تاثیر قطع پایه چشمی و تزریق هورمون بر عملکرد تولیدمثل و استرس فیزیولوژیکی در میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*)

- **حسین آدینه***: گروه شیلات، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، صندوق پستی: ١٦٣
- **محمد سوداگر**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ٤٨٧-٤٩١٧٥
- **حسن صالحی**: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، صندوق پستی: ٦١١٦- ١٤١٥٥
- **سیدعباس حسینی**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ٤٨٧-٤٩١٧٥
- **حسنی قلی‌پور**: گروه شیلات، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، صندوق پستی: ١٦٣

تاریخ دریافت: خرداد ١٣٩٤ تاریخ پذیرش: شهریور ١٣٩٤

چکیده

قطع پایه چشمی رایج‌ترین روش برای تحریک رسیدگی جنسی در هچری‌های تجاری میگوی خانواده پنائیده است. این مطالعه به‌منظور بررسی قابلیت استفاده از هورمون اواپریم (گنادوتروپین و ضد دوپامین) برای القاء رسیدگی تخمدان در میگو وانامی انجام شد. مولدین ماده در ٤ تیمار آزمایشی به‌شرح زیر تقسیم شدند: ١) تیمار قطع پایه چشمی، ٢ و ٣) به‌ترتیب تیمارهای ٥٠٠ و ١٠٠٠ نانوگرم تزریق هورمون اواپریم به ازای هرگرم وزن بدن میگو، ٤) تیمار تزریق سرم فیزیولوژی (شاهد). فاکتورهای تولیدمثلی مانند تعداد تخم‌ها، قطر اووسیت‌ها، شاخص گنادوسوماتیک و تعداد ناپلی بررسی شد. نتایج آنالیز فاکتورهای تولیدمثلی نشان داد که بین تیمارهای مختلف آزمایشی تفاوت معنی‌داری وجود داشت($p<0/05$). بیش‌ترین میانگین تعداد تخم و ناپلی(به‌ترتیب١٦٩٩٣±٨٣١٠٠ و ٥١٨٠±٥٦١٣٢) در تیمار قطع پایه چشمی به‌دست آمد. ضعیف‌ترین عملکرد تولیدمثل در تیمار تزریق سرم فیزیولوژی (شاهد) مشاهده شد. تغییرات همولنف در برابر استرس‌های فیزیولوژیکی بررسی شد. تعداد سلول‌های هموررال بین تیمار قطع پایه چشمی و تیمار تزریق تفاوت آماری معنی‌داری نداشت ($p>0/05$). پاسخ‌های متابولیکی (پروتئین کل، گلوکز، لاکتات و کورتیزول) بین تیمارهای آزمایشی، در دو زمان ٠ و ٤٥ دقیقه تفاوت آماری معنی‌داری داشت ($p<0/05$). در این دو زمان، پارامترهای متابولیکی در تیمار قطع چشمی افزایش و در تیمار تزریقی کاهش یافت.

کلمات کلیدی: استرس فیزیولوژیکی، بلوغ تخمدان و تخم‌ریزی، تزریق هورمون، قطع پایه چشمی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Adineh.h@gmail.com

مقدمه

در میان سخت‌پوستان، میگوهای خانواده پنائیده از اهمیت خاص تجاری در جهان برخوردار هستند. میگوی پاسفید (وانامی) یکی از مهم‌ترین گونه‌ها، برای تولید تجاری است. این گونه بومی سواحل غربی اقیانوس آرام از جنوب پرو تا شمال کشور مکزیک بوده (Rosenberry، ۲۰۰۲) که در سال ۱۹۸۵ به آسیا معرفی شده است.

با افزایش صید مولدین میگوهای وحشی از طبیعت جهت تکثیر نیمه‌مصنوعی، جمعیت این آبزیان در منابع آبی کاهش پیدا کرد و برای رفع این مشکل کارشناسان این بخش به فکر تولید مولدین در محیط‌های محصور درآمدند (Diwan، ۲۰۰۵). در محیط‌های محصور تکنیک قابل استفاده برای تحریک بلوغ تخمدان و تخم‌ریزی میگوی خانواده پنائیده به‌کارگیری قطع پایه چشمی به‌صورت یک‌طرفه است (Panouse، ۱۹۴۳). اگرچه در سرتاسر جهان این تکنیک به‌طور معمول در هچری‌ها استفاده شده اما، بیش‌ترین مشکلات وارده بر این تکنیک تباهی تخم، تخم‌ریزی و هم‌چنین پایین آمدن کیفیت لارو می‌باشد (Vaca و Alfaro، ۲۰۰۰). به‌علاوه قطع پایه چشمی قابل تکرار نیست و گاهی اوقات منجر به افزایش مرگ و میر می‌شود (Okumura، ۲۰۰۴) و شاید این امر باعث ایجاد استرس در طی دستکاری نیز شود (Aktas و Kumlu، ۲۰۰۵). بر این اساس، هدف بلندمدت در صنعت میگو به‌دست آوردن توانایی پیش‌بینی بلوغ و تحریک تخم‌ریزی مولدین پرورش یافته در محیط‌های محصور بدون اعمال قطع پایه چشمی است (Quackenbush، ۱۹۹۱). تکنیک‌های جایگزین به‌جای روش قطع پایه چشمی شامل دستکاری‌های نوری و دمایی، تزریق‌های هورمونی و استفاده از روش تلقیح مصنوعی است که در گونه‌های مختلف میگو بررسی شده است. دستکاری هورمونی می‌تواند روشی برای تکامل گنادها باشد اما متاسفانه اطلاعات تزریق هورمون برای رسیدگی جنسی مولدین میگوی خانواده پنائیده به‌خوبی احراز نگردیده است. پژوهش در زمینه فیزیولوژی تولیدمثل سخت‌پوستان و به‌ویژه هورمون‌تراپی میگوها می‌تواند در این خصوص به توسعه آبزی‌پروری کمک نماید. هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRH) هورمون پپتیدی مناسبی است که باعث تحریک گنادها و تنظیم تولیدمثل در مهره‌داران و بی‌مهرگان می‌شود (Tsai، ۲۰۰۶؛ Sherwood، ۱۹۹۳). در مولدین ماده میگوی مونودون تیمار شده با سه ایزوفرم GnRHs خارجی یعنی هورمون آزادکننده گنادوتروپین پستانداران، ماهی آزاد و ماهی لامپری منجر به کوتاه شدن زمان بلوغ تخمدان شد (Ngernsoungnern و همکاران، ۲۰۰۸c). به‌طور مشابه، در میگوی آب شیرین *Macrobrachium rosenbergii* دوره بلوغ تخمدان مولدین ماده که تحت تاثیر هورمون‌های اختوپوس، لامپری I و لامپری III بودند به‌طور قابل توجهی نسبت به تیمار شاهد کوتاه‌تر شد (Ngernsoungnern و همکاران، ۲۰۰۹؛ Ngernsoungnern و همکاران، ۲۰۰۸a). برخی از هورمون‌ها مانند سروتونین، متیل فارنوست باعث تحریک بلوغ تخمدان و تخم‌ریزی در میگوی وانامی (Vaca و Alfaro، ۲۰۰۰؛ Tsukimura و Kamemoto، ۱۹۹۱)، مونودون (Nagur Babu و همکاران، ۲۰۱۳)، میگوی آب شیرین روزنبرگی (Meeratana و همکاران، ۲۰۰۶) شده است. استفاده از دوپامین باعث جلوگیری از رشد گنادها در میگوی مونودون و دیگر سخت‌پوستان گردید (Nagur Babu و همکاران، ۲۰۱۳؛ Swetha و همکاران، ۲۰۱۱). اگرچه هورمون‌های آزادکننده گنادوتروپین نقش مهمی در القاء بلوغ تخمدان بازی می‌کنند اما دوپامین موجود در پایه چشمی یکی از عوامل بازدارنده رسیدگی جنسی محسوب می‌شود (Poljaroen و همکاران، ۲۰۱۱). به‌همین دلیل در این آزمایش از هورمون اواپریم (ترکیب گنادوتروپین ماهی آزاد و ضد دوپامین دوپریدون) استفاده شد. شرایط استرس‌زا مانند قطع پایه چشمی و انجام فرایند تزریق منجر به تغییر ترشحات غدد عصبی شده، از این‌رو زمان بروز استرس منابع انرژی ارگانیسم به‌جای صرف در فرآیندهای تولیدمثل و رشد در جهت سازگاری متابولیکی و حفظ بقاء منحرف می‌شود (Maggioni و همکاران، ۲۰۰۴؛ Maule و Vanderkooi، ۱۹۹۹).

این مطالعه با هدف مقایسه اثرات قطع پایه چشمی، تزریق هورمون اواپریم و تزریق سرم فیزیولوژی بر روی کیفیت تخمدان، تخم‌ریزی و تغییرات پارامترهای همولنف میگوی وانامی انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه مولدین و شرایط آزمایش: پس از بررسی‌های ظاهری و اطمینان از سلامت میگوها، مولدین جنس ماده با میانگین وزنی ۴۴/۰۵±۷/۶۴ گرم و جنس نر با میانگین وزنی ۳۸/۱۱±۸/۱۷ گرم تهیه و به کارگاه سنتدرف واقع در بندرجاسک- استان هرمزگان انتقال یافتند. این آزمایش از اوایل فروردین تا اوایل اردیبهشت‌ماه سال ۱۳۹۴ انجام شد. بدین‌منظور ابتدا ۵ روز مراحل آداپتاسیون و سپس ۳۰ روز آزمایش در مخازن مدور تیره با حجم آبگیری ۲ تن و تراکم ۱۵ قطعه انجام شد. تعویض آب ۱۰۰ درصد در روز بود. در طی دوره آزمایش شوری به

میزان ۳۲-۳۱ گرم در لیتر، درجه حرارت ۳۱-۲۹ درجه سانتی‌گراد، pH حدود ۷/۵ تا ۸/۵، میزان الکالینیتی حدود ۱۷۵-۱۵۰ و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی تنظیم گردید. نسبت جنسی نر و ماده ۲:۱ بود. تغذیه مولدین با اسکوئید، صدف ملالیس و هم‌چنین پودر کرم با نام تجاری (ZM mate) به‌میزان حدود ۱۵٪ وزن بدن (سیری کامل) در ۵ وعده برنامه‌ریزی شد.

طرح آزمایش: در این آزمایش از هورمون اواپریم (Ovaprim) ترکیبی از هورمون آنالوگ آزادکننده گنادوتروپین ماهی آزاد و ضد دوپامین به‌نام دومپریدون ساخت شرکت علوم زیستی آبزیان کشور کانادا استفاده شد. تعداد ۶۰ مولد ماده در ۴ تیمار آزمایشی جایابی شدند (جدول ۱). تزریق سرم فیزیولوژی و هورمون اواپریم در ناحیه پشتی بین اولین و دومین حلقه شکمی میگوی توسط سرنگ انسولین ۱ میلی‌لیتری با سرسوزن شماره ۲۶ انجام شد.

جدول ۱: طراحی تیمارهای مختلف آزمایشی

ردیف	تیمارها
۱	قطع یک‌طرفه پایه چشمی مولد میگو
۲	تزریق سرم فیزیولوژی با حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر در ۳ زمان (روزهای صفر، ۷ و ۱۴) به‌عنوان تیمار شاهد
۳	تزریق ۵۰۰ نانوگرم هورمون اواپریم به‌ازای هر گرم وزن بدن با حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر در ۳ زمان (روزهای صفر، ۷ و ۱۴)
۴	تزریق ۱۰۰۰ نانوگرم هورمون اواپریم به‌ازای هر گرم وزن بدن با حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر در ۳ زمان (روزهای صفر، ۷ و ۱۴)

ارزیابی تولیدمثل: پس از گذشت دوره آزمایش مولدین ماده‌ای که به مرحله کامل جنسی (دوره بلوغ) رسیده بودند به مخازن مولدین نر انتقال تا عمل جفت‌گیری انجام شود، آن‌هایی که جفت‌گیری کرده بودند به مخازن ۳۰۰ لیتری تخم‌ریزی انتقال و آن‌هایی که جفت‌گیری نکرده بودند به مخازن اولیه خود انتقال یافتند. بعد از تخم‌ریزی، نمونه‌برداری از تخم‌ها به‌صورت تصادفی انجام (۱۰۰ میلی‌لیتر آب حاوی تخم در ۳ زمان) و سپس شمارش کل تخم‌ها صورت پذیرفت. بعد از تخم‌گشایی، از ناپلی‌ها به‌صورت تصادفی ۳ نمونه ۱ میلی‌لیتری نمونه‌برداری و تعداد ناپلی‌ها شمارش شدند (Ngernsoungnern و همکاران، ۲۰۰۸b). شاخص گنادوسوماتیک (GSI) به‌عنوان یکی از شاخص‌های ارزیابی عملکرد تولیدمثل می‌باشد بنابراین با تقسیم وزن تخمدان به وزن کل بدن میگو در هر تیمار و ضرب آن در عدد ۱۰۰ به‌دست می‌آید.

برای سنجش قطر اووسیت، تخمدان‌ها در محلول فرمالین ۴ درصد فیکس گردیدند و سپس قطر ۳۰ اووسیت از هر تخمدان میگو با استفاده از میکرومتر چشمی در زیر میکروسکوپ مدرج اندازه‌گیری و میانگین قطر اووسیت‌ها ثبت شدند (Santhoshi و همکاران، ۲۰۰۹).

نمونه‌برداری و آنالیز همولنف: نمونه‌برداری از همولنف در زمان‌های صفر یعنی پس از ایجاد استرس فیزیولوژیکی (قطع پایه چشمی و تزریق) و ۴۵ دقیقه پس از آن انجام و برای آنالیز به آزمایشگاه تخصصی دامپزشکی ویرومد استان گیلان ارسال شد. در زمان صفر سلول‌های خونی و فاکتورهای متابولیکی مرتبط با استرس مورد سنجش قرار گرفت اما در زمان ۴۵ تنها تغییرات فاکتورهای متابولیکی مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه همولنف به‌وسیله سرنگ انسولین با سر سوزن شماره ۲۶ از طریق سینوس شکمی (حفره پریکاردیال) در فاصله بین سفالوتراکس و اولین بند شکمی خارج و سپس در لوله‌های کوچک (میکروتیوپ) حاوی ۰/۱ ماده ضد انعقاد الزور (Alsever) که شامل (۱۱۵ میلی‌مول گلوکز، ۳۳۶ میلی‌مول کلرید سدیم، ۲۷ میلی‌مول سیترات سدیم و ۹ میلی‌مول EDTA با پی‌اچ برابر با ۷) تخلیه گردید (Vargas و همکاران، ۱۹۹۳). از این نمونه برای تعیین میزان تعداد هموسیت کل (THC) و شمارش افتراقی هموسیت‌ها (DHC) استفاده شد. تعداد هموسیت کل همولنف به‌وسیله لام هموسیتومتر (نئوبار با حجم شبکه ۰/۱ مترمکعب) با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ در زیر میکروسکوپ شمارش شد (Meeratana و همکاران، ۲۰۰۶). برای تعیین تابلوی هموسیتی یا شمارش افتراقی هموسیت‌ها، پس از تهیه گسترش از همولنف جهت خشک شدن کامل گسترش‌ها آن‌ها را در الکل ۷۰٪ به‌مدت ۱۰ دقیقه در معرض جریان هوا قرار داده شده و سپس به‌روش می‌گرانوالد-گیمسا رنگ‌آمیزی و توسط میکروسکوپ نوری تعداد ۲۰۰ سلول هموسیت شمارش و تعداد هموسیت‌های دانه‌دار بزرگ، نیمه دانه‌دار و هیالین تعیین گردید. برای سنجش پروتئین کل، گلوکز، لاکتات و کورتیزول بایستی سرم همولنف تهیه گردد بدین‌منظور، همولنف به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شده تا سلول‌ها رسوب نماید بعد محلول رویی آن در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره‌سازی شد. غلظت پروتئین کل همولنف طبق روش بیورت تعیین گردید (Shi و همکاران، ۲۰۰۶). کورتیزول سرم همولنف با استفاده از کیت تجاری استاندارد به‌روش فتومتری و با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری شد. طبق روش Kunst و همکاران (۱۹۸۳) غلظت گلوکز و لاکتات مورد سنجش قرار گرفت.

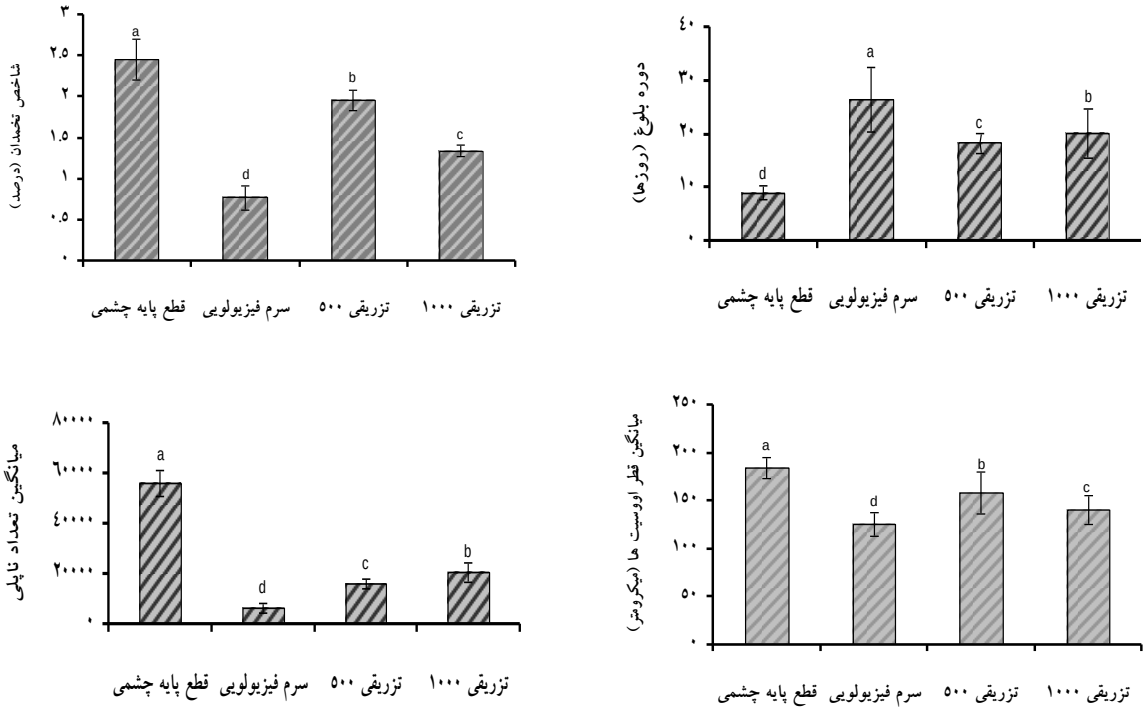
آنالیز آماری: از نرم‌افزار Excel برای ثبت داده‌ها و از نرم‌افزار آماری Spss برای آنالیز داده‌ها استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌های به‌دست آمده از ارزیابی تولیدمثلی مولد وانامی از واریانس یک‌طرفه و از آزمون دانکن برای بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین تیمارها استفاده شد. به‌منظور بررسی اثر استرس‌های فیزیولوژیکی از آزمون T-test (T غیرجفتی) در سطح (p =۰/۰۵) استفاده شد.

نتایج

نتایج به‌دست آمده نشان داد که قطع پایه چشمی نسبت به تیمارهای تزریق هورمون و تزریق سرم، توانست دوره بلوغ یا مدت زمان سپری شده برای رسیدن به بلوغ جنسی را کوتاه کند (۱/۳۲±۹/۰۰ روز). در بین تیمارهای تزریقی، مولدین تیمار شاهد با سپری کردن بیش‌ترین زمان ممکن ۶/۰۲±۲۶/۴۰ روز به بلوغ جنسی رسیدند. اختلاف آماری معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی وجود داشت (P<۰/۰۵، شکل ۱).

تعداد مولدین ماده مرحله ۴ جنسی نشان از اثرگذاری تکنیک به‌کار رفته جهت تحریک بلوغ جنسی است بنابراین تیمار قطع پایه چشمی با تعداد ۷ مولد و تیمارهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ به‌ترتیب با ۶ و ۵ مولد در رتبه دوم و سوم قرار گرفتند. مولدین ماده براساس توانایی فیزیولوژیکی و فراهم شدن شرایط محیطی مناسب می‌توانند تخم‌ریزی نمایند. بیش‌ترین تعداد تخم به‌دست آمده (۱۶۹۹۳±۸۳۱۰۰) متعلق به تیمار قطع پایه چشمی و کم‌ترین تعداد تخم متعلق به تیمار تزریقی سرم فیزیولوژی (۴۹۹۶±۳۰۴۱۲) بود.

برخی از نتایج به‌دست آمده از عملکرد تولیدمثل مولدین ماده میگوی وانامی در شکل ۱ نشان داده شده است. بین میانگین شاخص تخمدان (درصد) در تیمارهای مختلف تفاوت آماری معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵)، و بیش‌ترین میزان آن در تیمار قطع پایه چشمی مشاهده شد. هم‌چنین میانگین قطر اووسیت‌ها در بین تیمارهای مختلف میگوی وانامی اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵) که بیش‌ترین میانگین قطر اووسیت در تیمار قطع پایه چشمی و کم‌ترین آن در تیمار تزریق سرم فیزیولوژی به‌دست آمد. همان‌گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود بین میانگین تعداد ناپلی به‌دست آمده در تیمارهای مختلف، تفاوت معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۵)، و بیش‌ترین تعداد ناپلی متعلق به تیمار قطع پایه چشمی است.



شکل ۱: نمودارهای مربوط به فاکتورهای تولیدمثلی میگوی مولد ماده وانامی تحت تاثیر تیمارهای مختلف آزمایشی

حروف انگلیسی مختلف بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد (داده‌ها به‌صورت میانگین± انحراف معیار نشان داده شده است).

جدول ۲، نتایج پاسخ متغییر هماتولوژیکی در برابر استرس‌های فیزیولوژیکی (قطع پایه چشمی و تزریق هورمون) را نشان می‌دهد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که استرس قطع پایه چشمی باعث افزایش غیرمعنی‌دار تعداد کل هموسیت‌ها (۲۸/۵۲ درصد) نسبت به استرس تزریق هورمون شده که در این میان هیالین‌ها ۳۰/۶۲ درصد، هموسیت‌های دانه‌بزرگ ۸۹/۸۷ درصد و هموسیت‌های نیمه دانه ۲/۴۳ درصد افزایش داشته‌اند (P>۰/۰۵).

پاسخ متغییر متابولیکی همولنف در برابر استرس‌های فیزیولوژیکی (قطع پایه چشمی و تزریق هورمون) در جدول ۳ مشخص شده است. پروتئین کل پلاسمای همولنف در تیمار تحت استرس قطع پایه چشمی نسبت به تیمار استرس تزریق به‌میزان ۶/۸۴ درصد در زمان صفر افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). ۴۵ دقیقه پس از عمل قطع پایه چشمی (۱۷۲/۱۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و تزریق (۱۶۹/۵۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) میزان این فاکتور افزایش یافت. اختلاف آماری معنی‌داری بین این دو تیمار به‌دست آمد (P<۰/۰۵). اختلاف معنی‌دار آماری دو برابری (٪۵۸/۷۴) از نظر مقدار گلوکز در دو تیمار تحت استرس در زمان صفر مشاهده شد (P<۰/۰۵). بررسی مقدار گلوکز همولنف ۴۵ دقیقه پس از اعمال قطع پایه چشمی و تزریق نشان داد که تفاوت آماری بین این دو تیمار وجود دارد به‌طوری‌که میزان آن به‌ترتیب ۲۰/۷۵ و ۷۵/۱۵ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود (P<۰/۰۵). در زمان صفر، میزان لاکتات در تیمار استرس قطع پایه چشمی ۴/۳۰±۰/۲۶ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر و در تیمار استرس تزریق ۱/۳۷±۰/۰۵ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به‌دست آمد که طبق آنالیز آماری دارای اختلاف معنی‌داری بودند (P<۰/۰۵). مقدار این معیار ۴۵ دقیقه بعد اعمال استرس افزایش یافت. مقدار لاکتات بین تیمارهای آزمایشی تفاوت آماری معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵).

میزان کورتیزول همولنف مولدین که در معرض استرس قطع پایه چشمی قرار داشتند نسبت به مولدینی که در معرض استرس تزریق بودند، تفاوت آماری معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵) اما پس از گذشت ۴۵ دقیقه از بروز استرس میزان کورتیزول در تیمار قطع پایه چشمی کاهش و در تیمار تزریق افزایش یافت. آنالیز آماری میزان کورتیزول در این زمان نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین این دو تیمار وجود دارد و مقدار آن به‌ترتیب برابر با ۷۵/۶۰ و ۵۲/۱۹ نانوگرم بر میلی‌لیتر (P<۰/۰۵) است.

جدول ۲: متغییر هماتولوژی (سلول‌های هموراال) همولنف میگوی وانامی تحت استرس‌های فیزیولوژی

شاخص‌های همولنف ($\times 10^6$ cell/ml)	تیمارها		آنالیز آماری
	قطع پایه چشمی	تزریق	T- غیر جفتی
تعداد هموسیت کل	۱۵/۵۰ ±۱/۰۹	۱۲/۰۶±۰/۶۳	NS
تعداد سلول‌های هیالین	۸/۳۶ ±۰/۳۹	۶/۴۰ ±۰/۱۹	NS
تعداد سلول‌های گرانولی بزرگ	۳/۰۰ ±۰/۰۸	۱/۵۸ ±۰/۰۹	NS
تعداد سلول‌های گرانولی کوچک	۴/۲۱ ±۰/۰۸	۴/۱۱ ±۰/۲۱	NS

NS: بدین معنی است که بین تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌دار آماری وجود ندارد

جدول ۳: پارامترهای متابولیکی همولنف میگوی وانامی تحت استرس‌های فیزیولوژی

پارامترهای همولنف	زمان نمونه‌برداری	تیمارها		آنالیز آماری
		قطع پایه چشمی	تزریق	T- غیرجفتی
پروتئین (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	T-۰	۱۵۹/۳۰ ±۶/۲۷	۱۴۹/۰۹ ±۷/۴۹	P<۰/۰۵
	T-۴۵	۱۷۲/۱۱ ±۹/۶۵	۱۶۹/۵۹ ±۱۴/۳۳	P<۰/۰۵
گلوکز (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	T-۰	۲۱/۵۱ ±۰/۶۱	۱۳/۵۵ ±۰/۹۶	P<۰/۰۵
	T-۴۵	۲۰/۷۵ ±۱/۰۸	۷۵/۱۴ ±۳/۲۹	P<۰/۰۵
لاکتات (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	T-۰	۴/۳۰±۰/۲۶	۱/۳۷ ±۰/۰۵	P<۰/۰۵
	T-۴۵	۳/۸۸ ±۰/۱۹	۱/۵۲ ±۰/۰۶	P<۰/۰۵
کورتیزول (نانوگرم بر دسی‌لیتر)	T-۰	۹۸/۱۵ ±۳/۲۰	۴۹/۶۶ ±۲/۵۲	P<۰/۰۵
	T-۴۵	۷۵/۶۰ ±۵/۲۲	۵۲/۱۹ ±۲/۴۸	P<۰/۰۵

P<۰/۰۵: بدین معنی‌است که بین تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌دار آماری وجود دارد

بحث

در مطالعات گذشته بیش‌تر تحقیقات بر اثر بخشی تزریق هورمون سروتونین در گونه‌های مختلف میگو و دیگر سخت‌پوستان متمرکز بوده است و بررسی میزان اثرگذاری هورمون گنادوتروپین بر روند تولیدمثل محدود به پژوهش‌های Ngernsoungnern و همکاران (a, b, c ۲۰۰۸؛ ۲۰۰۹) بر روی میگوی ماده مونودون و میگوی روزنبرگی و هم‌چنین میگوی وانامی (Tinikul و همکاران، ۲۰۱۴) در سال‌های اخیر بوده است. هدف اصلی استفاده تزریقی از هورمون‌های محرک بلوغ تخمدان جایگزینی این روش به‌جای تکنیک قطع پایه چشمی به‌منظور کوتاه کردن زمان بلوغ جنسی و افزایش کارایی تولیدمثل مولدین ماده با کم‌ترین میزان استرس می‌باشد. مطالعات صورت گرفته بر روی سخت‌پوستان ده‌پا مانند *P. clarkia* (Sarojini و همکاران، ۱۹۹۳)، *U. pugilator* (Sarojini و همکاران، ۱۹۹۵)، *L. stylirostris* (Alfaro و همکاران، ۲۰۰۴)، *L. vannamei* (Vaca و Alfaro، ۲۰۰۰) و *P. monodon* (Wongprasert و همکاران، ۲۰۰۶) نشان داد که سروتونین باعث تحریک بلوغ تخمدان درحالی‌که دوپامین باعث جلوگیری از تحریک تخمدان در هر دو جنس نر و ماده میگو می‌شود. به‌دلیل هزینه بالای تهیه هورمون سروتونین و عدم دسترسی به این هورمون در این پژوهش با توجه به این‌که مطالعات اخیر نشان داده بود که ایزوفرم‌های هورمون‌های گنادوتروپین هم قابلیت تحریک تخمدان میگوها را دارند از هورمون اواپریم که ترکیبی از هورمون گنادوتروپین ماهی آزاد و ضد دوپامین است، استفاده شد. نتایج آماری بررسی مدت زمان رسیدن میگوها به رسیدگی کامل جنسی نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف آزمایشی وجود دارد به‌طوری‌که، میگوها در تیمار قطع پایه چشمی با سپری کردن (۱/۳۲±۹/۰۰ روز) توانستند بیش‌ترین تعداد مولد به مرحله ۴ رسیدگی جنسی برسند درحالی‌که در تیمار تزریق سرم فیزیولوژی با سپری کردن (۶/۰۲±۲۶/۴۰ روز) به این مرحله رسیدند ($p<0/05$). در این مطالعه علاوه بر تیمار قطع پایه چشمی، تیمارهای تزریقی هورمون اواپریم توانستند باعث تحریک رسیدگی جنسی نسبت به تیمار شاهد در زمان کوتاه‌تری شوند که با پژوهش Meeratana و همکاران (۲۰۰۶) مطابقت داشت. آن‌ها دریافتند که تزریق دوزهای مختلف هورمون سروتونین در مقایسه با تیمار نرمال (بدون تزریق) و تیمار شاهد (تزریق سرم فیزیولوژی) تفاوت‌های چشمگیری وجود داشت به‌طوری‌که، سروتونین با دوز ۱ میکروگرم بر گرم وزن بدن توانست ۸۰ درصد مولدین میگوی روزنبرگی را پس از ۱۵ روز به مرحله ۴ رسیدگی جنسی برساند درحالی‌که میگوها در تیمار نرمال و شاهد به مرحله بلوغ کامل نرسیدند. نتایج به‌دست آمده از این معیار، با مطالعات صورت گرفته توسط Alfaro و همکاران (۲۰۰۴) بر مولد میگوی وانامی و پژوهش‌های انجام شده توسط Ngernsoungnern و همکاران (b,c ۲۰۰۸) و Nagur Babu و همکاران (۲۰۱۳) بر میگوی مونودون (ببری سیاه) مطابقت دارد. مطابق با مطالعه حاضر، Vaca و Alfaro (۲۰۰۰) گزارش دادند که میگو وانامی تحت قطع پایه چشمی پس از ۷ روز به بلوغ کامل جنسی رسیده و تعداد کمی از میگوها در تیمار تزریق هورمون سروتونین با طی دو برابر زمان (۱۴ روز) کاملاً بالغ شدند درحالی‌که تیمار سرم فیزیولوژی (شاهد) هیچ‌گونه اثربخشی در تسریع روند بلوغ جنسی نداشته است. در میگوها تعداد تخم به‌دست آمده بستگی به گونه میگو، اندازه، نوع تغذیه، محل زیست (طبیعت یا پرورشی)، مرحله تخم‌ریزی میگو و عوامل زیست محیطی (مانند: دوره نوری، درجه حرارت، میزان شوری) دارد. بیش‌ترین میانگین تعداد تخم به‌دست آمده مربوط به تیمار قطع پایه چشمی و کم‌ترین آن مربوط به تیمار تزریق سرم فیزیولوژی (شاهد) بود. به‌طور مشابه Wongprasert و همکاران (۲۰۰۶) گزارش دادند که قطع پایه چشمی باعث شده تا مولدین میگوی مونودون نسبت به تیمار تزریق سروتونین بیش‌تر تخم‌ریزی نمایند درحالی‌که در مغایرت با این تحقیق، Ngernsoungnern و همکاران (b ۲۰۰۸) بیان داشتند که تفاوتی در تعداد تخم به‌دست آمده بین تیمارهای تزریقی گنادوتروپین با تیمار تزریق سرم فیزیولوژی و قطع پایه چشمی وجود ندارد. میانگین تعداد ناپلی به‌دست آمده بین تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌دار داشت ($p<0/05$) به‌طوری‌که بیش‌ترین میانگین ناپلی به‌دست آمده مربوط به تیمار قطع پایه چشمی (۵۱۸۰±۵۶۱۳۲) و پس از آن مربوط به تیمارهای تزریق دوزهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم هورمون اواپریم به‌ترتیب (۹۷۸±۱۶۳۲۶ و ۱۸۲۴±۲۰۵۲۵) بود. کم‌ترین تعداد ناپلی در تیمار تزریق سرم فیزیولوژی (۹۱۳±۶۳۲۶) به‌دست آمد. مطابق با این یافته‌ها محققین با بررسی میانگین تعداد ناپلی به‌دست‌آمده در پایان آزمایش دریافتند که تیمار قطع پایه چشمی نسبت به تیمارهای تزریقی از وضعیت مطلوب‌تری برخوردار هستند (Aktas و Kumlu، ۲۰۰۵؛ Munoz و همکاران، ۲۰۰۰). اگرچه تزریق هورمون می‌تواند منجر به تحریک تخم‌ریزی و تولید ناپلی شود اما باید توجه داشت که این تحریک پذیری موقتی است و ممکن است دلیل آن به نیمه‌عمر اثر هورمون ارتباط داشته باشد. شاخص گناد و قطر اووسیت‌ها به‌عنوان یک ابزار برای شناسایی و تعیین وضعیت تولیدمثل در سخت‌پوستان

استفاده می‌شود (Haley، ۱۹۷۲). نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر نشان از تاثیر تزریقی هورمون گنادوتروپین است که در همین راستا، Tinikul و همکاران (۲۰۱۴) گزارش دادند که تزریق ۲۵ و ۲۵۰ نانوگرم بر گرم وزن بدن هورمون‌های گنادوتروپین اختاپوس و لامپری به میگوی وانامی با وزن ۶۰ گرم باعث افزایش معنی‌دار شاخص گنادوسوماتیک و قطر اووسیت‌ها در مقایسه با گروه شاهد (تزریق سرم فیزیولوژی) شدند، اما میگوهای دریافت کننده دوپامین نتایج متضادی را نشان دادند. در یک گونه میگوی، اندازه اووسیت‌ها تنها متاثر از وزن بدن مولدین نیستد (Palacios و Racotta، ۲۰۰۳)، بلکه رشد اووسیت‌ها در تخمدان می‌تواند تحت تاثیر تغییرات محیطی، غذایی و هم‌چنین فاکتورهای استرس‌زا باشند. با توجه به نتایج به‌دست آمده تفاوت معنی‌داری بین قطر اووسیت‌ها در تیمارهای آزمایشی وجود داشت ($p<۰/۰۵$) و بالاترین میزان آن در تیمار قطع پایه چشمی مشاهده شد. در مغایرت با این نتایج، تزریق هورمون سروتونین (۲۵ و ۴۵ میکرو گرم) نسبت به تیمارهای شاهد (بدون دستکاری و قطع پایه چشمی) در میگوی مونودون (Nagur Babu و همکاران، ۲۰۱۳) و تزریق سروتونین (۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر گرم وزن بدن) در مقایسه با تیمارهای شاهد (قطع پایه چشمی و تزریق سرم فیزیولوژی) در میگوی موزی (Ikhwanuddin و همکاران، ۲۰۱۲) توانستند بهتر عملکرد را نشان دهد. Sainath و Reddy (۲۰۱۱)، با بررسی تیمارهای مختلف دریافتند که شاخص تخمدان و میانگین قطر اووسیت‌های خرچنگ (*Oziotelphusa senex senex*) در تیمار قطع دوطرفه پایه چشمی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت درحالی‌که تزریق هورمون سروتونین و ملاتونین باعث کاهش بلوغ تخمدان شد. این گزارش با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد با این تفاوت که آزمایش حاضر بر روی گونه اهلی میگو وانامی صورت گرفت و این‌که قطع پایه چشمی یک‌طرفه بود. مطالعه عوامل و شرایط استرس‌زا می‌تواند به‌عنوان شاخص مهم در جهت کنترل و ارزیابی سلامت مولدین میگو در کارگاه‌های تکثیر و پرورش حائز اهمیت باشد. مقدار کل هموسیت به‌عنوان یک پارامتر اصلی جهت ارزیابی وضعیت سلامت سخت‌پوستان محسوب می‌شود و افزایش مقدار آن مربوط به بروز استرس‌های مختلف (Chang و همکاران، ۲۰۰۷) و استرس ناشی از قطع پایه چشمی می‌باشد (Maggioni و همکاران، ۲۰۰۴). در این مطالعه بیش‌ترین مقدار هموسیت کل و درنتیجه بیش‌ترین تعداد سلول‌های هماتولوژیکی در تیمار قطع پایه چشمی بود که خود نشان از وجود استرس در این تیمار می‌باشد. Maggioni و همکاران (۲۰۰۴) برخی پارامترهای هماتو-ایمونولوژی در میگوی ماده وانامی تحت قطع یک‌طرفه پایه چشمی تغذیه شده با ویتامین C را مورد بررسی قرار دادند و نمونه‌برداری از همولنف یک روز قبل و روزهای ۱، ۳، ۷ و ۱۴ بعد از قطع پایه چشمی انجام شد. به‌جز گلوکز تغییرات معنی‌داری در دیگر فاکتورها هم‌چون مقدار هموسیت کل، پروتئین کل و فعالیت فنولوکسیداز بین تیمارهای آزمایشی و شاهد مشاهده نگردید. در تضاد با این گزارش در مطالعه حاضر به‌جز مقدار هموسیت کل و سلول‌های هماتولوژیکی در دیگر فاکتورهای متابولیکی تفاوت آماری مشاهده گردید ($p<۰/۰۵$)، که این ناهمسویی در این دو گزارش ممکن است به‌دلیل وجود ویتامین C به‌عنوان محرک ایمنی در جیره غذایی باشد. Racotta و Palacios (۱۹۹۸) در تحقیقی، ناپایداری متابولیکی همولنف در پاسخ به استرس دستکاری و تزریق هورمون سروتونین در میگوی وانامی را مورد بررسی قرار دادند. نمونه‌گیری از همولنف در زمان‌های قبل و ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه پس از تزریق هورمون سروتونین انجام شد و نتایج نشان داد که استرس ناشی از دستکاری در زمان نمونه‌برداری منجر به تحریک هایپرگلیسمیا و افزایش سطح گلوکز و لاکتات در تیمارهای آزمایش شد. در همین راستا Chiu و همکاران (۲۰۰۶) و Chang و همکاران (۲۰۰۷)، پاسخ فیزیولوژیکی هم‌چون گلوکز، لاکتات، هموسیانین و پروتئین کل در میگوهای وانامی و مونودون تحت تزریق دوپامین با دوزهای $۱۰^{-۶}$، $۱۰^{-۷}$ و $۱۰^{-۸}$ مول برای هر میگو را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که ۲ ساعت پس از تزریق میزان پروتئین کل و بین ۲ تا ۴ ساعت پس از تزریق میزان گلوکز و لاکتات نسبت به تیمار شاهد (تزریق سرم فیزیولوژی) افزایش یافت. نتایج متابولیکی حاصل از اعمال قطع پایه چشمی و تزریق نشان داد که بین این دو تیمار اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد ($p<۰/۰۵$). پارامترهای متابولیکی پس از گذشت ۴۵ دقیقه در تیمار قطع پایه چشمی (به‌جز پروتئین کل) کاهش و در تیمار تزریق افزایش یافت. از آن‌جائی‌که پایه چشم سخت‌پوستان محل ترشح، ذخیره‌سازی هورمون هایپرگلیسمیا (قند خون) می‌باشد بنابراین با اعمال قطع یک‌طرفه پایه چشمی امکان انتقال این هورمون از پایه چشم به همولنف کاهش یافته در نتیجه میزان گلوکز و لاکتات همولنف پایین می‌آید. براساس گزارش محققین و نتایج به‌دست آمده می‌توان اظهار داشت که تکنیک قطع پایه چشمی یک روش قابل قبول است و تزریق هورمون گنادوتروپین می‌توند به‌عنوان عامل اثرگذار به‌همراه قطع پایه چشمی برای تسریع فرایند زرده‌سازی و تکامل گنادها و در نتیجه بالا رفتن توانایی تولیدمثل استفاده شود که این امر نیاز به تحقیق دارد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان از حمایت‌های جناب آقای مهندس محمد گرگیج و همکاری‌های کارشناسان کارگاه تکثیر میگوی پردیس و سنتدرف بندرجاسک تقدیر و تشکر می‌نمایند.

منابع

۱. **Aktas, M. and Kumlu, M., ۲۰۰۵.** Gonadal maturation and spawning in *Penaeus semiculcatus d*e Hann, ۱۸۴۴ by Hormone Injection. Turk J Zoo. Vol. ۲۹, pp: ۱۹۳-۱۹۹.

۲. **Alfaro, J.; Zuniga, G. and Komen, J., ۲۰۰۴.** Induction of ovarian maturation and spawning by combined treatment of serotonin and a dopamine antagonist, spiperone in *Litopenaeus stylirostris* and *Litopenaeus vannamei*. Aquacul. Vol. ۲۳۶, pp: ۵۱۱-۵۲۲.

۳. **Chang, C.C.; Wu, Z.R.; Chen, C.S.; Kuo, C.M. and Cheng, W., ۲۰۰۷.** Dopamine modulates the physiological response of the tiger shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture. Vol. ۲۷۰, pp: ۳۳۳-۳۴۲.

۴. **Chiu, H.T.; Yeh, S.P.; Huang, S.H.; Chang, C.C.; Kuo, C.M. and Cheng, W., ۲۰۰۶.** Dopamine induces transient modulation of the physiological responses of whit eleg shrimp. Aquaculture. Vol. ۲۵۱, pp: ۵۵۸-۵۶۶.

۵. **Diwan, A.D., ۲۰۰۵.** Current progress in shrimp endocrinology. India J Exp Biol. Vol. ۴۳, pp: ۲۰۹-۲۲۳.

۶. **Haley, S.R., ۱۹۷۲.** Reproductive cycling in the ghost crab, *Ocypode quadrata*. Crustaceana. Vol. ۲۳, pp: ۱-۱۱.

۷. **Ikhwanuddin, M.; Lyana, N.A.; Bakar, N.H.A.; Jasmani, S. and Bolong, A.M.A., ۲۰۱۲.** Stimulation of Ovarian Maturation Using Serotonin (۵-Hydroxy tryptamine) Hormone on Banana Shrimp. World Applied Sciences Journal. Vol.۱۸, No, ۳, pp: ٤۳٦-٤٤٥.

۸. **Kunst, A.; Draeger, B. and Ziegenhorm, J., ۱۹۸۳.** UV-methods with hexoquinase and glucose-۶-hosphate dehydrogenase. Meth Enzym Anal. Vol. ۶, pp: ۱۶۳-۱۷۲.

۹. **Maggioni, D.S.; Andreatta, E.R.; Hermes, E.M. and Barracco, A., ۲۰۰۴.** Evaluation of some hemato-immunological parameters in female shrimp *Litopenaeus vannamei* submitted to unilateral eyestalk ablation in association with a diet supplemented with super doses of ascorbic acid as a form of immune stimulation. Aquaculture. Vol. ۲۴۱, pp: ۵۰۱-۵۱۵.

۱۰. **Maule, A.G. and Vanderkooi, S.P., ۱۹۹۹.** Stress-induced immune-endocrine interaction. In: Balm, P.H.M. (Ed.), Stress Physiology in Animals. Academic Press, Sheffield, UK. pp: ۲۰۵-۲۴۵.

۱۱. **Meeratana, P.; Withyachumnarnkul, B.; Damrongphol, P.; Wongprasert, K.; Suseangtham, A. and Sobhon, P., ۲۰۰۶.** Serotonin induces ovarian maturation in giant freshwater prawn brood stock, *Macrobrachium rosenbergiide* Man. Aquaculture. Vol. ۲۶۰, pp: ۳۱۵-۳۲۵.

۱۲. **Munoz, M.; Cedeno, R.; Rodriguez, J.; Van der Knaap, W.P.W.; Mialhe, E. and Bachere, E., ۲۰۰۰.** Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. Aquaculture. Vol. ۱۹۱, pp: ۸۹-۱۰۷.

۱۳. **Nagur Babu, K.; Pallavi, P.N.; Reddy, D.C. and Nanda Kuma, N.V., ۲۰۱۳.** Ovarian maturation and spawning in the tiger shrimp by serotonin and dopamine injection. Iin.JPLS. Vol. ۷, pp: ۲۷۸۵-۲۷۹۳.

۱۴. **Ngernsoungnern, A.; Ngernsoungnern, P.; Kavanaugh, S.; Sower, S.A.; Sobhon, P. and Sretarugsa, P., ۲۰۰۸ a.** The identification and distribution of gonadotropin-releasing hormone-like peptides in the central nervous system and ovary of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Invertebr neurosci. Vol. ۸, pp: ۴۹-۵۷.

۱۵. **Ngernsoungnern, A.; Ngernsoungnern, P.; Weerachatyanukul, W.; Chavadej, J.; Sobhon, P. and Sretarugsa, P., ۲۰۰۸ b.** The existence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) immune reactivity in the ovary and the effects of GnRHs on the ovarian maturation in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture. Vol. ۲۷۹, pp: ۱۹۷-۲۰۳.

۱۶. **Ngernsoungnern, P.; Ngernsoungnern, A.; Sobhon, P. and Sretarugsa, P., ۲۰۰۹.** Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and a GnRH analog induce ovarian maturation in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Invert Repro Deve. Vol. ۵۳, PP: ۱۲۵-۱۳۵.

۱۷. **Ngernsoungnern, P.; Ngernsoungnern, A.; Kavanaugh, S.; Sobhon, P.; Sower, S.A. and Sretarugsa, P., ۲۰۰۸ c.** The presence and distribution of gonadotropin releasing hormone-liked factor in the central nervous system of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Gen. Comp. Endocrinol. Vol. ۱۵۵, PP: ۶۱۳-۶۲۲.

۱۸. **Okumura, T., ۲۰۰۴.** Review: Perspectives on Hormonal Manipulation of Shrimp Reproduction. JARQ. Vol. ۳۸, No.۱, PP: ۴۹-۵۴.

۱۹. **Palacios, E. and Racotta. L., ۲۰۰۳.** Assessment of Ovarian Development and Its Relation to Mating in Wild and Pond-Reared *Litopenaeus vannamei* Shrimp in a Commercial Hatchery. Journal of the World Aquaculture Society. Vol. ۳٤, No. ٤, pp: ٤٦٦-٤٧٧.

۲۰. **Panouse, J.B., ۱۹۴۳.** Influence de l'ablation du pe´doncule oculaire sur la croissance de l'ovaire chez la crevette *Leander serratus*. C. R. Acad. Sci. Paris. Vol. ۲۱۷, pp: ۵۵۳-۵۵۵.

۲۱. **Poljaroen, J.; Tinikul, Y.; Phoungpetchara, I.; Kankoun, W.; Suwansaard, S.; Siangcham, T.; Meeratana, P.; Cummins, S.F.; Sretarugsa, P.; Hanna, P.J. and Sobhon, P., ۲۰۱۱.** The effects of biogenic amines, gonadotropin-releasing hormones and corazonin on spermatogenesis in sexually mature small giant freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture. Vol. ۳۲۱, pp: ۱۲۱-۱۲۹.

۲۲. **Quackenbush, L.S., ۱۹۹۱.** Regulation of vitellogenesis in penaeid shrimp; In: DeLoach P, Dougherty WJ, Davidson M, editors. Amsterdam: Elsevier. pp: ۱۲۵-۱۴۰.

۲۳. **Racotta, I.S. and Palacios, E., ۱۹۹۸.** Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Peneues vannamei*. J World Aqua Soci. Vol. ۲۹, pp: ۳۵۱-۳۵۶.

۲۴. **Rosenberry, B., ۲۰۰۲.** World shrimp farming. Shrimp news International. ۲۷۶ p.

۲۵. **Sainath, S.B. and Reddy, P.S., ۲۰۱۱.** Effect of selected biogenic amines on reproduction in the fresh water edible crab, *Oziotelphusa senex senex*. Aquaculture. Vol. ۳۱۳, pp: ۱٤٤-۱٤۸.

۲۶. **Santhoshi, S.; Sugumar, V. and Munuswamy, N., ۲۰۰۹.** Serotonergic stimulation of ovarian maturation and hemolymph vitellogenin in the Indian white shrimp. Aquaculture. Vol. ۲۹۱, pp: ۱۹۲-۱۹۹.

۲۷. **Sarojini, R.; Nagabhushanam, R. and Fingerman, M., ۱۹۹۳.** In vivo evaluation of ۵-hydroxytryptamine stimulation of the testes in the fiddler crab, *Uca pugilator*, a presumed action on the neuro- endocrine system. Comp. Biochem. Physiol. C۱۰۶, PP: ۳۲۱- ۳۲۵.

۲۸. **Sarojini, R.; Nagabhushanam, R. and Fingerman, M., ۱۹۹۵.** In vivo inhibition by DA of ۵-hydroxy tryptamine stimulated ovarian maturation in the red swamp crayfish. Experiential. Vol. ۵۱, PP: ۱۵۶-۱۵۸.

۲۹. **Sherwood, N.M.; Lovejoy, D.A. and Coe, I.R., ۱۹۹۳.** Origin of mammalian gonadotropin releasing hormones. Endocrin Reviews. Vol. ۱۴, PP: ۲۴۱-۲۵۴.

۳۰. **Shi, X.; Li, D.; Zhuang, P.; Nie, F. and Long, L., ۲۰۰۶.** Comparative blood biochemistry of amur sturgeon and Chinese sturgeon. Fish physio and biochem. Vol. ۳۲, PP: ۶۳-۶۶.

۳۱. **Swetha, C.H.; Sainath, S.B.; Ramachandra Reddy, P. and Sreenivasula Reddy, P., ۲۰۱۱.** Reproductive Endocrinology of Female Crustaceans: Perspective and Prospective. J Marine Sci Res Development.

۳۲. **Tinikul, Y.; Poljaroen, J.; Tinikul, R.; Anuracpreeda, P.; Chotwiwatthanakun, C.; Senin, N.; Poomtong, T.; Hanna, P.J. and Sobhon, P., ۲۰۱٤.** Effects of gonadotropin-releasing hormones and dopamine on ovarian maturation in the Pacific white shrimp and their presence in the ovary during ovarian development. Aquaculture. Vol. ٤۲۰-٤۲۱, pp: ۷۹-۸۸.

۳۳. **Tsai, P.S., ۲۰۰۶.** Gonadotropin-releasing hormone in invertebrates: structure, function, and evolution. Gen. Comp. Endocrinol. Vol. ۱۴۸: ۴۸-۵۳.

۳۴. **Tsukimura, B. and Kamemoto, F.I., ۱۹۹۱.** In vitro stimulation of oocytes by presumptive mandibular organ secretions in the shrimp, *Penaeus vannamei*. Aquaculture. Vol. ۹۲, pp: ۵۹-۶۶.

۳۵. **Vaca, A.A. and Alfaro, J., ۲۰۰۰.** Ovarian maturation and spawning the white shrimp, *Penaeus vannamei*, by serotonin injection. Aquaculture. Vol. ۱۸۲, pp: ۳۷۳-۳۸۵.

۳۶. **Vargas-Albores, F.; Guzmán-Murillo, M.A. and Ochoa, J.L., ۱۹۹۳.** Anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies in penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). Comp. Biochem. Physiol. Vol. ۱۰۶, pp: ۲۹۹-۳۰۳.

۳۷. **Wongprasert, K.S.; Asuvapongpatana, P.; Poltana, M.T. and Withyachumnarnkul, B., ۲۰۰۶.** Serotonin stimulates ovarian maturation and spawning in the black tiger shrimp. Aquaculture. Vol. ۲۶, pp: ۱۴۴۷-۱۴۵۴.

۳۸. **Yano, I.; Tsukimura, B.T.; Sweeny J.N. and Wyban, J.A., ۱۹۸۸.** Induced ovarian maturation by implantation of lobster ganglion. J World Aqua Soci. Vol ۱۹, No ۴, pp: ۲۰۴-۲۰۹.