

بررسی عملکرد زیستی GnRH نوترکیب به عنوان القاء کننده تخم‌ریزی در ماهی طلایی (*Carassius auratus*)

صدیقه محمدزاده^۱، سکینه یگانه^{*}^۱، فاطمه مرادیان^۲، مسعود رکابی^۱

*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- گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۸

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۸

چکیده

هormون‌های مختلفی برای تکثیر مصنوعی آبزیان در مراکز تکثیر و پرورش استفاده می‌شود و یکی از انواع این هورمون‌ها، آنالوگ‌های مختلفی از هورمون آزاد کننده گنادوتropin (GnRH) با نام‌های تجاری مختلف می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی فعالیت زیستی GnRH نوترکیب تولیدی در آزمایشگاه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری بر القاء و همزمانی اوولاسیون در مولدین ماهی طلایی (*Carassius auratus*) می‌باشد. برای این منظور ۲۰ جفت مولد آماده تکثیر ماهی طلایی از یکی از مراکز تکثیر و پرورش خریداری شده و به سالن تکثیر و پرورش ماهی گروه شیلات منتقل گردید و بعد از گذراندن دو هفته دوره سازگاری با شرایط آزمایش در ۴ گروه آزمایشی تقسیم شدند، سپس به گروه اول، دوم و سوم بترتیب ۱۵ و ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن هورمون GnRH نوترکیب تولیدی به همراه ۲۰ میلیگرم بر کیلوگرم وزن بدن متوكلوپرامید (آنتی‌دوپامین) و به گروه شاهد سرم فیزیولوژی ۰/۰۹ درصد به همراه ۲۰ میلیگرم بر کیلوگرم وزن بدن متوكلوپرامید طی یک مرحله تزریق گردید. نتایج نشان داد هورمون GnRH تولیدی قابلیت القاء بلوغ نهایی را در مولدین مورد مطالعه داشته و تمامی گروه‌های دریافت کننده این هورمون به مرحله باروری رسیدند، اما هیچیک از مولدین گروه شاهد تخم‌ریزی نکردند. دوره تاخیر در مولدین تزریق شده با دوز ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن به طور معنی‌داری کمتر از سایر تیمارها بود ($p < 0.05$). در میزان تخم استحصالی و هماروی نسبی اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای دریافت کننده هورمون GnRH نوترکیب وجود نداشت ($p > 0.05$). از نتایج بدست آمده می‌توان استنباط کرد که هورمون GnRH نوترکیب تولیدی فعالیت بیولوژیک مناسبی داشته و می‌تواند به عنوان یک جایگزین مناسب برای درمان اختلالات تولید مثلی در مولدین پرورشی معرفی گردد.

لغات کلیدی: GnRH نوترکیب، القای هورمونی، ماهی طلایی، *Carassius auratus*

*نویسنده مسئول

مقدمه

بوسیله دستکاری عوامل محیطی از قبیل دوره نوری، دمای آب یا بستر تخم‌ریزی قابل کنترل می‌باشد (Mylonas and Zohar, 2001). با توجه به اینکه نیاز زیستی بعضی از گونه‌ها هنوز بخوبی شناخته شده نیست و با شبیه‌سازی پارامترهای محیطی انجام تولید مثل طبیعی غیر ممکن می‌باشد، مهمترین گام جهت تکثیر مصنوعی ماهیان و مطلوب کردن مدیریت و فن‌آوری پرورش مولдин استحصال تخم و همزمان سازی استحصال سلول‌های جنسی از جنس نر و ماده می‌باشد. این عمل سبب کاهش هزینه، ساده کردن جمع‌آوری سلول‌های جنسی و انکوباسیون تخم می‌گردد. تقریباً تمام ماهیان در محیط پرورشی عملکرد تولیدمثلی ضعیفی را از خود نشان می‌دهند. غالباً در جنس ماده، ناتوانی در بلوغ نهایی اووسیت‌ها، تخم‌گذاری و تخم‌ریزی وجود دارد (Mylonas *et al.*, 2010) و در جنس نر ممکن است Mylonas and Asperm با کیفیت ضعیف تولید شود (Zohar, 2007). این عملکرد ضعیف ناشی از این واقعیت است که ماهی در شرایط اسارت، شرایط تخم‌ریزی طبیعی را تجربه نکرده است. بنابراین، غده هیپوفیز در ترشح گندوتروپین‌ها، بلوغ و تخم‌گذاری ناتوان است. دستکاری هورمونی در آبزی پروری تجاری حتی در مورد گونه‌هایی که به صورت طبیعی مرحله تخم‌گذاری و اسپرمیشن را طی می‌کنند، نیز اهمیت فوق العاده‌ای دارد بطوریکه در بسیاری از کارگاه‌های تکثیر ماهیان جهت بهینه‌سازی و همزمانی تولید تخم و لارو، کاهش دستکاری و استرس وارد به ماهیان و نیز کاهش هزینه‌های تخم‌گذاری و اسپرم‌ریزی، القاء هورمونی صورت می‌گیرد (سوداگر و همکاران، ۱۳۹۵). مطالعات نشان داده است که پارامترهای مختلف تولید مثلی از جمله زمان رسیدگی، هم‌آوری کاری، تعداد تخم، درصد لقاد و سطح استروئیدهای جنسی تحت تاثیر هورمون‌های مورد استفاده در تکثیر مصنوعی آبزیان قرار می‌گیرد (Aizen *et al.*, 2005; Barrero *et al.*, 2008) مختلفی برای تکثیر مصنوعی آبزیان در مراکز تکثیر و پرورش استفاده می‌شود و یکی از انواع این هورمون‌ها، آنالوگ‌های مختلفی از GnRH با نام‌های تجاری مختلف

استفاده از آکواریوم و نگهداری ماهیان زینتی در گذشته جنبه تجملاتی و تفننی داشت، ولی در حال حاضر در اکثر کشورها از جمله ایران، نگهداری ماهیان آکواریومی در خانواده‌ها مرسوم شده است. پرورش این ماهیان به عنوان یک صنعت که از قابلیت‌های اشتغال‌زایی قابل توجیهی برخوردار است، اهمیت دارد (قدسی، ۱۳۸۱؛ رامین و همکاران، ۱۳۹۶). ماهیان زینتی آب شیرین در مناطق مختلفی از جهان وجود دارند که کشورهای مختلف از جمله کشورهای آسیای جنوب شرقی و برخی از کشورهای اروپایی، این ماهیان را تکثیر و پرورش می‌دهند و به عنوان ماهیان زینتی در محل تولید به فروش می‌رسانند یا به سایر کشورها صادر می‌کنند (عبدی، ۱۳۷۸) بطوریکه پرورش و صادرات ماهیان تزئینی در برخی کشورها به یک تجارت سودآور تبدیل شده است. در کشور ایران نیز این صنعت در دهه اخیر رونق زیادی یافته است و تعداد زیادی از افراد در روند تولید، فروش و صادرات آن سهیم می‌باشند. یکی از مهمترین گونه‌های زینتی، ماهی طلای (گلدفیش) (*Carassius auratus*) می‌باشد که از خانواده کپور ماهیان و تخم‌گذار بوده و به لحاظ زینتی دارای ارزش اقتصادی می‌باشد (رعیت‌پیشه و همکاران، ۱۳۹۰). ماهی طلای گونه بسیار مناسبی برای مطالعات تولید مثلی، آندوکرینولوژی، سلولی، ایمنی‌شناسی، سمشناسی و مولکولی می‌باشد، زیرا برای تحقیقات آزمایشگاهی از اندازه مناسبی برخوردار است و همچنین در محیط‌های آزمایشگاهی براحتی قادر به بلوغ و تولید مثل می‌باشد. در واقع، از این گونه به عنوان مدل برای بررسی کپور ماهیان استفاده می‌شود (Munakata *and Kobayashi*, 2010).

گسترش صنعت آبزی پروری این ماهیان با یک چالش بزرگ در مرحله بلوغ نهایی و تکثیر مولдин در شرایط اسارت در مراکز تکثیر و پرورش رویرو می‌باشد. یکی از پیش‌نیازها برای تکثیر و پرورش مصنوعی این ماهیان و تولید پایدار کنترل فرآیند تولید مثل این ماهیان در شرایط اسارت و بدست آوردن تخم‌های (اسپرم و تخم) با کیفیت بالا می‌باشد. تولید مثل ماهی در شرایط اسارت

جهت تسهیل در امر کلونینیگ و بیان ژن، تغییراتی از جمله اضافه کردن کدون شروع و خاتمه بر توالی ژن و افزودن جایگاه برش آنزیم‌های محدود کننده در هر دو انتهای ژن صورت گرفت. با مجموعه تغییرات صورت گرفته، توالی مورد نظر با ۱۸۶ جفت باز به شرکت Shainegene (کشور چین) برای سنتز بیوشیمیابی ارسال شد و به صورت کلون شده در وکتور بیانی pET28a⁺ دریافت گردید. وکتور نوترکیب به باکتری میزبان Escherichia coli BL21(DE3) انتقال داده شد و بعد از بررسی بیان، میزان تولید پپتید نوترکیب بهینه سازی شده و سپس خالص‌سازی انجام شده و صحت خالص‌سازی با تکنیک‌های SDS-PAGE و وسترن بلاست سنجیده شد.

ماهی و شرایط پرورش

برای بررسی فعالیت زیستی هورمون نوترکیب در ماهی طلایی، در این آزمایش ابتدا تعداد ۴۰ جفت مولد ماهی طلایی (با میانگین وزن $6/21 \pm 72/2$ گرم) آماده تکثیر (مولدها ماده با شکمی نرم و برآمده) از مرکز تکثیر و پرورش ماهی گربابی در استان گیلان خریداری شد و پس از انتقال به سالن تکثیر و پرورش ماهی در دانشکده علوم دامی و شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به مدت دو هفته به شرایط آزمایش سازگار شدند. سپس در ۴ گروه آزمایشی تقسیم گردیدند. در هر تیمار ده مولد مورد بررسی قرار گرفت. هر جفت ماهی در یک آکواریوم ۵۰ لیتری به ابعاد $15 \times 15 \times 20$ سانتی‌متر مجرا به صورت کاملاً تصادفی قرار داده شدند. بعد از گذراندن دوره آداتاسیون و مناسب شدن دمای محیط، تکثیر مولدها انجام شد. آب مورد استفاده برای نگهداری ماهیان با استفاده از تیوسولفات سدیم و همچنین هوده‌ی، کلرزدایی گردید و شرایط فیزیکوشیمیابی آب در حد بهینه گونه شامل درجه حرارت 26 ± 1 درجه سانتی‌گراد، pH $8/3 \pm 0/3$ و pH مطلوب برای تکثیر و پرورش در طولانی‌مدت برای گونه‌ی مورد مطالعه $7-8$ می‌باشد (ارجینی، ۱۳۸۸). اما بنظر می‌رسد با توجه به کوتاه بودن دوره تکثیر، در مطالعه ۲۳

می‌باشد (Zohar and Mylonas, 2001). نوروهورمون دکاپتیدی است که از هیپotalamus ترشح شده و سبب تحريك سنتز و ترشح گنادوتropin‌ها از هیپوفیز می‌شود (Okubo and Nagahama, 2008). یکی از بزرگترین معايب استفاده از آنالوگ‌های تولیدی توسط شرکت‌های مختلف قیمت بالای آن می‌باشد که تهیه آن را برای بسیاری از مراکز تکثیر و پرورش ماهیان زینتی غیر ممکن می‌کند. از سویی، مشکلات زیادی پیش‌روی واردات محصول از سایر کشورها وجود دارد که نیاز به استفاده از ذخیره ارزی کشور می‌باشد. همچنین تولید هورمون به کمک روش DNA نوترکیب، روش مناسب جهت تولید داروهای پروتئینی می‌باشد که با توجه به ساختار پپتیدی GnRH و عدم تغییرات پس از ترجمه می‌توان از میزبان پروکاریوتی همانند باکتری Escherichia coli استفاده نمود که دارای قابلیت کشت در محیط کشت‌های ارزان قیمت می‌باشد. بنابراین، تولید این پروتئین در داخل کشور به روش نوترکیب روش مقرن به صرفه‌ای می‌باشد. لذا، هدف از این مطالعه بررسی فعالیت زیستی هورمون GnRH نوترکیب تولیدی در آزمایشگاه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری (محمدزاده و همکاران، ۱۳۹۸) بر القاء و همزمانی اوولاسیون در ماهی طلایی (*C. auratus*) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تولید GnRH نوترکیب به روش محمدزاده و همکاران (۱۳۹۸) انجام شد. بدین صورت که توالی DNA مربوط به هورمون GnRH ماهیان مختلف از بانک اطلاعاتی NCBI¹ استخراج گردید. توالی پپتیدی این هورمون در انواع مختلف ماهیان نیز بررسی شد و بهترین توالی به لحاظ پایداری بیشتر در برای هضم آنزیم‌های پروتئولیتیک و ماندگاری بیشتر در سیستم زنده در نظر گرفته شد. سپس با توجه به توالی انتخابی برای این پپتید، توالی ژنی آن ترجمه شد. پس از انتخاب توالی ژنی و نواحی مورد نظر از جمله ناحیه دکاپتید (پپتید فعال) و ناحیه GAP،

¹ National Center Biotechnology Information

مدت یک دقیقه با پر به آرامی هم زده شدند و پس از یک دقیقه لقادم شد. برای رفع چسبندگی تخمهای لقادم یافته از محلول کاربامید (۳ گرم اوره، ۴ گرم نمک در یک لیتر آب) استفاده شد و به مدت ۳۰ دقیقه تخمهای در محلول قرار گرفتند (هر ده دقیقه یکبار تعویض محلول کاربامید صورت گرفت و مقدار محلول اضافه شده به اندازه ۱۰ درصد از حجم کل تخم بود) و بعد از ۳۰ دقیقه شستشو با محلول کاربامید، به مدت یک ساعت و ۳۰ دقیقه توسط آب شیرین شستشو داده شدند و سپس تخمهای به آرامی وارد آکواریوم انکوباسیون شدند. تعیین هماوری، شمارش تخمهای به صورت تخمینی و با روش وزنی صورت گرفت. در تعیین هماوری نسبی نیز، مولدین وزن شده و نسبت تعداد تخمهای استحصال شده به وزن ماهیان بر حسب گرم بر اساس رابطه ذیل محاسبه گردید (Targonska and Kucharczyk, 2011):

وزن مولدین (کیلوگرم) / تعداد کل تخمهای هم‌آوری نسبی

آنالیز آماری

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. بررسی نرمال بودن داده‌ها از طریق آزمون Kolmogorov-Smirnov، تجزیه و تحلیل داده‌های بدست آمده به روش آنالیز واریانس یک طرفه انجام گردید و برای آنالیز آماری از نرم‌افزار SPSS 25، مقایسه میانگین‌ها از آزمون آماری دانکن در سطح احتمال ۹۵ درصد استفاده شد.

نتایج

بعد از تزریق هورمون، مولدین ماده طی روز اول، چندین بار مورد معاینه قرار گرفتند تا در صورت آماده بودن و اوله شدن تخمهای تکثیر شوند. این روند معاینه مولدین تا ۲۴ ساعت پس از تزریق ادامه یافت و ماهیان رسیده و آماده تکثیر شناسایی و همان روز تکثیر شدند. در پایان این دوره، از گروه‌های دریافت کننده هورمون، در تیمار اول از ۵ جفت مولد ۴ جفت، در تیمار دوم ۳ جفت مولد و در تیمار سوم تمامی ۵ جفت مولد به مرحله باروری رسیدند در حالیکه از گروه شاهد هیچیک از مولدین به

حاضر H مذکور اثر منفی در عملکرد مولدین نداشت) و میزان اکسیژن محلول بوسیله هواهی مداوم در حد اشباع نگهداری شد و به میزان 11.5 ± 0.8 میلی‌گرم در لیتر تعیین شد. سختی کل 18.46 ± 1.51 میلی‌گرم در لیتر بود. سیستم آبرسانی به تانک‌های نگهداری ماهیان متصل به آب لوله‌کشی شهری (شهر ساری) بود و آب مورد استفاده پیش از ورود به تانک نگهداری ماهیان، در تانک‌های ذخیره آب با استفاده از تیوسولفات سدیم کلرزاوی و به مدت ۴۸ ساعت هواهی گردید. طول دوره روشنایی ۱۶ ساعت و طول دوره تاریکی ۸ ساعت طی ۴ تیمار ساعت بود. برای تکثیر مصنوعی این مولدین ۴ میلی‌گرم آزمایشی در نظر گرفته شد. در تیمارهای اول، دوم و سوم از دوزهای مختلف هورمون GnRH نوترکیب تولیدی شامل ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن (زادمجدید و همکاران، ۱۳۸۸؛ رعیت‌پیشه و همکاران، ۱۳۹۰؛ احمدی‌فر و همکاران، ۱۳۹۴) به همراه ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن متوكلوبیرامید (آناتی‌دوپامین) (Podhorec *et al.*, 2016) و در تیمار چهارم از سرم فیزیولوژی 0.09 درصد به همراه ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن متوكلوبیرامید با حجم یک میلی‌لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به عنوان شاهد استفاده شد. تزریق هورمون به وسیله سرنگ انسولین در یک مرحله انجام گرفت و مولدین قبل از تزریق با پودر گل میخک با دوز ۱۵ ppm بیهوش شدند (احمدی‌فر و همکاران، ۱۳۹۴). سوزن سرنگ حاوی محلول هورمون با زاویه ۴۵ درجه در زیر ناحیه باله پشتی وارد گردید و هورمون به میزان تعیین شده به صورت عضلانی به ماهی تزریق شد. بعد از انجام عمل تزریق، خروج سرنگ به آرامی، همراه با ماساژ ناحیه تزریق هورمون صورت گرفت تا محلول هورمون تزریقی از بدن خارج نشود.

بررسی عملکرد تولیدمثلی مولدین ماهی طلای
در این آزمایش تخم‌کشی و اسپرم‌گیری به صورت دستی از مولدین صورت گرفت و تخم و اسپرم در ظرفی استریل و خشک مخلوط گردید، سپس آب شیرین بتدربیج اضافه شد تا حرکت اسپرم به سمت تخمک تسهیل گردد و به

مقدار تخم استحصالی در هر تیمار و هماوری نسبی (جدول ۲) اختلاف معنی‌داری بین سطوح مختلف هورمون نوترکیب تزریقی مشاهده نشد ($p > 0.05$).

این مرحله نرسیدند (جدول ۱). اختلاف معنی‌داری بین تیمارها در دوره تاخیر مشاهده شد و کمترین زمان در مولدین تیمار سوم ثبت گردید (جدول ۲؛ $p < 0.05$). در

جدول ۱. نرخ جواب دهی مولدین ماهی طلایی تزریق شده با تیمارهای آزمایشی

Table 1: The response rate of goldfish broods injected with experimental treatments

تیمارها	نوع هورمون	دور تزریقی هورمون (میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن)	تعداد مولدین	درصد مولدین تخم‌ریزی کرده
اول	GnRH نوترکیب	۱۰	۴	۸۰ ^b
دوم	GnRH نوترکیب	۱۵	۳	۶۰ ^c
سوم	GnRH نوترکیب	۲۰	۵	۱۰۰ ^a
چهارم	سرم فیزیولوژی	۰/۰۹	-	-
بدن متوكلوروپرامید				

حروف لاتین نامشابه در هر ستون نماینگر وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی می‌باشد ($p < 0.05$)

جدول ۲: عملکرد تولید مثلی مولدین ماهی طلایی تزریق شده با تیمارهای آزمایشی

Table 1: Reproductive performance of goldfish broods injected with experimental treatments

تیمارها	دور تزریقی هورمون (میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن) ۲۰+ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن متوكلوروپرامید	دوره تاخیر (ساعت)	تعداد تخم استحصالی	هم‌آوری نسبی
اول	GnRH ۱۰ نوترکیب	۲۲ ± ۰/۶ ^a	۲۵۴۲ ± ۵۷/۱ ^a	۱۷/۸۶ ± ۰/۵ ^a
دوم	GnRH ۱۵ نوترکیب	۲۱ ± ۰/۵ ^a	۲۵۴۰ ± ۴۸/۲ ^a	۱۸/۰۵ ± ۰/۳۳ ^a
سوم	GnRH ۲۰ نوترکیب	۱۷ ± ۰/۵ ^b	۲۵۵۶ ± ۵۷/۵ ^a	۱۸/۴ ± ۰/۴۸ ^a
چهارم	۰/۰۹ سرم فیزیولوژی	-	-	-

حروف لاتین نامشابه در هر ستون نماینگر وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی می‌باشد ($p < 0.05$)

ورونه (and Mylonas, 2001) در مطالعه حاضر، کارایی هورمون GnRH نوترکیب تولیدی در آزمایشگاه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در القاء رسیدگی نهایی جنسی در مولدین ماهی طلایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که مولدین دریافت کننده سطوح مختلف (۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن مختلف) نرخ تخم‌ریزی (۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) همراه با آنتی‌دوپامین (GnRH) این هورمون به مرحله نرسيدينده رسانیدند، اما هیچیک از مولدین گروه شاهد (تزریق با سرم فیزیولوژی همراه با آنتی‌دوپامین) به این مرحله نرسیدند. مطالعات مختلفی در زمینه استفاده از GnRH سنتتیک برای القاء بلوغ نهایی در ماهیان انجام شد، اثر القایی GnRH در گونه‌های مختلف ماهیان به اثبات رسیده است

بحث

یکی از بزرگترین مشکلات آبزی پروری تجاری خانواده کپورماهیان، مشکلات بدست آوردن تخم‌های با کیفیت در Targonska and Kucharczyk (2011). تکثیر مصنوعی کپورماهیان سخت می‌باشد و نیاز به تحریکات هورمونی مناسب دارد (Brzuska, 2005). بسیاری از ماهیان در زمان پرورش به دلیل کاهش هورمون‌های استروئیدی در روند تولیدمثلی خود دچار نقصان می‌شوند. برخی از موقع تنهای راه کنترل تولیدمثل ماهیان پرورشی استفاده از هورمون‌ها به منظور افزایش سطح هورمون استروئیدی همچون تستوسترون و Zohar کتوستوسترون جهت القاء تولیدمثل می‌باشد (Zohar, 2005).

حاضر، از فرم نوترکیب تولیدی این هورمون استفاده شد که از مزیت‌های هورمون GnRH نوترکیب می‌توان به این نکته اشاره کرد که این هورمون همانند سایر آنالوگ‌های هورمون GnRH قابل سنتز و استحصال به شکل خالص است (بر خلاف هورمون هیپوفیز) و احتمال انتقال بیماری‌ها وجود ندارد و همچنین می‌توان در طراحی توالی آن از سایر قسمت‌های پیتید همانند قسمت پروتئولیتیک سایت (بخشی از پروتئین کامل GnRH که بعد از منطقه فعال بیولوژیک قرار دارد) و بخش وابسته به پروتئین استفاده نمود (بر خلاف آنالوگ‌های سنتیک) که در پایداری و حفظ ساختار سوم آن کمک می‌کند. از سویی، با توجه به وارداتی بودن آنالوگ‌هایی سنتیک هر ساله هزینه زیادی در مراکز تکثیر و پرورش صرف تهیه این آنالوگ‌ها می‌گردد که هزینه تولید را افزایش می‌دهد، ولی با توجه به تولید GnRH نوترکیب در میزان باکتریایی و عدم نیاز به سنتز شیمیایی، هزینه تولید آن کمتر است. بنابراین، فرم نوترکیب تولیدی می‌تواند جایگزین مناسبی برای آنالوگ‌های سنتیک موجود در بازار باشد.

در مطالعه حاضر، به همراه GnRH نوترکیب از آنتی‌دوپامین (متوکلوبپرامید) استفاده شد. مطالعات مختلف نشان داد که آنتی‌دوپامین‌ها اثر القایی در بلوغ نهایی و اوولاسیون ندارند و با توجه به فعالیت بالای دوپامین و اثر بازدارندگی آنها در عملکرد تولید مثل در خانواده کپورماهیان در فصل تولید مثل، آنتی‌دوپامین‌ها فقط به عنوان بازدارنده دوپامین در این خانواده کاربرد دارند (Podhorec *et al.*, 2016). به طور کلی، از ترکیب GnRH به عنوان القاء کننده بلوغ نهایی و آنتی‌دوپامین به عنوان بازدارنده عملکرد دوپامین به طور گسترده برای Podrorec *et al.*, 2016) القاء اوولاسیون استفاده می‌شود (Podrorec *et al.*, 2016). ترکیب آنالوگ‌های GnRH و آنتی‌دوپامین در چندین گونه از ماهیان موثر بوده و به عنوان ابزاری مفید برای غلبه بر اختلالات تولیدمثلی و بدست آوردن تخم باکیفیت در مولдин چرورشی می‌باشد (Heyrati *et al.*, 2007; Podhorec *et al.*, 2016).

در مطالعه حاضر، تمامی دوزهای مورد استفاده سبب القاء بلوغ نهایی شدند. اثر القایی هورمون نوترکیب مورد

(Drori *et al.*, 1994; Podhorec *et al.*, 2016) القاء کننده‌های مختلفی در بازار وجود دارند که برای القاء بلوغ نهایی در مولдин چرورشی مورد استفاده قرار می‌گیرند. یکی از القاء کننده‌ها عصاره هیپوفیز می‌باشد، اما استفاده از عصاره هیپوفیز با اشکالات مختلفی در ارتباط است و یکی از مهمترین مشکلات در این زمینه انتقال بیماری از ماهی‌دهنده به ماهی گیرنده می‌باشد. همچنین برداشت و آماده‌سازی عصاره هیپوفیز کار سخت و زمان بری بوده و این عصاره علاوه بر هورمون‌های گنادوتروپین، دارای سایر هورمون‌هایی می‌باشد که می‌توانند فعالیت گنادوتروپین‌ها را تقویت یا مهار کنند (Aizen *et al.*, 2017). القاء کننده دیگری که به طور گسترده در هچجری‌ها استفاده می‌شود، هورمون گنادوتروپین می‌باشد. این هورمون مزایای بیشتری نسبت به عصاره هیپوفیز دارد، اما از قیمت بالایی برخوردار می‌باشد و همچنین یک مولکول بزرگ می‌باشد. لذا، تزربیق آن در دفعات مختلف ممکن است سبب بروز واکنش ایمنی گردد. بنابراین، قابلیت استفاده را در همه گونه‌ها ندارد (Mylonas and Zohar, 2001). اما رویکرد دیگری که در مورد القاء کننده‌ها وجود دارد، استفاده از آنالوگ‌های مختلف هورمون GnRH با نامهای تجاری مختلف می‌باشد. ترکیب GnRH شیمیایی بر خلاف عصاره هیپوفیز ریسک انتقال بیماری‌های عفونی را از بین می‌برد و نیز امکان کاربرد دوزهای صحیح GnRH را ایجاد می‌کند. علاوه بر آن، یک مولکول کوچک می‌باشد. لذا، احتمال تحریک سیستم ایمنی کاهش می‌یابد. همچنین از بالاترین سطح محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد عمل می‌کند و در این مسیر ممکن است سبب تحریک ترشح سایر عوامل از جمله هورمون رشد، هورمون تیروئید شود که به صورت غیر مستقیم در فرآیند تولید مثل نقش مثبت دارد. همچنین به دلیل همولوژی در توالی پروتئینی GnRH در بین گونه‌های مختلف ماهیان، آنالوگ‌های تولیدی قابلیت استفاده را برای تمامی گونه‌ها دارند (Nazari *et al.*, 2009). لذا، در بیشتر گونه‌های تجاری از آنالوگ‌های سنتیک GnRH که فقط شامل بخش فعال پیتید (دکاپتید) می‌باشد و به روش شیمیایی تولید می‌شوند، استفاده می‌گردد. در مطالعه

Targonska and Kucharczyk, 2011 تزریق تک مرحله‌ای کمتر می‌باشد (Kucharczyk, 2011). تزریق در مطالعه حاضر به صورت تک مرحله‌ای انجام شد. به طور معمول تزریق GnRH سنتیک در دو مرحله با فاصله زمانی ۱۸-۱۰ ساعت در خانواده کپورماهیان انجام می‌گیرد و تزریق تک مرحله‌ای برای القاء اولاسیون در این خانواده کافی نمی‌باشد. عدم پاسخ‌دهی تزریق یکباره GnRH سنتیک در القاء رسیدگی نهایی جنسی ماهیان مربوط به نیمه عمر کوتاه آن در گردش خون می‌باشد. با توجه به ساختار پیتیدی هورمون، این هورمون در معرض انواعی از GnRH، آن می‌شوند بطوریکه GnRH طبیعی به مدت ۵ دقیقه در بدن باقی می‌ماند و بعد از آن توسط پیتیدازها تخریب Gothilf and Zohar, 1991; Zohar and Mylonas, 2001 می‌شود (Mylonas, 2001). از سویی، رسیدگی نهایی برای کامل شدن در ماهیان ممکن است به چندین روز زمان نیاز داشته باشد. بنابراین، غلظت بالای GnRHa باید در این مدت در سیستم گردشی حفظ شود تا غلظت بالا و مورد نیازی را از گنادوتروپین نوع دوم القاء کند. همچنان ماهیان بلافصله بعد از تزریق GnRHa شروع به بلوغ نهایی نمی‌کنند و غلظت LH پلاسمای استرتوئید ممکن است چند ساعت بعد از تزریق هورمون افزایش یابد. بنابراین، در پروتکل القاء رسیدگی جنسی با GnRH با توجه به نیمه عمر کوتاه آن در سیستم گردشی نیاز به تزریق پی در پی (۳-۲ مرتبه) آن می‌باشد (Zohar and Mylonas, 2001). در مطالعه حاضر، هورمون نوترکیب تولیدی در یک مرحله تزریق شد. تفاوت هورمون تولیدی با هورمون سنتیک احتمالاً در میزان پایداری آن در بدن می‌باشد. هورمون نوترکیب تولیدی در بخش فعال بگونه‌ای طراحی شده است که مقاومت بالایی در برابر هضم پروتولیتیک داشته باشد. برای افزایش پایداری از تغییر در برخی اسید‌آمینه‌های بخش دکاپتید استفاده شده است و ابتدا بخش دکاپتید طراحی گردید (Mohammadzadeh et al., 2019). چندین روش برای افزایش نیمه عمر پیتید وجود دارد که این تکنیک‌ها شامل روش‌های شیمیایی و ژنتیکی می‌باشند (Moradi and ۲۷

استفاده در این مطالعه مشابه با اثر القایی هورمون GnRH سنتیک مورد استفاده در ماهی طلایی در مطالعات گذشته توسط محققین مختلف می‌باشد (زمجید و همکاران، ۱۳۸۸؛ رعیت‌پیشه و همکاران، ۱۳۹۰). زادمجید و همکاران (۱۳۸۸) از دوز ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن هورمون GnRH سنتیک و رعیت‌پیشه و همکاران (۱۳۹۰) از دوزهای ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن هورمون GnRH سنتیک برای القاء بلوغ نهایی در ماهی طلایی استفاده نمودند. با توجه فقدان مطالعه پیشین در مورد دوز مطلوب هورمون نوترکیب تولیدی در مطالعه حاضر از سه دوز (۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن) استفاده شد و تمامی دوزها قابلیت القاء بلوغ نهایی را داشت، اما بهترین دوز مورد استفاده از لحاظ عملکرد تولید مثلی (مولدین تخم‌ریزی کرده بیشتر و دوره تاخیر کوتاه‌تر) در این مطالعه دوز ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن بود. بر اساس نتایج این تحقیق مشخص شد که در استفاده از دوز ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن هورمون GnRH نوترکیب تعداد مولدینی که موفق به تخم‌ریزی شدند، کمتر از سایر تیمارهای هورمونی بود که می‌توان آن را به نامناسب بودن مقدار تزریقی این هورمون برای القاء تخم‌ریزی مولدین ماهی طلایی نسبت داد، زیرا بر اساس یک بررسی انجام شده بر مولدین ماهی کپور (*Cyprinus carpio*), استفاده از مقدار پایین آنالوگ‌های هورمون Drori et al., 1994 GnRH موجب عدم تخم‌ریزی مولدین گردید (GnRH). سطح جواب‌دهی گونه‌های مختلف به هورمون GnRH متفاوت بود و میزان جواب‌دهی به عواملی مانند دوز اولیه هورمون تزریقی، میزان پایداری هورمون در بدن، گونه ماهی و دمای آب بستگی دارد (Mylonas and Zohar, 2001). یکی از مهم‌ترین عوامل در فرآیند تکثیر مصنوعی مولدین، دفعات تزریق مولدین می‌باشد که بر عملکرد تولید مثلی مولدین تاثیرگذار می‌باشد. تکثیر مولدین با تزریق تک مرحله‌ای در برخی از گونه‌ها نتایج بهتری را بهمراه داشت، زیرا استرس ناشی از دستکاری که نقش تعیین کننده‌ای در عملکرد تولید مثلی برخی گونه‌ها ایفاء می‌کند، در

مدت ۱۷ ساعت بعد از تزریق اوولاسیون رخ داد و بالاترین مقدار آن در مولدین تیمار اول و دوم مشاهده شد که به مدت ۲۱ و ۲۲ ساعت بعد از تزریق هورمون اوولاسیون آتفاق افتاد. Targonska و Kucharczyk (۲۰۱۱) گزارش دادند تفاوت در دوره تأخیر مربوط به تفاوت در عملکرد هورمون در سطوح مختلف و دمای آب می‌باشد. با توجه به یکسان بودن شرایط آزمایشگاه برای همه تیمارهای آزمایشی می‌توان استنباط کرد که تفاوت در نتایج در تیمارهای مختلف به علت تفاوت در سطح هورمون مورد استفاده بود (Targonska and Kucharczyk., 2011).

در مطالعه حاضر، کاربرد هورمون GnRH نوترکیب تاثیر منفی بر عملکرد تولید مثلی مولدین ماهی طلایی نداشت که با نتایج سایر محققینی که تاثیر منفی در استفاده از آنالوگ‌های مختلف هورمون GnRH بر عملکرد تولید مثلی مولدین گونه‌های مختلف را مشاهده نکردد، مطابقت داشت (Nazari *et al.*, 2009; Podhorec *et al.*, 2009).

با توجه به نتیجه بدست آمده از مطالعه حاضر می‌توان استنباط کرد که هورمون GnRH نوترکیب تولیدی در آزمایشگاه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، دارای فعالیت بیولوژیک مناسب می‌باشد و قابلیت القاء بلوغ نهایی را در مولدین پرورشی دارد. لذا، می‌تواند به عنوان یک آنالوگ خاص برای درمان اختلالات تولیدمثلی در دسترس پرورش‌دهندگان قرار گیرد. برای تعیین دوز موثر، با توجه به حصول بهترین نتیجه در تیمار دریافت کننده ۲۰ میکروگرم هورمون نوترکیب بر کیلوگرم وزن بدن، عدم بررسی دوزهای بالاتر، جهت تعیین دوز هورمون نیاز به مطالعات بیشتر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شد. از همکاران آزمایشگاه سلولی و مولکولی، آزمایشگاه ژنتیک و تکثیر و پرورش گروه شیلات جهت همکاری و فراهم نمودن تسهیلات، سپاسگزاری می‌گردد.

Varamini, 2015 اسیدآمینه‌هایی که در پایداری اهمیت بالایی دارند، برای افزایش نیمه عمر استفاده می‌شود، زیرا تغییر در اسیدآمینه در انتهای آمینی و کربوکسیلی می‌تواند سبب افزایش نیمه عمر و تمایل اتصال به گیرنده سطح سلول گردد (Blomenroh *et al.*, 2002)، برای طراحی بخش دکاپیتید، اسیدآمینه‌های شماره ۲، ۳، ۴، ۹ و ۱۰ که در بین گونه‌های مختلف ماهیان در GnRH نوع یک و نوع دو کاملاً حفظ شده بودند، بدون تغییر در نظر گرفته شدند، اما اسیدآمینه‌های شماره ۱، ۵، ۷، ۸ در بین گونه‌های مختلف متفاوت می‌باشد. بنابراین، اسیدآمینه پایدارتری که شامل اسیدآمینه‌های گلوتامیک‌اسید، هیستیدین، لوسین و تیروزین می‌باشد، انتخاب شد. اسیدآمینه شماره ۶ در تمام گونه‌ها در انواع GnRH اسیدآمینه گلایسین می‌باشد، اما حضور این اسیدآمینه در موقعیت ۶ می‌تواند محلی برای هضم پروتئولیتیک باشد. Moradi and Moradi (2015) معمولاً جایگزینی گلایسین در موقعیت ۶ با اسیدآمینه‌ی دی مانند دی‌سرین یا با اسیدآمینه هیستیدین و لاژین سبب افزایش پایداری متاپولیک می‌شود (Moradi and Varamini, 2015). علاوه بر قسمت فعلی پیپتید (قسمت‌های پروتئولیتیک سایت و بخش وابسته به پروتئین)، سبب حفظ ساختار سوم و پایداری آن در برابر هضم پروتئولیتیک می‌گردد (Anderson and Klungland, 1993). در مطالعه حاضر، حضور سرین در این موقعیت پایداری بیشتری در برابر هیستیدین و لاژین نشان داد. لذا، با جواب‌دهی مناسب در مولدین مورد مطالعه با تزریق تک مرحله‌ای می‌توان استنباط کرد که هورمون مذکور از پایداری قابل قبولی در بدن ماهیان برخوردار است.

یکی دیگر از عوامل مهم در فرآیند تکثیر مصنوعی مولدین، دوره تأخیر می‌باشد که بر اساس آن برنامه‌ریزی‌های مربوط به عملیات تکثیر و سالن انکوباسیون انجام می‌شود. در مطالعه حاضر، کوتاه‌ترین زمان تأخیر در مولدین تیمار سوم (تزریق با دوز ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن) مشاهده شده است که به

عبدلی، ا. ۱۳۷۸. ماهیان آب‌های داخلی ایران. موزه حیات وحش ایران. صفحه ۳۷۶.

محمدزاده، ص.، یگانه، س.، مرادیان، ف.، فلاحتکار، ب. و میلا، س.. ۱۳۹۸. انتقال و بیان زن GnRH نوترکیب ماهی در باکتری *E. coli* BL21 به منظور تولید هورمون نوترکیب. مجله علمی شیلات ایران، سال ۲۸، شماره ۳. صفحات ۱۳۷ تا ۱۴۸.

Doi: 10.22092/ISFJ.2019.119131

مقدسی، ا. و دندانی، ع. ۱۳۸۱. اطلس رنگی ماهیان زینتی. چاپ کیمیا، صفحه ۲۱۲.

Aizen, J., Meiria, I., Tzchoria, I., Levavi-Sivan, B. and Rosenfeld, H., 2005. Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. *General and Comparative Endocrinology*, 142: 212-221.

Doi: 10.1016/j.ygcen.2005.01.002.

Aizen, J., Hollander-Cohen, L., Shpilman, M. and Levavi-Sivan, B., 2017. Biologically active recombinant carp LH as a spawning-inducing agent for carp. *Journal of Endocrinology*, 232: 391-402.

Doi: 10.1530/JOE-16-0435.

Andersen, O. and Klungland, H., 1993. The salmon GnRH encoding gene in teleost fish. *International Review Cytology*, 147: 165-191.

Barrero, M., Small, B.C., Dabramo, L.R., Waldbieser, G.C., Hanson, L.A. and Kelly, A.M., 2008. Effect of carp pituitary extract and luteinizing hormone releasing analog hormone on reproductive indices and spawning of 3-year-old channel catfish.

منابع

- احمدی‌فر، ا.، ایمانپور، م.ر.، امینی، ک.، زادم吉د، و. و غلامپور، ط.ع.، ۱۳۹۴. روش‌های مختلف بکارگیری هورمون LHRHa در تکثیر از از فصل جنس نر ماهی قرمز (*Carassius auratus*, Linnaeus 1758) (تکثیر از از فصل جنس نر ماهی *Carassius auratus*). مجله پژوهشی بیولوژی کاربردی، دوره ۶، شماره ۱، صفحات ۲۹ تا ۳۹.
- ارجینی، م.. ۱۳۸۸. راهنمای گلدفیش (تکثیر و پرورش، تغذیه و بیماری‌ها) انتشارات برهمند. ایران.
- رامین، م.، دوستدار، م. و عوفی، ف.، ۱۳۹۶. معرفی ماهی *Chaana gachua* (Hamilton, 1822) نگهداری در آکواریوم. مجله آبزیان زینتی، دوره ۴، شماره ۴، صفحات ۱۸ تا ۲۸.
- ريعیت‌پیشه، م.ک.، مجازی‌امیری، ب.، موسوی‌ثابت، ح.، مرادخانی، ز. و محبی، ص.. ۱۳۹۰. بررسی مقایسه‌ای اثر ترزیق GnRHa و عصاره هیپوفیز CPE بر القاء و همزمانی اوولاسیون، هماوری نسی، درصد لفاح، تخم‌گشایی، تلفات و بازماندگی لارو در ماهی طلایی (*Carassius auratus*). مجله پژوهش‌های علوم و فنون دریایی، سال ۶، شماره ۱، صفحات ۴۰ تا ۴۸.
- زادم吉د، و.، ایمانپور، م.ر.، سوداگر، م. و شعبانی، ع.. ۱۳۸۸. اثرات تزریق هورمون‌های GnRHa و عصاره هیپوفیز روی پارامترهای بیوشیمیایی *HCG* پلاسمای اسپرمی در ماهی قرمز (*Carassius auratus gibelio*). مجله زیست‌شناسی ایران، جلد ۲۲، شماره ۲، صفحات ۳۳۳ تا ۳۴۲.
- سوداگر، م.، صدق‌پور ثابت، س.، ذکریائی، ح. و دادگر، ش.. ۱۳۹۵. بررسی اثر هورمون‌های اواپریم (آنتاگونوست دوپامین + دامپریدون)، اوافکت (آنتاگونوست sGnRHa) و عصاره هیپوفیز بر بازده تکثیر مصنوعی ماهی سفید (*Rutilus kutum*). پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی، دوره ۴، شماره ۳، صفحات ۵۳ تا ۶۴.

- North American Journal of Aquaculture*, 70: 138-146. Doi: 10.1577/A06-072.1.
- Blomenrohr, M., Laak, T.T., Kuhen, R., Beyermann, M., Hund, E., Bogerd, J. and Leurs, R., 2002.** Chimaeric gonadotropin-releasing hormone (GnRH) peptides with improved affinity for the catfish (*Clarias gariepinus*) GnRH receptor. *Biochemistry Journal*, 361: 515-523. Doi: 10.1042/0264-6021:3610515.
- Brzuska, E., 2005.** Artificial spawning of carp (*Cyprinus carpio* L.), differences between females of Polish strain 6 and Hungarian strain W treated with carp pituitary homogenate, Ovopel or Digin. *Aquaculture Research*, 36: 1015-1025. Doi: 10.1046/j.1365-2109.1999.00350.x.
- Drori, S., Ofir, M., Levavi-Sivan, B. and Yaron, Z., 1994.** Spawning induction in common carp (*Cyprinus carpio*) using pituitary extract or GnRH superactive analogue combined with metoclopramide: analysis of hormone profile, progress of oocyte maturation and dependence on temperature, *Aquaculture*. 1119: 393-407. Doi: 10.1016/0044-8486(94)90303-4.
- Gothilf, Y. and Zohar, Y., 1991.** Clearance of different forms of GnRH from the circulation of the gilthead seabream, *Sparus aurata*, in relation to their degradation and bioactivities. In: (Scott A.P., Sumpter J.P., Kime D.E. and Rolfe M.S) Reproductive Physiology of Fish. *Fish Symposium*, 91, Sheffield. pp. 35-37
- Heyrati, F.P., Mostafavi, H., Toloe, H. and Dorafshan, S., 2007.** Induced spawning of kutum, *Rutilus frisii kutum* (Kamenskii, 1901) using (D-Ala(6), Pro(9)-NEt) GnRHa combined with domperidone. *Aquaculture*, 265: 288–293. Doi: 10.1016/j.aqua.2006.12.011.
- Mohammadzadeh, S., Moradian, F., Yeganeh, S., Falahatkar, B. and Milla, S., 2019.** 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: 1-20. Doi: 10.1016/j.pep.2019.105510.
- Moradi, V.S., Varamini, P. and Toth, I., 2015.** Evaluation of the biological properties and the enzymatic stability of glycosylated luteinizing hormone-releasing hormone analogs. *The AAPS Journal*, 5: 1135-1143. Doi: 10.1208/s12248-015-9769-x.
- Munakata, A. and Kobayashi, M., 2010.** Endocrine control of sex behavior in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 456-468. Doi:10.1016/j.ygcen.2009.04.011.
- Mylonas, C.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: 10.1023/A:1012279814708.
- Mylonas, C.C. and Zohar, Y., 2007.** Promoting oocyte maturation, ovulation and spawning in farmed fish. In: Babin, P.J., Cerdá, J., Lubzens, E. (Eds.), The Fish Oocyte: from Basic Studies to Biotechnological Applications. Kluwer

- Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 433–470.
- Mylonas, C.C., Fostier, A. and Zanuy, S., 2010.** Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 516-534. Doi: 10.1016/j.ygcen.2009.03.007.
- Nazari, R.M., Modanloo, M., Ghomi, M.R. and Ovissipor, M.R., 2009.** Application of synthetic hormone LHRH-A₂ on the artificial propagation of Persian sturgeon *Acipenser persicus*. *Aquaculture International*, 18: 837-841. Doi: 10.1007/s10499-009-9304-0.
- Okubo, K. and Nagahama, Y., 2008.** Structural and functional evolution of gonadotropin releasing hormone in vertebrates. *Acta Physiologica*, 193: 3-15. Doi: 10.1111/j.1748-1716.2008.01832.
- 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: .org/10.1016/j.
- Targonska, K. and Kucharczyk, K., 2011.** The Application of hCG, CPH and Ovopel in Successful Artificial Reproduction of Goldfish (*Carassius auratus auratus*) Under Controlled Conditions. *Reproduction in Domestic Animals*, 46: 651-655. Doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01723.x
- Zohar, Y. and Mylonas, C.C., 2001.** Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, 197: 99-136. Doi: 10.1016/S0044-8486(01)00584-1.

Study on biological performance of recombinant GnRH as a spawning – inducing agent for goldfish (*Carassius auratus*)

Mohammadzadeh S.¹; Yeganeh S.^{1*}; Moradian F.²; Rekabi M.¹

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

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

2-Department of Basic Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

Abstract

Different hormones are used to induce final sexual maturation in fish breeders and one of these hormones is different analogue of gonadotropin releasing hormone (GnRH) with different trade names. The aim of this study was to evaluate the biological activity of recombinant GnRH produced in the laboratory of Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University on the induction and synchronization of ovulation in goldfish broodstock (*Carassius auratus*). For this purpose, 20 pairs of mature goldfish were obtained from goldfish breeding centers and transferred to wet laboratory of the Fisheries Department. Fish were acclimated to experimental conditions for 2 weeks then they were divided to 4 treatments. The first, second and third groups received 10, 15 and 20 µg recombinant GnRH/kg body weight, respectively, as well as 20 mg metoclopramide (anti-dopamine)/ kg body weight and control group was injected by physiological saline with 20 mg metoclopramide (0.09% NaCl.) The results showed that the produced recombinant GnRH had the ability to induce final maturation in the studied broodstock and all groups received recombinant GnRH ovulated but none of the control group ovulated. The latency period in the broods injected by dose of 20 µg/kg was significantly lower than the other treatments ($p<0.05$). There was no significant difference in the total obtained egg and relative fecundity between treatments of recombinant GnRH ($p<0.05$). The results indicated that the recombinant GnRH has a good biological activity and it can be introduced as a suitable alternative for the treatment of reproductive disorders in goldfish.

Keywords: Recombinant GnRH, hormonal induction, Goldfish, *Carassius auratus*

*Corresponding author