تغییرات بیوشیمی، استروئیدهای جنسی و ترکیب لاشه در بچه ماهیان ازون برون (*Acipenser stellatus*) تغذیه شده با هورمون ۱۷– بتا استرادیول

بهمن مکنت خواه [۱]، بهرام فلاحتکار [۲]*، حسین خارا[۳]، ایرج عفت پناه [۱]

* falahatkar@guilan.ac.ir

۱- مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان دریایی شادروان دکتر یوسف پور، سیاهکل، گیلان
۲- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، گیلان
۳- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان، گیلان

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۳

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی تاثیر هورمون ۱۷- بتا استرادیول (E_2) بر شاخص های بیوشیمیایی خون، استروئیدهای جنسی و ترکیب لاشه ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*) جوان انجام گردید. ۱۸۰ عدد بچه ماهی ازون برون ۵ ماهه با میانگین وزن ۰/۲ ± ۱۱/۷ گرم در ۳ تیمار و ۳ تکرار به تعداد ۲۰ عدد در هر تانک تقسیم شدند. تیمارها شامل دوزهای صفر، ۲۵ و ۵۰ میلی گرم هورمون E_2 به ازای هر کیلوگرم غذا در نظر گرفته شد. اندازه گیری پارامترهای بیوشیمیایی خون شامل گلوکز، پروتئین کل، کلسترول، تری گلیسرید، کلسیم و فسفر، استروئیدهای جنسی شامل تستوسترون، پروژسترون و استرادیول و آنالیز تقریبی ترکیبات لاشه در پایان دوره هفت ماهه تغذیه با سطوح مختلف E_2 انجام شد. اندازه گیری ها نشان داد شاخص های بیوشیمیایی پلاسما شامل گلوکز، پروتئین کل، کلسترول، تری گلیسرید، کلسیم و فسفر تابع دوز هورمون می باشند. در تیمار شاهد، کمترین مقدار و در تیمار ۵۰ میلی گرم هورمون، بیشترین مقدار شاخص های بیوشیمیایی مذکور دیده شدند ($p <$ ۰/۰۵). اندازه گیری استروئیدهای جنسی پلاسما نشان داد که مقدار E_2 در پلاسمای خون ماهیان تیمار شاهد نسبت به تیمارهای تغذیه شده با جیره حاوی هورمون، کمترین بوده، در حالی که هورمون های تستوسترون و پروژسترون در تیمار شاهد بیشترین مقادیر را نشان دادند ($p <$ ۰/۰۵). نتایج آنالیز تقریبی ترکیبات لاشه حاکی از عدم وجود اختلاف معنی دار در مقادیر رطوبت، پروتئین، چربی و خاکستر بین تیمارها بود ($p >$ ۰/۰۵). وزن نهایی، طول کل و شاخص های هپاتوسوماتیک و احشایی تحت تأثیر سطوح مختلف E_2 قرار گرفتند ($p <$ ۰/۰۵). نتایج این مطالعه نشان داد کاربرد هورمون ۱۷- بتا استرادیول در جیره غذایی سبب تأثیرگذاری قابل توجهی بر اغلب شاخص های بیوشیمیایی و استروئیدهای جنسی در ماهی ازون برون جوان می گردد که به نظر می رسد این تغییرات در راستای تغییر نسبت جنسی و شاخص های فیزیولوژیک می باشند.

لغات کلیدی: ازون برون، استروئیدهای جنسی، بیوشیمی، رشد

*نویسنده مسئول

مقدمه

در بین گونه های متنوع آبزیان، ماهیان خاویاری جزء ارزشمندترین موجودات آبزی محسوب می گردند. این ماهیان به دلایلی نظیر جثه بزرگ، سهولت در صید، گوشت لذیذ و خاویار مطبوع همواره به عنوان گونه های با ارزش تجاری مورد توجه بوده اند (Peter, 2000). توجه بیش از حد به ارزش تجاری آنها، عاملی برای آسیب رساندن به ذخایر آنها شده است. در حال حاضر کلیه گونه های ماهیان خاویاری در دریای خزر و حوضه آبریز آن، در فهرست ماهیان در معرض خطر قرار دارند (IUCN, 2012)، بنابراین تکثیر و پرورش مصنوعی این ماهیان می تواند راهکاری مناسب برای بازسازی ذخایر و تأمین نیازمندی های گوشت و خاویار باشد (Chebanov & Billard, 2001).

با توجه به اینکه ارزش خاویار استحصالی به مراتب بیشتر از تولید گوشت آنهاست، کنترل نسبت جنسی در این گروه از ماهیان دارای اهمیت فوق العاده ای می باشد (Falahatkar *et al*., 2011). بنابراین استفاده از روش های کم هزینه برای هدایت نسبت جنسی به سمت تولید جمعیت های با ارزش اقتصادی بیشتر در پرورش این گروه از ماهیان اهمیت به سزایی دارد.

۱۷- بتا استرادیول یکی از مهم ترین هورمون های جنسی است که در پاسخ محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- گناد به منظور رشد گنادها و بلوغ توسط فولیکول های تخمدانی تولید می شود (Nagahama, 1987). این هورمون از جمله هورمون های استروئیدی است که به صورت مصنوعی در دسترس بوده و در صنعت آبزی پروری با هدف ایجاد جمعیت های تک جنسی ماده استفاده می‌شود (Yamamoto, 1953). به کارگیری این هورمون به صورت اضافه کردن به جیره غذایی و یا حمام هورمونی در مراحل جنینی تا مرحله جوانی باعث القای ماده زایی در کپورماهیان، آزادماهیان، سیچلایدها، آنابانتیده ها و پوسیلیده ها شده است (Pandian & Sheela, 1995; Piferrer, 2001). از سوی دیگر مطالعات نشان داده است که هورمون ۱۷- بتا استرادیول با ارتباط متقابلی که با سایر هورمون های آندوکرینی دارد تأثیرات مختلفی بر رشد سوماتیک، فعالیت های متابولیک کبد، رشد گنادی، صفات ثانویه جنسی و سیستم ایمنی می گذارد (Kim *et al*., 1997; Wang *et al*., 2008; Malison *et al*., 1988; 1983).

در ماهیان خاویاری، بلوغ فرآیندی طولانی است و انتظار برای رسیدن ماهی به مرحله ای که بتوان جنسیت آنها را تعیین نمود زمان بر است؛ این در حالی است که در بحث پرورش ماهیان خاویاری با توجه به اهمیت جنس ماده به دلیل ارزش بالای آن در تولید خاویار، می توان با استفاده از هورمون ۱۷- بتا استرادیول در ماهیان تمایز نیافته و حتی در ماهیان تمایز یافته از نظر جنسی، به تولید فیزیولوژیک جمعیت تمام ماده اقدام نمود (Piferrer, 1995). Flynn و همکاران (۲۰۰۶) اثرات رژیم غذایی حاوی E_2 را در ماهی خاویاری پوزه کوتاه جوان *Acipenser brevirostrum* را طی دو آزمایش جداگانه، بر روی ماهیان ۵ و ۷ ماهه و در دوزهای مختلف بررسی کردند. نتایج بدست آمده در هر دو آزمایش حاکی از آن بود که در گروه های شاهد و ۱۰ میلی گرم E_2/kg، ماهیان جوان فعال باقی ماندند و خوب تغذیه نمودند. اما در سایر تیمارها مطابق با افزایش دوز E_2 فعالیت و تغذیه ماهیان کمتر شد (Flynn & Benfey, 2007).

ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus* Pallas, 1771) یکی از گونه های مهم ماهیان خاویاری است که جمعیت قابل توجهی را در دریای خزر به خود اختصاص داده است. از مزیت های این گونه می توان به کیفیت بالای گوشت و بازار پسندی فوق العاده آن و مدت زمان کمتر برای رسیدن به مرحله بلوغ و تولید خاویار نسبت به اکثر گونه های خاویاری و همچنین میزان بالای خاویار استحصالی نسبت به وزن بدن (حدود ۱۹٪) اشاره کرد (کیوان، ۱۳۸۲). این گونه به دلیل سن پایین رسیدگی جنسی، قابلیت تولید خاویار را در سنین پایین تر نسبت به گونه هایی نظیر فیل ماهی و تاسماهی روسی و ایرانی دارا بوده و برای تولید خاویار در سیستم های پرورشی مناسب می باشد.

با اینکه مطالعات بر روی تکثیر، فیزیولوژی و تغذیه ازون برون در داخل کشور انجام شده است (یونس زاده و همکاران، ۱۳۸۶؛ یوسفی و همکاران، ۱۳۹۱؛ امدادی و همکاران، ۱۳۹۲) اما تاکنون مطالعه ای در خصوص اثر هورمون استرادیول در این گونه صورت نگرفته است.

بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر این ترکیب بر رشد، ترکیبات بیوشیمیایی و استروئیدهای خون و نسبت جنسی ماهی ازون برون طراحی و اجرا شد.

مواد و روش ها

ماهی و شرایط پرورش

بچه ماهیان ازون برون حاصل تکثیر مصنوعی مولدین وحشی صید شده از دریای خزر در مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی در سال ۱۳۸۹ به مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان دریایی شادروان دکتر یوسف پور سیاهکل منتقل شدند و پس از چهار ماه نگهداری و تطابق با غذای دستی در ۵ ماهگی با وزن متوسط ۰/۲ ± ۱۱/۷ گرم و به تعداد ۲۰ عدد در هر حوضچه توزیع شدند.

جهت پرورش از ۹ حوضچه بتونی گرد به قطر ۱۸۵ cm، سطح مقطع ۲/۷ m^2 و ارتفاع ۵۰ cm در ۳ تیمار و هر تیمار با ۳ تکرار استفاده گردید. ارتفاع آب برای همه حوضچه ها به صورت مساوی و معادل ۱ ± ۳۰ cm در نظر گرفته شد و حجم آب هر حوضچه ۲۷ ± ۸۰۶ لیتر بود. میزان آب ورودی به هر حوضچه با توجه به تغییرات دمای آب ورودی و نیز افزایش اندازه و زی توده ماهیان در طول دوره، بین ۰/۴ ± ۱۰ الی ۰/۵ ± ۲۰ لیتر و به طور متوسط ۰/۵ ± ۱۷ لیتر در دقیقه متغیر بود. منبع تامین آب در این تحقیق رودخانه دیسام (خرارود) سیاهکل بود.

دما، اکسیژن، درصد اشباعیت اکسیژن و pH آب محل پرورش در طول دوره تحقیق با دستگاه پی اچ- اکسی متر WTW 340 i اندازه گیری شد، بطوریکه میانگین دما ۰/۴ ± ۱۳/۶ درجه سانتیگراد، اکسیژن mg/l ۰/۲ ± ۸/۹، درصد اشباعیت اکسیژن ۰/۲ ± ۸۴ و pH معادل ۰/۰۲ ± ۷/۹ بود. فتوپریود نیز به صورت شرایط طبیعی در طول دوره پرورش در نظر گرفته شد.

غذا و تغذیه

هورمون E_2 از شرکت (St. Louis, MO, USA) Sigma-Aldrich تهیه و در سه سطح صفر، ۲۵ و ۵۰ میلی گرم به هر کیلوگرم از جیره های غذایی اضافه شد (Flynn & Benfey, 2007). هورمون مربوطه برای تیمارهای ۲۵ و۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم غذا پس از توزین با دقت ۱ میلی گرم و حل کردن در الکل اتانول ۹۶ درصد بر روی خوراک بچه ماهیان (بیومار، فرانسه) اسپری شد. بر روی غذای مربوط به تیمار شاهد نیز تنها الکل اتانول ۹۶ درصد اسپری شد. اندازه غذای مورد استفاده در ابتدا به قطر ۰/۵ میلیمتر با ۵۸ درصد پروتئین بود و در ادامه دوره پرورش با توجه به بزرگ شدن اندازه ماهیان به ترتیب از غذاهای به قطر ۰/۸، ۱/۱، ۱/۵، ۱/۹ و ۳ میلیمتر با مقدار پروتئین به ترتیب ۵۶، ۵۶، ۵۴، ۴۸ و ۴۴ درصد استفاده شد. غذادهی به بچه ماهیان با توجه به دمای آب بین ۲ تا ۶ وعده در شبانه روز بسته به اشتهای آنها و به صورت دستی صورت پذیرفت (Shearer, 2000).

نمونه برداری و آنالیز نمونه ها

به منظور اندازه گیری شاخص های رشد و بررسی روند رشد ماهیان در طول دوره پرورش با فاصله هر سه هفته یکبار تا انتهای دوره پرورش، وزن و طول هر ماهی با ترازوی دیجیتال با دقت ۱ گرم و خط کش بیومتری با دقت ۱ میلیمتر اندازه گیری شدند. در طول دوره پرورش، تلفات احتمالی رخ داده بصورت روزانه جمع آوری و ثبت می گردید.

پس از ۷ ماه پرورش، از هر مخزن ۵ عدد ماهی به طور تصادفی صید و از خون آنها نمونه برداری صورت گرفت. به منظور خونگیری از ماهی ابتدا ماهی در محلول ۳۰۰ ppm پودر گل میخک بیهوش شده و سپس با استفاده از سرنگ های ۵ ml آغشته به هپارین از سیاهرگ ساقه دمی واقع در انتهای باله مخرجی، مقدار ۲ میلی لیتر خون از هر ماهی گرفته شد. همچنین در پایان دوره از هر تانک ۳ نمونه جهت اندازه گیری شاخص های هپاتوسوماتیک (HSI) و احشایی (VSI) به طور تصادفی صید و شاخص های مذکور با استفاده از فرمول های زیر اندازه گیری گردیدند (Turchini *et al.*, 2003):

HSI = (وزن کبد به گرم/ وزن کل ماهی به گرم) × ۱۰۰

VSI = (وزن احشاء به گرم/ وزن ماهی به گرم) × ۱۰۰

جدا سازی پلاسما از سلول‌های خونی توسط سانتریفیوژ مدل Universal (شرکت پارس آزما، ایران) به مدت ۷ دقیقه در دور g ۱۵۰۰ انجام شد. سپس پلاسما به لوله های پلاستیکی درب دار شماره گذاری شده منتقل و در فریزر با دمای ۲۰°C- تا زمان اندازه گیری پارامترهای مورد نظر نگهداری گردیدند (Pottinger & Carrick, 2001).

تعیین مقادیر هورمون های استروئیدی (۱۷- بتا استرادیول، تستوسترون و پروژسترون) به روش Radioimmunassay با استفاده از دستگاه گاماکانتر LKB (فنلاند) و به کارگیری کیت Immunotech (مارسی، فرانسه) انجام شد (Migaud *et al.*, 2004).

گلوکز پلاسمای خون به روش آنزیماتیک GOD-POD رنگ سنجی با کیت تشخیصی (شرکت Greiner، باهلینگن، آلمان) و با دستگاه اسپکتروفتومتر (شرکت Technicon، آمریکا) سنجش گردید (Lister *et al.*, 2008). مقادیر تری گلیسرید و کلسترول در نمونه های پلاسما با استفاده از کیت های شرکت پارس آزمون (تهران، ایران) و با روش آنزیمی-کالریمتری (GPO-PAP) مورد سنجش قرار گرفتند. اندازه گیری پروتئین کل به روش بیوره و با استفاده از کیت مربوطه (زیست شیمی، تهران، ایران) انجام شد (Sandnes *et al.*, 1988). برای تعیین مقدار کلسیم نمونه ها از کیت شرکت من (تهران، ایران) استفاده شد که این اندازه گیری بر اساس روش تیمول بلو بود (Casenave *et al.*, 2003). به منظور اندازه گیری مقادیر فسفر نمونه ها از کیت های شرکت من (تهران، ایران) استفاده شد. مقادیر فسفر با بهره گیری از دستگاه Auto analyzer در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و طول موج ۳۴۰ نانومتر محاسبه شد (Henry *et al.*, 1974).

همچنین به منظور اندازه گیری رطوبت، خاکستر، چربی و پروتئین کل، در انتهای دوره پرورش ۳ عدد ماهی از هر تانک صید و در پلاستیک های کدگذاری شده گذاشته شدند. نمونه ها به فریزر با دمای ۲۰°C- سانتیگراد منتقل و تا زمان اندازه گیری شاخص های اشاره شده به صورت منجمد نگهداری شدند. نمونه های مربوط به تکرارهای مختلف هر تیمار پس از خارج کردن از فریزر بوسیله چرخ گوشت صنعتی مدل ۴۲ به طور کامل دو بار چرخ شدند تا کاملاً خرد و میکس گردند. در ادامه مقادیر رطوبت، پروتئین، چربی و خاکستر نمونه ها به روش AOAC (1995) اندازه گیری شدند، بطوری که رطوبت با قرار دادن نمونه ها در دمای ۱۰۵ درجه سانتیگراد تا رسیدن به وزن ثابت، پروتئین از روش کلدال، چربی از سوکسله و خاکستر از طریق سوزاندن ماده خشک در کوره الکتریکی با دمای ۵۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۵ ساعت اندازه گیری شد.

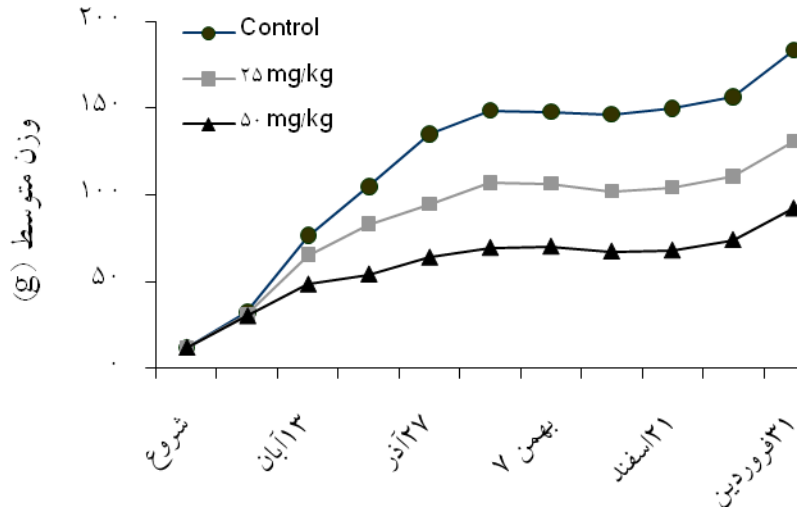
تجزیه و تحلیل آماری

داده های کسب شده پس از کنترل نرمال بودن با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov و همگنی واریانس ها از طریق آزمون Levene، به وسیله آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) مقایسه شدند و سپس با مشاهده اختلاف معنی دار از طریق تست Tukey مقایسه میانگین داده ها بین تیمارها و گروه شاهد در سطح اطمینان ۹۵٪ و از طریق نرم افزار SPSS نسخه ۱۳ صورت گرفت. داده های درون متن بصورت میانگین ± خطای استاندارد (SE) آورده شده است.

نتایج

رشد

نتایج نشان داد پس از ۷ ماه پرورش اختلاف معنی داری در وزن ($F=۶۳/۵۴۷$, $df=۲$, $p<۰/۰۰۱$) و طول کل ($F=۱۱۷/۸۵۲$, $df=۲$, $p<۰/۰۰۱$) بین گروه کنترل و دو گروه تغذیه شده با دو سطح هورمون E_2 وجود دارد طوری که حداکثر وزن و طول کل در ماهیان تیمار کنترل (صفر میلی گرم E_2) و حداقل وزن و طول کل در ماهیان تغذیه شده با سطح بالای هورمون (تیمار ۵۰ میلی گرم هورمون E_2 به ازای هر کیلوگرم غذا) مشاهده شد. بررسی روند رشد در طول دوره نیز حاکی از بوجود آمدن اختلاف وزن و طول کل بین تیمار کنترل و گروه های تغذیه شده با جیره حاوی هورمون از هفته ششم مطالعه بود. با افزایش زمان پرورش نیز این اختلاف افزایش یافت (نمودار ۱).



نمودار ۱: روند تغییرات میانگین وزن ماهیان ازون برون (*Acipenser stellatus*) تغذیه شده با سطوح مختلف ۱۷- بتا استرادیول طی ۷ ماه پرورش.

نتایج اندازه گیری های انجام شده نشان داد که تغذیه بچه ماهیان با هورمون E_2 بر شاخص های HSI ($F=۲۵/۸۱۳, df=۲, p=۰/۰۰۱$) و VSI ($p< ۰/۰۰۱$، $F=۳۷/۱۲۷, df=۲$) تأثیر معنی داری داشت (جدول ۱).

جدول ۱: برخی شاخص های رشد، هپاتوسوماتیک (HSI) و احشایی (VSI) در ماهیان ازون برون (*Acipenser stellatus*) تغذیه شده با سطوح مختلف هورمون E_2 پس از ۷ ماه پرورش.

شاخص	سطوح تغذیه ای E_2 (میلی گرم/کیلوگرم جیره)		
	صفر	۲۵	۵۰
وزن (g)	۱۸۳/۴ ± ۶ ^{a}	۱۳۱/۵ ± ۶/۲ ^{b}	۹۲/۲ ± ۴/۲ ^{c}
طول کل (cm)	۴۲/۵ ± ۰/۴ ^{a}	۳۷ ± ۰/۴ ^{b}	۳۳/۵ ± ۰/۴ ^{c}
HSI (%)	۲/۵۸ ± ۰/۱۶ ^{c}	۳/۷ ± ۰/۱۷ ^{b}	۴/۹۷ ± ۰/۲۵ ^{a}
VSI (%)	۷/۴۸ ± ۰/۲۴ ^{c}	۸/۸۴ ± ۰/۳ ^{b}	۱۰/۱۱ ± ۰/۲۴ ^{a}

مقادیر به صورت میانگین ± SE و برای شاخص های وزن و طول n=۶۰ و برای شاخص های HSI و VSI n=۹ بیان شده است. وجود حروف متفاوت در هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی دار می باشد ($p<۰/۰۵$).

هورمون های استروئیدی خون

نتایج حاصل از اندازه گیری سطوح هورمون E_2 در تیمارهای مختلف تفاوت معنی دار بین گروه های مختلف نشان داد ($F=۳۹/۲۷۳, df=۲, p<۰/۰۰۱$). بالاترین مقدار هورمون ۱۷- بتا استرادیول در تیمار دوز ۲۵ mg/kg و کمترین مقدار این هورمون در نمونه ماهیان تیمار کنترل بود. نتایج حاصل از اندازه گیری تستوسترون نیز تفاوت معنی دار بین گروه‌های تحت تغذیه با هورمون و تیمار کنترل نشان داد ($p< ۰/۰۰۱$, $F=۷۹/۸۳۶,df=۲$). بالاترین مقدار هورمون تستوسترون در خون ماهیان تیمار کنترل و کمترین مقدار هورمون

مذکور در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۵۰ میلی گرم هورمون E_2 در هر کیلوگرم غذا مشاهده شد. بر اساس سنجش های انجام شده، مقادیر هورمون پروژسترون پلاسما در تیمارهای مختلف تفاوت معنی داری بین گروه کنترل و تیمارهای تغذیه شده با هورمون E_2 نشان داد ($F=۴/۹۱, df=۲, p=۰/۰۱۲$). بالاترین سطح هورمون پروژسترون در تیمار شاهد بود، در حالی که مقدار همین هورمون در تیمارهای تغذیه شده با سطح پایین هورمون E_2 از کمترین مقدار برخوردار بود (جدول ۲).

شاخص های بیوشیمیایی

بررسی های انجام شده بر روی نوسان سطوح گلوکز خون در تیمارهای مورد آزمون حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف بود ($F=۷/۷۷۶ ,df=۲ ,p< ۰/۰۰۱$). بالاترین مقدار گلوکز در تیمار دوز بالای هورمون E_2 و پایین ترین مقدار گلوکز در تیمار کنترل بود.

نتایج حاصل از اندازه گیری کلسترول پلاسمای خون در تیمارهای مختلف تفاوت معنی دار بین گروه کنترل و گروه های تحت تیمار هورمون ۱۷- بتا استرادیول نشان داد ($F=۶۸/۸۵۸, df=۲, p<۰/۰۰۱$). مقدار کلسترول در تیمار کنترل پائین ترین حد را داشت در حالیکه در تیمار سطح بالای هورمون E_2 حدود ۵ برابر بیشتر بود.

اندازه گیری مقادیر تری گلیسرید در پلاسمای خون ماهیان تیمارهای مورد آزمون حاکی از وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها بود ($F= ۲, df=۲, p<۰/۰۰۱$). پائین ترین سطح تری گلیسرید در تیمار کنترل و بالاترین مقدار به تیمار تحت دوز بالای هورمون اختصاص داشت.

مقادیر پروتئین کل پلاسما در تیمارهای مورد آزمون اختلاف معنی داری بین سه تیمار نشان داد ($p<۰/۰۰۱, F=۲۹/۷۸۷, df=۲$). پائین ترین مقدار پروتئین کل در تیمار کنترل و بالاترین مقدار پروتئین در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۵۰ mg/kg هورمون E_2 بدست آمد.

اندازه گیری مقادیر کلسیم پلاسمای خون ماهیان مورد مطالعه نشان دهنده تبعیت میزان کلسیم از دوز هورمون بود. در تیمار کنترل مقدار کلسیم کمترین مقدار بود، در صورتی که در تیمارهای تغذیه شده با جیره های حاوی هورمون مذکور، میزان کلسیم خون، حدود ۱۷ تا ۲۰ بار بیشتر از گروه کنترل بود. آنالیز داده های کسب شده اختلاف معنی دار بین گروه های مختلف از نظر سطوح کلسیم پلاسما نشان داد ($F=۱۲۶/۸۰۸ , df=۲, p<۰/۰۰۱$).

با افزایش دوز هورمون E_2 میزان فسفر نیز در خون ماهی ازون برون افزایش یافت. در نتیجه بیشترین مقدار فسفر در خون ماهیان تیمار تغذیه شده با سطح بالای هورمون و کمترین مقدار فسفر در خون ماهیان گروه کنترل وجود داشت. ($F=۴۳/۸۷۷, df=۲, p<۰/۰۰۱$).

جدول ۲: استروئیدهای جنسی و شاخص های بیوشیمیایی در ماهیان ازون برون (*Acipenser stellatus*) تغذیه شده با سطوح مختلف هورمونE_2 پس از ۷ ماه پرورش.

شاخص	سطوح تغذیه ای E_2 (میلی گرم/کیلوگرم جیره)		
	صفر	۲۵	۵۰
۱۷- بتا استرادیول(ng/ml)	۸/۷۸ ± ۲/۱ ^{b}	۴۴/۲ ± ۱/۷ ^{a}	۴۱/۹۵ ± ۳/۹ ^{a}
تستوسترون(ng/ml)	۱/۰۱ ± ۰/۰۶ ^{a}	۰/۱۸۳ ± ۰/۰۴۷^{b}	۰/۱۵۷ ± ۰/۰۵۱ ^{ab}
پروژسترون (ng/ml)	۰/۰۸ ± ۰/۰۱۲ ^{a}	۰/۰۴ ± ۰/۰۰۸^{b}	۰/۰۵۷ ± ۰/۰۰۷ ^{ab}
گلوکز (mg/dl)	۷۵/۶ ± ۳/۷ ^{b}	۹۷/۳ ± ۷/۳ ^{b}	۱۳۵/۲۷ ± ۱۶/۹ ^{a}
کلسترول (mg/dl)	۵۹/۲۰ ± ۳/۱ ^{b}	۲۵۵/۹ ± ۱۲/۴ ^{a}	۲۹۸/۱ ± ۲۳/۴ ^{a}
تری گلیسرید (mg/dl)	۵۲۶/۷ ± ۲۸/۲ ^{c}	۱۴۲۷ ± ۱۱۱ ^{b}	۲۰۷۰ ± ۲۱۷ ^{a}
پروتئین کل (g/dl)	۲/۲۱ ± ۰/۰۴ ^{c}	۱۲/۶۴ ± ۱/۵ ^{b}	۲۱/۱۱ ± ۲/۶ ^{a}
کلسیم (mg/dl)	۶/۸ ± ۰/۷ ^{c}	۱۱۳/۹ ± ۵/۵ ^{b}	۱۳۶/۹ ± ۹/۱ ^{a}
فسفر (mg/dl)	۱۵/۶ ± ۰/۷۸ ^{c}	۶۱/۷ ± ۴/۶ ^{b}	۸۸/۷ ± ۸/۵ ^{a}

مقادیر به صورت میانگین ± SE و n=۱۵ بیان شده است. وجود حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار می باشد ($p<۰/۰۵$).

ترکیب لاشه

نتایج حاصل از آنالیز ترکیب لاشه ماهیان تیمار کنترل و تیمارهای تغذیه شده با سطوح مختلف هورمون E_2 اختلاف معنی داری را در رطوبت (F=۰/۹۵۵,df=۲,p=۰/۳۹۶)، خاکستر (p= ۰/۳۰۴, F=۰/۸۰۸,df=2)، چربی کل (۰/۹۵۵, df=۲, p= ۰/۴۰۶, F=) و پروتئین خام (F=۲/۵۵۳, df=۲, p=۰/۱۱۳) نشان نداد (جدول ۳).

جدول ۳: آنالیز بیوشیمیایی ترکیب لاشه بچه ماهیان ازون برون (*Acipenser stellatus*) تغذیه شده با سطوح مختلف هورمون E_2 پس از ۷ ماه پرورش.

	سطوح تغذیه ای E_2 (میلی گرم/کیلوگرم جیره)		
شاخص (%)	صفر	۲۵	۵۰
رطوبت	۷۴/۲ ± ۰/۴	۷۴/۶ ± ۰/۲	۷۴/۷ ± ۰/۲
خاکستر	۲/۹۱ ± ۰/۱	۲/۵۷ ± ۰/۱	۲/۵۴ ± ۰/۰۳
چربی کل	۹/۲ ± ۰/۴	۸/۷ ± ۰/۵	۸/۴ ± ۰/۴
پروتئین کل	۱۴/۶۲ ± ۰/۱۹	۱۵/۰۵ ± ۰/۱۲	۱۴/۴۵ ± ۰/۱۷

مقادیر به صورت میانگین ± SE و n= ۹ می باشد. سطح معنی دار بودن بر اساس ($p <$ ۰/۰۵) می باشد.

بحث

تغذیه بچه ماهیان ازون برون با جیره حاوی هورمون E_2، بر شاخص های رشد ماهی ازون برون تاثیر قابل توجهی داشت و سبب کاهش وزن و سایر شاخص های رشد گردید. اثرات منفی این هورمون بر شاخص های رشد تابع دوز هورمون بود به طوری که در تیمار تغذیه شده با سطح بالاتر هورمون نسبت کاهش وزن و سایر شاخص های رشد در مقایسه با تیمار تغذیه شده با سطح پائین تر هورمون از شدت بیشتری برخوردار بود. شاخص های HSI و VSI نیز در این تحقیق تفاوت معنی دار بین گروه های مختلف نشان داد. به نظر می رسد تجمع چربی در امعاء و احشاء و بافت کبد یکی از علل بزرگ شدن این اندام ها خصوصاً بافت کبد باشد. به طور کلی مشخص گردید که با افزایش دوز هورمون، وزن و طول ماهیان کاهش بیشتری می یابد و بالطبع اغلب شاخص های رشد تحت تأثیر این دو شاخص افت شدیدی را نشان می دهند.

نتایج مطالعه Mei-Ping و همکاران (۲۰۰۹) بر روی تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*) ۶۰ روزه که به مدت ۳ ماه با دوزهای ۱ و ۱۰ میلی گرم هورمون E_2 به ازای هر کیلوگرم غذا تغذیه شده بودند، مشابه نتایج بدست آمده تحقیق حاضر بود. Flynn و Benfey (۲۰۰۷) نیز در بررسی اثرات رژیم غذایی E_2 در تاسماهی پوزه کوتاه (*Acipenser brevirostrum*) ۵ ماهه به مدت ۹ ماه دریافتند که با افزایش دوز E_2 تحرک و تغذیه ماهیان کمتر شده و میزان رشد کاهش می یابد.

کاهش رشد ماهی ازون برون را می توان اینگونه توجیه نمود که E_2 با کاهش فعالیت تیروییید، محور رشد را تحت تاثیر قرار می دهد، به طوریکه در کنش متقابل بین E_2 و هورمون های تیروییدی به ماهیان تنها اجازه شرکت و مداخله در یک فرایند هزینه بر مانند تولید مثل (در ارتباط با E_2) و یا رشد سوماتیـــک (در ارتباط با هورمون های تیـرووییدی) در زمان خاصی از چرخه زنـــدگی داده می شـــود (Cyr & Eales, 1996). در این مطالعه، تفاوت معنی دار بین تیمارهای هورمونی با تیمار کنترل گواه این امر است.

غلظت E_2 در پلاسمای خون ماهیان تیمارهای تحت هورمون اختلاف قابل توجهی با گروه کنترل داشت. نتایج، افزایش حدود ۵ برابری هورمون E_2 را در پلاسمای خون ماهیان ازون برون تیمار شده نشان داد. این امر مؤید این نکته است که افزودن هورمون در جیره غذایی سبب افزایش سطح هورمون در پلاسمای خون می شود. افزایش این هورمون در پلاسما را شاید بتوان به دلیل انباشتگی آن

در خون ماهی در شرایطی که هنوز توانایی فیزیولوژیک کافی به منظور استفاده از هورمون مذکور در جهت توسعه گنادی وجود ندارد، دانست. غلظت هورمون تستوسترون در تیمارهای تحت هورمون با افزودن E_2 به شدت کاهش یافت و به حدود ۱۵ تا ۲۰ درصد تیمار کنترل رسید. نتایج به دست آمده با نتایج Schafhauser-Smith و Benfey (۲۰۰۳) مطابقت داشت.

ماهیان استخوانی توانایی سنتز تستوسترون و تبدیل آن به E_2 را دارند (Fostier *et al.*, 1983). همچنین در بسیاری از گونه ها گزارش شده است که استرادیول می تواند تبدیل تستوسترون به 5 α-dihydrotestosterone را تحریک کند (Tilakaratne & Soory, 1999). در ماهیان خاویاری زمانی که فعالیت ویتلوژنز پایین است مقدار تستوسترون بالاست. این امر ناشی از کاهش تبدیل تستوسترون به E_2 در این مرحله از توسعه گنادی است. در این تحقیق نیز همزمان با افزایش قابل توجه میزان E_2 در پلاسمای خون ماهیان ازون برون تغذیه شده با جیره حاوی E_2 کاهش چشمگیری در میزان T در این تیمارها نسبت به تیمار کنترل مشاهده شد. بررسی سایر نتایج، نظیر تغییرات سطوح پروتئین، کلسترول، کلسیم و غیره نیز حاکی از وقوع ویتلوژنز تحت تاثیر E_2 افزوده شده به جیره بود و لذا رابطه معکوس زرده سازی و مقدار تستوسترون نیز مطابق انتظار می باشد. به نظر می رسد هورمون ۱۷- بتا استرادیول به عنوان یک هورمون شاخص در جنس ماده اثر متقابل بر هورمون تستوسترون که یک هورمون شاخص در جنس نر می باشد دارد به طوریکه با افزایش E_2 از مقادیر T کاسته می شود.

نتایج این تحقیق اختلاف فاحشی در سطح هورمون پروژسترون در پلاسمای خون ماهیان جوان ازون برون تیمار کنترل در مقایسه با ماهیان تیمار شده با E_2 نشان داد. هرچند بین تیمارهای تغذیه شده با دو سطح مختلف هورمون اختلاف معنی داری وجود نداشت اما مقدار هورمون پروژسترون در پلاسمای خون ماهیان جوان گروه کنترل ۱۵ تا ۲۰ برابر بیشتر بود. پروژسترون می تواند در سنتز آندروژن ها دخیل باشد (Tilakaratne & Soory, 1999). مطالعات نشان داده اند که برخی هورمون های استروژنی نظیر Genestin سبب جلوگیری از تولید پروژسترون می شود (Whitehead & Lacy, 2000). به نظر می رسد که هورمون E_2 اثر کاهشی بر مقدار ترشح هورمون پروژسترون داشته است.

نتایج این تحقیق حاکی از افزایش گلوگز پلاسمای خون در بچه ماهیان ازون برون تیمار شده با جیره حاوی E_2 بود. هر چند تیمار دوز ۲۵ میلی گرم E_2 تفاوت معنی داری با تیمار کنترل نشان نداد ولی افزایش حدود ۲۹ درصدی قند خون در این گروه قابل توجه بود. این امر در تیمار سطح بالای E_2 با شدت بیشتری به وقوع پیوست و افزایش قریب ۷۹ درصدی گلوکز تفاوت معنی دار با هر دو گروه کنترل و دوز پائین هورمون از نظر مقادیر گلوگز پلاسما نشان داد. داده های این تحقیق با نتایج Mei-Ping و همکاران (۲۰۰۹) که تاسماهی سیبری ۶۰ روزه را به مدت ۳ ماه با دوزهای ۱ و ۱۰ میلی گرم E_2 تغذیه نمود، مغایرت داشت. همچنین مطالعه Zhang و همکاران (۲۰۱۴) بر روی تاسماهی چینی (*Acipenser sinensis*) ۳ ساله با دوزهای تزریقی ۰/۱ و ۰/۵ میلی گرم E_2 به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۴۲ روز سبب کاهش گلوکز در دوز بالای مصرف گردید. این اختلافات می تواند ناشی از بکارگیری دوز بالاتر هورمون در تحقیق حاضر و شیوه بکارگیری آن باشد. عدم معنی دار بودن اختلاف گروه کنترل و دوز ۲۵ میلی گرم هورمون تا حدود زیادی این امر را تأیید می کند. از طرف دیگر مواردی نظیر گونه، سن و مدت در معرض قرارگیری هورمون می تواند از عوامل ایجاد اختلاف در نتایج به دست آمده این دو تحقیق باشد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان کلسترول پلاسمای خون ماهیان متاثر از استرادیول می باشد، به طوریکه بیشترین مقدار کلسترول در پلاسمای خون ماهیان ازون برون تیمار سطح بالا و کم ترین آن در ماهیان تیمار کنترل بود. داده ها، افزایش ۴/۳ و ۵ برابری کلسترول را در تیمارهای تغذیه شده با جیره های حاوی هورمون نسبت به تیمار کنترل نشان داد. هر چند اختلاف بین تیمارهای تحت هورمون معنی دار نبود، اما هر دو گروه با تیمار کنترل اختلاف فاحش و معنی داری را نشان داده اند. مشابه این نتایج در تحقیق Zhang و همکاران (۲۰۱۴) بر روی تاسماهی چینی مشاهده شد. Wallaert و Babin در سال ۱۹۹۲ وقوع Hyperlipidemia و

Hyperlipoproteinemia را که سبب افزایش غلظت های کلسترول آزاد، تری گلیسرید، فسفولیپیدها و اسیدهای چرب آزاد در قزل آلای تیمار شده با هورمون E_2 شده بود گزارش کردند. این موضوع در مطالعه Woo و همکاران (۱۹۹۳) که هورمون E_2 را در جیره غذایی ماهیان سیم دریایی قرمز (*Chrysophrys major*) بکار گرفته بودند نیز مشاهده شد، به طوریکه این امر سبب افزایش میزان غلظت کلسترول سرم خون ماهیان گشت. نتایج مطالعه Wiegand و Peter (۱۹۸۰) نیز نشان داد که میزان لیپیدهای پلاسما، به در معرض بودن با استروژن حساس اند و به نظر می رسد که پاسخ آن ها به E_2 با پارامترهای خارجی محیطی مانند دما ارتباط داشته باشد. در مطالعه Sharpe و Maclatchy (۲۰۰۷) هورمون E_2 سبب افزایش معنی دار میزان کلسترول در هر دو جنس ماهیان طلایی همزمان با طولانی تر شدن دوره روشنایی و افزایش دما گردید. ماهیان جوان قزل آلای رنگین کمان که به مدت ۲۴ ساعت در معرض E_2 قرار گرفته بودند نیز به E_2 با افزایش میزان کلسترول پلاسما پاسخ نشان دادند. این در حالی است که MacLatchy و همکاران (۱۹۹۷) هیچ تغییری در میزان غلظت کلسترول پلاسمای خون در ماهیان تیمار شده با E_2 مشاهده ننمودند. Mei-Ping و همکاران (۲۰۰۹) نیز در بررسی انجام گرفته بر روی بچه تاسماهیان سیبری که با جیره حاوی E_2 تغذیه شده بودند، کاهش کلسترول را در سرم خون این ماهی مشاهده کردند. Khanna و Singh در سال ۱۹۸۳ با مطالعه بر روی *Barbus conchonius* که در مراحل آغازین رسیدگی گنادی قرار داشتند و با E_2 ۲۵µg تیمار شده بودند، مشاهده نمودند که میزان کلسترول پلاسما به طور معنی داری کاهش می یابد. از آن جایی که استروژن سبب تحریک ازدیاد انسولین می گردد این امر می تواند دلیلی محتمل برای کاهش کلسترول در ماهیان *B. conchonius* باشد. کلسترول به عنوان پیش ساز هورمون های استروئیدی نظیر استروژن ها، آندروژن ها و کورتیکوستروئیدها در ماهی ها محسوب می شود (Scott *et al*., 1987). تحقیقات گذشته نشان داد که هورمون E_2 در تنظیم تجمع لیپید در تخمدان ماهی آزاد کوهو (*Onchorhynchus kisutch*) دخالت دارد. بنابراین توانایی اثرات Lipidemia این هورمون مشخص می گردد (Campbell *et al*., 2006).

ماهیان میزان کلسترول در حال گردش پایینی را در طول رسیدگی گنادی به نمایش می گذارند و مشخص شده است که لیپیدهای پلاسما تحت تاثیر مرحله رسیدگی قرار دارند. برخی مطالعات بیان داشته اند که میزان کلسترول خون در ماهیان در طول رسیدگی جنسی کاهش می یابد (Babin & Vernier, 1989). لذا حساسیت متفاوت ماهیان به تغییرات لیپیدی را زمانی که در معرض مواد شیمیایی افزایش دهنده لیپید قرار می گیرند می توان به مرحله رسیدگی و خصوصیات فیزیولوژیک هر مرحله رسیدگی به لحاظ متابولیسم لیپید نسبت داد. در واقع هرچند ماهیان جوان مطالعه حاضر هنوز در مراحل اولیه رشد گنادی بودند اما نتایج بدست آمده در غالب شاخص های بیوشیمیایی بروز تغییرات گسترده ای را در راستای فعالیت هایی مجازی و شبه تولید مثلی تحت اثر فعال سازی E_2 نشان دادند. از اینرو به نظر می رسد که نه تنها E_2 برای تحریک پیش سازهای زرده ای ضروری است بلکه همچنین در بسیج اندوخته های انرژی برای برآورده نمودن نیازهای اووسیت های در حال رشد ضروری است.

در این مطالعه افزایش شدیدی در میزان تری گلیسرید پلاسمای خون ماهیان ازون برون در تیمارهای هورمونی مشاهده شد. مطالعات انجام شده بر روی ماهیان نشان داده است که غلظت تری گلیسرید پلاسما به صورت معنی داری، در ماهیان تیمار شده با E_2 افزایش می یابد (Wallaert & Babin, 1992; Zhang *et al*., 2014). همچنین نتایج مطالعه Sharpe و Maclatchy در سال ۲۰۰۷ بر روی ماهیان طلایی که با کپسول های جامد سیلاستیکی محتوی E_2 ۱۰ µg/g ایمپلنت شده بودند نیز افزایش معنی دار تری گلیسرید را به نمایش گذاشت. ماهیان جوان قزل آلای رنگین کمان نیز که به مدت ۲۴ ساعت در معرض E_2 قرار گرفته بودند با افزایش میزان تری گلیسرید پلاسما به تغییرات پلاسما پاسخ نشان

می دادند. تری گلیسرید از جمله لیپیدهای طبیعی موجود در ماهیان است. در ماهیان استخوانی مشخص شده که انرژی اصولاً به صورت تری گلیسرید ذخیره می شود. مطالعات در پستانداران نشان داده که E_2 طبیعی و یا استروژن های سنتتیک توانایی مداخله در میزان لیپیدهای موجود در بـــدن را دارند (Bertolotti & Spady, 1996). همچنین مشخص شده است که مقادیر لیپید خون ماهیان به مقدار زیادی متأثر از مرحله رسیدگی جنسی ماهیان است. White و همکاران (۱۹۸۶) در مطالعه بر روی ماهیان کفشک *Pleuronectes platessa* نشان دادند که میزان کلسترول و تری گلیسرید سرم پیش از مرحله زرده ســـازی به اوج خود می رسد.

در این تحقیق میزان پروتئین کل خون رابطه خطی مستقیمی با دوز هورمون افزوده شده به غذا داشت. افزایش حدوداً ۶ و ۱۰ برابر پروتئین کل در پلاسمای خون بچه ماهیان تحت تغذیه با هورمون استرادیول نسبت به گروه کنترل را می توان ناشی از تجمع پروتئین ناشی از پدیده ویتلوژنزیز در پلاسما تحت تأثیر عملکرد هورمون E_2 توجیه نمود. مشابه این نتایج نیز در مطالعه Zhang و همکاران (۲۰۱۴) بر روی تاسماهی چینی ملاحظه گردید. همچنین نتایج بدست آمده با نتایج کسب شده توسط Benfey و همکاران (۱۹۸۹) که با تزریق هفتگی و همچنین غوطه وری در حمام استرادیول عنوان کردند که این هورمون سبب تحریک ویتلوژنین در ماهی آزاد کوهو شده است مطابقت داشت. همچنین Pelissero و همکاران (۱۹۸۹) سطوح بالای استروئیدهای جنسی در جیره را بر ظرفیت زرده سازی در تاسماهی سیبری تأثیر گذار دانست. Wallaert و Babin (۱۹۹۲) نیز به نتایجی مشابه این تحقیق رسیدند و افزایش پروتئین را در ماهیان قزل آلای جوان تیمار شده با E_2 گزارش نمودند. همچنین افزایش ویتلوژنین در پلاسما و تحریک زرده سازی ماهیان مختلف آب های شیرین و شور در مواجهه با E_2 در پژوهش های مختلفی ثبت شده است (Gillespie and de Peyster, 2004; Suzuki *et al.*, 2004; Liao *et al.*, 2008).

مقادیر کلسیم در پلاسمای خون ماهیان ازون برون ارتباط مستقیمی با E_2 افزوده شده به جیره نشان داد. نتایج نشان داد که مقدار کلسیم خون در گروه های تغذیه شده با هورمون E_2 بسته به میزان هورمون جیره حدود ۱۶ تا ۲۰ برابر نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است. مشابه این امر میزان کلسیم کل در مطالعه Guerreiro و همکاران (۲۰۰۲) بر روی ماهیان سیم دریایی (*Sparus aurata*) که با E_2 ۱۰ µg/g ایمپلنت شده بودند پس از ۱۵ روز، ۱۰ برابر بیش از ماهیان کنترل بود. مشخص شده است که غلظت کلسیم در ماهیان خاویاری یکی از کمترین مقادیر کلسیم در شاخه مهره داران است (Urist *et al.*, 1972). غلظت کم کلسیم در ماهیان خاویاری را می توان به عدم وجود اسکلت استخوانی و فعالیت فیزیولوژیک ناچیز این ماهیان نسبت داد. Casenave و همکاران (۲۰۰۳) کلسیم پلاسما را شاخصی برای زرده سازی در تاسماهی سفید (*Acipenser transmontanus*) دانستند و ارتباط مستقیم بین کلسیم پلاسما و ویتلوژنین را ثابت نموده و عنوان کردند با سنجش ویتلوژنین و کلسیم می توان ماده های زرده سازی نموده را جدا نمود. به نظر می رسد افزایش E_2، به صورت مستقیم و یا غیر مستقیم با تاثیر بر کبد سبب افزایش میزان کلسیم می شود. مشخص شده است که E_2 نقش hypercalcemic در هموستازی کلسیم دارد. گیرنده های استروژن در فلس ها و استخوان های ماهیان قرار گرفته اند، جایی که مشخص شده E_2 سبب حرکت کلسیم و فسفات از فلس ها می شود (Armour *et al.*, 1997). همچنین E_2 سبب افزایش جذب کلسیم محیط، از طریق آبشش ها و روده می شود (Guerreiro *et al.*, 2002).

نتایج بدست آمده از این تحقیق، افزایش ۴ و ۶ برابری غلظت فسفر پلاسما را در تیمارهای سطح پایین و بالای هورمون E_2 نسبت به تیمار کنترل نشان داد. افزایش فسفر در تاسماهی سیبری تغذیه شده با جیره حاوی E_2 توسط Mei-Ping و همکاران (۲۰۰۹) گزارش شد. Nagler و همکاران در سال ۱۹۸۷ ارتباط مستقیمی بین افزایش مقادیر شاخص های غیر مستقیمی مانند فسفرفسفوپروتئینی و فسفرفسفوپروتئینی قلیایی ناپایدار با افزایش ویتلوژنین در ماهیان ماده رسیده قزل آلای رنگین کمان مشاهده نمود. نتایج مطالعه Srivastav و Srivastav (۱۹۹۸) بر روی ماهیان مارل *Channa*

punctatus نیز ثابت کرد که میزان فسفر پلاسمای خون ماهیان با افزایش شاخص گنادوسوماتیک و به عبارت دیگر با توسعه تخمدانی افزایش می یابد. غلظت های کلسیم و فسفات در مهره داران ارتباط تنگاتنگی با هم دارند. در مقایسه، با تنظیم کلسیم، در ارتباط با تنظیم فسفات و ارتباط متقابل آن با کلسیم مطالعات ناچیزی انجام گرفته است. در ماهیان فسفات یک ترکیب مهم در ویتلوژنین به حساب می آید (Mommsen & Walsh, 1998). لذا ماهیان ماده ای که در مرحله زرده سازی هستند مقادیر بالاتری از کلسیم و فسفات را به نمایش می گذارند. در ماهیان خاویاری ماده میزان آن با پیشرفت مرحله رسیدگی جنسی افزایش می یابد که این روند با نقش های آن در فرایند زرده سازی سازگار است. افزایش فسفر در پلاسمای خون ماهیان تیمار شده با E_2 را می توان به تحریک این هورمون برای افزایش جذب فسفر در فعالیت ساخت ویتلوژنین نسبت داد. همانگونه که اشاره شد ویتلوژنین ترکیبی فسفولیپوپروتئینی است، لذا افزایش آن می تواند باعث افزایش هر یک از اجزا تشکیل دهنده ماده مذکور شود. بنابراین می توان گفت افزایش فسفر در پلاسمای خون ماهیان تیمار شده با E_2 ناشی از فعالیت ویتلوژنز است که به تحریک هورمون افزوده به جیره، ماهی از محیط جذب و در ساختار مولکولی ویتلوژنین شرکت داده است.

بر اساس نتایج حاصل از آنالیز تقریبی ترکیب لاشه اختلافی در بین تیمارهای مختلف در مقادیر رطوبت، خاکستر، پروتئین و چربی کل لاشه مشاهده نشد. با وجود افزایش برخی از عناصر و مواد بیوشیمیایی نظیر کلسیم، فسفر، پروتئین و چربی در پلاسمای خون و همچنین افزایش شاخص های VSI و HSI در تیمارهای تغذیه شده با جیره حاوی E_2 به نظر می رسد که این تغییرات تأثیر چندانی در ترکیب بیوشیمیایی کل لاشه نمی توانست داشته باشد.

نتایج بدست آمده نشان داد دوزهای بکار گرفته شده هورمون E_2 می تواند تأثیرات شدیدی بر وضعیت بیوشیمیایی کل بدن ماهی بگذارند که برخی از آنها مثبت، ولی غالب آنها نتیجه فرآیند زرده سازی بر اثر تحریک هورمون E_2 می باشند که به دلیل عدم توانایی فولیکول های تخمدانی در جذب و تبدیل مواد پروتئینی، چربی ها، قندها و املاح به مواد ذخیره ای تخم، در خون و کبد تجمع یافته و باعث به هم خوردن تعادل فیزیولوژیک و بیوشیمیایی بدن ماهی می شوند. به نظر می رسد بکارگیری دوزهای پایین تر برای مدت زمان طولانی تر می تواند به ماهی فرصت دهد تا ضمن حفظ تعادل فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در کل بدن، روند تأثیرگذاری E_2 بر اندام های هدف خصوصاً گنادها را به سمت و سوی تولید جمعیت تمام ماده به نحو مطلوب تری اعمال نماید. نتایج این تحقیق ثابت نمود دوزهای بالای هورمون E_2 دارای اثرات سوئی بر رشد و برخی شاخص های فیزیولوژیک بوده و می بایست جهت استفاده از این هورمون با هدف تغییر جنسیت از دوزهای پایین تر و یا با زمان کوتاه تری خصوصاً در دوران جنینی و لاروی استفاده نمود که می تواند راهکار مناسبی در تغییر جنسیت و ایجاد ماهیان تمام ماده در ماهی ازون برون باشد. مطالعات تکمیلی بعدی یافته های جدیدتری را در این خصوص آشکار خواهد ساخت.

تشکر و قدردانی

از خانم مهندس سمانه پورسعید به خاطر تمام همکاری ها و مساعدت‌هایشان و همچنین آقایان مهندس سبحان رعنای اخوان، مهندس مجید موسی پور، مهندس سینا قنبری و نیز گروهی از پرسنل زحمتکش مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان دریایی شادروان دکتر یوسف پور سیاهکل که در مراحل مختلف اجرای این پروژه از زحمات بی دریغشان بهره مند شدیم صمیمانه تشکر و قدردانی می نماییم.

منابع

امدادی، ب.، سجادی، م.م.، یزدانی، م.ع.، شکوریان، م. و پوردهقانی، م.، ۱۳۹۲. اثر جایگزینی آرد ماهی با کنجاله سویا در جیره غذایی بچه ماهیان ازون برون (*Acipenser stellatus*)، بر ترکیبات لاشه و

فاکتورهای بیوشیمیایی پلاسمای خون. نشریه بهره برداری و پرورش آبزیان (۱)۲، ۵۴-۴۱.

کیوان، ا.، ۱۳۸۲. ماهیان خاویاری ایران. انتشارات نقش مهر. ۴۰۰ صفحه.

یوسفی، ا.، بهمنی، م.، کاظمی، ر.، حلاجیان، ع. و پوردهقانی، م.، ۱۳۹۱. ارتباط تغییرات اسمولاریته سرم و برخی شاخص های یونی در روند رسیدگی جنسی ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*) پرورشی. مجله زیست شناسی دریا (۴)۱۵، ۶۸-۶۱.

یونس زاده، م.، بهمنی، م.، کاظمی، ر.، یاوری، و.، پوردهقانی، م.، فیض بخش، ح.، یوسفی، ا.، حلاجیان، ع.، دژندیان، س.، زارع، ر. و ناطقی، ا.، ۱۳۸۶. تاثیر بکارگیری GnRH بر روند رسیدگی جنسی ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*) پرورشی. مجله شیلات (۱)۱، ۱۸-۱۰.

AOAC, 1995. Official Methods of Analysis. 16th Ed., Association of Official Analytical Chemists. Arlington. VA, USA.

Armour, K.J., Lehane, D.B., Pakdel, F., Valotaire, Y., Graham, R., Russell, G. and Henderson, I.W. 1997. Estrogen receptor mRNA in mineralized tissues of rainbow trout: calcium mobilization by estrogen. FEBS Letters, 41, 145-148.

Babin, P.J. and Vernier, J.M. 1989. Plasma lipoproteins in fish. Journal of Lipid Research, 30, 467-489.

Benfey, T.J., Dye, H.M. and Donaldson, E.M. 1989. Estrogen induced vitellogenin production by triploid coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), and its effect on plasma and pituitary gonadotropin. *General* and *Comparative Endocrinology*, 75, 83-87.

Bertolotti, M. and Spady, D. 1996. Effect of hypocholesterolemic doses of 17 alpha-ethinyl estradiol on cholesterol balance in liver and extrahepatic tissues. Journal of Lipid Research, 37, 1812-1822.

Campbell, B., Dickey, J., Beckman, B., Young, G., Pierce, A., Fukada, H. and Swanson, P. 2006. Previtellogenic oocyte growth in salmon: relationships among body growth, plasma insulin-like growth factor-1, estradiol-17 beta, follicle-stimulating hormone and expression of ovarian genes for insulin-like growth factors, steroidogenic- acute regulatory protein and receptors for gonadotropins, growth hormone, and somatolactin. Biology of Reproduction, 75, 34-44.

Casenave, J.L., Kroll, K.J., Van Eenennaam, J.P. and Doroshov, S.I. 2003. Effect of ovarian stage on plasma vitellogenin and calcium in cultured white sturgeon. Aquaculture, 221, 645-656.

Chebanov, M.S. and Billard, R. 2001. The culture of sturgeons in Russia: production of juveniles for stocking and meat for human consumption. Aquatic Living Resources, 14, 375-381.

Cyr, D.G. and Eales, J.G. 1996. Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 6, 165-200.

Falahatkar, B., Tolouei, M.H., Falahatkar, S. and Abbasalizadeh, A. 2011. Laparoscopy, a minimally-invasive technique for sex identification in cultured great sturgeon *Huso huso*. Aquaculture, 321, 273-279.

Flynn, S.R., Matsuoka, M., Reith, M., Martin-Robichaud, D.J. and Benfey, T.J. 2006. Gynogenesis and sex determination in shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum* Lesuere. Aquaculture, 253, 721-727.

Flynn, S.R. and Benfey, T.J. 2007. Effects of dietary estradiol-17β in juvenile shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum*, Lesueur. Aquaculture, 270, 405-412.

Fostier, A., Jalbert, B., Billard, R., Breton, B. and Zohar, Y. 1983. The gonadal steroids. In: Fish physiology. Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. (Eds). Vol. 9, Part B. New York, London: Academic Press. pp. 117-170.

Gillespie, D.K. and de Peyster, A. 2004. Plasma calcium as a surrogate measure for vitellogenin in fathead minnows (*Pimephales promelas*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 58, 90-95.

Guerreiro, P.M., Fuentes, J., Canario, A.V.M. and Power, D.M. 2002. Calcium balance in sea bream (*Sparus aurata*): the effect of estradiol-17β. Journal of Endocrinology, 173, 377-385.

Henry, R.J., Cannon, D.C. and Winkelman, J.W. 1974. Clinical chemistry: Principles and techniques. (2 eds.). Harper and Row Publisher, Hagerstown, Maryland, pp. 287-341.

IUCN, 2012. The 2012 Red list of threatened animals. IUCN, Gland, Switzerland. 369p.

Khanna, N. and Singh, T. 1983. "*In vivo*" effects of estradiol-17β in a freshwater fish, *Barbus conchonius* Hamilton. Experientia, 39, 1160-1161.

Kim, D.S., Nam, Y.K. and Jo, J.Y. 1997. Effect of estradiol-17β immersion treatments on sex reversal of mud loach, *Misgurnus mizolepis*. Aquaculture Research, 28, 941-946.

Liao, T., Guo, Q.L., Jin, S.W., Cheng, W. and Xu, Y. 2008. Comparativ responses in rare minnow exposed to 17β-estradiol during diferferent life stages. Fish Physiology and Biochemistry, 35, 341-349.

Lister, A., Nero, V., Farwell, A., Dioxn, D.G. and Van Der Kraak, G. 2008. Reproductive and stress hormone levels in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. Aquatic Toxicology, 87, 170-177.

MacLatchy, D., Peters, L., Nickle, J. and Van Der Kraak, G. 1997. Exposure to β-sitosterol alters the endocrine status of goldfish differently than 17β-estradiol. Environmental Toxicology and Chemistry, 16, 1895-1904.

Malison, I.A., Kayes, T.B., Wentworth, B.C. and Amundson, C.H. 1988. Growth and feeding responses of male versus female yellow perch (*Perca flavescens*) treated with estradiol-17β. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science, 45, 1942-1948.

Mei-Ping, T., Ping, Z., Tao, Z., Long-Zhen, Z. and Shi-Wei, Y. 2009. Effects of dietary estradiol-17β on reared juvenile Siberian sturgeon *Acipenser baerii*. 6th International Symposium on Sturgeon. Wuhan, China.

Migaud, H., Fontaine, P., Wang, N. and Brun-Bellut, J., 2004. Influence of photoperiod on the onset of gonadogenesis in Eurasian perch *Perca fluviatilis*. Aquaculture, 241, 561-574.

Mommsen, T.P. and Walsh, P.J. 1998. Vitellogenesis and oocyte assembly. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), Fish Physiology. The physiology of developing fish: Part A: Eggs and larvae, vol. XI. Academic Press, New York, USA. pp. 347-406.

Nagahama, Y. 1987. Gonadotropin action on gametogenesis and steroidogenesis in teleost gonads. Zoological Science, 4, 209-222.

Nagler, J.J., Ruby, S.M., Idler, D.R. and So, Y.P. 1987. Serum phosphoprotein phosphorus and calcium levels as reproductive indicators of vitellogenin in highly vitellogenic mature female and estradiol-injected immature rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Canadian Journal of Zoology, 65, 2421-2425.

Pandian, T.J. and Sheela, S.G. 1995. Hormonal induction of sex reversal in fish. Aquaculture, 138, 1-22.

Pelissero, C., Cuissent, B. and, Le Menn, F. 1989. The influence of sex steroids in comercial fish meals and fish diets on plasma concentration of estrogens and vitellogenin in cultured Siberian sturgeon *Acipenser baeri.* Aquatic Living Resources, 2, 161-168.

Peter, S.M. 2000. Freshwater fish of Britian and Europe. Octopus publishing. Landan. 256p.

Petersen, I.M., S.O. and Korsgaard, B. 1983. A time course study of the effect of repetitive doses of estradiol-17 β on serum glucose and lipids, liver glycogen and some carbohydrate metabolizing enzymes in liver of male flounder (*Platichthys flesus* L.). Comparative Biochemistry and Physiology B, 74, 459-466.

Piferrer, F. 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. Aquaculture, 197, 229-281.

Pottinger, T.G. and Carrick, T.R., 2001. ACTH does not mediate divergent stress responsiveness in rainbow trout. Comparative Biochemistry and Physiology, 129 A, 399-404.

Sandnes, K., Lie, O. and Waagbo, R. 1988. Normal ranges of some blood chemistry parameters in adult farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*. Journal of Fish Biology, 32, 129-136.

Scott, A.P. and Canario, A.V.M. 1987. Status of oocyte maturationinducing steroids in teleosts. In: Idler, D.R., Crim, L.W., Walsh, J.M. (Eds.), Proceedings of the Third International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Memorial University Press, St. John's. pp. 224-234.

Schafhauser-Smith, D. and Benfey, T.J. 2003. The effects of long-term estradiol-17b treatment on the growth and physiology of female triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis*). General and Comparative Endocrinology, 131, 9-20.

Sharpe, R.L. and MacLatchy, D.L. 2007. Lipid dynamics in goldfish (*Carassius auratus*) during a period of gonadal recrudescence: Effects of β-sitosterol and 17β-estradiol exposure. Comparative

Biochemistry and Physiology, 145, 507-517.

Shearer, K.D. 2000. Experimental design, statistical analysis and modeling of dietary nutrient requirement studies for fish: a critical review. Aquaculture Nutrition, 6, 91-102.

Srivastav, S.K. and Srivastav, A.K. 1998. Annual changes in serum calcium and inorganic phosphate levels and correlation with gonadal status of a freshwater murrel, *Channa punctatus* (Bloch). Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 31, 1069-1073.

Suzuki, N., Yamamoto, K., Sasayama, Y., Suzuki, T., Kurokawa, T., Kambegawa, A., Srivastav, A.K., Hayashi, S. and Kikuyama, S. 2004. Possible direct induction by estrogen of calcitonin secretion from ultimobranchial cells in the goldfish. General and Comparative Endocrinology, 138, 121-127.

Tilakaratne, A. and Soory, M. 1999. Modulation of androgen metabolism by estradiol-17h and progesterone, alone and in combination, in human. Journal of Periodontology, 70, 1017-1025.

Turchini, G.M., Menasti, T., Frqyland, L., Orban, E., Caprino, F., Moretti, V.M. and Valfrre, F. 2003. Effects of alternative dietary lipid sources on performance, tissue chemical composition, mitochondrial fatty acid oxidation capabilities and sensory characteristics in brown trout (*Salmo trutta* L.). Aquaculture, 225, 251-267.

Urist, M.R., Uyeno, S., King, E., Okada, M. and Applegate, S. 1972. Calcium and phosphorous in the skeleton and blood of the lungfish *Lepidosiren paradoxa*, with comment on the humoral factors in calcium homeostasis in the osteichthyes. Comparative Biochemistry and Physiology, 42, 393-408.

Wallaert, C. and Babin, P.J. 1992. Effects of 17β-estradiol and starvation on trout plasma lipoproteins. Lipids, 27, 1032-1041.

Wang, H., Gao, Z., Beres, B., Ottobre, J., Wallat, G., Tiu, L., Rapp, D., O'Bryant, P. and Yao, H. 2008. Effects of estradiol-17β on survival, growth performance, sex reversal and gonadal structure of bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*. Aquaculture, 285, 216-223.

White, A., Fletcher, T.C. and Pope, J.A. 1986. Seasonal changes in serum lipid composition of the plaice, *Pleuronectes platessa* L. Journal of Fish Biology, 28, 595-606.

Whitehead, S.A. and Lacey, M. 2000. Protein tyrosine kinase activity of the phytoestrogen genistein and lavendustin A on progesterone synthesis in cultured ovarian cells of the rat. Fertility and Sterility 73, 613-619.

Wiegand, M.D. and Peter, R.E. 1980. Effects of sex steroids on plasma lipids in the goldfish, *Carassius auratus*. Canadian Journal of Zoology, 58, 967-972.

Woo, N.Y.S., Chung, A.S.B. and Ng, T.B. 1993. Influence of oral administration of estradiol-17β and testosterone on growth,

digestion, food conversion and metabolism in the underyearling red sea bream, *Chrysophrys major*. Fish Physiology and Biochemistry, 10, 377-387.

Yamamoto, T. 1953. Artificially induced sex-reversal in genotypic males of the medaka (*Oryzias latipes*). Journal of Experimental Zoology, 123, 571-594.

Zhang, X.Y., Du, H., Zhang, Y.Z., Wang, Y.P., Cai, J.J., Chai, Y., Liu, Z.G., Qiao, X.M. and Wei, Q.W. 2014. Hematological and biochemical responses of juvenile Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis* Gray 1835, to exogenous 17b-estradiol. Journal of Applied Ichthyology, 30, 1216-1221.

Changes of biochemical, sex steroids and carcass composition of stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*) juveniles fed different dietary levels of 17-ß estradiol

Meknatkhah B.[1]; Falahatkar B.[2*]; Khara H.[3]; Efatpanah I.[1]

[*] falahatkar@guilan.ac.ir

1- Dr. Yousefpour Fish Hatchery Center, Siahkal, Guilan, Iran
2- Fisheries Department, Faculty of Natural Resources University of Guilan, Sowmeh Sara, 1144, Guilan, Iran
3- Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, Islamic Azad University, Lahijan Branch, Lahijan, Guilan, Iran

Key words: Stellate sturgeon, Sex steroids, Biochemistry, Growth

Abstract

This study was carried out to find the effects of 17-ß estradiol (E_2) on biochemical parameters, sex steroids and carcass composition in juvenile stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*). One hundred and eighty 5-month stellate sturgeon with an average weight of 11.7 ± 0.2 g were divided into 3 treatments with 3 replicates each with 20 fish per tank. The treatments were included 0, 25 and 50 mg E_2/kg diet. At the termination of 7 months feeding trial with different levels of E_2, blood biochemical parameters, sex steroids and carcass composition were measured. The results of biochemical parameters including plasma glucose, total protein, cholesterol, triglyceride, calcium and phosphorus showed dose-dependent manner. The lowest and highest levels of all biochemical parameters were observed in fish fed control and 50 mg E_2/kg diet, respectively ($p<0.05$). Plasma sex steroids concentrations showed the lowest level of E_2 in fish fed control diet, while the highest levels of testosterone and progesterone were observed in this treatment ($p<0.05$). Proximate carcass analysis showed no significant difference in moisture, crude protein, crude fat and ash contents among the treatments ($p>0.05$). Final weight, total length, hepatosomatic and viscerosomatic indices were also affected by different levels of E_2 ($p<0.05$). The results of present study demonstrated that using E_2 in the diet of juvenile stellate sturgeon can influence most of biochemical indices and sex steroids which seems that those were related to the changes of sex ratio and some physiological parameters.

[*]Corresponding author