

## اثر استرس نگهداری در شرایط اسارت بر تغییرات شاخص‌های فیزیولوژیک موثر در تولیدمثل ماهی ماده سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*)

• علی‌نقی سرپناه\*: مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۷

### چکیده

ماهیان استخوانی دریای خزر از جمله مهم‌ترین و بارزترین ماهیان این دریا می‌باشند، که متأسفانه ذخایر آن در سال‌های اخیر به‌دلایل متعدد رو به کاهش نهاده است. تحقیق حاضر، به‌منظور بررسی اثر استرس نگهداری بر تغییرات شاخص‌های فیزیولوژیک موثر در تولیدمثل ماهیان مولد سفید دریای خزر انجام شد. ماهیان برای تطابق با شرایط جدید به‌مدت ۳ روز دوره سازگاری را طی کردند و سپس به‌طور تصادفی و به تعداد مساوی (۱۰ عدد در هر مخزن) در ۳ مخزن فایبرگلاس (گروه شاهد، تیمار اول، تیمار دوم) توزیع و به‌مدت ۱۰ روز در شرایط اسارت نگهداری شدند. بعد از ۱۰ روز نگهداری، به ماهیان تیمار اول و دوم هورمون محرک رسیدگی جنسی (Ovaprim) تزریق شد. از نمونه‌ها طی ۳ مرحله، نمونه خون گرفته شد. نتایج نشان داد، میزان هورمون ۱۷ بتااسترادیول پلازما، بعد از ۱۰ روز نگهداری و بعد از رسیدگی جنسی در تمام گروه‌های آزمایشی نسبت به قبل از شروع آزمایش کاهش یافت که این کاهش بعد از رسیدگی جنسی، نسبت به قبل از شروع آزمایش معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ). میزان تستوسترون پلازما، در همه گروه‌های آزمایشی کاهش معنی‌داری داشت ( $P < 0/05$ ). تغییرات سطح هورمون پروژسترون در تمامی گروه‌های آزمایشی معنی‌دار نبود ( $P > 0/05$ ). براساس نتایج این تحقیق، می‌توان بیان نمود که استرس نگهداری در شرایط اسارت در مولدین ماده بر روی شاخص‌های فیزیولوژیک مورد بررسی، تاثیرگذار بوده است. کاهش نسبی مقادیر پارامترهای بررسی شده موجود در پلاسمای خون این ماهیان، نظیر هورمون‌های جنسی پلازما (۱۷ بتااسترادیول، تستوسترون و پروژسترون) که در برخی موارد قابل ملاحظه و معنی‌دار بود، نشان‌دهنده این اثرات است.

**کلمات کلیدی:** شرایط اسارت، هورمون‌های جنسی پلازما، کورتیزول، تولیدمثل، *Rutilus frisii kutum*



## مقدمه

به‌خصوص در مورد استرس‌های مزمن شایع‌تر می‌باشد. بنابراین با توجه به توضیحات فوق می‌توان گفت بر خورداری از یک درک پایه از فیزیولوژی واکنش ماهیان مولد سفید دریای خزر با توجه به اهمیت اکولوژیک و اقتصادی این ماهی، در برابر استرس‌های ناشی از نگهداری در شرایط اسارت کمک می‌کند تا بتوان شرایط محیطی را که برای مولدین ایجاد استرس می‌کند و باعث کاهش راندمان تکثیر می‌شود شناسایی نمود و به‌روش‌های مناسب جهت تخفیف اثرات این عوامل بر شرایط فیزیولوژیک ماهی دست یافت. لذا انجام این مطالعه به‌منظور ارزیابی پاسخ‌های فیزیولوژیک و عملکرد تکثیر ماهی مولد سفید به استرس‌های ناشی از نگهداری ضروری می‌باشد. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثر استرس نگهداری در شرایط اسارت بر تغییرات شاخص‌های فیزیولوژیک موثر در تولیدمثل و تکثیر ماهی سفید دریای خزر به‌منظور جمع‌آوری اطلاعات و دانش لازم در این خصوص و پرکردن خلاء علمی در این زمینه و استفاده از نتایج پژوهش حاضر در جهت امکان‌سنجی کاهش اثرات منفی این نوع از استرس در فرایند تکثیر و پرورش ماهی سفید دریای خزر مد نظر بوده است. بدین‌منظور تحقیق حاضر در فصل تکثیر در یکی از مهم‌ترین مراکز شیلاتی تکثیر و رهاسازی بچه ماهی سفید دریای خزر در استان گیلان به‌منظور ارائه راهکار مدیریتی در اجرای عملیات تکثیر مصنوعی این ماهیان با ارزش و کاهش ضایعات موجود و افزایش راندمان کمی و کیفی تولید جهت حفظ ذخایر و توسعه پایدار منابع آبزیان دریای خزر برنامه‌ریزی و اجرا گردید.

## مواد و روش‌ها

**صید و حمل مولدین:** مولدین در منطقه غرب استان گیلان از دریای خزر در فروردین ماه سال ۱۳۹۰ توسط پره ساحلی براساس شرایط وزن بدن (۵-۱/۱ کیلوگرم) و میزان آمادگی برای رسیدگی جنسی با چک کردن ناحیه شکم (سفتی یا نرمی این ناحیه) انتخاب و به کارگاه بازسازی ذخایر ماهیان دریایی شادروان دکتر یوسف‌پور سیاهکل منتقل شدند.

**تیمار بندی مولدین و گرفتن نمونه خون:** مولدین درون مخازن ۲ مترمکعبی فایبرگلاس مکعبی شکل توزیع گردیدند. مجموعاً ۳ مخزن که هر کدام حاوی ۱۰ عدد مولد بودند جهت این کار در نظر گرفته شد. در مرحله اول از ماهیان پس از آدآپته شدن با شرایط مخازن (۳ روز بعد از معرفی) نمونه خون (نمونه‌های اولیه) با سرنگ هپارینه به‌میزان ۲ میلی‌لیتر از ساقه دم و ناحیه باله مخرجی جهت اندازه‌گیری پارامترهای مربوطه اخذ شد. ۳ تیمار برای این تحقیق در نظر گرفته شد که شامل شاهد (تزریق سرم فیزیولوژی پس از ۱۰ روز نگهداری)، تیمار اول (تزریق هورمون Ovaprim پس از ۱۰

دریای خزر با دارا بودن گونه‌های بومی ماهیان استخوانی و ماهیان خاویاری دارای ارزش اکولوژیک و زیست‌شناسی بسیاری می‌باشد. هم‌چنین این دریا به‌عنوان بزرگ‌ترین دریاچه و حوزه آبی بسته جهان، مأمّن گرانبهارترین ماهیان با ارزش اقتصادی و زیستی دنیا نظیر ماهی سفید می‌باشد (امینیان‌فتیده و همکاران، ۱۳۹۵). ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) از اعضای خانواده کپورماهیان بوده و گونه بومی دریای خزر به‌شمار می‌رود. عمده پراکنش ماهی سفید در دریای خزر مربوط به مناطق جنوبی و جنوب‌غربی این دریا بوده و این ماهی به‌عنوان یک ماهی اقتصادی ارزشمند توسط صیادان صید می‌گردد. این گونه‌ها در آب‌های ساحلی در دسته‌های کوچک زندگی می‌کنند و در ماه‌های مارس تا آوریل برای تخم‌ریزی به آب‌های کم‌عمق رودخانه می‌روند (Falahatkar و همکاران، ۲۰۱۳). صید انبوه ماهیان مولد در رودخانه‌ها به‌هنگام آمادگی برای تخم‌ریزی یکی از عوامل مهم و اصلی کاهش ذخایر ماهی سفید می‌باشد. فرم بهاره ماهی سفید دریای خزر در فصل تولیدمثل (اواخر زمستان و اوایل بهار) به رودخانه مهاجرت می‌کند. گروهی از آنان به‌طور طبیعی و گروهی نیز پس از صید توسط شیلات به طریقه مصنوعی تکثیر می‌یابند (خانی‌پور و ولی‌پور، ۱۳۸۸). استرس، عامل محرک تهدید کننده حیات با منشا داخلی یا خارجی است که موجب بروز یک پاسخ ویژه و هماهنگ در سیستم غدد درون‌ریز بدن می‌شود. در واقع می‌توان گفت که استرس شامل مجموع واکنش‌های فیزیولوژیک است که به‌وسیله آن یک حیوان تلاش می‌کند تا سوخت و ساز طبیعی خود را در برابر تغییرات فیزیکی و شیمیایی ایجاد شده حفظ کند. استرسور یا عامل استرس‌زا، سبب بروز تغییر در سیستم فیزیولوژیک بدن و پاسخ‌های مربوط به استرس و در نتیجه تغییر هوموستازی می‌گردد. عوامل استرس‌زای بالقوه را به انواع محیطی، فیزیکی و بیولوژیک تقسیم می‌کنند. عوامل استرس‌زای محیطی عمدتاً تغییر در شرایط فیزیکی و شیمیایی آب را در بر می‌گیرد. دست‌کاری، تراکم، نگهداری در اسارت و حمل و نقل از انواع اختلالات فیزیکی هستند که اثرات رفتاری مهمی در ماهیان بر جای می‌گذارند (عسکریان و کوشا، ۱۳۸۵). به‌هنگام وقوع استرس، عود یا کاهش مقاومت در برابر بیماری‌ها که به‌توقف کار سیستم ایمنی بدن یا اختلال در این سیستم مربوط می‌شود، بروز می‌نماید. شیوه‌های معمول در حوزه آبی‌پروری، از جمله صید ماهی، چگالی بالای ذخیره‌سازی، دست‌کاری و حمل و نقل می‌تواند برای ماهی‌ها تنش‌زا باشند و در نتیجه بر تولیدمثل تأثیر می‌گذارد (Nikoo و Falahatkar، ۲۰۱۲). شکست در تولیدمثل یا کاهش بقاء نوزادان و کاهش درصد لقاح و کاهش یا توقف کامل رشد



آنتی‌بادی ضد استرادیول کد شده (فاز جامد) به‌طور پیاپی با ۱۰۰ میکرولیتر از کالیبراتور کنترل شده یا نمونه و ۵۰۰ میکرولیتر از ردیاب حاوی ید نشان‌دار (۱۲۵) مخلوط گردیدند. سپس به‌مدت ۳ ساعت در درجه حرارت اتاق (۱۸-۲۵) درجه سانتی‌گراد با سرعت ۳۵۰ rpm سانتریفوژ شدند. لوله‌ها تخلیه شدند و توسط سه شوآر خشک گردیدند. سپس در دستگاه گاما کانتر LKB نمونه‌ها تعیین گردیدند. اعداد حاصل بر حسب واحد نانو گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد.

**هورمون تستوسترون پلازما:** تعیین مقادیر هورمون تستوسترون در نمونه‌های پلاسمابه‌روش (RIA) Radioimmunoassay (Fischbach و Dunning, ۲۰۰۹) انجام پذیرفت. لوله‌های حاوی آنتی‌بادی ضد تستوسترون کد شده (فاز جامد) با ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتور کنترل شده یا نمونه و ۵۰۰ میکرو لیتر از ردیاب حاوی ید نشان‌دار (۱۲۵) مخلوط شدند. نمونه‌ها در حمام آبی با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ ساعت نگهداری شدند. لوله‌ها تخلیه شدند و توسط سه شوآر خشک گردیدند. سپس در دستگاه گاما کانتر LKB نمونه‌ها تعیین گردیدند. اعداد حاصل بر حسب واحد نانوگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد.

**هورمون پروژسترون پلازما:** تعیین مقادیر هورمون پروژسترون در نمونه‌های پلاسمابه‌روش (RIA) Radioimmunoassay (Kubokawa و همکاران، ۱۹۹۹) انجام پذیرفت. لوله‌های حاوی آنتی‌بادی ضد پروژسترون کد شده (فاز جامد) با ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتور کنترل شده یا نمونه و یک میلی‌لیتر از ردیاب حاوی ید نشان‌دار (۱۲۵) مخلوط گردیدند. نمونه‌ها در حمام آبی با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ ساعت نگهداری شدند. لوله‌ها تخلیه و توسط سه شوآر خشک گردیدند و سپس در دستگاه گاما کانتر LKB ساخت فنلاند نمونه‌ها تعیین گردیدند. اعداد حاصل بر حسب واحد نانوگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد.

**کورتیزول تخمک:** پس از نمونه‌برداری، ۳۰۰-۱۰۰ میلی‌گرم از بافت تخمک به ویال‌های ایندروف منتقل و تا زمان اندازه‌گیری در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت انجام دادن آزمایش، بافت‌ها با محلول بافر فسفات (۰/۱ M, pH=۷/۲) سرد شده در یخ (پنج برابر وزن بافت‌های توزین شده)، توسط دستگاه هموژنایزر (Ultra turrax, Germany) هموژن گردیدند. سپس ۳۰۰ میکرولیتر از بافت هموژن شده به لوله‌های جدید پیپت شدند و ۳ میلی‌لیتر دی‌اتیل‌اتر به‌منظور استخراج کردن کورتیزول از درون بافت به لوله‌ها اضافه و به مدت دو دقیقه به‌شدت تکان داده شد. بعد از این مرحله، لوله‌های حاوی بافت هموژن شده به‌همراه دی‌اتیل‌اتر به دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند تا دو فاز جامد و مایع تشکیل گردند. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه، لایه رویی که حاوی دی‌اتیل‌اتر بود جمع‌آوری و به لوله جدید

روز نگهداری) و تیمار دوم (تزریق هورمون کورتیزول در ابتدای تحقیق و تزریق هورمون Ovaprim پس از ۱۰ روز نگهداری) بودند. سعی شد تمامی تیمارها در شرایط محیطی یکسان از نظر نور، سر و صدا، میزان آب ورودی و خروجی، دما و حجم آب قرار گیرند (Falahatkar و همکاران، ۲۰۰۹). تیمارهای مذکور به‌مدت ۱۰ روز بر روی ماهیان اعمال شد و پس از آن ماهیان آماده تزریق (سرم فیزیولوژی برای تیمار شاهد و هورمون Ovaprim برای تیمارهای اول و هورمون Ovaprim و هورمون کورتیزول برای دوم) جهت القای رسیدگی جنسی شدند. تزریق سرم فیزیولوژی یا هورمون Ovaprim به‌میزان ۲ میکروگرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن ماهی در بالای خط جانبی با استفاده از سرم انسولین انجام گرفت. در مرحله دوم نمونه‌گیری و هم‌زمان با تزریق (قبل از انجام تزریق)، مجدداً از ماهیان هر تیمار نمونه خون گرفته شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت از تزریق، هر ۶ ساعت یک‌بار به‌طور منظم ماهیان تمامی تیمارها از نظر رسیدگی جنسی چک شدند (گرفتن ماهی و فشار به ناحیه شکم و بررسی خروج یا عدم خروج تخمک از ناحیه شکم) و زمان رسیدگی جنسی یا فوق رسیدگی جنسی ماهیان ثبت و در مرحله سوم نمونه‌گیری، هم‌زمان با رسیدگی هر ماهی، مجدداً نمونه خون آن گرفته شد. اندازه طول کل تمامی ماهیان توسط اشل چوبی مدرج و وزن آنان به‌وسیله ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه‌گیری و ثبت شد. در انتها پارامترهای مربوط به تولیدمثل شامل هم‌آوری کاری، تعداد تخمک در هر گرم به‌ازای هر مولد تعیین گردید. از نمونه‌های تخمک هر مولد نیز مقدار یک گرم نمونه جهت اندازه‌گیری مقدار کورتیزول تخمک در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان آنالیز نگهداری شد.

**مرحله آزمایشگاهی:** پلاسمای نمونه‌های خون گرفته شده از ماهیان از طریق سانتریفیوژ جدا و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان سنجش هورمون‌ها و ترکیبات مورد نظر نگهداری گردید. این عمل توسط دستگاه سانتریفوژ با سرعت ۱۶۰۰ g به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. سپس با استفاده از سمپلر با دقت پلازما جدا و به محفظه‌های پلاستیکی درب‌دار (موسوم به ایندورف) منتقل گردید. نمونه‌های پلازما شماره‌گذاری شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شدند (Carrick و Pottinger, ۲۰۰۱). نمونه‌ها به آزمایشگاه ارسال و مقادیر هورمون‌های جنسی (استرادیول، تستوسترون و پروژسترون) در آن‌ها مورد سنجش قرار گرفتند. نمونه‌های تخمک برداشت شده هم برای اندازه‌گیری غلظت کورتیزول داخل آن‌ها استفاده شدند.

**هورمون ۱۷ بتا استرادیول پلازما:** تعیین مقادیر هورمون استرادیول در نمونه‌های پلازما به‌روش (RIA) Radioimmunoassay (Fischbach و Dunning, ۲۰۰۹) انجام پذیرفت. لوله‌های حاوی



نانوگرم بر میلی‌لیتر) کاهش قابل توجه‌ای دیده شد ( $P < 0/05$ ). در تمامی گروه‌های آزمایشی پس از ۱۰ روز نگهداری، سطح هورمون ۱۷بتاسترادیول کم‌تر از قبل از شروع آزمایش بود، که این تفاوت تنها در مقایسه تیمار دوم ( $485 \pm 66/2$ ) نانوگرم بر میلی‌لیتر) با قبل از شروع آزمایش معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ). آزمون T انجام شده برای هر گروه آزمایشی به صورت مجزا، بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار میزان ۱۷بتاسترادیول پلازما بین نمونه‌های بعد از ۱۰ روز نگهداری و بعد از رسیدگی جنسی (اوولاسیون) در گروه شاهد بود ( $P < 0/05$ ). میزان این هورمون در گروه شاهد پس از اوولاسیون به شدت کاهش یافت و از  $708/6 \pm 69$  نانوگرم بر میلی‌لیتر به  $346/9 \pm 111/3$  نانوگرم بر میلی‌لیتر رسید. آزمون T در تیمارهای دیگر با وجود بروز تغییرات جزئی سطوح هورمون ۱۷بتاسترادیول بین نمونه‌های پلازما بعد از ۱۰ روز نگهداری مولدین و بعد از رسیدگی جنسی (اوولاسیون) اختلاف فاحش و معنی‌داری را نشان نداد ( $P > 0/05$ ).

جدول ۱: تغییرات میزان هورمون ۱۷بتاسترادیول پلاسمای خون (نانوگرم بر میلی‌لیتر) در مولدین ماهی سفید دریای خزر

گروه آزمایشی	شاهد	تیمار اول	تیمار دوم	قبل از شروع آزمایش
زمان نمونه برداری				
بعد از ۱۰ روز نگهداری	$708/6 \pm 69^{ab(*)}$	$519 \pm 105/9^{ab}$	$485 \pm 66/2^b$	$793/4 \pm 43/0^a$
بعد از رسیدگی جنسی	$346/9 \pm 111/3^b$	$294/3 \pm 66/7^b$	$410/2 \pm 65/2^b$	

نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد گزارش شده است ( $n=10$ ،  $Mean \pm SE$ ). حروف غیرمشابه در هر سطر و علامت \* در هر ستون نشانه اختلافات معنی‌دار می‌باشد ( $P < 0/05$ ).

### تغییرات میزان تستوسترون پلازما: میزان تغییرات هورمون

تستوسترون موجود در نمونه‌های پلاسمای خون ماهیان مولد ماده سفید دریای خزر در گروه‌های مختلف آزمایشی مطابق جدول ۲ می‌باشد. تغییرات میزان هورمون تستوسترون (نانوگرم بر میلی‌لیتر) پلاسمای خون در مولدین ماهی سفید دریای خزر  $1217/6 \pm 34/3$  گرمی در قبل از شروع آزمایش و گروه شاهد، تیمارهای اول و دوم، بعد از ۱۰ روز نگهداری و بعد از رسیدگی جنسی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در خصوص غلظت تستوسترون پلازما، میزان کمینه از  $0/07 \pm 0/01$  نانوگرم بر میلی‌لیتر (در تیمار دوم، بعد از ۱۰ روز نگهداری) تا بیشینه  $2/32 \pm 0/92$  نانوگرم بر میلی‌لیتر (در قبل از شروع آزمایش) متغیر بود. کلیه تیمارهای موجود نسبت به قبل از شروع آزمایش کاهش قابل توجه و معنی‌داری را هم بعد از ۱۰ روز نگهداری مولدین و هم بعد از رسیدگی جنسی (اوولاسیون) نشان دادند

منتقل شد. سپس دی‌اتیل‌اتر موجود در لوله‌ها در دمای اتاق تبخیر شدند. بعد از تبخیر دی‌اتیل‌اتر، به عصاره خشک شده باقی‌مانده در لوله‌ها، ۳۰۰ میکرولیتر تتراکلروکربن اضافه و به مدت ۴ دقیقه با دستگاه شیکر به شدت تکان داده شد. بعد از این مرحله، ۳۰۰ میکرولیتر از محلول بافر فسفات که حاوی ۰/۱ درصد ژلاتین بود به لوله‌ها اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط شدند. بعد از سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها ( $1600g$  در ۱۰ دقیقه)، لایه روئی که حاوی هورمون کورتیزول بود با سمپلر جدا شد و تا زمان انجام اندازه‌گیری در دمای  $-70$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Hiroi و همکاران، ۱۹۹۷).

**تعداد تخمک در گرم:** نمونه‌هایی از تخمک‌های ماهیان مولد گروه‌های آزمایشی برداشته شد. پس از وزن کردن نمونه‌های تهیه شده، تعداد تخمک‌های موجود در هریک از آن‌ها با استفاده از لوپ دو چشمی شمارش شد. سپس با به دست آوردن میزان تعداد تخمک در آن وزن مشخص، از طریق عملیات تناسب ریاضی، تعداد تخمک در گرم برای هر ماهی تعیین گردید (Snyder، ۱۹۹۴).

**آنالیز آماری:** برای انجام تجزیه و تحلیل آماری، نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov بررسی شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آنالیز واریانس دو طرفه استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها توسط تست Tukey انجام گرفت. برای انجام آنالیز آماری نمونه‌ها در داخل هر تیمار در طول دوره آزمایش از آزمون آماری Independent sample t-test استفاده گردید. کلیه عملیات آماری مربوطه از طریق نرم‌افزارهای SPSS و Excel انجام شد.

## نتایج

### تغییرات میزان ۱۷بتاسترادیول پلازما: میزان تغییرات هورمون

۱۷بتاسترادیول موجود در نمونه‌های پلاسمای خون ماهیان مولد ماده سفید دریای خزر در گروه‌های مختلف آزمایشی مطابق جدول ۱ می‌باشد. تغییرات میزان هورمون ۱۷بتاسترادیول (نانوگرم بر میلی‌لیتر) پلاسمای خون در مولدین ماهی سفید دریای خزر  $1217/6 \pm 34/3$  گرمی در قبل از شروع آزمایش و گروه شاهد، تیمارهای اول و دوم، بعد از ۱۰ روز نگهداری و بعد از رسیدگی جنسی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان سطوح هورمون جنسی ۱۷بتاسترادیول پلازما در ماهیان مولد مورد مطالعه، به ترتیب بین مقدار حداقل  $294/3 \pm 66/7$  نانوگرم بر میلی‌لیتر (در تیمار اول بعد از رسیدگی جنسی) تا میزان حداکثر  $793/4 \pm 43/0$  نانوگرم بر میلی‌لیتر (در نمونه‌های گرفته شده قبل از شروع آزمایش)، متغیر بود. بعد از رسیدگی جنسی (اوولاسیون) در میزان هورمون ۱۷بتاسترادیول نمونه‌های پلاسمای همه گروه‌های آزمایشی نسبت به قبل از شروع آزمایش ( $793/4 \pm 43/0$ )

**تغییرات میزان کورتیزول تخمک:** میزان تغییرات هورمون کورتیزول داخل تخمک نمونه‌های گرفته شده از ماهیان مولد ماده سفید دریای خزر در گروه‌های مختلف آزمایشی مطابق جدول ۴ می‌باشد. تغییرات میزان هورمون کورتیزول (نانوگرم بر میلی‌لیتر) تخمک در مولدین ماهی سفید دریای خزر  $1217/6 \pm 34/3$  گرمی در گروه شاهد، تیمار اول و تیمار دوم، بعد از رسیدگی جنسی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. پس از رسیدگی جنسی ماهیان در گروه‌های آزمایشی مختلف (شاهد، تیمار اول و تیمار دوم) میزان کورتیزول تخمک تعدادی از آنان نیز اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که سطح کورتیزول داخل تخمک در گروه شاهد و تیمار اول تقریباً مشابه هم بود اما در تیمار دوم این میزان به طرز محسوسی نسبت به دو گروه دیگر افزایش داشت (تقریباً ۲ برابر آنان بود). با این وجود آنالیزهای آماری صورت گرفته تفاوت معنی‌داری را بین تغییرات سطوح کورتیزول تخمک در مقایسه گروه‌های آزمایشی مختلف با یکدیگر و با گروه شاهد نشان نداد ( $P > 0/05$ ).

**تغییرات تعداد تخمک در گرم:** میزان تغییرات تعداد تخمک در گرم نمونه‌های گرفته شده از ماهیان مولد ماده سفید دریای خزر در گروه‌های مختلف آزمایشی مطابق جدول ۵ می‌باشد. تغییرات تعداد تخمک در گرم در مولدین ماهی سفید دریای خزر  $1217/6 \pm 34/3$  گرمی در گروه شاهد (استرس ندیده و بدون تزریق هورمون Ovaprim)، تیمار اول (استرس ندیده همراه با تزریق هورمون Ovaprim) و تیمار دوم (استرس دیده با تزریق هورمون Ovaprim)، بعد از رسیدگی جنسی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. پس از رسیدگی جنسی ماهیان در گروه‌های آزمایشی مختلف (شاهد، تیمار اول و تیمار دوم) تعداد تخمک در گرم تعدادی از آن‌ها نیز محاسبه شد. نتایج نشان داد که میانگین تعداد تخمک در گرم در تمامی گروه‌های آزمایشی با وجود داشتن اختلاف اندک نسبت به هم تقریباً مشابه می‌باشد و اختلاف معنی‌داری بین میزان آنان دیده نمی‌شود ( $P > 0/05$ ).

**جدول ۳ تغییرات میزان هورمون پروژسترون پلاسمای خون (نانو گرم بر میلی‌لیتر) در مولدین ماهی سفید دریای خزر**

گروه آزمایشی	شاهد	تیمار اول	تیمار دوم	قبل از شروع آزمایش
زمان نمونه برداری				
بعد از ۱۰ روز نگره‌داری	$0/38 \pm 0/10^a$	$0/34 \pm 0/01^a$	$0/29 \pm 0/02^a$	$0/30 \pm 0/03^a$
بعد از رسیدگی جنسی	$0/38 \pm 0/06^a$	$0/45 \pm 0/05^a$	$0/30 \pm 0/05^a$	

نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد گزارش شده است ( $n=10$ ). حروف غیر مشابه در هر سطر و علامت \* در هر ستون نشانه اختلافات معنی‌دار می‌باشد ( $P < 0/05$ ).

( $P < 0/05$ ). اما بین گروه شاهد و سایر گروه‌های آزمایشی هم بعد از ۱۰ روز نگره‌داری و نیز بعد از رسیدگی جنسی، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ). نتایج حاصل از آزمون T در تیمار دوم (ماهیان تحت استرس دستکاری) در مورد میزان تستوسترون پلاسمای بعد از ۱۰ روز نگره‌داری مولدین و بعد از رسیدگی جنسی (اوولاسیون) نمایانگر تفاوت معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ), که نشان‌دهنده افزایش میزان این هورمون بعد از رسیدگی جنسی ماهیان (از  $0/07 \pm 0/01$  نانوگرم بر میلی‌لیتر به  $0/19 \pm 0/03$  نانوگرم بر میلی‌لیتر) می‌باشد. این تفاوت در گروه شاهد و نیز تیمار اول بین دو حالت فوق الذکر معنی‌دار نبود ( $P > 0/05$ ).

**جدول ۲: تغییرات میزان هورمون تستوسترون پلاسمای خون (نانو گرم بر میلی‌لیتر) در مولدین ماهی سفید دریای خزر**

گروه آزمایشی	شاهد	تیمار اول	تیمار دوم	قبل از شروع آزمایش
زمان نمونه برداری				
بعد از ۱۰ روز نگره‌داری	$0/19 \pm 0/04^b$	$0/2 \pm 0/05^b$	$0/07 \pm 0/01^b$	$2/32 \pm 0/92^a$
بعد از رسیدگی جنسی	$0/12 \pm 0/03^b$	$0/14 \pm 0/08^b$	$0/19 \pm 0/03^{b(*)}$	

نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد گزارش شده است ( $n=10$ ). حروف غیر مشابه در هر سطر و علامت \* در هر ستون نشانه اختلافات معنی‌دار می‌باشد ( $P < 0/05$ ).

### تغییرات میزان پروژسترون پلاسمای خون ماهیان مولد ماده سفید دریای خزر در گروه‌های مختلف آزمایشی مطابق جدول ۳ می‌باشد.

پروژسترون موجود در نمونه‌های پلاسمای خون ماهیان مولد ماده سفید دریای خزر در گروه‌های مختلف آزمایشی مطابق جدول ۳ می‌باشد. تغییرات میزان هورمون پروژسترون (نانوگرم بر میلی‌لیتر) پلاسمای خون در مولدین ماهی سفید دریای خزر  $1217/6 \pm 34/3$  گرمی در قبل از شروع آزمایش و گروه شاهد، تیمارهای اول و دوم، بعد از ۱۰ روز نگره‌داری و بعد از رسیدگی جنسی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که میزان هورمون پروژسترون پلاسمای در نمونه‌ها از حداقل  $0/29 \pm 0/02$  نانوگرم بر میلی‌لیتر (در تیمار دوم، بعد از ۱۰ روز نگره‌داری) تا حداکثر  $0/45 \pm 0/05$  نانوگرم بر میلی‌لیتر (در تیمار اول، بعد از رسیدگی جنسی) نوسان داشت. آنالیزهای آماری انجام شده هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری را بین تیمارهای مختلف با یکدیگر و با نمونه‌های گرفته شده قبل از شروع آزمایش، هم بعد از ۱۰ روز نگره‌داری مولدین و هم بعد از رسیدگی جنسی (اوولاسیون) نشان نداد ( $P > 0/05$ ). آزمون T نیز بیانگر این موضوع بود که تفاوت معنی‌داری در میزان سطح پروژسترون پلاسمای دو حالت فوق الذکر در هر تیمار وجود نداشت ( $P > 0/05$ ).



## جدول ۴: تغییرات میزان هورمون کورتیزول داخل تخمک (نانو گرم

بر میلی لیتر) در مولدین ماهی سفید دریای خزر

گروه آزمایشی	شاهد	تیمار اول	تیمار دوم
زمان نمونه برداری			
بعد از رسیدگی جنسی	۴/۰۸±۱/۰۱ <sup>a</sup>	۴/۳۰±۱/۴۰ <sup>a</sup>	۸/۷۹±۲/۱۶ <sup>a</sup>

نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شده است (Mean ± SE, n=10). حروف غیرمشابه در هر سطر و علامت \* در هر ستون نشانه اختلافات معنی دار می باشد (P<0/05).

## جدول ۵: تغییرات میزان تعداد تخمک در گرم در مولدین ماهی

سفید دریای خزر

گروه آزمایشی	شاهد	تیمار اول	تیمار دوم
زمان نمونه برداری			
بعد از رسیدگی جنسی	۲۶۲/۶۶±۶۱/۰۱ <sup>a</sup>	۲۵۷/۳۳±۶۷/۴۰ <sup>a</sup>	۲۵۸/۵۶±۶۵/۱۶ <sup>a</sup>

نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شده است (Mean ± SE, n=10). حروف غیرمشابه در هر سطر و علامت \* در هر ستون نشانه اختلافات معنی دار می باشد (P<0/05).

## بحث

تحقیقات انجام شده توسط محققین موید این است که پاسخ به استرس وراثتی بوده و پاسخ‌های فردی در طول زمان خصوصیتی پایدار محسوب می‌گردند (Pottinger و Carrick, ۱۹۹۹). در نتیجه تغییرات به وجود آمده در اثر استرس با توجه به گونه ماهی، مرحله زندگی آن، ماهیت عامل استرس‌زا و غیره می‌تواند سریعاً رخ دهد، یا با تأخیر اتفاق بیافتد و یا این که بلندمدت، میان مدت یا کوتاه مدت باشد (Ramsay و همکاران، ۲۰۰۶). در خصوص نوسانات هورمون‌های جنسی چون ریتم‌های گلوکوکورتیکوستروئیدی بازتابی از تغییرات تعادل انرژی جانوران می‌باشند، بنابراین وقتی نیاز ماهیان به انرژی، بیش تر از منابع انرژی موجود باشد، سطوح گلوکوکورتیکوستروئیدها افزایش می‌یابد و از آنجا که به لحاظ فیزیولوژیک استرس باعث کاهش میزان گردش این استروئیدهای جنسی در خون از طریق عملکرد کورتیزول می‌گردد، در نتیجه افزایش کورتیزول سبب خواهد شد میزان ترشح هورمون‌های جنسی در ماهیان استرس دیده کاهش یابد (Pankhurst و Van Der Kraak, ۱۹۹۷). در تحقیق کنونی کاهش سطح هورمون ۱۷ بتا استرادیول در پلاسمای خون ماهیان مولد استرس دیده بعد از ۱۰ روز نگهداری در مقایسه با سایر گروه‌های آزمایشی دیده شد که تنها با نمونه‌های اولیه گرفته شده از مولدین قبل از شروع آزمایش اختلاف معنی داری را نشان داد. بعد از رسیدگی جنسی (اوولاسیون) مولدین، میزان این هورمون در ماهیان تیمار دوم بیش تر از گروه شاهد و کم تر از نمونه‌های قبل از شروع آزمایش بود که این اختلاف از نظر آماری با گروه شاهد معنی دار نبود. ولی با نمونه‌های قبل از شروع آزمایش تفاوت قابل

ملاحظه‌ای را نشان داد. هم‌چنین در همه تیمارها اختلاف فاحش و معنی داری بین سطح تستوسترون پلازما با نمونه‌های اولیه گرفته شده از مولدین قبل از انجام تیمار بندی مشاهده شد. در تحقیقی مشخص گردید که چرخه هورمون‌های ۱۷ بتا استرادیول و تستوسترون در ماهیان ماده بالغ سفید دریای خزر از اواسط بهمن ماه تا اوایل فروردین ماه هر سال بسیار کم و به تدریج تغییر کرده و غلظت این دو استروئید جنسی در پلازما از فروردین ماه افزایش قابل توجهی یافته و در اواخر این ماه و اوایل اردیبهشت به حداکثر میزان خود رسید (Shafiei و Sabet و همکاران، ۲۰۰۹). کاهش میزان آندروژن‌ها و استروژن‌های خون ماهیان استخوانی در اثر استرس ایجاد شده یک پدیده شایع و معمول محسوب می‌شود (Pankhurst و Haddy, ۲۰۰۰). از موارد موید این موضوع می‌توان به کاهش شدید میزان هورمون‌های ۱۷ بتا استرادیول و تستوسترون خون در ماهی سیم سیاه در اثر استرس دست‌کاری اشاره نمود (Pankhurst و Haddy, ۲۰۰۰). هم‌چنین در مطالعه‌ای دیگر بر روی گونه‌ای از گربه ماهی *Rhamdia quelen* که تحت تأثیر استرس دست‌کاری قرار گرفته بود، مشخص گردید که این عامل سبب کاهش معنی‌دار هورمون ۱۷ بتا استرادیول در پلاسمای خون آنان گشته و به علاوه تخمک‌های کم تر و با کیفیت پایین تری نیز از آنان به دست آمده است (Soso و همکاران، ۲۰۰۸). در ضمن کاهش تولید هورمون‌های جنسی توسط فولیکول‌های تخمدان در ماهیان می‌تواند در اثر استرس وارده به آنان اتفاق بیفتد (Janz و Van Der Kraak, ۱۹۹۷). پس می‌توان نتیجه گرفت که استرس می‌تواند روند طبیعی تبدیل پروژسترون به تستوسترون و تستوسترون به ۱۷ بتا استرادیول توسط فولیکول‌های تخمدان را در ماهیان مختل نماید. بررسی اثرات استرس حاد بر روی قزل‌آلای رنگین کمان در مرحله قبل از اوولاسیون نشان داد که استرس حاد باعث کاهش تستوسترون خون شد، اما اثر معنی داری بر غلظت گنادوتروپین و استرادیول پلازما نداشت. این مطالعه نشان داد که استرس، بدون تأثیر بر ترشح گنادوتروپین نقش بازدارنده بر عملکرد تولیدمثل دارد (Pankhurst و Van Der Kraak, ۲۰۰۰). آنالیزهای آماری انجام شده در خصوص میزان پروژسترون پلازما در نمونه‌های موجود در تحقیق حاضر هیچ گونه تفاوت معنی داری را بین تیمارهای مختلف با هم و با نمونه‌های اولیه گرفته شده قبل از تیمار بندی، هم در حالت پس از ۱۰ روز نگهداری مولدین و هم در حالت بعد از رسیدگی جنسی (اوولاسیون) نشان نداد. نتایج بررسی Kubokawa و همکاران (۱۹۹۹) که طی آن مولدهای ماهی *Oncorhynchus nerka* تحت تأثیر استرس دست‌کاری با تور قرار گرفتند و (پس از ۳۰ ثانیه قرارگیری در تور) از آن‌ها نمونه خون اخذ کردند نشان داد، سطوح پروژسترون در ماهیان ماده در پاسخ به استرس تقریباً ثابت ماند. چنین عنوان شد، که ممکن است سطح اولیه پروژسترون در آن‌ها احتمالاً

آن قدر پایین بوده که نمی‌توانست از استرس حاد تأثیر بپذیرد، که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. از موارد مشابه این حالت می‌توان به عدم تغییر معنی‌دار سطح پروژسترون خون در ماهی سیم سیاه در اثر نگره‌داری اشاره نمود (Haddy و Pankhurst, ۲۰۰۰). در خصوص کورتیزول داخل تخمک ماهیان سفید دریای خزر همان‌طور که در تحقیق حاضر مشخص شد، با وجود این که تخمک ماهیان تیمار دوم نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی افزایش زیادی داشت (سطح کورتیزول تخمک در ماهیان استرس دیده ۲ برابر گروه‌های استرس ندیده بود)، اما این میزان افزایش، از نظر آماری نسبت به تیمارهای شاهد و تیمار اول معنی‌دار نبود. در مطالعات گوناگون در این خصوص، در شرایط مختلف و گونه‌های متفاوت، نتایج گوناگونی به دست آمد. به نحوی که در مطالعه بر روی تخم ماهیان قزل‌آلا افزایش معنی‌دار میزان کورتیزول داخل تخمک در اثر استرس وارده به آن‌ها دیده نشد (Van Der Janz و Kraak, ۱۹۹۷). بررسی‌های متعدد نشان داده است که کورتیزول در اووسیت‌های ماهیان در حال نمو انباشته می‌شود و در تخم‌های لقاح یافته و جنین‌های موجود دارد (Hwang و همکاران, ۱۹۹۲). در تحقیقات انجام شده کورتیزول در تخم ماهی فلاندر ژاپنی، *Papalichthys olivaceus* (De Jesus و همکاران, ۱۹۹۱)، ماهی تیلایپای موزامبیک *Oreochromis mossambicus* (Wu و Hwang, ۱۹۹۳)، و ماهی کپور معمولی *Cyprinus carpio* (Stouthart و همکاران, ۱۹۹۸) گزارش شد. Jentoft و همکاران (۲۰۰۵) با بررسی مراحل تکاملی واکنش کورتیزول به استرس در ماهی سوف زرد (*Perca fluviatilis*) نشان دادند که در تخم‌های تازه لقاح یافته در آنان میزان کورتیزول موجود  $41 \pm 0.3$  pg/embryo می‌باشد و ۶ روز بعد از آن به  $8 \pm 3$  pg/embryo کاهش یافت و سپس تا زمان تخم‌گشایی (روز دهم) بدون تغییر باقی ماند و استرس حاد وارد شده به جنین‌ها (روزهای ۶ و ۸ بعد از لقاح) و لاروها (تخم‌گشایی و ۲ روز بعد از تخم‌گشایی) تفاوت‌هایی را در میزان کورتیزول بین استرس دیده‌ها و استرس ندیده‌ها ایجاد نکرد. Simontacchi و همکاران (۲۰۰۸) میزان کورتیزول و هورمون‌های جنسی (تستوسترون و استرادیول) را در تخم تاس‌ماهی سفید (*Acipenser transmontanus*) اندازه‌گیری کردند و به این نتیجه رسیدند که کورتیزول بعد از رسیدگی جنسی کاهش پیدا می‌کند. تعداد تخمک در گرم ماهیان مولد از جمله شاخص‌های مرتبط با هم‌آوری در تولیدمثل ماهیان می‌باشد. در مطالعه حاضر نیز بررسی نمونه‌های تخمک گرفته شده از گروه‌های آزمایشی نشان داد که با وجود اختلافات جزئی در میانگین تعداد تخمک در گرم، تفاوت معنی‌داری بین ماهیان تیمارهای مختلف، مشاهده نگردید. در مولدین گربه‌ماهی (*Ictalurus punctatus*) در ماهیان تحت استرس، هیچ اختلافی در وزن تخم، هم‌آوری و درصد تفریح بین آنان و گروه شاهد مشاهده نشد (Small, ۲۰۰۴). در تحقیقی که بر روی تون ماهیان انجام گرفت، اثرات قابل ملاحظه و معنی‌داری در اثر بروز استرس صید بر روی تعداد تخمک در گرم آن‌ها مشاهده نشد (Schaefer, ۲۰۰۱). Campbell و همکاران (۱۹۹۴) بر اساس نتایج حاصل از یک تحقیق، معتقد بودند که استرس موجب کاهش هم‌آوری کاری، کیفیت گامت‌های بالغ و لاروها در طی تکثیر و پرورش مصنوعی ماهیان قزل‌آلا گردید. در مطالعه دیگری که بر روی کپور ماهیان صورت پذیرفت، مشخص شد که ایجاد اختلال در عملکرد طبیعی غده هیپوتالاموس و هیپوفیز که قطع ترشح هورمون‌های محرک رسیدگی جنسی را به دنبال داشته است باعث اشکال در تکامل تخمک‌ها و فرآیند زرده‌سازی گردیده است. این حالت به‌ویژه در مراکز تکثیر و پرورش مصنوعی این ماهیان که شرایط زندگی محدود و اسارت بر آنان حاکم بوده است از شدت بیشتری برخوردار بود. در این موقعیت استفاده از هورمون‌های محرک رسیدگی جنسی به‌طور مصنوعی سبب برگشت روند طبیعی در رسیدگی تخمک‌ها و کاهش ضایعات بافتی در آن‌ها گردیده است (Kouril و Podhorec, ۲۰۰۹). ماهیان مولد سفید دریای خزر از جمله ماهیانی هستند که ساختار بدنی آنان در مواجهه با استرس تطابق حاصل کرده و در صورت تداوم استرس اعمال شده، شاخص‌های بروز استرس در پلاسما به‌میزان زیادی کاهش می‌یابد. نتایج حاصل از سنجش عوامل هورمونی در پلاسما خون ماهیان تیمار دوم، پس از ۱۰ روز نگره‌داری در اسارت شاهد این مدعا است. هرچند نگره‌داری ۱۰ روزه ماهیان مولد سفید دریای خزر نیز در عدم موفقیت رسیدگی جنسی مناسب تخمک‌های آنان بی‌تأثیر نبوده است. در خصوص اسارت و روند دستکاری ماهی هم باید اشاره کرد که اغلب سبب افزایش پاسخ‌های استرس فیزیولوژیک می‌شود از اثرات منفی اسارت و استرس می‌توان کاهش ایمنی بدن ماهی و استعداد و ابتلا به بیماری و کاهش کیفیت تخمک و اسپرم در ماهی‌های مولد اشاره کرد. پس می‌توان نتیجه گرفت که هرچه محل صید مولدین به مرکز تکثیر نزدیک‌تر باشد و نیاز به نگره‌داری کوتاه مدت‌تری در مرکز تکثیر داشته باشند و عملیات تزریق هورمون در آنان زودتر انجام شود، شاهد اولاسیون مناسب‌تر و تخمک‌های با کیفیت‌تر و در نتیجه لقاح موفق آمیز و طبیعتاً لاروهای مناسب و دارای بازماندگی بیشتر خواهیم بود.

## منابع

۱. امینیان‌فتیده، ب.؛ کریم‌زاده، ق.؛ جعفری، ع. و وحدتی‌راد، ن.، ۱۳۹۵. بررسی بیولوژی و تأثیر شرایط محیطی بر میزان صید و مهاجرت ماهی سفید در حوضه جنوب‌شرقی دریای خزر (استان گلستان). مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران). جلد ۲۹، شماره ۴، صفحات ۳۸۰ تا ۴۰۰.



- frisii kutum*) subjected to transportation stress. J. Appl. Anim. Welfare Sci. Vol. 15, No. 4, pp: 372-382.
۱۷. Pankhurst, N.W. and Van Der Kraak, G., 2000. Evidence that acute stress inhibits ovarian steroidogenesis in rainbow trout in vivo, through the action of cortisol. Gen. Comp. Endocrinol. Vol. 117, No. 2, pp: 225-237.
  ۱۸. Pankhurst, N.W. and Van Der Kraak, G., 1997. Effects of stress on reproduction and growth on fish. Fish Stress and Health in Aquaculture, GK Iwama, AD Pickering, JP Sumpter, CB Schreck (ed), Cambridge. pp: 73-93.
  ۱۹. Podhorec, P. and Kouril, J., 2009. Induction of final oocyte maturation in Cyprinidae fish by hypothalamic factors: a review. Vet. Med. Vol. 54, No. 3, pp: 97-110.
  ۲۰. Pottinger, T.G. and Carrick, T.R., 1999. Modification of the plasma cortisol response to stress in rainbow trout by selective breeding. Gen. Comp. Endocrinol. Vol. 116, No. 1, pp: 122-132.
  ۲۱. Ramsay, J.M.; Feist, G.W.; Varga, Z.M.; Westerfield, M.; Kent, M.L. and Schreck, C.B., 2006. Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio*. Aquaculture. Vol. 258, No. 1-4, pp: 565-574.
  ۲۲. Schaefer, K.M., 2001. Reproductive biology of tunas. In Tuna physiology, ecology, and evolution. Vol. 19. Fish Physiology. (Eds BA Block and ED Stevens). pp: 225-270.
  ۲۳. Shaffiei Sabet, S.; Imanpoor, M.R.; Aminian Fatideh, B. and Gorgin, S., 2009. Study on sexual maturity and levels of gonad steroid hormones in female *kutum Rutilus frisii kutum* (Kamenskii, 1901) during spawning season from river Sefid-Rood of the Southern Caspian Sea. J. Cell Anim. Biol. Vol. 3, No. 11, pp: 208-215.
  ۲۴. Simontacchi, C.; Poltronieri, C.; Carraro, C.; Bertotto, D.; Xiccato, G.; Trocino, A. and Radaelli, G., 2008. Alternative stress indicators in sea bass *Dicentrarchus labrax*, L. J. Fish Biol. Vol. 72, No. 3, pp: 747-752.
  ۲۵. Small, B.C., 2004. Effect of dietary cortisol administration on growth and reproductive success of channel catfish. J. Fish Biol. Vol. 64, No. 3, pp: 589-596.
  ۲۶. Snyder, D.E., 1984. Fish eggs and larvae. In Fisheries techniques. Nielsen, L.A. Johnson, D.L. (Eds). American Fisheries Society, Bethesda. pp: 165-198.
  ۲۷. Soso, A.B.; Gil Barcellos, L.J.; Ranzani-Paiva, M.J.; Kreutz, L.C.; Quevedo, R.M.; Lima, M.; Bolognesida Silva, L.; Ritter, F.; Bedin, A.C. and Finco, J.A., 2008. The effects of stressful broodstock handling on hormonal profiles and reproductive performance of *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) females. J. World Aquacult. Soc. Vol. 39, No. 6, pp: 835-841.
  ۲۸. Stouthart, A.J.; Lucassen, E.C.; Van Strien, F.J.; Balm, P.H.; Lock, R.A. and Bonga, S.W., 1998. Stress responsiveness of the pituitary-interrenal axis during early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of endocrinology. Vol. 157, No. 1, pp: 127-137.
  ۲۹. خانی‌پور، ع.ا. و ولی‌پور، ع.، ۱۳۸۸. ماهی سفید جواهر دریایی خزر. موسسه تحقیقات شیلات ایران. مدیریت اطلاعات علمی. ۷۷ صفحه.
  ۳۰. عسکریان، ف. و کوشا، آ.، ۱۳۸۵. مجموعه فیزیولوژی ماهی و آبزیان. نشر علوم کشاورزی. ۴۳۲ صفحه.
  ۴. Campbell, P.M.; Pottinger, T.G. and Sumpter, J.P., 1994. Preliminary evidence that chronic confinement stress reduces the quality of gametes produced by brown and rainbow trout. Aquaculture. Vol. 120, No. 1-2, pp: 151-169.
  ۵. de Jesus, E.G.; Hirano, T. and Inui, Y., 1991. Changes in cortisol and thyroid hormone concentrations during early development and metamorphosis in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Gen. Comp. Endocrinol. Vol. 82, No. 3, pp: 369-376.
  ۶. Falahatkar, B.; Poursaeid, S.; Langroudi, H.E.; Efatpanah, I.; Meknatkhah, B. and Rahmati, M., 2013. Spawning induction in Kutum, *Rutilus frisii kutum* (Kamensky), with different hormones: Analysis of hormone profiles and induced spawning success. Arch. Pol. Fish. Vol. 21, No. 4, pp: 271-281.
  ۷. Falahatkar, B.; Poursaeid, S.; Shakoorian, M. and Barton, B., 2009. Responses to handling and confinement stressors in juvenile great sturgeon *Huso huso*. J. Fish Biol. Vol. 75, No. 4, pp: 784-796.
  ۸. Fischbach, F.T. and Dunning, M.B., 2009. Manual of Laboratory and Diagnostic Tests, 8<sup>th</sup> end. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 1317 p.
  ۹. Hwang, P.P.; Wu, S.M.; Lin, J.H. and Wu, L.S., 1992. Cortisol content of eggs and larvae of teleosts. Gen. Comp. Endocrinol. Vol. 86, No. 2, pp: 189-196.
  ۱۰. Haddy, J.A. and Pankhurst, N.W., 2000. The efficacy of exogenous hormones in stimulating changes in plasma steroids and ovulation in wild black bream *Acanthopagrus butcheri* is improved by treatment at capture. Aquaculture. Vol. 191, No. 4, pp: 351-366.
  ۱۱. Hiroi, J.; Sakakura, Y.; Tagawa, M.; Seikai, T. and Tanaka, M., 1997. Developmental changes in low-salinity tolerance and responses of prolactin, cortisol and thyroid hormones to low-salinity environment in larvae and juveniles of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Zool. Sci. Vol. 14, No. 6, pp: 987-992.
  ۱۲. Hwang, P.P. and Wu, S.M., 1993. Role of cortisol in hypomsmoregulation in larvae of the tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Gen. Comp. Endocrinol. Vol. 92, No. 2, pp: 318-324.
  ۱۳. Janz, D.M. and Van Der Kraak, G., 1997. Suppression of apoptosis by gonadotropin, 17 $\beta$ -estradiol, and epidermal growth factor in rainbow trout preovulatory ovarian follicles. Gen. Comp. Endocrinol. Vol. 105, No. 2, pp: 186-193.
  ۱۴. Jentoft, S.; Aastveit, A.H.; Torjesen, P.A. and Andersen, Ø., 2005. Effects of stress on growth, cortisol and glucose levels in non-domesticated Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) and domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol. Vol. 141, No. 3, pp: 353-358.
  ۱۵. Kubokawa, K.; Watanabe, T.; Yoshioka, M. and Iwata, M., 1999. Effects of acute stress on plasma cortisol, sex steroid hormone and glucose levels in male and female sockeye salmon during the breeding season. Aquaculture. Vol. 172, No. 3-4, pp: 335-349.
  ۱۶. Nikoo, M. and Falahatkar, B., 2012. Physiological responses in wild broodstocks of the Caspian Kutum (*Rutilus*

