

روند تغییرات بافتی اندام‌های جنسی لای‌ماهی (*Tinca tinca*) در تالاب انزلی و شرایط پرورشی

اکرم تهرانی فرد^{۱*}، محدثه معتقدی^۱

۱- گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۹/۲۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۵/۷

چکیده

در این مطالعه، تغییرات بافتی اندام‌های جنسی لای‌ماهی (*Tinca tinca*) در تالاب انزلی و شرایط پرورشی مقایسه گردید. تعداد ۹۶ و ۳۶ ماهی از استخر پرورشی و تالاب انزلی جمع‌آوری شد. برای تعیین هم‌آوری، ماهیانی که در مرحله چهارم از رشد شش مرحله‌ای غدد جنسی، یعنی هم‌زمان با مرحله پیش از تخم‌ریزی بودند مورد بررسی قرار گرفتند. در مطالعه میکروسکوپی برش‌های تخمدان و بیضه و رشد و نمو تخمدان و بیضه آن طی مراحل مختلف جنسی، از نمونه‌های تالاب، از ۳ ماهی ماده تخمدان دو مورد از آنها در مرحله III-IV رسیدگی بوده و یکی از آنها در مرحله III بود (آب سردتر). همچنین، در نمونه‌های پرورشی، ۸ ماده مورد بررسی قرار گرفت که از این تعداد تخمدان، ۷ مورد آنها در مرحله رسیدگی بوده و یکی از آنها از مرحله III-IV بود (در شرایط آب گرم‌تر). در اواخر اردیبهشت که دمای آب به ۱۹ درج سانتی‌گراد افزایش یافت، بافت‌های تهیه شده از تخمدان ماهیان دارای فولیکول‌های بعد از تمخک گذاری (اووسیت‌هایی با تجمع زرده و اووسیت‌های باز جذب شده) بودند. در بزرگترین اووسیت دیده شده واکوئل‌ها نزدیک هسته رسیده بودند. بررسی بر روی ۲۴ نمونه لای‌ماهی ماده مرحله ۴ و ۵ که دارای وزن ۵۰/۹ تا ۲۳۸/۲ گرم و میانگین $۹۹/۸۶ \pm ۴۱/۰۱$ گرم و طول کل ۱۴۶ تا ۲۳۳ با میانگین $۱۷۶/۹۳ \pm ۲۲/۲۸$ میلیمتر بودند و سنی معادل ۳ تا ۶ با میانگین $۰/۹۳ \pm ۴/۰۰$ سال داشتند نشان داد که هم‌آوری مطلق بین ۱۴۰۸۶ تا ۱۵۳۶۰۰ با میانگین $۲۸۲۰۵/۷ \pm ۳۶۳۶۲/۴$ عدد و هم‌آوری نسبی بین ۱۷۰/۱ تا ۶۴۴/۸ با میانگین $۱۲۵/۰۲ \pm ۳۶۷/۹$ عدد در ازای یک گرم ماهی ماده متغیر است. نتایج بدست آمده به این ترتیب است که: بیضه این ماهی از نوع لوبولار بوده و اسپرماتوزن در ماهیان هم‌زمان با ریخته شدن یا جذب اسپرم‌ها در فصل تخم‌ریزی آغاز می‌شود و بتدریج تا اواسط پاییز پیشرفت می‌کند، با افزایش دما، میزان تولید مثل و هم‌آوری ماهیان نر و ماده افزایش معنی‌داری نشان داد. بیشترین میانگین قطر تخمک‌ها در اردیبهشت ماه و کمترین در مرداد ماه مشاهده شدند. اوج رسیدگی جنسی در ماهیان ماده در ماه‌های اسفند و فروردین بود. تخم‌ریزی ماهیان از اردیبهشت شروع و تا اواخر تیر ماه ادامه داشت. اووزن و اسپرماتوزن در محیط‌های پرورشی زودتر از تالاب انزلی شروع می‌شود.

کلمات کلیدی: لای‌ماهی، تغییرات فصلی، تولید مثل، اندام‌های جنسی، تالاب انزلی.

مقدمه

مطالعه زیست‌شناسی و بوم‌شناسی گونه‌های مختلف ماهیان در یک اکوسیستم آبی از ضرورت اولیه حفظ و بازسازی ذخایر آنها بوده و منجر به شناخت و تحلیل اکولوژیکی زنجیره‌غذایی اکوسیستم می‌گردد، که این امر در اعمال مدیریت صحیح شیلاتی کاربرد فراوان دارد. با توجه به نیاز روز افزون استفاده از ماهیان در تغذیه انسان، مطالعه غدد تولیدمثلی، تعیین فصل تخم‌ریزی از طریق شاخص گنادی (GSI) و تاثیر شرایط اکولوژیکی بر زمان اسپرم‌ریزی، از نظر شیلاتی و اقتصادی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. تعیین دوره‌ی تخم‌ریزی و اوج تخم‌ریزی در مدیریت و بازسازی ذخایر یک گونه نقش بسیار مهمی را دارد (Siwicki et al., 2010؛ Mylonas et al., 2010). تخم‌ریزی یکی از مراحل مشخص دوره تولیدمثلی ماهیان استخوانی می‌باشد. موفقیت یا عدم موفقیت تخم‌ریزی اثر مستقیمی روی تراکم جمعیت و بقا گونه دارد. ماهیان استخوانی دارای دوره تخم‌ریزی متفاوتی می‌باشند و زاد و ولد فصلی دارند. فصل تولید مثل ممکن است به وسیله شرایط آب و هوایی یا اثر متقابل بین گونه‌ای باشد. لای ماهی با نام علمی *Tinca tinca* (Linnaeus, 1758) و نام انگلیسی *tench* تنها گونه جنس *Tinca* است. لای ماهی در حد وسیعی در اروپا، بغیر از قسمت‌های شمالی پراکنش دارد. همچنین این ماهی در خاور نزدیک و غرب سبیری یافت می‌شود (Kujawa et al., 2011). لای ماهی یک ماهی eurhythm بوده و قادر به زیست در دامنه حرارتی وسیعی می‌باشد، اما مناسب‌ترین دما برای آن ۲۰ درجه سانتیگراد یا بالاتر می‌باشد و درجه حرارت مناسب آب برای تخم‌ریزی ۲۰-۱۹ درجه سانتی‌گراد می‌باشد.

مناسب‌ترین pH برای لای ماهی ۷/۵-۸ می‌باشد، اما این ماهی حتی قادر است در pH های اسیدی ۴-۳/۵ نیز تا مدتی زنده بماند. از نظر اکسیژنی بسیار کم توقع بوده و نسبت به کاهش اکسیژن در زمان حمل و نقل و استخرهای نگهداری مقاوم می‌باشد، اما این ماهی در استخرهایی که آب آن تخلیه شده و دمای آن زیاد است نمی‌تواند زنده بماند (Owen et al., 2010). که انواع جوان و بالغ این ماهی عمدتاً به تغذیه از موجودات کفزی می‌پردازند یا به عبارتی کفزی خواری (benthivorous) هستند. آزمایش میکروسکوپی و بافت‌شناسی دوره‌ای بیضه و تخمدان حداقل طی یکسال، به شناخت و آگاهی از تولید و تخلیه اندام‌های جنسی در سرتاسر چرخه‌ی بلوغ جنسی کمک می‌نماید (Nowosad et al., 2013). رشد تخمدان‌ها و بیضه‌ها نیز اغلب با یکدیگر یکسان بوده و رشد بیضه‌ای به مراتب کمتر از تخمدان می‌باشد. سن بلوغ در لای ماهی با توجه به خصوصیات اقلیمی زیستگاه متفاوت می‌باشد. برای مثال لای ماهی در مصب رود ولگا در ۳ سالگی بالغ می‌شود و حدوداً ۴۰-۳۰ درصد از لای ماهیان این منطقه در این گروه سنی بالغ می‌شوند و در رده سنی ۵-۴ سال حدوداً ۶۰٪ بالغ می‌شوند (Siwicki et al., 2010؛ Alas et al., 2010). Horoszewicz (2010). در سال ۱۹۸۳، بر روی ریتم تولید مثلی لای ماهی در نوسانات دما بررسی‌هایی را انجام داد که نتایج زیر حاصل گردید: درصد ماهی‌های ماده شرکت‌کننده در تخم‌گذاری بستگی به الگوی تغییرات دمایی در طول زمان دارد. تنوع ریتم تولید مثلی در فصولی که نوسانات دما بیشتر است بالاتر می‌باشد. طبق بررسی‌های Benzer در سال ۲۰۱۱، میزان هم‌آوری مطلق لای ماهی بین ۱۴۰۸۶ تا ۱۵۳۶۰۰ متغیر بوده و

زیست سنجی

تعداد ۹۹ عدد ماهی از استخرهای پرورشی (۶۸ عدد ماده و ۳۱ عدد نر) با میانگین سنی ۲ تا ۴ سال همچنین ۳۰ عدد دیگر از تالاب انزلی (۲۳ عدد ماده و ۷ عدد نر) با میانگین ۳ تا ۴ سال عدد دیگر از تالاب انزلی جمع آوری شدند. به منظور بررسی ریخت‌سنجی با توجه به منابع علمی ماهی شناسی، نمونه‌ها از نظر ویژگی‌های مورفومتریک مورد بررسی قرار گرفتند. پس از انجام بیومتری برای تعیین جنسیت، ماهی را تشریح و وزن گناد (G.W) را با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه‌گیری شده است. گنادها در محلول بوئن به منظور فیکس شدن به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند تا جهت مراحل بعدی عمل آوری بافت آماده شوند. گنادها از ۳ قسمت فوقانی، میانی و تحتانی بریده شده و در محلول بوئن فیکس شدند. برای تهیه اسلایدهای بافتی باید نمونه‌های بافتی را پس از فیکس کردن از مراحل آبگیری، شفاف‌سازی پارافینه، قالب‌گیری، برش، رنگ‌آمیزی و مونته عبور داد. مرحله آبگیری از بافت عبارت است از گرفتن آب از بافت و جایگزینی الکل به جای آب در این مرحله از الکل‌های ۱، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۹۶ درجه و الکل ۱- بوتانل استفاده گردید. سپس مرحله شفاف‌سازی انجام شد. این مرحله عبارت از جایگزینی کلروفرم یا بنزن و یا گزلیل به جای الکل و جذب چربی بافت است. پس از آن پارافینه کردن بافت انجام شد که برای نرم‌شدن نمونه‌ها مخلوط کلروفرم و پارافین خالص نرم بکار رفت. در این مرحله نمونه بافت در مخلوط کلروفرم و پارافین خالص نرم به نسبت یک به یک در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفته و سپس نمونه بافت در پارافین خالص نرم و تمیز در انکوباتور ۵۶ درجه سانتی‌گراد در دو مرحله و

میزان همآوری نسبی نیز بین ۱۷۰/۱ تا ۶۴۴/۸ بوده که با افزایش سن میزان هم‌آوری مطلق افزایش و هم‌آوری نسبی کاهش یافته است.

در ایران این ماهیان معمولاً در سن ۲-۳ سالگی به بلوغ می‌رسند به نحوی که حتی در تالاب انزلی در اردیبهشت ماه ماهیان مولد رسیده به طول ۱۴-۱۳ سانتی‌متر و به سن بالای ۲ نیز مشاهده شده است. در ماهی‌ها عوامل زیست محیطی و اکولوژیکی نقش مهمی در تعیین جنسیت دارند و تعاملی که بین ژن‌ها و عوامل محیطی موثر مثل درجه حرارت، شوری، pH، O₂ و موقعیت‌های اجتماعی وجود دارد، می‌تواند به عنوان عامل تعیین‌کننده جنسیت شناخته شود (Elia et al., 2010). اهمیت همکاری‌های بین ژنتیک و محیط، سال‌هاست که در علوم کشاورزی و باغبانی شناخته شده است. تمام متغیرهای محیطی مربوط به پرورش ماهی، می‌توانند از طریق همکاری با ژنوم ماهی، در تولید تاثیر داشته باشند.

مواد و روش‌ها

زمان و مکان منطقه نمونه‌برداری

نمونه برداری لای ماهی از ایستگاه تحقیقات شیلات سفیدرود آستانه اشرفیه و نیز تالاب انزلی به صورت ماهیانه بمدت یکسال از بهمن ماه سال ۱۳۹۶ تا دی ماه سال ۱۳۹۷ صورت گرفت. ذخایر لای ماهی در تالاب انزلی بسیار ناچیز می‌باشد، بنابراین تهیه این ماهی خصوصاً در فصل سرد سال به دلیل زمستان خوابی این ماهی بسیار دشوار است. به همین دلیل نمونه‌برداری از تالاب انزلی، قسمت مرکزی تالاب (سرخال کول) بوده، که فقط در ماه‌های تولیدمثلی (اواخر اسفند تا اوایل تیر) صورت گرفت.

جنسی و میزان شاخص بلوغ جنسی معادله
 $GSI = WG/WT \times 100$ به کار گرفته شد (Biswas, 1993)؛
 (Bagenal, 1978):

که در آن، GSI = شاخص گنادوسوماتیک، WG = وزن
 گناد به گرم، WT = وزن بدن به گرم، تعیین هم آوری
 مطلق می باشد (Schiel, 1994).

برای تعیین هم آوری، ماهیانی که در مرحله چهارم
 از رشد شش مرحله ای غدد جنسی، یعنی هم زمان با
 مرحله پیش از تخم ریزی بودند مورد بررسی قرار
 گرفتند. برای تعیین هم آوری، مقداری زیر نمونه از
 تخمک های موجود در بخش های ابتدایی، میانی و
 انتهایی تخمدان جدا شده، برای استحکام بخشیدن و
 ثبات تخمک ها در فرمالین ۴٪ قرار داده شد (آذری
 تاکامی، ۱۳۵۸). تخمک های موجود در زیر نمونه به
 دقت شمارش و به وزن کل تخمدان تعمیم داده شد.
 هم آوری مطلق از روش وزنی و معادله زیر بدست آمد:

وزن کامل تخم ها \times تعداد تخم ها در یک گرم = هم آوری مطلق

پس از محاسبه هم آوری مطلق، به منظور تعیین
 هم آوری نسبی از معادله زیر استفاده شد:
 هم آوری نسبی = تعداد کل تخمک / وزن بدن

نتایج

نتایج بافت شناسی

مراحل رشد تخمدانی (اووژنز) بر مبنای

مطالعات میکروسکوپی

مراحل اووژنز به طور کلی به دسته های زیر تقسیم
 می شود (شکل ۱ و جدول ۱):

هر مرحله به مدت یک ساعت انجام شد. در مرحله
 قالب گیری، نمونه بافت ها در داخل قالب های ویژه
 قرار گرفته و با استفاده از پارافین مذاب پوشانده شدند.
 پس از سرد شدن قالب های پارافینی حاوی نمونه، بافت
 جهت تهیه برش های بافتی آماده شد. در این مرحله
 پارافین های حاوی نمونه بافت از قالب های کاغذی جدا
 و با استفاده از اسکالپل تا حد امکان پارافین های اضافه
 از اطراف نمونه ها بریده و در نهایت قالب های پارافینی
 حاوی نمونه بافت روی پایک های چوبی سوار شدند.
 مشخصات مربوط به هر نمونه بافت روی پایک ها
 یادداشت گردید. پس از آن از نمونه ها برش تهیه شد.
 در این مرحله نیز اطلاعات مربوط به هر نمونه بافت
 توسط برچسب روی لام ها یادداشت گردید. این لام-
 های حاوی اسلایدهای برش داده شده، به مدت ۲۴
 ساعت در انکوباتور قرار داده شدند تا خشک شوند. از
 هر نمونه بافتی ۵ لام جهت بررسی میکروسکوپی تهیه
 گردید. از روش هماتوکسیلین ائوزین برای رنگ آمیزی
 استفاده شد. مراحل تهیه بافت بر اساس پروتکل
 استاندارد از کتاب Fish pathology انجام شده است
 (Genten, 2009).

زیست شناسی تولیدمثل

در بررسی تولیدمثل موارد زیر مورد بررسی قرار
 گرفت:

تعیین نسبت جنسی نر به ماده (Richer, 1975).

از تقسیم تعداد ماهیان نر در هر گروه سنی به تعداد
 ماهیان ماده در هر گروه سنی بدست آمد.

شاخص گنادوسوماتیک یا شاخص بلوغ جنسی
 (G.S.I) روش غیر مستقیمی برای تخمین فصل تخم
 ریزی ماهی است. برای تعیین وضعیت تکامل غدد

مرحله V و IV بود بسیاری از سلول‌ها پر از زرده بودند و به سمت Circumference حرکت کرده بود. در خرداد ۹۳ نمونه‌ها دو بار گرفته شدند یک بار ۷ خرداد و بار دوم ۲۲ خرداد ماه نمونه‌های اول زمانی گرفته شدند که دمای آب سبب القای تخم‌ریزی در ماهی شده بود. در نمونه‌های ماده تخمدان‌ها در مرحله V و IV بودند.

تخمدان‌ها محتوای اووسیت‌های فراوانی پر از زرده بودند. هسته این سلول‌ها به سمت میکروپیل حرکت کرده بود. ۲ تا از ماده‌های گرفته شده در حال تخم‌ریزی بودند. تخمدان این نمونه‌ها محتوای تعداد زیادی اووسیت پر از زرده به همراه تشکیل میکروپیل و مهاجرت هسته بود. همچنین در این نمونه‌ها فولیکول‌های خالی مشاهده شدند. تخمدان در این ماده در مرحله VI و V و IV بود. نمونه‌گیری بعدی در اواخر خرداد ماه بود که تخمدان بیشتر آن‌ها در مرحله VI و IV بودند، اما بعضی نمونه‌ها دارای تخمدانی در مرحله IV و III هم دیده شدند.

در نمونه‌های تیر ماه تخمدان‌ها محتوای اووسیت‌های atretic در مراحل V و VI بود. تخمدان‌های همه در مرحله تخم‌ریزی بودند اووسیت‌های فراوان و کاملاً پر از زرده بوده و محتوای میکروپیل مشاهده شده. همچنین فولیکول‌های کوچک قابل توجه هستند. در مرداد ماه تخمدان از اووسیت خالی شده و آن‌هایی که باقیمانده‌اند در حال بازجذب می‌باشند (شکل ۱) تخم‌ریزی کامل شده است. در شهریور ماه ۷ ماده گرفته شد تخمدان آنها در مرحله پسروی بوده (بعد از تخم‌ریزی). در فصل پاییز و زمستان از محیط تالاب به دلیل زمستان خوابی لای ماهی صید این ماهی امکان پذیر نبود.

مرحله پیش از زرده‌سازی - مرحله زرده‌سازی - مرحله رهاسازی تخمک - پسروی تخمدان و استراحت. مرحله پیش از زرده‌سازی شامل مراحل V, IV, III, II, I می‌باشد. در این مطالعه این مراحل مشاهده شدند. تغییرات مشاهده شده در تخمدان‌های ماهی از فروردین شروع شد. از نظر بافت‌شناسی تخمدان‌ها در مرحله III رسیدگی بودند.

در ۲۳ اردیبهشت ۱۳۹۳، ۳ ماهی ماده گرفته شد. تخمدان دو مورد از آن‌ها در مرحله III-IV رسیدگی بوده و یکی از آن‌ها در مرحله III بود (آب سردتر). در ۲۳ اردیبهشت ۱۳۹۳، ۸ ماده گرفته شد که از این تعداد تخمدان ۷ مورد آن‌ها در مرحله رسیدگی بوده و یکی از آن‌ها از مرحله III-IV بود (در شرایط آب گرم تر).

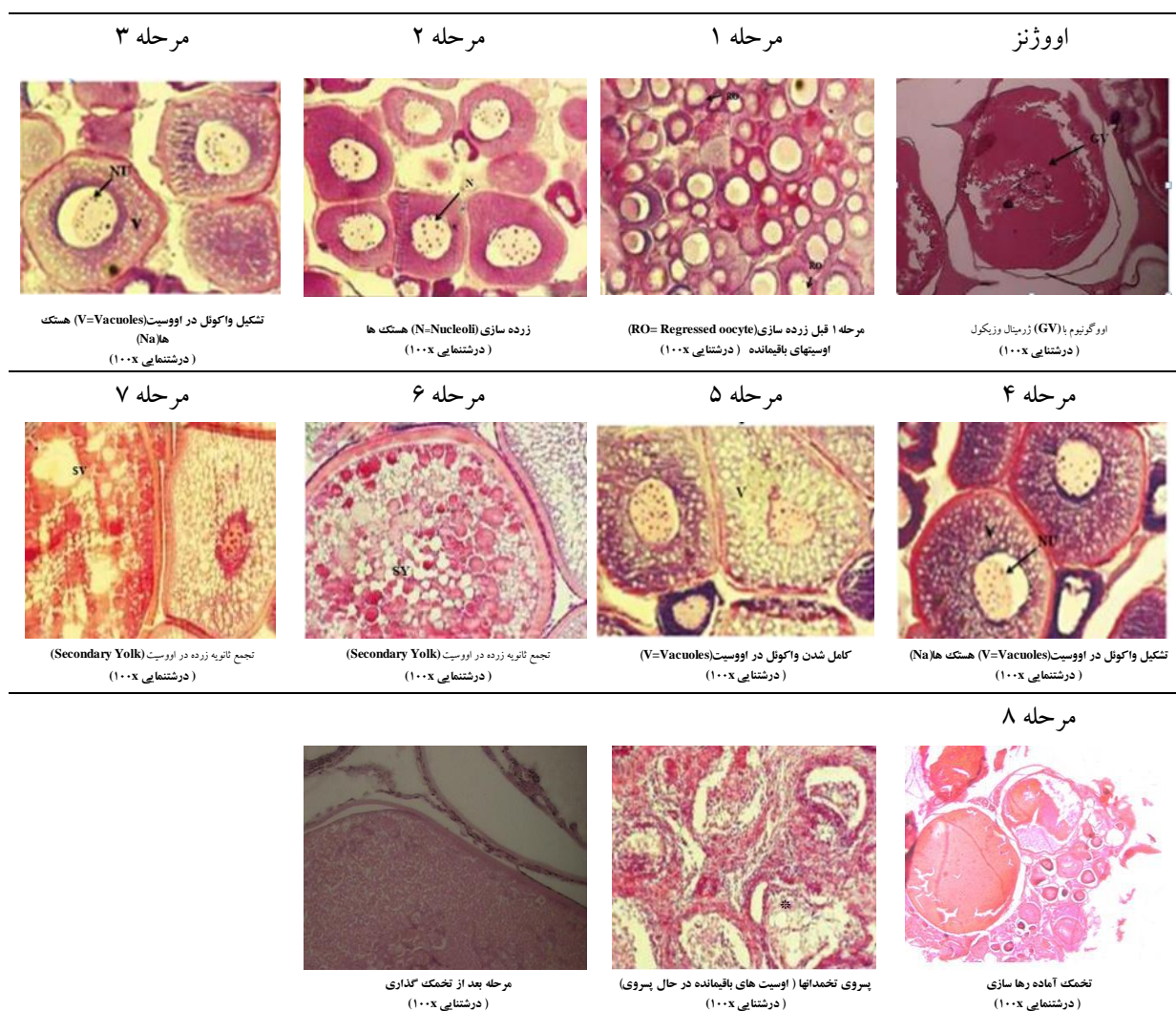
STAGE III

اووسیت‌ها در این ۷ تخمدان دارای ۴-۵ ردیف واکوئل بودند و در بعضی اووسیت‌ها واکوئل‌ها به نزدیک هسته رسیده بودند.

STAGE III-V

تخمدان در مرحله III-IV رسیدگی دارای اووسیت‌هایی در فاز اولیه از تجمع زرده به همراه ۳-۴ ردیف واکوئل در اطراف سلول بودند.

در اواخر اردیبهشت که دمای آب به ۱۹ درج سانتی‌گراد افزایش یافت، بافت‌های تهیه شده از تخمدان ماهیان دارای فولیکول‌های بعد از تخمک‌گذاری (اووسیت‌هایی با تجمع زرده و اووسیت‌های باز جذب شده) بودند. در بزرگترین اووسیت دیده شده واکوئل‌ها نزدیک هسته رسیده بودند. تخمدان این در مرحله VI و IV بودند تصور می‌شود که برخی از تخمک‌ها خارج شده باشند. تخمدان یک ماهی ماده در



شکل ۱: مراحل مختلف رشد تخمدانی لای ماهی بر اساس رسیدگی اووژنز (گروه پرورشی)

اندازه تخمدان متوسط بوده و $\frac{1}{4}$ و $\frac{3}{4}$ حفره بدن را اشغال می کند. اوویست ها قابل رؤیت یوده و با چشم غیر مسلح دیده نمی شود و یا به سختی دیده می شود. عروق فراوان در سطح تخمدان وجود دارد. مقداری ذرات زرده ای در آنها دیده می شود.

مرحله در حال بلوغ (رسیده ۳)

تخمدان های بزرگ $\frac{3}{4}$ حفره بدن را پر می کنند. همراه آن ها مویرگ های خونی زیادی دیده می شوند.

مراحل رشد تخمدانی اووژنز بر مبنای مطالعات میکروسکوپی

مراحل رشد تخمدانی اووژنز بر مبنای مطالعات میکروسکوپی در جدول ۱ نشان داده شده است.

مرحله نابالغ

تخمدان کوچک و بدون اوویست های قابل مشاهده بوده، دیواره تخمدان نازک است. تخمک ها با چشم غیر مسلح دیده نمی شوند.

مرحله رسیده ۲ (استراحت)

تخمندان ارغوانی رنگ و خیلی شل و چروک شده و گاهی دارای تعداد کمی اوویست های مات می باشد (اوویست با چشم دیده می شود و بزرگ و زردرنگ می باشند).

مرحله بی رمق

تخمندان ارغوانی رنگ و چروک شده و دیواره تخمدان ضخیم شده و مویرگ های خونی بزرگ شده- اند. اوویست های مرحله پیشرفته در تخمدان دیده نمی- شوند.

رنگ تخمدان ها زرد/ نارنجی بوده و اوویست هایی به اندازه ۰/۵ میلی متر با چشم دیده می شود و دارای ذرات زرده ای فراوان هستند.

مرحله کاملاً رسیده

اوویست ها نیم شفاف (مات) که ممکن است جریان داشته یا نداشته باشد. اوویست های آب دار شده و شفاف هستند و با چشم به خوبی دیده می شوند.

مرحله تخلیه

جدول ۱: ویژگی های ماکروسکوپی و میکروسپی تخمدان های لای ماهی در مراحل مختلف رسیدگی

مرحله رسیدگی	احتمال تشخیص درست براساس ویژگی های ماکروسکوپی	صفات ماکروسکوپی	صفات میکروسکوپی
نارس ۱ (immature)	زیاد	تخمندان کوچک و بدون اوویست های قابل مشاهده بوده، دیواره تخمدان نازک است.	همه اوویست ها در مرحله پیش زرده (previtelogenic) یعنی در مراحل اولیه رشد هستند.
رسیده ۲	کم (با مراحل ۵ و ۶ اشتباه می شوند)	اندازه تخمدان متوسط بوده ۱ و ۳ حفره بدن را اشغال می کند. اوویست ها قابل رویت بوده و با چشم انسان مشاهده نمی شوند (۰/۲-۰/۵ mm)	فرآیند رسیدگی شروع شده و اوویست های پیشرفته در مراحل اولیه و تپلوژنریس یا زرده سازی هستند.
رسیده ۳	زیاد	تخمندان بزرگ ۳ حفره بدن را پر می کنند. همراه آنها مویرگ های خونی زیادی دیده می شوند. رنگ تخمدانها زرد/نارنجی بوده و اوویست هایی به اندازه ۰/۵ مترمتر با چشم دیده می شوند.	اوویست ها در پیشرفته ترین مرحله در داخل تخمدان دیده می شوند و تخمدان در مراحل زرده سازی است.
تخمریزی	زیاد	اوویست ها نیم شفاف (مات) که ممکن است جریان داشته یا نداشته باشد. اوویست های آب دار شده بزرگتر از اوویست های مات هستند.	تخمریزی قریب الوقوع بوده که اوویست ها در مرحله مهاجرت هستند و آگیری هستند.
استراحت ۵	کم (با مرحله ۲ و ۶ اشتباه می شوند)	تخمندان ارغوانی رنگ و خیلی شل و چروک شده و گاهی دارای تعداد کمی اوویست های مات می باشد (اوویست ها با چشم دیده می شوند و بزرگ و زرد رنگ می باشند).	بعضی تخمک ها رها شده اند و فولیکول های بعد از تخمریزی مشاهده می شوند.
بی رمق (نیروی خود را از دست داده) ۶	کم (با مرحله ۵ و ۲ اشتباه می شود)	تخمندان ارغوانی رنگ و بسیار شل و چروک شده است. دیواره تخمدان ضخیم شده و مویرگ های خونی بزرگ شده اند. اوویست های مرحله پیشرفته در تخمدان دیده نمی شوند.	آخرین رسته تخمک ها رها شده اند. اووگونیا و هسته دارای شبکه کروماتین در اوویست دیده می شود. اوویست های باقیمانده بازجذب می شوند.

مراحل رشد بیضه (اسپرمتوزنز) بر مبنای مطالعات میکروسکوپی

تغییرات بافتی بیضه در طی چرخه تولید مثلی لای- ماهی در شکل ۲ و جدول ۲ نشان داده شده است. سلول‌های زایا در گناد نابالغ و در حال استراحت، اسپرمتوگونیا (SG) می‌باشند. این سلول‌ها در طول اسپرمتوزنریس در بافت بیضه وجود دارند و در لوله‌های سمنی فر (اسپریم ساز) بر روی غشاء پایه قرار گرفته‌اند. در بین آن‌ها سلول‌های سرتولی مشاهده می‌شوند.

قبل از مرحله رسیدگی جنسی، سلول‌های اسپرمتوگونیا (SG_A) شروع به تقسیم شدن می‌کنند. ابتدا تقسیم ناکاملی انجام داده بدین ترتیب که مرحله سیتوکنیزر انجام نشده و در نتیجه سلول‌ها تقسیم یک پل سیتوپلاسمی به هم متصلند (GG_B).

در حین رسیدگی گناد، تعداد بیشتری اسپرمتوگونیا نوع B بوجود آمده و زمانی که تقسیم میوز (با کاهش کروموزومی) شروع می‌گردد تبدیل به اسپرمتوسیت اولیه (SC₁) می‌شوند. با شروع مرحله دوم تقسیم میوزی که خیلی سریع اتفاق می‌افتد، اسپرمتوسیت ثانویه (SC₂) بوجود می‌آید چون این مرحله خیلی با سرعت انجام می‌شود می‌توان دلیل ایجاد اسپرمتوسیت ثانویه به تعداد زیاد را بیان نمود.

بعد از تقسیم میوز، داخل لومن لوله‌ها، اسپرمتیدها مشاهده می‌شوند سپس با کامل شدن اسپرژنریس، سلول‌ها به اسپرمتوزوآ (SZ) تبدیل شده و داخل لومن لوله‌های اسپریم ساز پر از اسپریم می‌شوند. هنگامی که تعداد اسپرمتوزوآها زیاد شد به سمت لوله‌های خروجی حرکت می‌کند. در طی تخم‌ریزی (spawning) اسپرمتوزوآهای رسیده رها می‌شوند. تا

شروع سیکل بعدی اسپرمتوزنریس، لوبول‌ها چروکیده شده و دیواره لوله‌ها ضخیم‌تر می‌شوند. اسپرمتوزوآهایی که بعد از تخم‌ریزی در بیضه باقی بمانند توسط سول‌های سرتولی فاگوسیت می‌شوند. هنگامی که لوله‌های اسپریم ساز از وجود اسپرمتوزوآها پاک می‌شوند، واکوئل‌های سلول‌های سرتولی از نظر اندازه افزایش پیدا می‌کنند. در بافت همبند بین لوله‌ها، رگهای خونی و سلول‌های لیگ دیده می‌شوند.

Stage 1: اکثر لوله‌های سمنی فر (اسپریم ساز) پر از اسپرمتوسیت بودند.

Stage 2: تعداد زیادی کیست در محیط لوله‌های اسپریم ساز دیده می‌شوند که پر از اسپرمتوسیت II و اسپرمتوتید هستند. اسپرمتوگونیاها و اسپرمتوسیت‌های اولیه کمتر از stage 1 بودند.

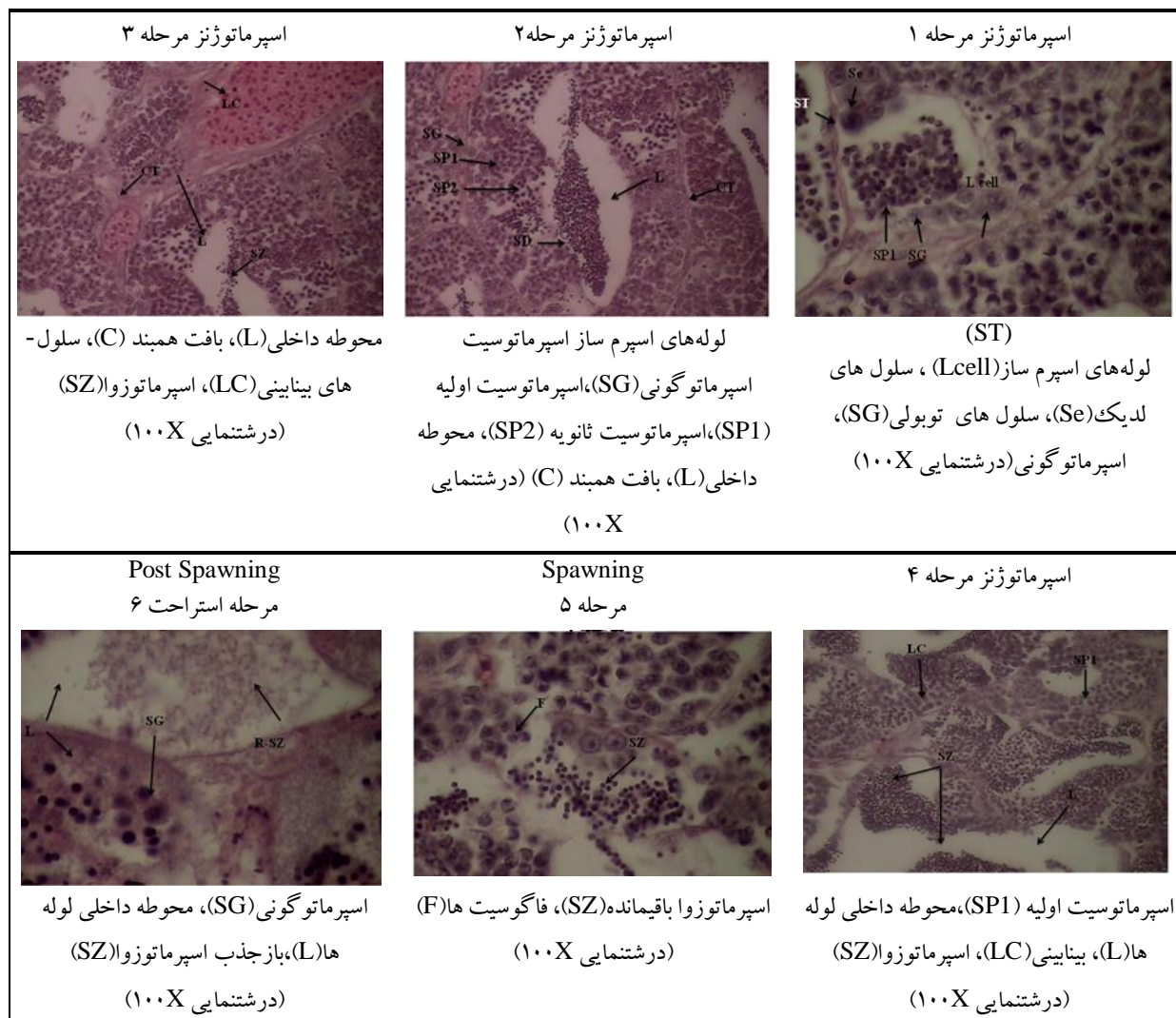
Stage 3: اسپرمتوزوآها سلول‌های غالب در لوله‌های اسپریم ساز هستند (شکل) تعداد زیادی سلول‌های بینابینی دیده می‌شوند.

Stage 4: اسپرمتوزوآها فراوان بوده، اسپرمتوسیت‌های اولیه در محیط لوله‌های اسپریم ساز مشاهده می‌شوند. سلول‌های بینابینی نمو خوبی یافته‌اند.

Spawning تخم‌ریزی یا رهاسازی اسپریم

Stage 5: اسپرمتوزوآها رهاسازی شده اند و لوله‌های اسپریم ساز کاملاً یا در بعضی موارد بخشی از آنها تخلیه شده‌است. اسپرمتوزوآها در مرکز (لومن) لوله‌ها هنوز دیده می‌شوند (تعداد کمی) بافت بین لوله‌ها وسیع تر شده نسبت به مرحله ۴ و فاگوسیت‌ها فراوانند.

Stage 6: بیضه‌ها در مرحله خاموشی یا استراحت هستند. لوله‌های اسپریم ساز دارای تعداد زیادی اسپرمتوگونیا (SG) می‌شوند.



شکل ۲: تغییرات بافتی بیضه لای ماهی در طی چرخه تولید مثلی

جدول ۲: مراحل رشد بیضه لای ماهی بر مبنای مطالعات ماکروسکوپی

مشخصات	مرحله
در این مرحله گناد غیر فعال و نابالغ است. بیضه ها کوچک و باریک و ظاهری شفاف دارند.	نابالغ (Immature Phase)
در این مرحله بر ضخامت بیضه تا حدودی افزوده شده و در حال سفید رنگ شدن می باشند.	در حال بالغ شدن (Maturing Virgin)
در این مرحله بیضه سفید رنگ و در مقایسه با قبل پهن تر، ضخیم تر و نرم تر است.	در تکامل حال (Developing male)
در این مرحله بیضه نرم و لطیف و پهن تر شده است و در مقایسه با مرحله قبل فضای بیشتری در محوطه شکمی به خود اختصاص میدهد. شیره اسپرم با فشار از محوطه شکمی خارج می شود.	تکامل یافته یا بالغ (Developed male)
در این مرحله بیضه تقریباً تمام محوطه شکمی را پر می کند و اسپرم با یک فشار آرام بر محوطه شکمی خارج می شود.	کاملاً رسیده (Ripe male)
بیضه ها در این مرحله قرمز رنگ و بافت آنها سست می باشد.	اسپرم ریزی کرده (Spent male)

افزایش سن میزان هم‌آوری نسبی به طور نامنظم تغییر می‌نماید به طوری‌که در ماهیان ۶ ساله $۴۵۷/ \pm ۱۶۲/۵$ محاسبه گردیده است.

بحث

در این تحقیق روند تکامل تخمدان و بیضه لای- ماهی در تالاب انزلی، منطقه سرخانکل و استخر پرورش واقع در شیلات سفیدرود آستانه اشرفیه با استفاد از مطالعات بافت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفت. در لای‌ماهی ماده هشت مرحله تکامل تخمک را می‌توان مشاهده نمود. این تشریح مراحل تکامل تخمک مطابق با آنچه بود که در برخی مطالعات پیشین نیز بیان شده بود.

مطالعات گسترده‌ای درباره تغییر ساختار بافتی و مورفولوژی تخمدان در ماهیان استخوانی طی روند اوورژنر توسط محققین مختلفی انجام شده است که این تحقیقات نشان می‌دهد که ماهیان استخوانی از دو نوع تخم‌ریزی برخوردار می‌باشند (Oropesa *et al.*, 2015) ؛ (Pula *et al.*, 2018). نوع اول در بیشتر ماهیان دیده می‌شود مانند قزل‌آلا و ماهیان آزاد که نوع تخم‌ریزی آنها همزمان (synchronous) می‌باشند، بدین معنی که تخمک‌های رسیده در یک زمان از تخمدان خارج می‌شوند، درحالی که در ماهیانی مانند لای‌ماهی از نوع (Asynchronous) می‌باشد. روند تخمک‌زایی بر طبق اندازه و محتویات تخمک‌ها به مراحل مختلف تقسیم می‌شود. تقسیم بندی مراحل تکامل تخمک‌ها فقط جهت تسهیل مطالعه است. برای مثال تکامل تخمک‌ها در قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به هشت مرحله، در سوزن ماهی (*Syngnathus scovelli*) و ماهی لجنی (*Labeo capensis*) به پنج مرحله، در

بیشترین میانگین قطر تخمک‌ها در اردیبهشت ماه و کمترین در مرداد ماه مشاهده شدند. افزایش تدریجی قطر تخمک‌ها از مرداد شروع شده تا فصل تخم‌ریزی بعدی که به حداکثر می‌رسند. در بررسی روند رسیدگی جنسی در دو جنس نر و ماده لای‌ماهی، اوج رسیدگی جنسی در ماهیان ماده در ماه‌های اسفند و فروردین رخ می‌دهد، بنابراین تخم‌ریزی از اردیبهشت شروع و تا اواخر تیر ماه ادامه می‌یابد.

هم‌آوری مطلق و نسبی

بررسی بر روی ۲۴ نمونه لای‌ماهی ماده مرحله ۴ و ۵ که دارای وزن $۵۰/۹$ تا $۲۳۸/۲$ گرم و میانگین $۹۹/۸۶ \pm ۴۱/۰۱$ گرم و طول کل ۱۴۶ تا ۲۳۳ با میانگین $۲۲/۲۸ \pm ۱۷۶/۹۳$ میلی تر بودند و سنی معادل ۳ تا ۶ با میانگین $۰/۹۳ \pm ۴/۰۰$ سال داشتند. هم‌آوری مطلق بین ۱۴۰۸۶ تا ۱۵۳۶۰۰ با میانگین $۲۸۲۰۵/۷ \pm ۳۶۳۶۲/۴$ عدد و هم‌آوری نسبی بین $۱۷۰/۱$ تا $۶۴۴/۸$ با میانگین $۳۶۷/۹ \pm ۱۲۵/۰۲$ عدد در ازای یک گرم ماهی ماده متغیر بود. با افزایش سن بر میزان هم‌آوری مطلق افزوده می‌شود، به طوری‌که در ماهیان ۳ ساله (تعداد=۷) میانگین هم‌آوری مطلق $۹۷۴۸/۵ \pm ۲۳۷۴۵/۴$ عدد، در ماهیان ۴ ساله ها (تعداد=۱۳) میانگین هم‌آوری مطلق $۳۱۳۸۱/۸ \pm ۱۲۳۲۰/۳$ عدد، در ماهیان ۵ ساله ها (تعداد=۱) میانگین هم‌آوری مطلق $۳۵۶۷۲/۷ \pm ۰/۰$ عدد و در ماهیان ۶ ساله‌ها (تعداد=۳) میانگین هم‌آوری مطلق $۸۷۶۱۴/۹ \pm ۵۷۳۹۵/۸$ عدد می‌باشد. بین وزن بدن و هم‌آوری مطلق همبستگی بالایی وجود داشته و $r=۰/۷۴$ و معادله خطی برقرار است. همچنین بین هم‌آوری مطلق و طول کل بدن نیز میزان همبستگی بالا بوده $(r=۰/۵۱)$ و معادله خطی پردازش گردید. با

آلای قهوه‌ای به موازات شروع کاهش طول روز، آغاز می‌گردد. دما تأثیر محدودتری بر گامتوزن آزادماهیان دارد. دوره‌های نوری نسبت به دما در زمان‌بندی دوره های تولید مثل در ماهیان دریای آبهای سرد نقش بیشتری دارد (Overturf et al., 2015؛ Zeilinger et al., 2009).

در ماهیان آب‌های گرم نظیر کپورماهیان، دما عامل تأثیرگذارتر می‌باشد، اگرچه دوره‌های نوری نیز در تنظیم گامتوزن نقش دارد. لای ماهی هم مانند کپور ماهیان دیگر همزمان با افزایش دمای آب، تخم‌ریزی می‌نماید. چند هفته پس از تخم‌ریزی، در حالی که دما همچنان رو به افزایش است، دوره جدید گامتوزن آغاز می‌گردد. تخمک‌ها مراحل زرده زایی را به سرعت طی می‌نمایند. در این زمان، دمای آب کاهش می‌یابد و تکامل تخمک‌ها تا بهار سال بعد متوقف می‌گردد. با افزایش مصنوعی دمای آب می‌توان دوره تخم‌ریزی کپورماهیان را طولانی‌تر نمود (Avlijas et al., 2017؛ Rojo et al., 2016). ماهی کفال‌خاکستری از ماهیان دریایی است که در زمستان تخم‌ریزی می‌نماید و گامتوزن در آن توسط کاهش طول روز و دمای آب القاء می‌گردد. بنابراین اگر این ماهی در معرض روزهای کوتاه و دمای پایین قرار گیرند، می‌توان تخم‌ریزی را القا نمود. تخم‌ریزی تحت تأثیر شرایط محیطی می‌باشد، این عوامل تخم‌ریزی ماهیانی که در شرایط پرورشی رشد می‌یابند را القا می‌نماید. در برخی از ماهیان که در تابستان تخم‌ریزی می‌نمایند مانند ماهی کپور معمولی آب گرم جهت تخم‌ریزی مورد نیاز است که از این نظر شباهت زیادی با لای ماهی دارد زیرا این ماهی نیز با گرم شدن آب شروع به تخم‌ریزی می‌کند. افزایش دمای آب برای برخی از گونه‌های ماهیان

هیبرید تاس ماهی (بستر) به پنج مرحله و در کفال قرمز (*Mullus surmuletus*) به شش مرحله تقسیم شده است. که این تحقیقات نشان می‌دهد که لای ماهی نیز در تکامل تخمک‌ها همانند قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) بوده و از هشت مرحله تبعیت می‌کند (Schreck et al.; Dolomatov, 2012؛ Benson, 1998 Arcand and al., 2001).

خصوصیات محیطی مکان‌های تخم‌ریزی باعث القاء بلوغ نهایی تخمک‌ها، اوولاسیون و تخم‌ریزی می‌شود. ترکیب فصل مطلوب و محیط مطلوب تخم‌ریزی، احتمالاً باعث ایجاد بهترین شرایط جهت بقای لاروها و بچه ماهیان می‌شود. کنترل محیطی گامتوزن هم بر اثرات بلند مدت جهت تکمیل گامتوزن و هم اثرات سریع بر مراحل اسپرمیشن، اوولاسیون و تخم‌ریزی می‌شود. پرورش ماهی در شرایط مصنوعی آن‌ها را از دستیابی به شرایط مطلوب جهت تولید مثل محروم می‌کند. این دلیل اصلی عدم انجام اوولاسیون و تخم‌ریزی در مولدین ماده‌ای که در شرایط پرورش نگهداری می‌شود، می‌باشد. به وسیله دستکاری محیط مولدین، می‌توان هم‌زمان تخم‌ریزی را تنظیم نمود و هم می‌توان در تمام طول سال تولید تخم و اوولاسیون و تخم‌ریزی را القا نمود. در مناطق معتدله، مهمترین عامل محیطی تأثیرگذار در تولید مثل طول روز و دما می‌باشد (Brion et al., 2004؛ Mylonas et al., 2010).

زمان‌بندی محیط دوره تولیدمثل ماهی در سال‌های اخیر مورد توجه محققین قرار گرفته‌است. بیشترین ماهیان مورد مطالعه، آزادماهیان و کپورماهیان بوده‌اند. دوره‌نوری، مهمترین محرک محیطی است که زمان‌بندی تولید مثل در آزاد ماهیان را تعیین می‌کند. رشد توده‌ای اووسیت در قزل‌آلای رنگین‌کمان و قزل-

بلوغ جنسی در لای ماهی در دریاچه Mogan برای ماده ها ۳ سالگی و برای نرها ۴-۳ سالگی تخمین زده شد و همچنین در دریاچه Porsuk سن بلوغ جنسی در لای- ماهی در ماده‌ها ۳ سالگی تعیین شد (Yilmaz, 2002). دوره تخم‌ریزی در Kapurukaya بین اواخر فروردین تا اوایل خرداد ماه تعیین شد (Yilmaz, 2002). از سوی دیگر این دوره در دریاچه Mogan و Porsuk به ترتیب در ماه‌های فروردین تا تیر و تیر تا شهریور تعیین شد (Benzer *et al.*, 2011) و همین‌طور این دوره در Kayabogazi در ماه‌های خرداد- تیر تخمین زده شد و نیز بیان شد که دوره تخم‌ریزی لای ماهی در دریاچه pamvotida در یونان در ماه‌های اردیبهشت تا خرداد می‌باشد. در پژوهش کنونی نیز دوره تخم‌ریزی از ماه اردیبهشت شروع شده و تا اواخر تیر ماه ادامه دارد. زمان این دوره تخم‌ریزی در لای ماهی در محیط پرورشی به دلیل دمای بالاتر آب زودتر اتفاق افتاده و از فروردین ماه شروع می‌شود. طبق بررسی‌ها بر روی ریتم تولید مثلی لای ماهی در نوسانات دما، درصد ماهی‌های ماده شرکت‌کننده در تخم‌ریزی بستگی به الگوی تغییرات دمایی در طول روز داشته و تنوع ریتم تولید مثلی در فصولی که نوسانات دما بیشتر است بالاتر می‌باشد، و نیز در تحقیق کنونی هم وابستگی شدید دما و زمان تخم‌ریزی دیده شد که با افزایش دما، زمان تخم‌ریزی فرا رسید و بهترین دما برای آن ۲۰-۱۹ درج سانتی‌گراد تخمین زده شد.

با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان گفت که بیضه این ماهی از نوع لوبولار بوده و اسپرما توژنز در ماهیان هم‌زمان با ریخته شدن یا جذب اسپرم‌ها در فصل تخم‌ریزی آغاز می‌شود و بتدریج تا اواسط پاییز پیشرفت می‌کند، با افزایش دما، میزان تولید مثل و هم-

بخصوص در کپورماهیان جهت القا تخم‌ریزی در شرایط پرورشی مورد استفاده قرار گرفته است. فصل تخم‌ریزی لای ماهی از اردیبهشت شروع شده و تا اواخر تیر پایان می‌پذیرد. این ماهی در شرایط طبیعی فقط یک‌بار در سال تخم‌ریزی می‌کند. درحالی که در ماهی کفال خاکستری تخم‌ریزی از مرداد تا مهرماه می‌باشد. در پژوهش حاضر، نیز فصل تخم‌ریزی لای ماهی از اردیبهشت تا اوایل مرداد تخمین زده شده است. میزان هم‌آوری مطلق با افزایش سن قابل توجهی افزایش می‌یابد. به سبب وجود این افزایش است که شاخص گونادوسوماتیک در ماهیان ماده نیز با افزایش سن اضافه می‌شود هر چه سن ماهی بالاتر می‌رود، تخم‌ها بزرگتر، چسبان‌تر و سنگین‌تر شده و در عوض تعداد آن‌ها در یک گرم کاهش می‌یابد. ماهیان هر چه به زمان تخم‌ریزی نزدیک‌تر می‌شوند مراحل سوم و چهارم رسیدگی جنسی در آن‌ها افزایش یافته و بالعکس از طرفی هر چه از زمان تخم‌ریزی فاصله می‌گیرند مراحل اول و دوم بیشتر مشاهده می‌گردد. سن رسیدگی جنسی در لای ماهی در ماده ۳ سالگی و در نرها ۴-۳ سالگی بوده است که با نتایج Benzer در سال ۲۰۱۱ تطبیق دارد. و همچنین نسبت جنسی نر به ماده تقریباً ۱: ۱ نمی‌باشد (Pimpicka, 1990). که این نسبت با اطلاعات بدست آمده در این تحقیق همخوانی می‌کند. میانگین شاخص گونادوسوماتیک ماهانه از 0.06 ± 38 را در ماه مهر تا 0.03 ± 8 در ماه اردیبهشت تغییر می‌کند. میانگین تعداد تخمک‌ها در لای ماهی تخمین زده شده و بین 17047 ± 23403 می‌باشد (Benzer *et al.*, 2007). به طور کلی، وزن ماهی‌ها و سایر جانوران تحت تاثیر طول بدن افزایش می‌یابد. پس می‌توان گفت که در یک گونه طول و رشد با هم نسبت دارند. سن

5. Bagenal, T., 1978. Methods for assessment of fish production in fresh waters. IBP Handbook No. 3: Blackwell Science Publication.
6. Benzer, S. Ş., Ali, G. Ü. L., & Yılmaz, M. (2007). Breeding properties of *Tinca tinca* (L., 1758) living in Hirfanlı dam lake (Kırşehir, Turkey). *Su Ürünleri Dergisi*, 24(1), 127-129.
7. Benzer, S., Gül, A., Yılmaz, M.. 2010. Growth properties of tench (*Tinca tinca* L., 1758) living in Kapulukaya Dam Lake, Turkey. *University of Kastamonu Education Journal*, 18(3), 839-848.
8. Benzer, S., Gül, A., Yılmaz, M., 2011. Breeding properties of *Tinca tinca* (L., 1758) living in Kapulukaya Reservoir (Kırıkkale, Turkey). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 10(3), 375-882.
9. Biswas, S., 1993. Manual of methods in fish biology: South Asian Publishers, p.157.
10. Brion, F., Tyler, C. R., Palazzi, X., Laillet, B., Porcher, J. M., Garric, J., & Flammarion, P. (2004). Impacts of 17 β -estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval, juvenile-and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic toxicology*, 68(3), 193-217.
11. Dolomatov, S. I., Zukow, W., Novikov, N. Y., Muszkieta, R., Bulatowicz, I., Dzierzanowski, M., ... & Strojek, K. (2012). The regulation of osmotic and ionic balance in fish reproduction and in the early stages of ontogeny. *Russian Journal of Marine Biology*, 38(5), 365-374.
12. Elia, A.C., Dörr, A.J.M., Abete, M.C., Prearo M., 2010. Seasonal variability of detoxificant response and heavy metal accumulation in tissues of both sexes in *Tinca tinca* (L.) from Lake Trasimeno. *Reviews in fish biology and fisheries*, 20(3), 425-534.
13. FEIST, S. W., 2009. Atlas of fish histology-Edited by F. Genten, E. Terwinghe and A. Danguy. *Journal of Fish Biology*, 75(3), 757-758.

آوری ماهیان نر و ماده افزایش معنی داری نشان داد. بیشترین میانگین قطر تخمک ها در اردیبهشت و کمترین در مرداد مشاهده شدند. اوج رسیدگی جنسی در ماهیان ماده در ماه های اسفند و فروردین بود. تخم ریزی ماهیان از اردیبهشت شروع و تا اواخر تیر ماه ادامه داشت. اووزنر و اسپرماتوزنر در محیط های پرورشی زودتر از تالاب انزلی شروع میشود.

سپاسگزاری

از پژوهشگر گرامی شهریار تقی پورکوه بجهت پیشبرد اهداف علمی این پژوهش کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

۱. آذری تاکامی، ق.، محمد، ا.، نقوی، م.، ۱۳۸۵. بررسی امکان ایجاد جنس تمام نر در ماهی گویی *Poecilia reticulata* توسط هورمون ۱۷-آلفا متیل تستوسترون. *مجله علوم آب و خاک (علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی)*، ۱۰(۲)، ۲۷۹-۲۸۷.
2. Alaş A., Altındağ A., Yılmaz M., Kırpık MA., Ak. A., 2010. Feeding Habits of Tench (*Tinca tinca* L., 1758) in Beyşehir Lake (Turkey). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 10(2), 187-194.
3. Arcand-Hoy, L.D., Benson, W.H., 1998. Fish reproduction: an ecologically relevant indicator of endocrine disruption. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 17(1), 49-57.
4. Avlijaš, S., Ricciardi, A., Mandrak, N.E., 2017. Eurasian tench (*Tinca tinca*): the next Great Lakes invader. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 75(2), 169-179.

22. Pula, H.J., Trenzado, C.E., García-Mesa, S., Fallola, C., Sanz, A., 2018. Effects of different culture systems on growth, immune status, and other physiological parameters of tench (*Tinca tinca*). *Aquaculture*, 485, 101-110.
23. Richer, G., Desrochers, M., Guevin, R., Turgeon, F., Viallet, A., 1975. Hepatitis B antigen in Montréal blood donors: childhood institutionalization as an epidemiologic factor. *Canadian Medical Association Journal*, 112(1), 49.
24. Rojo-Bartolomé, I., de Cerio, O.D., Diez, G., Cancio, I., 2016. Identification of sex and female's reproductive stage in commercial fish species through the quantification of Ribosomal Transcripts in gonads. *PloS one*, 11(2), e0149711.
25. Schiel, D., 1994. Kelp communities. *Marine Biology* (Eds LS Hammond and RN Synnot), 345-361.
26. Schreck, C.B., Contreras-Sanchez W., Fitzpatrick M.S., 2001. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Reproductive Biotechnology in Finfish Aquaculture: Elsevier*, 3-24.
27. Siwicki, A.K., Zakęś, Z., Terech-Majewska, E., Kazuń K., Lepa A., Głabski E., 2010. Dietary Macrogard reduces *Aeromonas hydrophila* mortality in tench (*Tinca tinca*) through the activation of cellular and humoral defence mechanisms. *Reviews in fish biology and fisheries*, 20(3), 435-9.
28. Yilmaz, F., 2002. Reproductive biology of the tench *Tinca tinca* (L., 1758) inhabiting Porsuk Dam lake (Kutahya, Turkey). *Fisheries Research*, 55(1-3), 313-317.
29. Zeilinger, J., Steger-Hartmann, T., Maser, E., Goller, S., Vonk, R., Länge, R., 2009. Effects of synthetic gestagens on fish reproduction. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(12), 2663-2670.
14. Horoszewicz, L., 1983. Reproductive rhythm in tench, *Tinca tinca*, in fluctuating, temperatures. *Aquaculture*, 32(-2), 79-92.
15. Kujawa, R., Kucharczyk, D., Mamcarz, A., Żarski, D., Targońska, K., 2011. Artificial spawning of common tench *Tinca tinca* (Linnaeus, 1758), obtained from wild and domestic stocks. *Aquaculture International*, 19(3), 513-521.
16. Mylonas, C.C., Fostier, A., Zanuy, S. 2010., Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 516-534.
17. Nowosad, J., Żarski, D., Biłas, M., Dryl, K., Krejszeff, S., Kucharczyk, D. 2013. Dynamics of ammonia excretion in juvenile common tench, *Tinca tinca* (L.), during intensive rearing under controlled conditions. *Aquaculture International*, 21(3), 629-637.
18. Oropesa, A., Martín-Hidalgo, D., Fallola, C., Gil, M., 2015. Effects of exposure to 17-alpha-ethynylestradiol on sperm quality of tench (*Tinca tinca*). *Ecotoxicology and environmental safety*, 120, 318-325.
19. Overturf, M.D., Anderson, J.C., Pandelides, Z., Beyger, L., Holdway, D.A. 2015. Pharmaceuticals and personal care products: A critical review of the impacts on fish reproduction. *Critical reviews in toxicology*, 45(6), 469-491.
20. Owen, M.A., Davies, S.J., Sloman, K.A. 2010. Light colour influences the behaviour and stress physiology of captive tench (*Tinca tinca*). *Reviews in fish biology and fisheries*, 20(3), 375-380.
21. Pimpicka, E. (1990). Formation of fecundity of tench, *Tinca tinca* (L.) females in Lake Drwęckie. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 20(2), 129-141.