روش‌های مختلف بکارگیری هورمون LHRHa در تکثیر خارج از فصل جنس نر ماهی قرمز (Carassius auratus, Linnaeus 1758)

احسان احمدی فر[1*]، محمدرضا ایمانپور[1]، کوروش امینی[2]، وحید زادمجید[3]، طیبه عنایت غلامپور[4]

۱. گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۲. مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آبهای داخلی گرگان، گرگان، ایران
۳. گروه شیلات، دانشگاه کردستان، صندوق پستی ٤١٦، کردستان، ایران
٤. دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ٣٦٩٧-١٩٣٩٥ ، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۹/۱۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۰۲)

چکیده

این پژوهش به منظور ارزیابی اثرات روش‌های مختلف ایمپلنت و تزریق LHRHa روی برخی خصوصیات زیست شناختی منی شامل تراکم اسپرم، درصد اسپرماتوکریت، پی اچ و طول دوره تحرک اسپرم در طی اسپرمیشن، حجم اسپرم دهی در طی دوره ۲۱ روز بعد از تیمار و تغییرات هورمون تستوسترون در روزهای بعد از ایمپلنت و تزریق (اسپرمیشن، ۷، ۱۴ و ۲۱) روز بعد از تیمار در ماهی مولد نر ماهی قرمز در خارج از فصل تکثیر انجام شد. ۴ تیمار شامل: تزریق LHRHa، EVAc، پلت کلسترولی و تیمار شاهد در نظر گرفته شد. تراکم اسپرم در بین تیمارها تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشت ($P \geq ۰,۰۵$). بالاترین درصد اسپرماتوکریت در تیمارهای EVAc و تزریق LHRHa مشاهده شد ($P \leq ۰,۰۵$). ایمپلنت EVAc بطور معنی داری سبب افزایش حجم اسپرم دهی در مقایسه با سایر تیمارها در طی ۲۱ روز بعد از تیمار شد ($P \leq ۰,۰۵$). طول دوره تحرک بطور معنی داری در تیمار EVAc نسبت به سایر تیمارها بالاتر بود ($P \leq ۰,۰۵$). بین pH در تیمارهای مختلف یا گروه شاهد (تزریق سرم فیزولوژی) تفاوت معنی داری مشاهده شد به طوری که پایین ترین میزان در تیمار شاهد مشاهده شد($P \leq ۰,۰۵$). تغییرات هورمون تستوسترون در طی اسپرمیشن در تیمارهای EVAc و تزریق LHRHa تفاوت معنی داری نسبت به سایر تیمارها داشت ($P \leq ۰,۰۵$)، و در روزهای ۷،۱۴ و ۲۱ روز بعد از تیمار به تدریج مقدار این هورمون در سرم خون مولدین نر ماهی قرمز کاهش یافت. نتایج نشان داد استفاده از هورمون LHRHa به روش EVAc تاثیر معنی داری روی برخی ترکیبات منی، اسپرمیشن و افزایش هورمون تستوسترون در طی اسپرمیشن در تکثیر خارج از فصل ماهی مولد نر قرمز دارد.

کلیدواژگان

تستوسترون، پارامترهای اسپرم شناختی، پلت کلسترولی، EVAc (کوپلیمر اتیلن وینیل استات)، ماهی قرمز.

* نویسنده مسئول، رایانامه: ehsan.ahmadifar@gmail.com

مقدمه

در سه دهه گذشته GnRHa-delivery systems به کار گرفته شده در انواع مختلفی از ماهیان وحشی و پرورشی، که کاربرد آنها سبب افزایش سطوح LH، همزمانی در اوولاسیون، FOM، زیاد شدن زرده سازی، کیفیت تخم، تخم ریزی و بازماندگی لارو در ماهیان ماده و همچنین تغییرات استروئیدهای جنسی شده و در نرها هم سبب پیشرفت در اسپرمیشن، افزایش میلت، تولید اسپرماتوزوآ و افزایش تحرک اسپرم بوسیله افزایش تولید پلاسمای سمینال شده است (۲۱). همچنین مدیریت مولدین نر در بسیاری از گونه های ماهیان بستگی به مورفولوژی گناد و فیزولوژی تولید اسپرم در آن ماهی دارد (۳).

دستکاری فرایندهای تولید مثلی می تواند با انواع تیمارهای هورمونی صورت گیرد (۲۱). به عنوان مثال، نشان داده شده که هورمون سنتتیک LHRHa پتانسیل زیادی در تحریک اوولاسیون و اسپرمیشن در تعداد زیادی از ماهیان استخوانی دارد (۳۶ و ۱۸). همچنین هورمون LHRHa مزایایی از جمله (۱): دکاپپتیدهای کوچکی هستند که به سیستم ایمنی آسیب نمی رسانند و می توانند بدون کاهش کارایی بارها و بارها استفاده شوند (۲): در ماهیانی که در مراحل رسیدگی پایینتری قرار دارند، سبب آزاد سازی LH برای غلبه بر اختلال غدد درون ریز می شود تا رسیدگی نهایی اووسیت و اوولاسیون را افزایش دهد (۳): در یک سطح بالاتری از محور HPG عمل می کند و یک تحریک متعادل تری از رویدادهای تولید مثلی ارائه می‌دهد (۴): در فرم خالص سنتز می شود و (۵): می‌توان بطور موفقیت آمیز در طیف گسترده ای از ماهیان استفاده کرد (۲۱). همچنین تیمارهای LHRHa سبب یک افزایش کوتاه مدتی در سطوح استرادیول و تستوسترون پلاسما در ماهیان می شوند (۱۰، ۲۳ و ۳۰).

ماهی قرمز (*Carassius auratus*) از خانواده کپور ماهیان (Cyprinidae) می باشد و به لحاظ شرایط زیستی و تغذیه ای شبیه کپور معمولی می باشد (۳). تکثیر و پرورش ماهی قرمز به منظور تامین ماهی کوچک مورد نیاز سر سفره هفت سین نوروزی و اهداف تحقیقاتی چندین سال است که رونق یافته و نیاز به آن هر سال بیشتر احساس می شود (۱). این ماهی به طور گسترده در مطالعات تولید مثلی و کنترل هورمونی مورد استفاده قرار می گیرد (۶).

تیمارهایی هورمونی با استفاده از روش تزریق، بطور موفقیت آمیزی تا کنون برای کنترل تکثیر ماهیان استفاده گردیده اما وجود مشکلاتی در این روش‌ها اعم از (۱) ماهیان باید در مراحل پیشرفته ای از توسعه هورمونی در زمان تیمار باشند (۲) برای پاسخ موفق از سوی ماهیان در زمان تیمار، اغلب دو بار کاربرد هورمون لازم است در نتیجه ماهیان بطور زیادی دستکاری می‌شوند که این عمل باعث وارد آمدن استرس زیادی به آنها می‌شود (۱۵) بنابراین نیاز داریم برای تحریک رسیدگی جنسی در ماهیان از تکنولوژی-هایی استفاده کنیم که کمترین جابجایی و دستکاری ماهی را انجام دهیم.

توسعه روشهای فارماکولوژیکال برای تحریک رسیدگی در ماهیان اولین بار توسط پرفسور هوسای که برنده جایزه نوبل فیزولوژی در سال ۱۹۷۴ شد انجام شد. در صنعت آبزی پروری توجه به کیفیت تخم یا لارو نسبت به اسپرم بیشتر می باشد این در حالی است که کیفیت هر دو گامت (اسپرم و تخمک) روی موفقیت لقاح و بقای لاروها موثر می باشد (۲۶).

عوامل محیطی مانند فصل، دما، شوری، تغذیه و کیفیت آب بر کیفیت اسپرم از لحاظ فیزولوژیکی و بیوشیمیایی تاثیر می گذارد (۸). محققین دریافتند استفاده از روشEVAc و میکروسفری در Striped bass سبب افزایشLH پلاسما شد. همچنین این ایمپلنت‌ها سبب افزایش استروئیدهای پلاسما و رسیدگی اسپرم

در این ماهی شد بطوری که حجم میلت ۲ روز بعد از تیمار کردن با ایمپلنت افزایش یافت. سیستم های GnRHa-deliveryنشان دادند علاوه بر کارایی داشتن در تحریک اوولاسیون و تولید اسپرم در زرده سازی و مراحل اولیه اسپرماتوژنز تاثیر می گذارند (۲۱). محققین گزارش کردند که استفاده از روش ایمپلنت برای انتقال GnRHa در ماهی باس دریایی (Dicentrarchus labrax) تولید اسپرم را برای ۲۷ روز بدون تغییر غلظت اسپرم، درصد اسپرم متحرک و توانایی لقاح اسپرماتوزوآ افزایش داد (۲۵). مشکل پروتکل‌های تزریق LHRHa ماندگاری کم این هورمون در چرخه تولید مثلی می باشد. ایمپلنت ها به نحوی طراحی شده اند که هورمون LHRHa را برای یک دوره چندین هفته ای به آرامی رها می کنند (۳۶).

با استفاده از کنترل شرایط محیطی مانند دما و دوره نوری می توان فرایند گامتوژنز در مولدین را تحت کنترل در آورد و در هر زمان از سال که نیاز باشد، اقدام به تولید تخمک، اسپرم و یا لارو نمود (۴). از طرفی اندازه گیری سطوح هورمون های جنسی در سرم ماهیان استخوانی شاخص مناسبی جهت بررسی روند رشد و تکامل تخمدان محسوب می شود (۱۹). در مقاله حاضر از روشهای ایمپلنت (EVAc و پلت های کلسترولی) و تزریق LHRHa همراه با تغییرات دمایی و نوری برای تحریک اسپرمیشن و تغییرات هورمون تستوسترون در تکثیر خارج از فصل ماهی قرمز استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه و توزین ماهی‌ها

تعداد ۳۰۰ ماهی مولد قرمز با میانگین وزن ۵/۴۶ +۶۷/۶ گرم و مولدین ماده با میانگین وزنی ۷۲/۲+۶/۱۲ از مرکز پرورش ماهیان آکواریومی در گرگان در سال ۱۳۹۲ گرم تهیه شدند. ماهیها در تانکهای فایبرگلاس (۱ متر قطر، ۰/۵ متر عمق) قرار گرفتند. میانگین فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب بدین شرح بود: (پی اچ : ۷/۵۲+۰/۶ ، اکسیژن محلول: mg/l ۷/۷+۰/۲، سختی کل : mg/l ۲۸۸+۱۳) و در شرایط ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی در پژوهشکده دانشگاه منابع طبیعی و علوم کشاورزی گرگان تا شروع آزمایش نگهداری شدند. ماهیان به میزان ۳٪ وزن بدن با غذاهای مخصوص ماهی قرمز (انرژی، تایلند) تغذیه شدند، سپس ماهیان نر و ماده در آکواریوم های ۶۵ لیتری مجهز به سیستم تنظیم کننده نوری و دمایی قرار گرفتند. در ابتدا یک کمون سرمایی ۱۰ درجه سانتی گراد با استفاده از کاهش دمایی به صورت مرحله ای و به میزان حداکثر ۲ درجه سانتی گراد در روز اعمال گردید. همزمان با کاهش دما، نور نیز با دامنه ۸ ساعت روشنایی و ۱۶ ساعت تاریکی با استفاده از کاهش تدریجی ۱۵ دقیقه در روز، تنظیم گردید (۳۵). ماهیان به مدت ۱۰ روز در شرایط ذکر شده نگهداری شدند. پس از پایان دوره کمون سرمایی، به منظور تحریک اوولاسیون درجه حرارت آب با استفاده از افزایش تدریجی به میزان حداکثر ۲ درجه سانتی گراد در روز، به حدود ۲۲ درجه سانتی گراد افزایش داده شد (۳۳). همزمان با افزایش درجه حرارت دوره نوری نیز با استفاده از افزایش تدریجی ۱۵ دقیقه در روز، به دامنه ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی تغییر داده شد. ماهیان به مدت ۲ هفته در شرایط ذکر شده نگهداری شدند (۱). تنظیم دوره نوری و درجه حرارت به ترتیب توسط لامپ‌های فلورسنت ۲۰ واتی متصل به یک زمان سنج دیجیتالی و یخچال مجهز به سیستم گرمایی (هیتر) صورت گرفت.

برای آماده سازی ایمپلنت ها از هورمون LHRHa، آلبومین سرم گاوی و اینولین (سیگما، آلمان)، اتیلن

وینیل استات، کلسترول، گلوکز، کره کاکائو و ... و بر طبق روش ارائه شده توسط سایر محققین انجام شد (۲۲ و ۲۷).

تزریق و ایمپلنت ماهی قرمز

ماهیها با ۱۵ppm عصاره گل میخک بیهوش شدند، سپس تزریق و ایمپلنت در تیمارها: (تزریق با سرم فیزیولوژی ۰/۷٪ ، EVAc شامل ۲۰ میکروگرم/ کیلوگرم وزن بدن LHRHa با ۴۰ میکرو گرم /کیلوگرم وزن بدن متوکلوپرماید، پلت‌های کلسترولی شامل ۲۰ میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن LHRHa با ۴۰ میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن متوکلوپرماید و تزریق ۱۰۰ میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن LHRH با ۴۰ میکروگرم / کیلو گرم وزن بدن متوکلوپرماید) صورت گرفت. در گروه شاهد LHRH تزریق بصورت داخل صفاتی، اما در تیمارهای ایمپلنت، ایمپلنتها با دستگاه ایمپلنتر بصورت داخل عضلانی انجام شد. هر گروه از تیمارها شامل ۱۰ عدد ماهی ماده بود. از متوکلوپرماید (موسسه رازی، تهران) هم به عنوان یک آنتی دوپامین در این مطالعه در هر تیمار استفاده شده بود.

روش اندازه گیری هورمون تستوسترون

خون گیری مولدین توسط سرنگ از ناحیه ساقه دمی صورت گرفته و به محفظه های حاوی مواد ضد انعقاد خون (CBC) منتقل و پس از انتقال لوله های CBC به آزمایشگاه، با استفاده از سانتریفیوژ نمودن آنها پلاسمای خون استخراج شد و توسط جعبه یونولیت حاوی یخ به آزمایشگاه شیمی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انتقال داده شد، در ادامه نمونه ها در فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد جهت آنالیز هورمونی نگهداری گردید. هورمون تستوسترون با دستگاه الایزا ریدر و سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر و رسم منحنی های مخصوص مقادیر هورمون ها سنجیده شد (۱۴).

جدول ۱- تیمارهای آزمایشی، تعداد ماهیان هر تیمار، مواد و دوز مصرفی آن برحسب میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن

تیمارها	تعداد ماهیان	موادمصرفی	دوز مواد مصرفی
شاهد	۱۰	سرم فیزیولوژی(۰/۷٪)	۱۰۰ میکروگ
تزریق LHRHa	۱۰	LHRHa + متوکلوپرماید	۱۰۰میکروگرم+ ۱۰۰ میکروگرم
پلت های کلسترولی	۱۰	پلت های کلسترولی+ متوکلوپرماید	۲۰میکروگرم+ ۱۰۰ میکروگرم

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده به دست آمده در قالب طرح کاملا تصادفی و با استفاده از نرم افزار SPSS و بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ انجام پذیرفت.

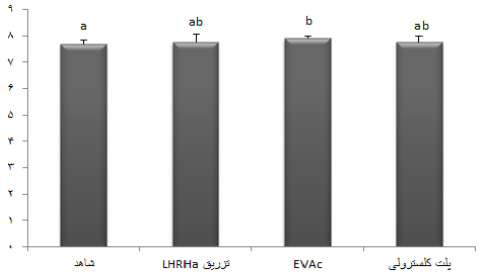
نتایج

پارامترهای اسپرم شناختی منی ماهی قرمز نر در شکلهای ۱،۲،۳،۴،۵،۶ نمایش داده شده است.

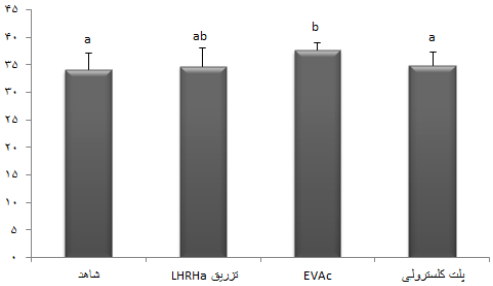
نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میانگین PH در تیمارهای مختلف در شکل ۱ نشان داد که بین PH در تیمارهای مختلف اختلاف معنی داری وجود داشت ($P\leq 0/5$)، به گونه ای که در تیمار سوم (EVAc) بالاترین PH مشاهده شد. همانگونه که در شکل ۲ مشاهده می شود بین اسپرماتوکریت در تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز اختلاف معنی داری وجود داشت ($P\leq 0/5$)، به گونه ای که درصد اسپرماتوکریت در تیمارهای سوم (EVAc) و دوم (تزریق LHRHa) به ترتیب نسبت به سایر تیمارها بالاتر بود.

همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود بین طول دوره حرکت در تیمارهای مختلف مولدین نر ماهی قرمز اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P≤۰/۵)، به گونه‌ای که طول دوره تحرک در تیمار سوم (EVAc) نسبت به سایر تیمارها بالاتر بود. تغییرات هورمون تستوسترون در شکل ۴ نشان داده شده است، این شکل نشان می‌دهد مقدار این هورمون طی اسپرمیشن در تیمارهای تزریق LHRHa و EVAc تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها داشته و در زمان‌های ۷، ۱۴ و ۲۱ مقدار این این هورمون به تدریج کاهش یافت. نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میانگین تراکم اسپرم بین تیمارهای مختلف مولدین ماهی نر قرمز در شکل ۵ نمایش داده شده است. همانگونه که در شکل مشاهده می شود بین تراکم اسپرم در تیمارهای مختلف اختلاف معنی داری وجود نداشت (P≥۰/۵).

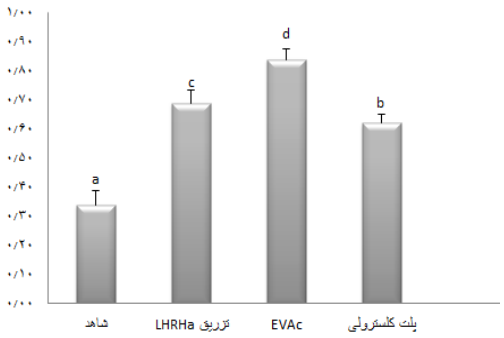
نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میانگین حجم اسپرم بین تیمارهای مختلف در طی ۲۱ روز پس از تیمار در شکل ۶ نشان داده شده است، همانگونه که در شکل مشاهده می‌شود بین حجم اسپرم بین تیمار سوم (EVAc) و سایر تیمارها اختلاف معنی داری وجود داشت (P≤ ۰/۵).



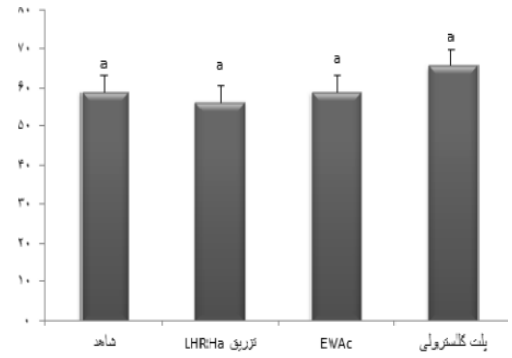
شکل ۱- پی-اچ مایع منی در تیمارهای مختلف



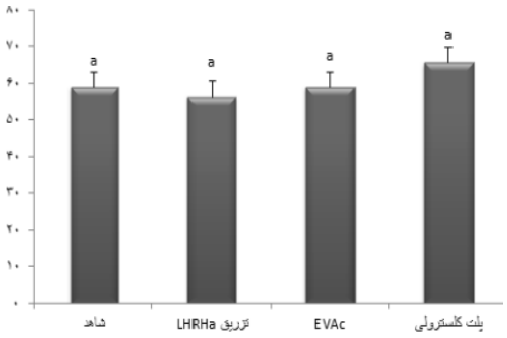
شکل ۲- اسپرماتوکریت در تیمارهای مختلف



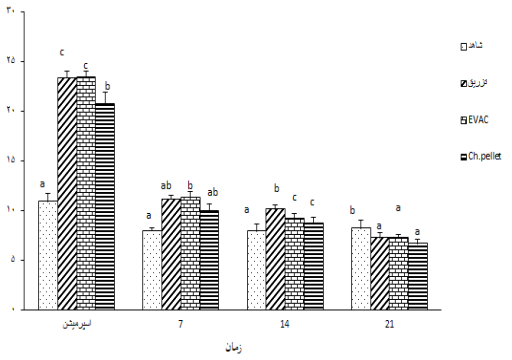
شکل ۳- طول دوره تحرک اسپرم در تیمارهای مختلف



شکل ٤- مقدار تستوسترون در تیمارهای مختلف



شکل ۵- تراکم اسپرم در تیمارهای مختلف



شکل ۶- حجم اسپرم دهی در زمانهای مورد بررسی در تیمارهای مختلف

بحث

تحقیق حاضر به منظور بررسی تاثیر بکارگیری هورمون LHRHa در تکثیر خارج از جنس نر ماهی قرمز (*Carassius auratus*) انجام شد. تزریق LHRHa و بخصوص ایمپلنت EVAc برای تکثیر خارج از فصل ماهی قرمز (*Carassius auratus*) موفقیت آمیز بود. از مزایای ایمپلنت این است که فقط یک جابجایی در مولدین انجام می شود و این سبب وارد آمدن استرس کمتر می شود در حالی که در روشهای تزریق نیاز به ۲ تزریق داریم و طبیعتا استرس بیشتری به مولدین وارد می شود (۲۲). LHRHa سبب تحریک، آزاد سازی گنادوتروپین‌ها، هورمون LH، FOM، اوولاسیون و اسپرمیشن می شود (Mylonas et al., 2010). همچنین فعالیتهای LHRHa در یک سطح بالاتری از گناد-هیپوفیز-هیپوتالاموس انجام می‌شود که می‌تواند تحریک بالانس شده بیشتری از رویدادهای تولید مثلی فراهم کند و بطور مستقیم و غیر مستقیم روی رها سازی هورمون های دیگر اثر میگذارد (۷). در تحقیق حاضر پارامترهای کیفی اسپرم در ۴ تیمار متغیر بود. تراکم اسپرم در مایع سمینال عموما برای ارزیابی کیفیت اسپرم استفاده می شود. تخمین صحیح غلظت اسپرم برای بسیاری از آزمایشات در رابطه با لقاح ماهی و نگهداری اسپرم ضروری است (۲۶). در تحقیق حاضر تفاوت معنی داری بین تیمارها از لحاظ تراکم اسپرم مشاهده نشد (شکل ۵). در مطالعه حاضر درصد اسپرماتوکریت در تیمارهای تزریق LHRHa و EVAc نسبت به سار تیمارها بود (شکل ۲)، تغییرات غلظت اسپرماتوکریت در بین گونه های مختلف متفاوت است، از طرفی برخی محققین گزارش کردند که استفاده از ایمپلنت EVAc سبب کاهش میزان اسپرماتوکریت در کفشک ماهی (*Hipoglossus hipoglossus*) گردید (۳۱). همچنین بطور مشابهی در North Sea plaice که GnRHa لود شده بود روی پلت های میکروسفری اگر چه افزایش یافت میزان پلاسمای سمینال اما سبب کاهش در میزان اسپرماتوکریت شد (۱۳). پی- اچ یکی از پارامترهای مهم فعال کننده اسپرم در گونه های ماهیان است که روی قابلیت لقاح اسپرم تاثیر می گذارد (۵). همبستگی مثبت و معنی داری بین پی-اچ مایع سمینال و طول دوره تحرک اسپرم وجود دارد (۲ و ۳۲). در تحقیق حاضر پی-اچ مایع سمینال در تیمار EVAc برابر با ۸/۱ و در تزریق LHRH برابر با ۸ بود که نسبت به گروه شاهد (۷/۸) بالاتر بود. که با مطالعات صورت گرفته توسط کلیر واتر و کرایم (۱۹۹۸) همخوانی دارد، مطالعات این محققین بر روی ماهی فلاندر زرد (*Pleuronectes ferrugineus*) نشان دادند که پی- اچ مایع سمینال و طول دوره تحرک در این ماهی در اثر استفاده از ایمپلنت GnRHa افزایش یافت. طول دوره تحرک به عنوان شاخص کیفی اسپرم مطرح می باشد و فاکتورهای متعددی مانند غلظت یون (سدیم، پتاسیم، کلسیم و منیزیم) ، فشار اسمزی، درجه حرارت، پی-اچ، نسبت رقیق سازی و پارامترهای درون سلولی روی طول دوره تحرک اسپرم اثر گذارند (۲). در تحقیق حاضر، طول دوره تحرک در تیمارهای مختلف تفاوت معنی داری را نشان داد بطوریکه در تیمار EVAc نسبت به سایر تیمارها بالاتر بود، این نتایج با مطالعه کلیر واتر وکرایم (۱۹۸۸) همخوانی داشت که نشان داد استفاده از ایمپلنت GnRHa سبب افزایش تولید اسپرم شده برای ۲۹ روز بدون اثر گذاری روی چگالی اسپرم، اما بطور معنی داری درصد اسپرم متحرک و طول دوره حرکتی را در ماهی فلاندر زرد (*Pleuronectes ferrugineus*) بهبود بخشید. همچنین محققین دریافتند که طول دوره تحرک اسپرم در ماهیان شاهد و ایمپلنت شده بعد از بکارگیری ایمپلنتGnRHa در ماهی تون اقیانوس اطلس تفاوت معنی داری نداشت (۲۲). به طور کلی تحقیقات

مختلف روی انواع گونه های ماهیان به منظور تاثیر روش های تزریق GnRHa روی حجم اسپرم دهی صورت گرفت است.

لویس ماریا گارسیا (۱۹۹۱) نشان داد که استفاده از روش تزریق LHRHa سبب افزایش حجم اسپرم در ماهی (*Siganus gultatus*) rabbit fish شد. دابروسکی و همکاران (۱۹۹۴) گزارش دادند تزریق LHRHa همراه با پیموزاید در تکثیر خارج از فصل در ماهی سوف (*Perca flavescens*) سبب افزایش حجم اسپرم در این ماهی شد. همچنین Takashima et al (1984) گزارش کرد که استفاده از آنالوگ LHRHa سبب افزایش حجم اسپرم در ماهی کپور شد. همچنین Kestemont (1989) نشان داد استفاده از میکروگرم LHRHa به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در این ماهی در ترکیب با پیموزاید سبب شد افزایشی در حجم اسپرم در ماهی (*Gobio gobio*) دیده نشود.

بطور کلی در ماهیان نر استفاده از تزریق یکباره LHRHa اثرات مثبتی روی اسپرمیشن دارد اما فقط برای چند روز این می تواند مفید باشد برای ماده هایی که در طول سال چند بار ریپ می شوند، نیاز داریم به اسپرم بیشتر و تولید اسپرم بیشتر در طول سال تا داشته باشیم یک تخم ریزی کارآ و تکثیر موفق هو و همکاران (۲۰۱۵) روشهای مختلف افزودن LHRHa (تزریق و ایمپلنت) را روی اسپرمیشن ماهی نر *Epinephelus akaara* ارزیابی کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که کل میزان حجم اسپرم دریافتی در تیمارهای ایمپلنت بطور معنی داری افزایش داشت در مقایسه با سایر تیمارها بدون تغییر در غلظت و کیفیت اسپرم (تراکم و طول دوره تحرک) در این مطالعه آنها دریافتند تا ۴۰ روز بعد از تیمار کل میزان حجم اسپرم دریافتی در تیمارها بررسی شد که بدین صورت بود ایمپلنت>تزریق>شاهد.

نوسانات در حجم اسپرم ممکن است در نتیجه متغیر بودن مراحل رسیدگی جنسی بین مولدین نر، روشهای بکارگیری هورمون (۲۴) و شرایط متفاوت محیطی و خصوصیات بیولوژیکی مولدین باشد (۲۶). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که استفاده از تیمار ایمپلنت EVAc سبب افزایش حجم اسپرم دریافتی از ماهی تا ۲۱ روز بعد از تیمار داشت که با نتایج فوق همخوانی داشت.

سنجش استروئیدهای جنسی همراه با شاخص گنادوسوماتیک در بررسی سیکل تولید مثلی استفاده و به نوعی کلید شناسایی مراحل تکامل گناد هستند (۱۲). در تحقیق حاضر هورمون تستوسترون در تیمارهای تزریق LHRHa, EVAc و پلت کلسترولی میزان آن بعد از اسپرمیشن کاهش یافت. در واقع کاهش هورمون تستوسترون پس از اسپرمیشن با کاهش درجه حرارت آن مطابق بود.

محققین نشان دادند استفاده از تزریق LHRHa برای تکثیر خارج از فصل ماهی سوف (*Perca flavescens*) سبب افزایش هورمون تستوسترون تا ۴۸ ساعت بعد از تزریق شد و سپس کاهش یافت (۱۱) که با نتایج مطالعه ما همخوانی داشت. همچنین ارتباط مثبت و معنی داری بین شاخص گنادوسوماتیک و سطح هورمون تستوسترون در ماهیان نر ماهی باس دریایی در اثر استفاده از ایمپلنت GnRHa دیده شد.

در مولدین ماهی قرمز نر (*Carassius auratus*) پلتهای کلسترولی نشان دادند که در تحریک اسپرم ریزی اثرات ضعیف تری دارند در مقایسه با روش EVAc و تزریق LHRHa که این میتواند به نسبت سلولز وکلسترول استفاده شده در ساخت پلتهای کلسترولی که سبب آزاد سازی آرام این هورمون در بدن ماهی شده بستگی داشته باشد. در بسیاری از گونه های ماهیان ، دما به عنوان یک فاکتور مهم برای توسعه گنادی، تکثیر و تخم ریزی خارج از فصل به حساب می آید. دما به عنوان یک فاکتور تنظیم کننده روی ساختار استروئیدهای جنسی نقش دارد (۱۷).محققین گزارش کردند که ماهی قرمز وقتی که

دمای آن به حدود ۲۰ درجه سانتی گراد برسد، یا ماهی از آب سرد به آب گرم انتقال داده شود، اوولاسیون در عرض چند روز اتفاق می افتد (۲۸). محققین گزارش کردند دستکاریهای دمایی و نوری همراه با تزریق اوواپریم سبب تکثیر خارج از فصل در ماهی قرمز (*Carassius auratus*) می‌گردد (۳۴). نتایج تحقیق حاضر نشان دادن روش ایمپلنت EVAc برای انتقال هورمون LHRHa در تکثیر خارج از فصل ماهی قرمز به عنوان یک گونه مدل بسیار مناسب است. در شرایط طبیعی، تخم ریزی ماهی قرمز در فصل بهار و در درجه حرارت بالای ۲۰ درجه سانتی گراد صورت می پذیرد، ولی در صورتی که مولدین رسیده در دمای ۱۲ درجه سانتی گراد نگهداری شوند، از تخم ریزی آنها ممانعت شده و میتوان در خارج از فصل تکثیر با افزایش درجه حرارت و تنظیمات نوری مولدین را به اسپرم‌ریزی و تخم‌ریزی تحریک نمود (۳۳). در مطالعه حاضر، ماهی قرمز توسط تغییر شرایط محیطی (درجه حرارت و نور) و استفاده از تیمارهای هورمونی ذکر شده تکثیر گردید.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله نگارندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی را از مسئولین محترم سالن آبزی پروری و آزمایشگاه ماهی شناسی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان اعلام میدارند.

منابع و مآخذ

۱. ایمانپور، م.ر. و کمالی، ا.، ۱۳۸۵. بررسی تکثیر مصنوعی و پرورش لاروهای ماهی قرمز (*Carassius carassius gibelio*) توسط HCG، مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، سال (۱۳)، شماره (۲).

۲. زاد مجید، و. ایمانپور، م.ر. سوداگر، م. شعبانی، ع.، ۱۳۸۶. مقایسه اثرات تزریق هورمون های GnRHa، HCG و عصاره هیپوفیز روی پارامترهای اسپرم شناختی در ماهی قرمز (*Carassius auratus gibelio*)، مجله علوم کشاورزی گرگان، جلد ۱۵، شماره اول.

۳. وثوقی، ع. و مستجیر، ب.، ۱۳۸۳. ماهیان آب شیرین. انتشارات دانشگاه تهران ۳۱۷ صفحه.

4. Aida, K., 1988. A review of plasma hormone changes during ovulation in cyprinid fishes. Aquaculture. 74, PP: 11-21.
5. Alavi, S.M.H., and Cosson, J., 2006. Sperm motility in fish. (II) Effects of ions and osmolality: A review. 30, PP: 1-14.
6. Alavi, S.M.H, Cosson, J., Coward, K., and Rafiee, G., 2008. Fish spermatology Alpha Science Ltd, Oxford, p 465.
7. Billard, R., and Breton, B., 1987. Rhythms of reproduction in teleost fish. In Rhythmic Activity of Fishes (J. E. Thorpe, ed.), Academic PRESS, New York. PP: 31-53.
8. Billard, R., Cosson, J., Crim, L.W., Suquet, M., 1995. Perm physiology and quality, In: Bromage, N.R., Roberts, R.J. (Eds.) Broodstock Management and Egg and Larval Quality, Blackwell, Oxford, PP: 25-52.
9. Bjerselius, R., Olsen, K.H., Zheng, W., 1995. Endocrine gonadal and behavioural responses of male crucian carp to the hormonal pheromone 17α, 20βdihydroxy-4pregnen-3-one. Chemical Senses. 20, PP: 221-230.
10. Chatakondi, N., Roger Yant, D., and Kristanto, A., 2011. The Effect of Luteinizing Hormone Releasing Hormone Analog Regime and Stage of Oocyte Maturity for Induced Ovulation of Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*. Journal of the World Aquaculture Society. 42, PP: 845-853.
11. Ciereszko, A., 2008. Chemical composition of seminal plasma and its physiological relationship with sperm motility, fertility, capacity and cryopservation in fish. In: Alavi, S.M.H, Cosson, Coward, K, Rafiee, G. (eds) Fish spermatology. Alpha Science Ltd, Oxford. PP: 215-240.
12. Clearwater, S.J., and Crim, L.W., 1998. Gonadotropin releasing hormone-analogue treatment increases sperm motility, seminal plasma pH and sperm production in yellowtail flounder *Pleuronectes ferrugineus*, Fish Physiol. Biochem. 19, PP: 349-357.
13. Crim, L.W., and Evans, D.M., 1983. Influence of testosterone and/or LHRHa on precocious sexual development in the juvenile rainbow trout. Reprod. 29-137-142.
14. Dabrowski, K., Ciereszko, A., 1994. Proteinase inhibitor (s) inseminal plasma of teleost fish. J Fish Biol 45: 801-809 Ellis A (1999) Immunity to bacteria in fish. Shellfish Immunology. 9, PP: 291-308.
15. De Valming, V., Grossman, G., and Chapman, F., 1982. On the use of the gonadosomatic index. Comp. Biochem Physiology. 73, PP: 31-39
16. Greenwood, L.M., Scott, A.P., Vermeirssen, E., Le., Gac, F., Mylonas, C.C. and Pavlides, M., 2001. Plasma steroids mature common dentex (*Dentex dentex*) stimulated with a gonadotropinreleasing hormone agonist, Gen. Comp. Endocrinol. 12, PP: 35-46.

17. Guzman, J.M., Norberg, B., Ramos, J., Mylonas, C.C., and Manano, E.L., 2008. Vitellogenin, steroid plasma levels and spawning performance of cultured female Senegalese sole (*Solea senegalensis*). General and Comparative Endocrinology. 156, PP: 285-297.

18. Harmin, S.A. and Crim, L.W. 1992. Gonadotropin –releasing-hormone analog (GnRH-A) in duced ovulation and spawning in female winter flounder, *Pseudopleuronectes ameri canus* (Walbaum).

19. Kestemont, P., 1989. Hormonal induction of the ovulation and spermiation of the gudgeon Gobio gobio L. In: N. De Pauw, E. Jaspers. H. Ackerfors and N. Wilkins (Editors), Aquaculture- A Bio-technology in progress. European Aquaculture Society, Bredene, Beligium, PP: 527-536.

20. Kime, D.E., 1982. The control of gonadal androgen biosynthesis in fish. In Proceedings of the International Symposium Om Reproductive Physiology of Fish. Centre of Agriculture Publishing and Documentation, Wageningen the Netherlands, PP: 95-98.

21. Kristano, A.H., 2004. Evaluation of various factors to increase the efficiency of channe blue hybrid catfish embryo production. Ph.D. Dissertation, Auburn University.

22. Kroon, F.J., Munday, P.L., and Pankhurest, N.W., 2003. Steroid hormone levels and bi-directional sex change in *Gobiodon histrio*, Journal of Fish Biology. 62, PP: 153-167.

23. Mylonas, C.C., Fostier, A., and Zanuy, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. Gen. Comp. Endocrinol. 165, PP: 516–534.

24. Mylonas, C.C., Zohar, Y., 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries. 10, PP: 463-491.

25. Mylonas, C.C., Zohar, Y., 2007. Promoting oocyte maturation, ovulation and spawning in farmed fish. In: Babin, P.J., Cerdá, J., Lubzens, E. (Eds.), the Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, PP: 433–470.

26. Pankhurst, N.W., and Van der kraak, G., 1997. Effects of strees on reproduction and growth of fish, In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P. and Schreck, C.B. (eds), Fish Stress and health in Aquaculture. Cambridge University Press, Cambridge, PP: 73-93.

27. Piros, B., Glogowski, J., Kolman, R., Rzemieniecki, A., Domagala, J., Horvath, A., Urbani, B., and Ciereszko, A., 2002. Biochemical characterization of Siberian sturgeon *Acipenser baeri* and starlet *Acipenser ruthenus* milt plasma and spermatozoa. Fish Physiol. And Biochem. 26, PP: 289-298.

28. Rainis, S., Mylonas, C.C., Kyriakou, Y., Divanach, P., 2003. Enhancement of spermiation in European sea bass (*Dicentrachus labrax*) at the end of the reproductive season using GnRHa implant. Aquaculture, 219, PP: 873-890.

29. Rurangwa, E., Kime, D.E., Olllevier, F., and Nash, J.P., 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquaculture. 234, PP: 1-28.

30. Sherwood, N.M., Crim, L.W., Carolsfeld, J., and Walters, S.M., 1988.Sustained hormone release.I. Characteristics of in vitro release of gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRH-A) from pellets. Aquaculture. 74, PP: 75-86.

31. Stacey N.E., Cook, A.F., and Peter, R.E., 1979a. Ovulation surge of gonadotropin in the goldfish, *Carassius auratus*. General and Comparative Endocrinology. 31, PP: 246-249.

32. Takashima, F., Weil, C., Billard, R., Crime, L.W., Fostier, A., 1984. Stimulation of spermiation by LHRHa analogue in carp, Bull, Jpn, Soc, Fish. 50, PP: 1323-1329.

33. Tan-Fermin, J.D., Pagador, R,R., and Chavez, R.C., 1997. LHRHa and pimozide- induced spawning of Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Gunther) at different times during an annual reproductive. Aquaculture. 148, PP: 323-331.

34. Vermeirssen, E.L.M., Shields, R., Mazorra de Quero, C., and Scott, A.P., 2000. Gonadotropin-releasing hormone agonist raises plasma concentrations of progettogens and enhances milt fluidity in male Atlantic halibut (*Hippoglossus hipoglossus*). Fish Physio. Biochem. 22, PP: 77-87.

35. Williot, P., Kopeika, EF., and Goncharo, BF., 2000. Influence of testis state, temperature and delay insemen collection on spermatozoa motility in the cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baeri Brandt*). Aquaculture. 189, PP: 53-61.

36. Yamamoto, K., Nagahama, Y., and Yamazaki, F., 1966. A method to induce artificial spawning of goldfish all through the year. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 32, PP: 977-983.

37. Zadmajid, V., Imanpour, M.R., Shabani, A., and Baharloi, A., 2012. Evaluation of Egg Production ana Sex Steroid Profiles in Goldfish *Carassius auratus* During Four Consecutive Seasons. Global Veterinaria. 9(3), PP: 367-375.

38. Zakes, Z. 2007. Out-of-season spawning of cultured pikeperch (*Sander lucioperca*). Aquaculture Reserch. 38, PP: 1419-1427.

39. Zohar, Y. 1996. New approaches for the manipulation of ovulation and spawning in farmed fish. Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture Supplement. 2, PP: 43-48.