اثرتزریق هورمون ۱۷- بتااستراديول برتغییرات هماتولوژیک ماهی ازون برون جوان (*Acipenser stellatus*)

حسین خارا[1*]
بهرام فلاحتکار[2]
بهمن مکنت‌خواه[3]
مینا رهبر[4]
محدثه احمدنژاد[5]

۱. گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران
۲. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، ایران
۳. مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان دریایی دکتر یوسف پور، سیاهکل، ایران
۴. واحد لاهیجان، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران
۵. بخش آبزی‌پروری، پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی، بخش آبزی پروری، بندر انزلی، ایران

***مسئول مکاتبات:**
h.khara1974@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۵/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۳۰
کد مقاله: ۱۳۹۳۰۱۰۱۹۶
این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی می‌باشد.

چکیده

در این پژوهش، اثرات هورمون ۱۷- بتااستراديول بر شاخص‌های هماتولوژیک ماهی‌ازون برون جوان از تابستان ۱۳۸۹ تا فروردین ۱۳۹۰ مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور، ۱۲۰ قطعه بچه‌ماهی ازون برون با میانگین وزن ۱/۱± ۴۰/۹ گرم در ۲ تیمار به تعداد ۲۰ قطعه در هر تانک تقسیم شدند. تیمارها شامل تزریق با سرم فیزیولوژی به عنوان تیمار کنترل و تزریق با ۵ میلی‌گرم هورمون ۱۷- بتااستراديول به ازای هرکیلوگرم وزن بدن در نظر گرفته شد. طول دوره بررسی، ۷ ماه در نظر گرفته شد و در پایان دوره، نمونه‌برداری خون از ۵ ماهی در هر تانک انجام و شاخص‌های هماتولوژیک شامل تعداد گلبول‌های سفید و قرمز خون، هموگلوبین، هماتوکریت، MCH، MCV و MCHC مورد اندازه‌گیری و سنجش قرار گرفتند. نتایج به‌دست آمده نشان داد که در ماهیان تزریق شده با ۵ میلی‌گرم هورمون ۱۷- بتا استراديول مقادیر RBC، Hb، HCT و MCH در خون ماهیان مورد مطالعه به‌طور معنی‌داری کاسته شد (P<۰/۰۵). در سایر فاکتورهای خونی شامل WBC، MCV و MCHC اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مختلف مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). این مطالعه تأیید کرد که تزریق بچه‌ماهیان ازون برون با هورمون ۱۷- بتااستراديول سبب وقوع کم خونی از نوع معمولی گردیده است.

واژگان کلیدی: ازون برون، ۱۷- بتااستراديول، تزریق، شاخص‌های خونی، *Acipenser stellatus*.

مقدمه

ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*) یکی از گونه‌های مهم ماهیان خاویاری است که جمعیت قابل توجهی را در دریای خزر به خود اختصاص داده است. از مزیت‌های این گونه می‌توان به کیفیت بالای گوشت و بازار پسندی فوق‌العاده آن و مدت زمان کم‌تر برای رسیدن به مرحله بلوغ و تولید خاویار نسبت به اکثر گونه‌های خاویاری (۷ تا ۸ سال) و همچنین میزان بالای خاویار استحصالی نسبت به وزن بدن، به‌طور متوسط ۱۹ درصد اشاره کرد (کیوان، ۱۳۸۲). مهم‌ترین فرآورده ماهیان خاویاری، تخم یا خاویار آن‌هاست که ارزش فوق‌العاده آن

خصوصاً از نظر اقتصادی بر کسی پوشیده نیست. به‌همین دلیل کنترل نسبت جنسی در این گروه از ماهیان دارای اهمیت فوق العاده‌ای می‌باشد. بنابراین استفاده از روش‌های کم هزینه برای هدایت نسبت جنسی به سمت تولید جمعیت‌های با ارزش اقتصادی بیشتر در پرورش این گروه از ماهیان و از جمله ماهی ازون برون اهمیت به سزایی دارد (مکنت‌خواه و همکاران، ۱۳۹۱).

هورمون‌های استروئیدی از مهم‌ترین هورمون‌های جنسی محسوب می‌شوند، از این رو مطالعه استروئیدهای جنسی می‌تواند باعث سهولت توسعه روش‌های کنترل تولید مثل ماهیان گردد (So *et al*., 1985). استرادیول از مهم‌ترین هورمون‌های جنسی است که در پاسخ محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- گناد به‌منظور رشد گنادها و بلوغ، توسط فولیکول‌های تخمدانی تولید می‌شود (Nagahama, 1987). این هورمون از جمله هورمون‌های استروئیدی است که به‌صورت سنتتیک در دسترس بوده و در صنعت آبزی‌پروری با هدف ایجاد جمعیت‌های تک جنسی ماده استفاده می‌شود. به‌کارگیری این هورمون به‌صورت اضافه کردن به جیره غذایی و یا حمام هورمونی باعث القای ماده‌زایی در کپورماهیان، آزادماهیان، سیچلایدها، آنابانتئیدها و پوسیلیده‌ها شده است (Piferrer, 2001; Pandian and Sheela,1995). از سوی دیگر مطالعات نشان داده است که هورمون ۱۷-بتااستراديول با ارتباط متقابلی که با سایر هورمون‌های آندوکرینی دارد، تأثیرات مختلفی بر رشد سوماتیک، فعالیت‌های متابولیک کبد، رشد گنادی، صفات ثانویه جنسی و سیستم ایمنی می‌گذارد (Perersen *et al*., 1983; Malison *et al*., 1988; Kim *et al*., 1997). از اندام‌های بسیار حیاتی ماهیان که تحت تأثیر عملکرد این هورمون در بدن قرار می‌گیرد، خون است که علاوه بر این که حامل اکسیژن و غذا برای سلول‌ها می‌باشد، نقش اساسی در تقویت سیستم ایمنی ماهی ایفا می‌کند (Petersen *et al*., 1983; Malison *et al*., 1988; Kim *et al*., 1997).

اطلاعاتی در مورد تزریق هورمون ۱۷- بتااستراديول در ماهیان وجود ندارد. بنابراین این فرضیه ارائه شده است که روش تزریق ۱۷- بتا استرادیول می‌تواند جایگزین روش‌های قبلی بدون اثرات سوء بر رشد ماهی گردد. نظر به بلوغ زودرس ماهی ازون برون و تأکید بیشتر بر پرورش ماهیان ماده جهت تولید خاویار در سیستم‌های پرورش و با توجه به احتمال تأثیر هورمون ۱۷- بتااستراديول بر تغییر جنسیت و ایجاد جمعیت‌های ماده در ماهیان خاویاری، این مطالعه با هدف بررسی اثرات تزریق هورمون ۱۷- بتااستراديول بر تغییرات شاخص‌های خونی به‌عنوان یکی از منابع مهم فیزیولوژیک بدن در بچه ماهیان ازون برون انجام گردید.

مواد و روش‌ها

بچه‌ماهیان ازون برون (*Acipenser stellatus*) حاصل از تکثیر مصنوعی مولدین وحشی صید شده از دریای خزر در مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی به مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان دریایی شادروان دکتر یوسف‌پور از تابستان ۱۳۸۹ تا فروردین ۱۳۹۰ منتقل شدند. بدین منظور ۱۲۰ قطعه ماهی ازون برون جوان با میانگین وزنی ۱/۱ ± ۴۰/۹ گرم به طور تصادفی در ۶ تانک بتونی گرد و به تعداد ۲۰ قطعه در هر حوضچه توزیع شدند. برای انجام این مطالعه ۲ تیمار شامل تزریق با سرم فیزیولوژی به عنوان تیمار کنترل و تزریق با ۵ میلی‌گرم هورمون ۱۷- بتااستراديول به ازای هرکیلوگرم وزن بدن (Lord *et al*., 2009) و سه تکرار به ازای هر گروه آزمایشی در نظر گرفته شد. به منظور تهیه دوز تزریق، هورمون ۱۷- بتااستراديول (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA) در آزمایشگاه بر اساس وزن بدن ماهیان با ترازویی با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم توزین و سپس در سرم فیزیولوژی به میزان ۱ میلی‌لیتر به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن حل گردید و تا زمان تزریق در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. به منظور تزریق هورمون، ابتدا ماهیان در پودر گل میخک با دوز ۳۰۰ قسمت در میلیون بیهوش شدند. تزریق ماهیان با توجه به وزن بدن آنها با استفاده از سرنگ‌های انسولین و سرنگ ۲ میلی‌لیتری در طول دوره آزمایش انجام پذیرفت. سوسپانسیون هورمونی به حفره صفاقی ماهیان بیهوش شده (تقریباً بین اسکوت‌های ۴ و ۵ انتهایی) تزریق شد، بطوری‌که به ازای هر ۱۰ گرم وزن بدن ماهی ۰/۱ میلی‌لیتر محلول تزریقی در نظر گرفته شد. تزریق به ماهیان گروه شاهد فقط با سرم فیزیولوژی و بدون حضور هورمون صورت گرفت (Lord *et al*., 2009). شایان ذکر است که ۲۴ ساعت قبل تزریق،

غذادهی به بچه‌ماهیان متوقف شد. تزریق ماهیان (سرم فیزیولوژی یا هورمون استرادیول) هر سه هفته یکبار در طول ۶ ماه از مهر ۱۳۸۹ تا فروردین ۱۳۹۰ تکرار شد.

پس از ۷ ماه پرورش، در بررسی هماتولوژیک (CBC)، از هر مخزن ۵ قطعه ماهی به‌طور تصادفی صید و نمونه خون آن‌ها اخذ گردید. به‌منظور خون‌گیری از ماهی ابتدا ماهی در محلول ۳۰۰ قسمت در میلیون پودر گل میخک بیهوش شده و سپس با استفاده از سرنگ آغشته به هپارین از سرخرگ یا سیاهرگ ساقه دمی و از انتهای باله مخرجی، مقدار ۱ میلی‌لیتر خون اخذ گردید و به ویال‌های پلاستیکی درب‌دار شماره‌گذاری شده منتقل شد. شمارش گلبول سفید و قرمز توسط ملانژورهای گلبول سفید و قرمز، محلول رقیق‌کننده ریس و با استفاده از لام‌های نئوبار و هموسیتومتر انجام شد (Barcellos *et al*., 2004). اندازه‌گیری هموگلوبین (Hb) برحسب گرم در دسی‌لیتر و از روش سیان‌مت هموگلوبین، در طول موج ۵۴۰ نانومتر و پس از مخلوط‌سازی با محلول درابکین و نگهداری در تاریکی انجام شد (Valenzuela *et al*., 2006). اندازه‌گیری هماتوکریت (HCT) با روش لوله‌های میکروهماتوکریت و توسط میکروسانتریفوژ Hettich (ساخت کشور آلمان) با دور ۱۴۰۰۰دور در دقیقه و خط‌کش مخصوص انجام گرفت (Biswas *et al*., 2006). سایر اندیس‌های خونی شامل میانگین حجم گلبول‌قرمز (MCV) بر حسب فمتولیتر (fl) ، میانگین هموگلوبین گلبول‌قرمز (MCH) برحسب پیکوگرم (pg) و میانگین درصد غلظت هموگلوبین در گلبول قرمز (MCHC) از طریق روابط زیر محاسبه شدند (Klinger *et al*., 1996):

$MCV_{(fl)}$ = (هماتوکریت)/ (تعداد گلبول‌قرمز برحسب میلیون در میلی‌متر مکعب) × ۱۰

$MCH_{(Pg)}$ = (مقدار هموگلوبین)/ (تعداد گلبول‌قرمز برحسب میلیون در میلی‌متر مکعب) × ۱۰۰

$MCHC_{(\%)}$ = (هموگلوبین/ هماتوکریت) × ۱۰۰

داده‌های کسب شده حاصل از اندازه‌گیری پارامترهای خونی، پس از کنترل نرمال بودن، از طریق آزمون کولموگروف – اسمیرونو (Kolmogorov-Smirnov) به‌وسیله آنالیز واریانس یک‌طرفه مقایسه شدند و سپس با مشاهده اختلاف معنی‌دار، از طریق تست Tukey مقایسه میانگین داده‌ها، بین تیمارها و گروه شاهد در سطح اطمینان ۵ درصد و از طریق نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۳ صورت گرفت.

نتایج

نتایج به‌دست آمده از داده‌های هماتولوژیک، اثرات هورمون E_2 بر گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت را در ماهیان تزریق شده با ۵ میلی‌گرم هورمون ۱۷- بتااستراديول ثابت نمود به طوری که این دوز سبب افت شاخص‌های یاد شده در خون ماهیان شد. با توجه به آنالیز واریانس یک‌طرفه، اختلاف معنی‌دار بین تیمار کنترل و تیمار تزریق شده با ۵ میلی‌گرم هورمون E_2 در فاکتورهای فوق بدست آمد ($P<۰/۰۵$) (جدول ۱). بر طبق نتایج بدست آمده، بیش‌ترین میانگین تعداد گلبول‌های سفید در تیمار کنترل مشاهده گردید. با توجه به آنالیز واریانس یک‌طرفه اختلاف معنی‌دار آماری بین تیمار کنترل و تیمار تزریق شده با ۵ میلی‌گرم هورمون E_2 از لحاظ فاکتور فوق مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$) (جدول ۱). بررسی شاخص MCH در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مورد بررسی نشان داد ($P<۰/۰۵$). در حالی که شاخص‌های MCV، MCHC در تیمارهای مختلف بین گروه های مورد بررسی اختلاف معنی‌داری وجودنداشت ($P>۰/۰۵$) (جدول ۱).

جدول ۱: نتایج شاخص‌های هماتولوژیک در بچه‌ماهیان ازون برون (*Acipenser stellatus*) تیمارهای تغذیه شده با سطوح مختلف هورمون E_2.

	سطوح تزریقی E_2 (به ازای هرگیلوگرم وزن بدن)	
شاخص	صفر	۵ میلی گرم
گلبول سفید (تعداد در میلی‌مترمکعب)	۹۹۹۲± ۷۵۷/۳	۸۲۸۰ ± ۷۸۰/۵
گلبول قرمز (تعداد در میلی‌مترمکعب)	۵۲۸۶۶۷ ± ۶۹۴۹/۳[a]	۴۲۰۴۶۶/۷ ± ۴۷۴۵۹/۵[b]
هموگلوبین (میلی‌گرم بردسی‌متر)	۷ ± ۰/۱[a]	۵/۵ ± ۰/۶[b]
هماتوکریت (میلی‌گرم بردسی‌متر)	۲۹/۵ ± ۰/۵ [a]	۲۳/۳ ± ۲/۶[b]
MCV (فمتولیتر)	۵۵۸/۵ ± ۵/۴	۵۵۶/۵ ± ۵/۶
MCH (پیکوگرم)	۱۳/۳ ± ۰/۰۱[a]	۱۲/۹ ± ۰/۲[b]
MCHC (درصد)	۲۳/۹ ± ۰/۲	۲۳/۲ ± ۰/۴

مقادیر به صورت میانگین و n= ۱۵ بیان شده است. حروف متفاوت در هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی دار می‌باشد (P<۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

تزریق E_2 به ماهی باعث تغییرات قابل توجهی در شاخص‌های اصلی سیتولوژیک خون ماهی ازون برون شد. این تغییرات خصوصاً در مقادیر RBC، Hb، HCT وMCH به وضوح وجود داشت، به‌طوری‌که با تزریق با ۵ میلی‌گرم هورمون ۱۷- بتااستراديول به ازای هرکیلوگرم وزن بدن از مقادیر شاخص‌های مذکور کاسته شد. نتایج این بررسی مشابه مطالعه Schafhauser-Smith و Benfey (۲۰۰۳) روی قزل‌آلای دریاچه‌ای (*Salvelinus fontinalis*) بود. به‌طوری‌که درصد هماتوکریت و غلظت هموگلوبین در قزل‌آلای دریاچه‌ای که به مدت ۸ ماه از جیره‌ای حاوی ۳۰ میلی‌گرم استرادیول به ازای هر کیلوگرم جیره تغذیه کردند، به طور معنی‌داری از گروه شاهد کم‌تر بود. در بررسی مکنت‌خواه و همکاران (۱۳۹۱) بر روی ازون‌برون نیز نتایج مشابه بدست آمد. به‌طوری‌که با افزایش دوز به‌کارگیری هورمون استرادیول در مقادیر RBC، Hb و HCT کاسته شد.

در بین پارامترهای خونی غلظت هموگلوبین و درصد هماتوکریت به یکدیگر مرتبط هستند، به طوری‌که با کاهش غلظت هموگلوبین، درصد هماتوکریت نیز کاهش می‌یابد. کاهش غلظت هموگلوبین در ازون برون‌های تیمار شده با استرادیول ممکن است به دلیل کاهش غلظت آهن باشد. نتایج این بررسی با مطالعات انجام شده روی قزل‌آلای رنگین کمان و ماهی آزاد چام (*Oncorhynchus keta*)، لامپری (*Petromyzon marinus*) (Hara, 1976; Tsioros *et al*., 1996)، ماهیان طلایی (*Carassius auratus*)، کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (Wang and Belosevi, 1994; Watanuki *et al*., 2002) و ازون برون (مکنت‌خواه و همکاران، ۱۳۹۱) تطابق داشت.

مطالعات انجام شده نشان داده است که استروژن‌ها از تولید گلبول‌های قرمز جلوگیری می‌کنند (Pickering, 1986). بنابراین کاهش معنی‌دار تعداد گلبول‌های قرمز در ازون‌برون‌های تزریق شده با استرادیول ممکن است به این دلیل باشد، اما مکانیسم عمل آن هنوز ناشناخته است.

نتایج این مطالعه نشان داد در تیمار تزریق شده با ۵ میلی‌گرم هورمون ۱۷- بتااستراديول تعداد گلبول‌های سفید کاهش یافته اما اختلاف معنی‌دارآماری بین دو گروه مورد بررسی مشاهده نگردید. در بررسی مکنت‌خواه و همکاران (۱۳۹۱) بر روی ازون‌برون نشان داد که تغذیه طولانی‌مدت از جیره‌ای که دارای ۵۰ میلی‌گرم استرادیول می‌باشد، سیستم ایمنی ازون‌برون را کاهش می‌دهد، به‌طوری‌که در ماهیان تیمار سطح بالای استرادیول به‌طور معنی‌داری کمتر از دو گروه آزمایشی دیگر بود. نتایج این مطالعه با بررسی‌های انجام شده روی ماهیان طلایی

(*Carassius auratus*) و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) مطابقت دارد (Wang and Belosevi, 1994; Watanuki *et al*., 2002). در واقع افزایش دوز هورمون باعث تشدید آنمی در ماهیان تحت تغذیه با هورمون شد.

با این وجود شاخص‌های MCV و MCHC تفاوت قابل توجهی در تیمارهای مختلف نداشتند. به‌نظر رسید که ساختار سلول‌های خونی چندان تحت تأثیر هورمون‌های مورد استفاده قرار نگرفته است. نتایج این بررسی مشابه مطالعه مکنت‌خواه و همکاران (۱۳۹۱) بر روی ازون‌برون بود.

نتایج این مطالعه نشان داد که بیشتر شاخص‌های اصلی خون شامل تعداد گلبول‌های قرمز، میزان هماتوکریت و غلظت هموگلوبین تحت تأثیر میزان هورمون E_2 در ماهی ازون برون کاهش یافته، به‌طوری که کم‌خونی از نوع معمولی مشاهده می‌شود. به‌نظر می‌رسد محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- رشد و سایر محورهای فیزیولوژیک درگیر در سیستم خون‌سازی و ایمنی ماهی تحت تأثیر هورمون مذکور قرار گرفته است.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان و همچنین از همکاران پرتلاش در بخش آزمایشگاه مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان دریایی دکتر یوسف پور سیاهکل آقایان وهابی، کریمی و قدمی سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

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

مکنت خواه، ب.، خارا، ح.، فلاحتکار، ب. و عفت‌پناه، ا.، ۱۳۹۱. اثر تغذیه‌ای هورمون ۱۷- بتا استرادیول بر تغییرات هماتولوژیک ماهی ازون برون جوان (*Acipenser stellatus*). مجله شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزادشهر، سال ششم، شماره چهارم، صفحات ۲۲-۱۳.

Barcellos, L. J. G., Kreutz, L. C., Souza, C. D., Rodigues, L. B., Fioreze, I., Quevedo, R. M., Cericato, L., Soso, A. B., Fagundes. M., Conrad, J., Lacerda, L. D. A. and Terra, S., 2004. Hematological changes in jundia (*Rhamdia quelen* Quoy end Gaimard imelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. Aquaculture, 237**:** 229-236.

Biswas, A. K., Seoka, M., Takii, K., Maita, M. and Kumai, H., 2006. Stress responses of red sea bream (*Pagrrus major*) to acute handling and chronic Photoperiod manipulation. Aquaculture, 225: 556-572.

Hara, A., 1976. Iron-binding activity of female-specific serum Proteins of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and chum salmon (*Oncorhynchus keta*). Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 427: 549–557.

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.

Klinger, R. C., Blear, V. S. and Echevarria, C., 1996. Effect of dietary lipid on the hematology of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Aquaculture, 147: 225–233.

Lord, L. D., Bond, J. and Thompson, R. R., 2009. Rapid steroid influences on visually-guided sexual behavior in goldfish. Hormones and Behaviour, 56(5): 519-526.

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 fla*vescens) treated with estradiol-17β. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 45: 1942–1948.

Nagahama, Y., 1987. Gonadotropin action on gametogenesis and steroidogenesis in teleost gonads. Zoological Sciences, 4: 209–222.

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

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

Pickering, A. D., 1986. Changes in blood cell composition of the brown trout, *Salmo trutta* L., during the spawning season. Journal of Fish Biology, 29: 335–347.

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

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.

So, Y., Idler, D. R., Truscott, B. and Walsh, J. M., 1985. Progesteron and androgens and their glucuronides in the terminal stages of oocyte maturation in Atlantic salmon. Steroid Biochemistry, 23: 583-891**.**

Tsioros, K. K., Holmes, J. A. and Youson, J. H., 1996. Origin of iron in sea lamprey, *Petromyzon marinus*, tissues during embryogenesis and early larval life. Candian Journal of Zoology, 74: 2206–2210.

Valenzuela, A. E., Silva, V. M. and Klempau, A. E., 2006. Effect of constant light on hematological Parameters of cultured Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Peripheral blood erythrocytes. Aquaculture, 251: 595-602.

Wang, R. and Belosevic, M., 1994. Estradiol increases susceptibility of goldfish to *Trypanosoma danilewskyi*. Development and Comparative Immunology, 18: 377–387.

Watanuki, H., Yamaguchi, T. and Sakai, M., 2002. Suppression in function of Phagocytes' cells in common carp *Cyprinus carpio* L. injected with estradiol, Progesterone or 11-ketotestosterone. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 132: 407–413.