیش ساز استروژن باشند. این نوع از P450c17 سلول های گرانولوزای تخمدان در مرحله زرده سازی بیان می شوند. نوع دیگر آن P450c17-II که کد کننده $\alpha 17$ هیدروکسیلاز بوده که فاقد فعالیت لیاز است و فقط در اووسیت های مرحله بلوغ بیان می شود (Zhou *et al.*, 2007; Nagahama and Yamashita, 2008). بنابراین، افزایش هورمون DHP و کاهش هورمون E2 در تیمارهای تزریق شده با هورمون GnRH نوترکیب با و بدون آنتی دوپامین (تیمار سوم و چهارم) نشان می دهد که این مولدین در مرحله بلوغ نهایی بودند و بعد از دریافت هورمون القاء کننده با افزایش سطح هورمون DHP به مرحله تخم ریزی رسیدند.

نتایج مربوط به القاء بلوغ نهایی در مولدین ماده کوی نشان داد که هورمون GnRH نوترکیب با و بدون آنتی دوپامین بر فرایند فیزیولوژیک تولید مثل ماهی کوی به طور طبیعی عمل می کند و باعث ناهنجاری در سیستم تولید مثلی در مراحل مختلف تکثیر مصنوعی ماهی کوی نمی شود. در

Ichthyology, 22:334–339. DOI:10.1111/j.1439-0426.2007.00980.x

Billard, R., Reinaud, P., Hollebecq, M.G. and Breton, B., 1984. Advancement and synchronisation of spawning in *Salmo gairdneri* and *S. trutta* following administration of LRH-A combined or not with pimozone. *Aquaculture*, 43(1-3):57-66. DOI:10.1016/0044-8486(84)90009-7

Brzuska, E., 2021. Reproduction effectiveness of carp (*Cyprinus carpio* L.) from the Hungarian W breeding line after stimulating ovulation with spawning inducing agents of natural (CPH, hCG, PMSG) and/or synthetic origin (ovopel, dagin, ovaprim, mGnRH-A). *Aquaculture*, 532:736023. DOI:10.1016/j.aquaculture.2020.736023.

Gillet, C., Breton, B. and Mikolajczyk, T., 1996. Effects of GnRH_a and pimozone treatments on the timing of ovulation and on egg quality in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) at 5 and 10 °C. *Aquatic Living Resources*, 9(3):257-263. DOI: 10.1051/alr:1996029

Kouřil, J., Barth, T., Hamáčková, J. and Flegel, M., 1986. Induced ovulation in tench (*Tinca tinca* L.) by various LH-RH synthetic analogues: effect of site of administration and temperature. *Aquaculture*, 54(1-2):37-44. DOI:10.1016/0044-8486(86)90252-8

Lahnsteiner, F., Urbanyi, B., Horvath, A. and Weismann, T., 2001. Bio-markers for egg quality determination in cyprinid fishes. *Aquaculture*, 19:331–352. DOI:10.1016/S0044-8486(00)00550-0

مولدین تحت تیمار، میزان هورمون P در تیمار دریافت کننده هورمون نو ترکیب بدون آنتی دوپامین افزایش یافت و روند مشابهی با تیمار تزریق شده با GnRH نو ترکیب با دامپریدون داشت. بنابراین، استفاده از هورمون GnRH نو ترکیب بدون آنتی دوپامین برای القاء رسیدگی نهایی ماهی کوی پیشنهاد می شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی قدردانی می گردد.

منابع

- Ahmadifar, A., Imanpour, M. R., Amini, K., Zadmajid, V. and Gholampour, T.A., 2016.** Different methods using GnRH_a on out of season reproductive efficiency in male goldfish (*Carassius auratus*, Linnaeus 1758). *Applied Biology*, 6(1):29-39. (In Persian)
- Aizen, J., Kobayashi, M., Selicharova, I., Sohn, Y.C., Yoshizaki, G. and Levavi-Sivan, B., 2012.** Steroidogenic response of carp ovaries to piscine FSH and LH depends on the reproductive phase. *General and Comparative Endocrinology*, 178:28-36. DOI:10.1016/j.ygcen.2012.04.002
- Aizen, J., Hollender, L., Shpilman, M. and Levavi-Sivan, B., 2017.** Biologically active recombinant carp LH as a spawning inducing agent for carp. *Journal of Endocrinology*, 3:391-402. DOI:10.1530/JOE-16-0435
- Bayunova, L.V., Canatio, A.M., Semenkova, T.B., Dybin, V.P., Svordlova, D. and Trenkler, I., 2007.** Sex steroids and cortisol levels in the blood stellate sturgeon (*Acipenser stellatus* Pallas) during final maturation induced by LH-RH analogue. *Journal of Applied*

- Levavi-Zermomsky, B. and Yaron, Z., 1986.** Changes in gonadotropin and ovarian-steroids associated with oocytes maturation during spawning induction in the carp. *General and Comparative Endocrinology*. 62:89-98. DOI:10.1016/0016-6480(86)90097-3.
- Mohammadzadeh, S., Moradian, F., Yeganeh, S., Falahatkar, B. and Milla, S., 2020a.** Design, production and purification of a novel recombinant gonadotropin-releasing hormone associated peptide as a spawning inducing agent for fish. *Protein Expression and Purification*. 166:105510. DOI:10.1016/j.pep.2019.105510.
- Mohammadzadeh, S., Yeganeh, S., Moradian, F. and Rekabi, M., 2020b.** Study on biological performance of recombinant GnRH as a spawning – inducing agent for goldfish (*Carassius auratus*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*. 29(2):21-32. DOI:10.22092/ISFJ.2019.121154. (In Persian)
- Mohammadzadeh, S., Yeganeh, S., Moradian, F., Milla, S. and Falahatkar, B., 2021a.** Spawning induction in Sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*) with recombinant GnRH: Analysis of hormone profiles and spawning indices. *Aquaculture*, 533:36108. DOI:10.1016/j.aquaculture.2020.736108.
- Mohammadzadeh, S., Milla, S., Ahmadifar, E., Karimi, M. and Dawood, M.A., 2021b.** Is the use of recombinant cGnRH may be a future alternative to control the fish spawning? Let us go with the goldfish example. *Fish Physiology and Biochemistry*, 47(4):951-960. DOI:10.1007/s10695-021-00953-6
- Mylonas, C. and Zohar, Y., 2001.** Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10:463-491. DOI:10.1016/S0044-8486(98)00374-3
- Negahama, Y., 1994.** Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *International Journal of Developmental Biology*, 38(2):217-229.
- Naghama, Y. and Yamashita, M., 2008.** Regulation of oocyte maturation in fish. *Development Growth and Regeneration*, 1:S195-219. DOI:10.1111/j.1440-169X.2008.01019.x
- Peter R.E. and Yu K.L., 1997.** Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 7:173–197. DOI: 10.1023/A:1018431610220
- Peter, R.E., Lin, H.R. and Van Der Kraak, G., 1988.** Induced ovulation and spawning of cultured freshwater fish in China: advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonists. *Aquaculture*, 74(1-2):1-10. DOI:10.1016/0044-8486(88)90080-4
- Pinillos, M.L., Guijarro, A.I., Delgado, M.J., Hubbard, P.C., Canario, A.V.M. and Scott, A.P., 2002.** Production, release and olfactory detection of sex steroids by the tench (*Tinca tinca* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 26:197–210. DOI:10.1023/A:1025421920443
- Podhorec, P. and Kouril, J., 2009.** Induction of final oocyte maturation in Cyprinidae fish by hypothalamic factors: A review. *Veterinárni Medicina*, 54(3):97–110. DOI:10.17221/50/2009-VETMED
- Podhorec, P., Socha, M., Sokolowska-Mikolajczyk, M., Drozd, B., Policar, T., Stejskal, V. and Kouril, J., 2011.** Effective dose of mGnRHa for induction of ovulation in tench (*Tinca tinca* L.). *Aquaculture*, 319:184–187. DOI:10.1016/j.aquaculture.2011.06.019

- Podhorec, P., Socha, M., Sokolowska-Mikolajczyk, M., Policar, T., Svinger, V.W., Drozd, B. and Kouril, J., 2012.** Dopamine control of LH release in the tench (*Tinca tinca*). *General and Comparative Endocrinology*, 175(1):34-38. DOI:10.1016/j.ygcen.2011.10.013
- Podhorec, P., Socha, M., Amma, B.I., Sokolowska, M., Brzuska E., Milla, S., Gosiewski, G., Stejskal, V., Simko, M. and Kouril, J., 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
- Prasad, P., Ogawa, S. and Parhar, I.S., 2015.** Role of serotonin in fish reproduction. *Frontier in Neuroscience*, 9(195):1-9. DOI: 10.3389/fnins.2015.00195
- Prat, F., Zanuy, S. and Carrillo, M., 2001.** Effect of gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRHa) and pimozide on plasma levels of sex steroids and ovarian development in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*, 198(3-4):325-338. DOI:10.1016/S0044-8486(00)00600-1
- Semenkova, T.B., Barannikova, I.A., Kime, D.E., McAllister, B.G., Bayunova, L.V., Dyubin, V.P. and Kolmakov, N.N., 2002.** Sex steroid profiles in female and male Stellate sturgeon during final maturation induced by hormonal treatment. *Journal of Applied Ichthyology*, 18:375-381. DOI:10.1046/j.1439-0426.2002.00368.x
- Semenkova, T.B., Bayunova, L.V., Webb, M.A.H., Kolmakov, N.N., Romanov, A.G. and Barannikova, I.A., 2006.** Effect of progestins on germinal vesicle break down in sturgeon follicles in vitro. *Journal of Applied Ichthyology*, 22:352-357. DOI:10.1111/j.1439-0426.2007.00983.x
- Sudagar, M., Sedgh Poorsabet, S., Zakariaee, H. and Dadgar, S., 2016.** Effect of ovaprim, ovafact hormones and pituitary extract on artificial reproduction of white fish *Rutilus kutum* (Kamensky, 1901). *Journal of Applied Ichthyological Research*, 4(3):53-64. (In Persian)
- Treves-Brown, K.M., 2000.** Breeding induction agents. *Applied Fish Pharmacology*, 220-240.
- Yaron, Z. and Levavi-Sivan, B., 2011.** Endocrine regulation of fish reproduction. *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*, 2(2):1500-1508.
- Yeganeh, S., Mohammadzadeh, S., Moradian, F. and Milla, S., 2022.** The effects of recombinant GnRH with dopamine antagonist on reproduction performance, sex steroid levels, and stress response in female koi carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Reports*, 22:101001. DOI:10.1016/j.aqrep.2021.101001
- Zhou, L.Y., Wang, D.S., Kobayashi, T., Yano, A., Paul-Prasanth, B., Suzuki, A., Sakai, F., and Nagahama, Y., 2007.** A novel type of P450c17 lacking the lyase activity is responsible for C21-steroid biosynthesis in the fish ovary and head kidney. *Endocrinology*, 148(9):4282-4291. DOI: 10.1210/en.2007-0487.
- Zohar, Y. and Mylonas, C.C., 2001.** Endocrine manipulation of spawning in cultured fish: From hormones to genes. *Aquaculture*, 197:99-136. DOI:10.1016/S0044-8486(01)005841.