

استفاده از روش‌های ایمپلنت آنالوگ LHRHa و فاکتورهای محیطی (دما و دوره نوری) برای تکثیر خارج از فصل ماهی قرمز (*Carassius auratus*)

- احسان احمدی فر*: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: 49175-487
 - محمدرضا ایمانیپور: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: 49175-487
 - وحید زادمجید: گروه شیلات، دانشگاه کردستان، صندوق پستی: 416
 - کوروش امینی: مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آب‌های داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، صندوق پستی: 139
 - بهرام فلاحتکار: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، صندوق پستی: 1144
- تاریخ دریافت: بهمن 1394 تاریخ پذیرش: اردیبهشت 1395

چکیده

این پژوهش به منظور ارزیابی اثرات روش‌های مختلف ایمپلنت و تزریق LHRHa همراه با تغییرات فاکتورهای محیطی (دما و دوره نوری) روی برخی خصوصیات زیست‌شناختی منی (درصد اسپرماتوکریت، حجم اسپرم‌دهی) و فاصله زمانی تیمار تا اوولاسیون، درصد هچ، شاخص گنادوسوماتیک (ماده) و تغییرات هورمون‌های استروئیدی در مولدین نر و ماده ماهی قرمز در خارج از فصل تکثیر انجام شد. ماهیان در 4 تیمار (تزریق با سرم فیزیولوژی 0/7٪، EVAc شامل 20 میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن LHRHa با 40 میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن متوکلوپرماید، پلت‌های کلسترولی شامل 20 میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن LHRHa با 40 میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن متوکلوپرماید و تزریق 100 میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن LHRH با 40 میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن متوکلوپرماید قرار گرفتند. نتایج نشان داد فاصله زمانی تا اوولاسیون بین تیمارهای مختلف، تفاوت معنی‌داری داشت ($p < 0/05$)، به‌طوری‌که کم‌ترین فاصله زمانی اوولاسیون در تیمار تزریق LHRHa و بیش‌ترین آن در تیمار پلت کلسترولی مشاهده شد. بالاترین درصد هچ تخم‌ها در تیمار EVAc و کم‌ترین آن در تیمار پلت کلسترولی وجود داشت ($p < 0/05$). بالاترین طول دوره تحرک اسپرم و بالاترین درصد اسپرماتوکریت در تیمار EVAc وجود داشت و بین بقیه تیمارها تفاوت معنی‌دار وجود نداشت ($p > 0/05$). حجم اسپرم‌دهی در تیمارهای مختلف، تفاوت معنی‌دار داشت ($p < 0/05$) به‌طوری‌که بیش‌ترین آن در تیمار EVAc و کم‌ترین آن در تیمار شاهد مشاهده شد. تغییرات هورمون تستوسترون در طی اسپرم‌ریزی در تیمارهای EVAc و تزریق LHRHa تفاوت معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها داشت ($p \leq 0/05$)، و در روزهای 7، 14 و 21 روز بعد از تیمار به تدریج مقدار این هورمون در سرم خون مولدین نر ماهی قرمز کاهش یافت. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سطوح هورمون 17-آلفا دی هیدروکسی پروژسترون (نانوگرم بر میلی‌لیتر) و هورمون 17-بتا استرادیول در مولدین ماده در تیمارهای مختلف مورد بررسی تفاوت معنی‌داری با یکدیگر داشت ($p < 0/05$) به‌طوری‌که در تیمار EVAc بیشتر از سایر تیمارها بود. مقدار این هورمون تا روز هفتم بعد از تیمار کاهش یافت اما این هورمون‌ها در روزهای 14 و 21 بعد از تیمار افزایش یافتند. در مجموع این تحقیق بیان می‌کند که روش EVAc جهت تکثیر خارج از فصل ماهی قرمز، روش مناسبی است.

کلمات کلیدی: پلت کلسترولی، تزریق هورمون LHRHa، EVAc، تکثیر خارج از فصل، ماهی قرمز



مقدمه

ماهی قرمز (*Carassius auratus*) از خانواده کپور ماهیان (Cyprinidae) می باشد و به لحاظ شرایط زیستی و تغذیه ای شبیه کپور معمولی می باشد (وئوق و مستجیر، 1383). 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 (ایمانپور و کمالی، 1386). این ماهی به طور گسترده در مطالعات تولید مثلی و کنترل هورمونی مورد استفاده قرار می گیرد (Bjerselius و همکاران، 1995).

در کپور ماهیان هم گونه هایی با تخم ریزی سالانه و هم گونه هایی با تخم ریزی های مکرر در طول سال دیده می شود که چندین بار در طول سال اووله می شوند و نوع تخمدان آن ها از نوع غیر همزمان است (Zadmajid و همکاران، 2012). ماهی قرمز (*Carassius auratus*) از ماهیانی است که اوولاسیون چند بار در طول سال با دستکاری های محیطی در آن انجام می شود (Kobayash و همکاران، 1988). دستکاری های هورمونی و محیطی این امکان را به پرورش دهندگان این ماهی داده تا تکثیر موفق در طول سال داشته باشند (Zadmajid و همکاران، 2012). اگر این ماهی در دمای 12 درجه سانتی گراد نگهداری شود، اووسیت های آن می تواند برای چندین ماه بدون اوولاسیون و یا تخریب حفظ شود و اوولاسیون می تواند بوسیله افزایش دمای آب از 12 به 20 درجه سانتی گراد همراه با تزریق هورمون اتفاق بیفتد (Yamamoto و همکاران، 1996؛ Stacey و همکاران، 1979a).

در سه دهه گذشته سیستم رسانش پایدار (GnRHa-delivery systems) به کار گرفته شده در انواع مختلفی از ماهیان وحشی و پرورشی، که کاربرد آن ها سبب افزایش سطوح هورمون LH، هم زمانی در تخم ریزی، 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 اسپرم ریزی، افزایش میل، تولید اسپرماتوزوآ و افزایش تحرک اسپرم بوسیله افزایش تولید پلاسمای سمینال شده است (Alavi و همکاران، 2008).

این هورمون بطور موفقیت آمیزی در تحریک تخم ریزی در بسیاری از گونه ها، شامل آزاد ماهیان (Mylonas و همکاران، 1995a)، شانک ماهی (*Githhead seabream*) (Zohar و همکاران، 1989)، کفشک زمستانه (*Winter flounder*) (Larsson، 1997)، کفشک زرد باله (*Yellowtail flounder*) (Larsson، 1997) استفاده شده است. مشکل پروتکل های تزریق LHRHa ماندگاری کم این هورمون در چرخه تولید مثلی می باشد. از طرفی رسیدگی نهایی

اووسیت برای تکامل نیاز به زمان بیشتری ممکن است داشته باشد، ایمپلنت ها به نحوی طراحی شده اند که هورمون LHRHa را برای یک دوره چندین هفته ای به آرامی رها می کنند (Zohar، 1996).

با استفاده از کنترل شرایط محیطی مانند دما و دوره نوری می توان فرایند گامتوژن 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 (Billard و Berton، 1987). از طرفی اندازه گیری سطوح هورمون های جنسی در سرم ماهیان استخوانی شاخص مناسبی جهت بررسی روند رشد و تکامل تخمدان محسوب می شود (Kroon، 2003). در مقاله حاضر از روش های ایمپلنت (EVAc و پلت های کلسترول) و تزریق LHRHa همراه با تغییرات دمایی و نوری برای تحریک اوولاسیون و تغییرات سطوح 17- بتا استرادیول و 17 آلفا دی هیدروکسی پروژسترون در تکثیر خارج از فصل ماهی قرمز استفاده شده است.

مواد و روش ها

تهیه و توزین ماهیان: تعداد 300 ماهی مولد قرمز با میانگین وزن 67/6+5/46 گرم و مولدین ماده با میانگین وزنی 72/6+2/12 از مرکز پرورش ماهیان آکواریومی در گرگان در سال 1392 گرم تهیه شدند. ماهیان در مخازن فایبرگلاس (1 متر قطر، 0/5 متر عمق) قرار گرفتند. میانگین فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب بدین شرح بود: pH: 7/0+52/6، اکسیژن محلول: 7/7+0/2 میلی گرم بر لیتر، سختی کل: 13+288 میلی گرم بر لیتر) و در شرایط 14 ساعت روشنایی و 10 ساعت تاریکی در پژوهشگاه منابع طبیعی و علوم کشاورزی گرگان تا شروع آزمایش نگهداری شدند. ماهیان به میزان 3٪ وزن بدن با غذاهای مخصوص ماهی قرمز (انرژی، تایلند) تغذیه شدند، سپس ماهیان نر و ماده در آکواریوم های 65 لیتری مجهز به سیستم تنظیم کننده نوری و دمایی قرار گرفتند. در ابتدا یک دوره سرمایی 10 درجه سانتی گراد با استفاده از کاهش دمایی به صورت مرحله ای و به میزان حداکثر 2 درجه سانتی گراد در روز اعمال گردید. همزمان با کاهش دما، نور نیز با دامنه 8 ساعت روشنایی و 16 ساعت تاریکی تنظیم گردید، ماهیان به مدت 10 روز در شرایط ذکر شده نگهداری شدند. پس از پایان دوره سرمایی، به منظور تحریک اوولاسیون درجه حرارت آب با استفاده از افزایش تدریجی به میزان حداکثر 2 درجه سانتی گراد در روز، به حدود 22 درجه سانتی گراد افزایش داده شد (Yamamoto و همکاران، 1996). همزمان با افزایش درجه حرارت دوره نوری به دامنه 8 ساعت تاریکی و 16 ساعت روشنایی تغییر داده شد. ماهیان به مدت 2 هفته در شرایط ذکر شده نگهداری شدند (Aida و همکاران، 1988). تنظیم

چاهک‌ها اضافه شد و به مدت 15 دقیقه در دمای محیط آنکوبه گردید و در نهایت 100 میکرولیتر محلول متوقف کننده فعالیت آنزیمی به چاهک‌ها اضافه شد و با دستگاه الیزا ریدر و سنجش جذب نوری در طول موج 450 نانومتر و رسم منحنی‌های مخصوص مقادیر هورمون‌ها سنجیده شد (Guzman و همکاران، 2008).

همچنین هورمون 17-بتا استرادیول توسط کیت مونوبایند به روش الیزا اندازه گیری شد. جهت سنجش هورمون 17-بتا استرادیول با استفاده از کیت مونوبایند 25 میکرولیتر نمونه و 25 میکرولیتر استاندارد در چاهک‌های مخصوص ریخته شد و به هر کدام 200 میکرولیتر آنزیم کنژوگه افزوده شد. سپس به مدت 120 دقیقه در دمای اتاق (25 درجه سانتی‌گراد) آنکوبه گردید و ادامه محتوی چاهک‌ها تخلیه گردید و 5 بار با بفر شستشو، شستشو داده شد. سپس 100 میکرولیتر محلول رنگزا به هر کدام از چاهک‌ها افزوده گردید و به مدت 15 دقیقه در دمای اتاق آنکوبه گردید. در نهایت به هر کدام از چاهک‌ها 100 میکرولیتر محلول متوقف کننده فعالیت آنزیمی اضافه شد و در طول موج 450 نانومتر و رسم منحنی‌های مخصوص سنجش انجام شد (Guzman و همکاران، 2008).

جدول 1: تیمارهای آزمایشی، تعداد ماهیان هر تیمار، مواد و دوز مصرفی آن برحسب میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن

تیمارها	تعداد ماهیان	مواد مصرفی
شاهد	10	سرم
فیزیولوژی (0.7٪)	100 میکروگرم	
تزریق LHRHa	10	LHRHa
+ متوکلوپرماید	100 میکروگرم + 100 میکروگرم	
EVAc	10	+EVAc
متوکلوپرماید	20 میکروگرم + 100 میکروگرم	
پلت‌های کلسترولی	10	پلت‌های
کلسترولی + متوکلوپرماید	20 میکروگرم + 100 میکروگرم	

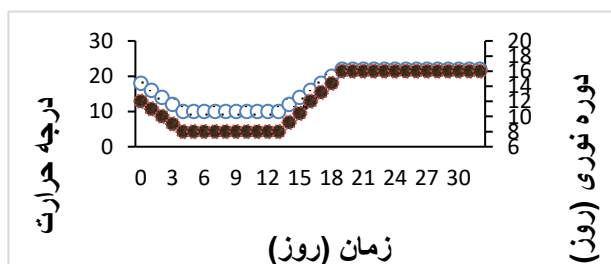
دوره نوری و درجه حرارت به ترتیب توسط لامپ‌های فلورسنت 20 واتی متصل به یک زمان سنج دیجیتالی و یخچال مجهز به سیستم گرمایی (هیتر) صورت گرفت.

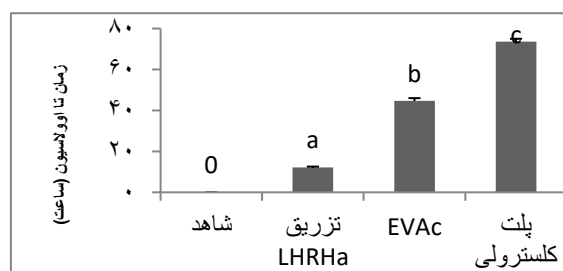
برای آماده‌سازی ایمپلنت‌ها از هورمون LHRHa، آلومین سرم گاوی و اینولین (سیگما، آلمان)، اتیلن وینیل استات، کلسترول، گلوکز، کره کاکائو و... و بر طبق روش ارائه شده توسط سایر محققین انجام شد (Mylonas و Zohar، 2007).

تزریق و ایمپلنت ماهی قرمز: ماهیان با 15 میلی گرم در لیتر عصاره گل میخک بیهوش شدند، سپس تزریق و ایمپلنت در تیمارها: (تزریق با سرم فیزیولوژی 0.7٪، EVAc شامل 20 میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن LHRHa با 40 میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن متوکلوپرماید، پلت‌های کلسترولی شامل 20 میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن LHRHa با 40 میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن متوکلوپرماید و تزریق 100 میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن LHRH با 40 میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن متوکلوپرماید) صورت گرفت. در گروه شاهد LHRH تزریق بصورت داخل صفاغی، اما در تیمارهای ایمپلنت، ایمپلنت‌ها با دستگاه ایمپلنتر بصورت داخل عضلانی انجام شد. هر گروه از تیمارها شامل 10 عدد ماهی ماده بود. از متوکلوپرماید (موسسه رازی، تهران) هم به عنوان یک آنتی دوپامین در این مطالعه در هر تیمار استفاده شده بود.

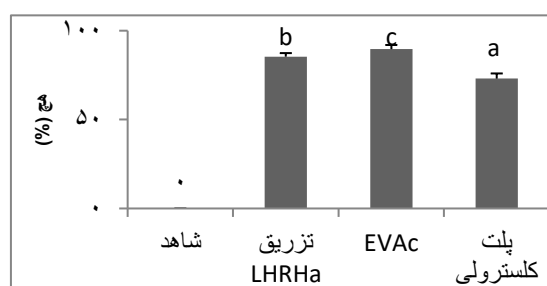
روش اندازه‌گیری هورمون‌ها: خون‌گیری مولدین توسط

سرنگ از ناحیه ساقه دمی صورت گرفت و به محفظه‌های حاوی مواد ضد انعقاد خون (CBC) منتقل و پس از انتقال لوله‌های CBC به آزمایشگاه، با استفاده از سانتریفیوژ نمودن آن‌ها پلاسماي خون استخراج شد و توسط جعبه یونولیت حاوی یخ به آزمایشگاه شیمی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انتقال داده شد، در ادامه نمونه‌ها در فریزر 70- درجه سانتی‌گراد جهت آنالیز هورمونی نگه‌داری گردید. هورمون تستوسترون پیش ساز هورمون آندروژن (11-کتو تستوسترون)، که غالباً از بیضه تولید می‌شود و با روش الیزا به‌عنوان شاخص بررسی گردید. این روش متشکل از کیت الیزایی مونوبایند و روش رقابتی به کمک آنتی بادی مونوکلونال می‌باشد. در این روش بدون استفاده از مواد رادیو اکتیو، مولکول با آنتی بادی ضد آن تشخیص داده می‌شود، یعنی مولکول خود آنتی‌ژن است که اصطلاحاً آنتی‌بادی مونوکلونال نام دارد. به این ترتیب که مقادیر 25 میکرولیتر از سرم نمونه به همراه استاندارد و سرم کنترل در چاهک مخصوص الیزا ریخته سپس 200 میکرولیتر آنزیم کنژوگه در چاهک‌ها ریخته شد و پس از یک ساعت محتوای چاهک‌ها خالی گردید، در ادامه 200 میکرولیتر محلول رنگزا به هر کدام از

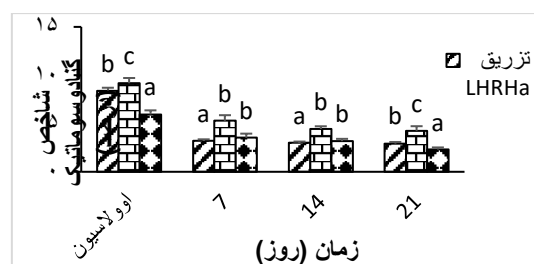




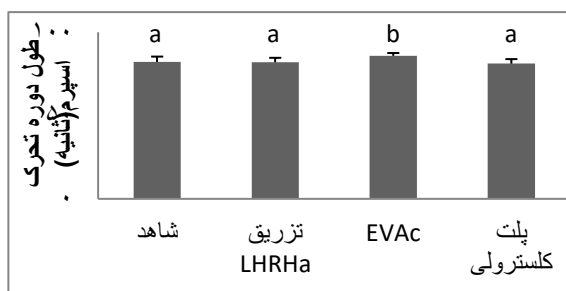
شکل 1: فاصله زمانی تا اوولاسیون در تیمارهای مختلف



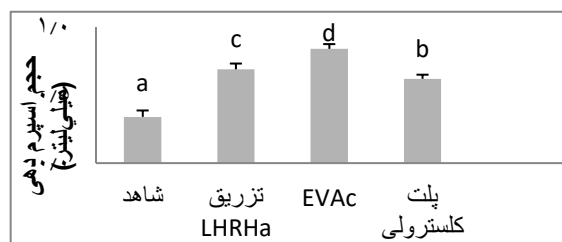
شکل 2: درصد هچ در تیمارهای مختلف



شکل 3: شاخص گنادوسوماتیک در جنس ماده در روزهای مختلف نمونه برداری



شکل 4: طول دوره حرکت اسپرم طی اوولاسیون



شکل 5: حجم اسپرم دهی ماهیان نر در تیمارهای مختلف

شکل 1: نمودار تغییرات دوره نوری و درجه حرارت در تحقیق حاضر

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل آماری داده به دست آمده در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از نرم افزار SPSS و بر اساس آزمون دانکن در سطح 5٪ انجام پذیرفت.

نتایج

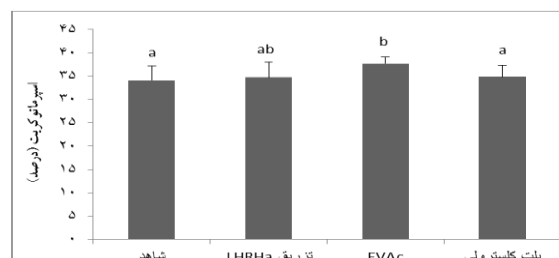
نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد فاصله زمانی تا اوولاسیون بین تیمارهای مختلف، تفاوت معنی داری داشت ($p < 0/05$)، به طوری که کمترین فاصله زمانی اوولاسیون در تیمار تزریق LHRHa و بیشترین آن در تیمار پلت کلسترول مشاهده شد (شکل 2). بالاترین درصد هچ تخمها در تیمار EVAc و کمترین آن در تیمار پلت کلسترول وجود داشت ($p < 0/05$) (شکل 3). شاخص گنادوسوماتیک (درصد) در بین تیمارهای مختلف و در روزهای مختلف نمونه برداری با یکدیگر تفاوت معنی داری داشت بطوریکه بالاترین مقدار شاخص گنادوسوماتیک در تیمار EVAc اندازه گیری شد (شکل 4). بالاترین طول دوره تحرک اسپرم (شکل 5) و حجم اسپرم دهی در تیمارهای مختلف، تفاوت معنی دار داشت ($p < 0/05$) به طوری که بیشترین آن در تیمار EVAc و کمترین آن در تیمار شاهد مشاهده شد (شکل 6). بالاترین درصد اسپرماتوکریت در تیمار EVAc وجود داشت (شکل 7) و بین بقیه تیمارها تفاوت معنی دار وجود نداشت ($p > 0/05$). تغییرات هورمون تستوسترون در طی اسپرم ریزی در تیمارهای EVAc و تزریق LHRHa تفاوت معنی داری نسبت به سایر تیمارها داشت ($p \leq 0/05$)، بطوریکه در تیمار تزریق هورمون و تیمار EVAc بیشتر از سایر تیمارها بود و در روزهای 7، 14 و 21 روز بعد از تیمار به تدریج مقدار این هورمون در سرم خون مولدین نر ماهی قرمز کاهش یافت (شکل 8).

بر طبق نتایج تحقیق حاضر، سطوح هورمون 17-بتا استرادیول در مولدین ماده در تیمار EVAc بیشتر از سایر تیمارها بود تا روز هفتم بعد از تیمار کاهش یافت اما این هورمونها در روزهای 14 و 21 بعد از تیمار افزایش یافتند (شکل 9).

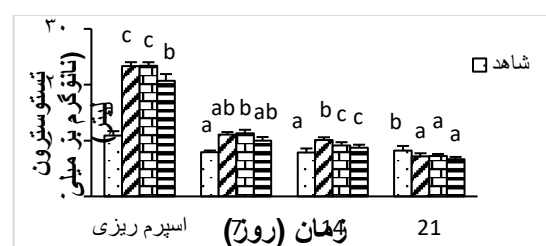
نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سطوح هورمون 17-آلفا دی هیدروکسی پروژسترون (نانوگرم بر میلی لیتر) در مولدین ماده در تیمارهای مختلف مورد بررسی تفاوت معنی داری با یکدیگر داشت ($p < 0/05$) بطوریکه در تیمار EVAc بیشتر از سایر تیمارها بود. مقدار این هورمون تا روز هفتم بعد از تیمار کاهش یافت اما این هورمونها در روزهای 14 و 21 بعد از تیمار افزایش یافتند (شکل 10).

وزن بدن LHRHa با 40 میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن متوکلوپرماید و تزریق 100 میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن LHRH با 40 میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن متوکلوپرماید قرار گرفتند. نتایج نشان داد فاصله زمانی تا اوولاسیون بین تیمارهای مختلف، تفاوت معنی‌داری داشت ($p < 0/05$)، به‌طوری‌که کمترین فاصله زمانی اوولاسیون در تیمار تزریق LHRHa و بیشترین آن در تیمار پلت کلسترولی مشاهده شد. بالاترین درصد هج تخم‌ها در تیمار EVAc و کمترین آن در تیمار پلت کلسترولی وجود داشت ($p < 0/05$). بالاترین طول دوره تحرک اسپرم در تیمار EVAc وجود داشت و بین بقیه تیمارها تفاوت معنی‌دار وجود نداشت ($p > 0/05$). حجم اسپرم‌دهی در تیمارهای مختلف، تفاوت معنی‌دار داشت ($p < 0/05$). به‌طوری‌که بیشترین آن در تیمار EVAc و کمترین آن در تیمار شاهد مشاهده شد. بالاترین درصد اسپرماتوکریت در تیمار EVAc وجود داشت ($p < 0/05$). تغییرات هورمون تستوسترون در طی اسپرمی‌شن در تیمارهای EVAc و تزریق LHRHa تفاوت معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها داشت ($p \leq 0/05$)، و در روزهای 7، 14 و 21 روز بعد از تیمار به تدریج مقدار این هورمون در سرم خون مولدین نر ماهی قرمز کاهش یافت.

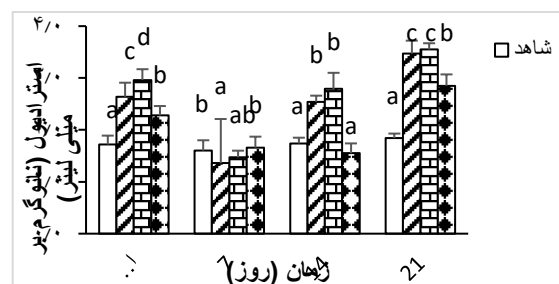
در تحقیق حاضر، تزریق LHRHa و بخصوص ایمپلنت EVAc برای تکثیر خارج از فصل ماهی قرمز (*Carassius auratus*) موفقیت‌آمیز بود. از مزایای ایمپلنت این است که تنها یک جابجایی در مولدین انجام می‌شود و این سبب وارد آمدن استرس کمتر می‌شود در حالی‌که در روش‌های تزریق نیاز به 2 تزریق داریم و طبیعتاً استرس بیشتری به مولدین وارد می‌شود (Suetal, 2013). LHRHa سبب تحریک، آزاد سازی گنادوتروپین‌ها، هورمون LH، بلوغ نهایی، تخم‌ریزی و اسپرم‌ریزی می‌شود (Mylonas و همکاران، 2010). همچنین فعالیت‌های LHRHa در یک سطح بالاتر از گناد-هیپوفیز-هیپوتالاموس انجام می‌شود که می‌تواند تحریک بالانس شده بیشتری از رویدادهای تولیدمثلی فراهم کند و بطور مستقیم و غیرمستقیم روی رهاسازی هورمون‌های دیگر اثر می‌گذارد (Chatakondi و همکاران، 2011). در تحقیق حاضر پارامترهای کیفی اسپرم در 4 تیمار متغیر بود. تراکم اسپرم در مایع سمینال عموماً برای ارزیابی کیفیت اسپرم استفاده می‌شود. تخمین صحیح غلظت اسپرم برای بسیاری از آزمایشات در رابطه با لقاح ماهی و نگهداری اسپرم ضروری است (Rurangwa و همکاران، 2004). در تحقیق حاضر، بالاترین درصد اسپرماتوکریت در تیمار EVAc وجود داشت ($p < 0/05$) (شکل 7). تغییرات غلظت اسپرماتوکریت در بین گونه‌های مختلف متفاوت است، از طرفی Vermeirssen و همکاران (2000) گزارش کرد که استفاده از ایمپلنت EVAc سبب کاهش میزان اسپرماتوکریت در



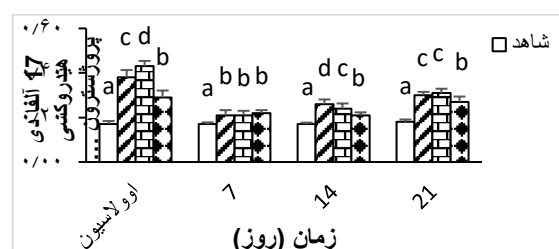
شکل 7: درصد اسپرماتوکریت در تیمارهای مختلف



شکل 8: مقدار هورمون تستوسترون در روزهای مختلف



شکل 9: مقدار هورمون استرادیول در روزهای مختلف



شکل 10: مقدار هورمون 17 آلفا دی هیدروکسی پروژسترون در روزهای مختلف

بحث

تحقیق حاضر به‌منظور بررسی استفاده از روش‌های ایمپلنت آنالوگ LHRHa و فاکتورهای محیطی (دما و دوره نوری) برای تکثیر خارج از فصل ماهی قرمز (*Carassius auratus*) انجام شد. ماهیان در 4 تیمار: (تزریق با سرم فیزیولوژی 0/7٪، EVAc شامل 20 میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن LHRHa با 40 میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن متوکلوپرماید، پلت‌های کلسترولی شامل 20 میکروگرم/کیلوگرم

نوسانات در حجم اسپرم ممکن است در نتیجه متغیر بودن مراحل رسیدگی جنسی بین مولدین نر، روش‌های به‌کارگیری هورمون (Piros و همکاران، 2002) و شرایط متفاوت محیطی و خصوصیات بیولوژیکی مولدین باشد (Rurangwa و همکاران، 2004). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که استفاده از تیمار ایمپلنت EVAc سبب افزایش حجم اسپرم دریافتی از ماهی تا 21 روز بعد از تیمار داشت که با نتایج فوق همخوانی داشت.

سنجش استروئیدهای جنسی همراه با شاخص گنادوسوماتیک در بررسی سیکل تولیدمثلی استفاده و به نوعی کلید شناسایی مراحل تکامل گناد هستند (De Valming و همکاران، 1982). در تحقیق حاضر بالاترین شاخص گنادوسوماتیک در تیمار EVAc مشاهده شد (شکل 4). در واقع کاهش هورمون تستوسترون پس از اسپرم‌ریزی با کاهش شاخص گنادوسوماتیک و درجه حرارت آن مطابق بود. Dabrowski و همکاران (1994)، نشان دادند استفاده از تزریق LHRHa برای تکثیر خارج از فصل ماهی سوف (*Perca fluviatilis*) سبب افزایش هورمون تستوسترون تا 48 ساعت بعد از تزریق شد و سپس کاهش یافت که با نتایج مطالعه ما همخوانی داشت. نتیجه مطالعه ما نشان داد که ایمپلنت LHRHa بخصوص به روش EVAc به‌خوبی سبب افزایش تستوسترون طی دوره اسپرم‌ریزی در ماهی قرمز می‌شود (شکل 8). در جنس نر آزاد ماهی کوهو (*Oncorhynchus kisutch*) بالاترین سطح هورمون تستوسترون (107/8 نانوگرم بر میلی‌لیتر) در طی مرحله نهایی رسیدگی جنسی مشاهده شد. به هر حال هورمون تستوسترون، علاوه بر دخیل بودن در روند اسپرماتوژنز، ممکن است در سایر فعالیت‌های فیزیولوژیکی نیز موثر باشد. همچنین ارتباط مثبت و معنی‌داری بین شاخص گنادوسوماتیک و سطح هورمون تستوسترون در جنس نر ماهی باس دریایی اروپایی (European sea bass) در اثر استفاده از ایمپلنت GnRHα مشاهده گردید (Zohar و Mylonas، 2007).

Crim و Evans (1983)، Pankhurst و Van der kraak (1997)، Tan-Fermin و همکاران (1997)، معتقدند که استفاده از LHRHa بصورت تزریق و ایمپلنت سبب آزادسازی کوتاه مدت (Short-term elevation) در سطوح تستوسترون و استرادیول پلاسما و به طبع آن سبب بروز پدیده بلوغ نهایی (FOM) و تخم‌ریزی می‌شود. در مولدین ماهی قرمز نر (*Carassius auratus*) پلت‌های کلسترولی نشان دادند که در تحریک اسپرم‌ریزی اثرات ضعیف‌تری دارند در مقایسه با روش EVAc و تزریق LHRHa که این می‌تواند به نسبت سلولز و کلسترول استفاده شده در ساخت پلت‌های کلسترولی که سبب آزادسازی آرام این هورمون در بدن ماهی شده بستگی داشته باشد. نتایج تحقیق حاضر نشان دادن روش ایمپلنت EVAc

کفشک ماهی (*Hipoglossus hipoglossus*) می‌شود. تغییرات فصلی غلظت اسپرماتوکریت در بین گونه‌های مختلف متفاوت است، در مطالعه حاضر غلظت اسپرماتوکریت همانند تراکم اسپرم تفاوت معنی‌داری در تیمارها نداشت. ارتباط معنی‌داری بین تراکم اسپرم و اسپرماتوکریت وجود دارد، ارتباط بین تراکم اسپرم و غلظت اسپرماتوکریت در گونه‌های مختلفی اثبات شده است (Dabrowski و Ciereszko، 1994). از طرفی محققین گزارش کردند که استفاده از ایمپلنت EVAc سبب کاهش میزان اسپرماتوکریت در ماهی هالیبوت اقیانوس اطلس (*Hipoglossus (hipoglossus)* گردید (Vermeirssen و همکاران، 2000).

طول دوره تحرک به عنوان شاخص کیفی اسپرم مطرح می‌باشد و فاکتورهای متعددی مانند غلظت یون (سدیم، پتاسیم، کلسیم و منیزیم)، فشار اسمزی، درجه حرارت، pH، نسبت رقیق‌سازی و پارامترهای درون سلولی روی طول دوره تحرک اسپرم اثر گذارند (علوی و همکاران، 2008). در تحقیق حاضر، بالاترین طول دوره تحرک اسپرم در تیمار EVAc وجود داشت و بین بقیه تیمارها تفاوت معنی‌دار وجود نداشت ($p > 0/05$). این نتایج با مطالعه Clearwater و Crim (1998)، همخوانی داشت که نشان داد استفاده از ایمپلنت GnRHα سبب افزایش تولید اسپرم برای 29 روز بدون اثرگذاری روی چگالی اسپرم شده است، اما بطور معنی‌داری درصد اسپرم متحرک و طول دوره حرکتی را در ماهی فلاندر زرد (*Pleuronectes ferrugineus*) بهبود بخشید. همچنین میلوناس و زوهر (2007) دریافتند که طول دوره تحرک اسپرم در ماهیان شاهد و ایمپلنت شده بعد از بکارگیری ایمپلنت GnRHα در ماهی تون اقیانوس اطلس تفاوت معنی‌داری نداشت.

هورمون‌های استروئیدی جنسی به عنوان یک شاخص مهم در فرآیند اسپرماتوژنز، از مرحله اسپرماتوگونی تا اسپرمیشتن فعالیت دارند و در واقع سنجش استروئیدها و شاخص گنادوسوماتیک در بسیاری از گونه‌ها به عنوان کلید شناسایی مراحل تکامل گناد هستند (De Valming و همکاران، 1982). در گونه‌های واجد تکامل گنادی غیرهمزمان، بررسی شاخص گنادوسوماتیک به تنهایی نمی‌تواند معیار مناسبی جهت تعیین مراحل رسیدگی گناد باشد. بنابراین سنجش استروئیدهای جنسی به همراه شاخص گنادوسوماتیک می‌تواند در بررسی سیکل تولیدمثلی دقیق‌تر باشد (Zadmajid و همکاران، 2012). در ماهی قرمز، تستوسترون علاوه بر پیش‌ساز برخی از هورمون‌های استروئیدی، باعث آزادسازی هورمون‌های گنادوتروپین از هیپوفیز از طریق افزایش پاسخ هیپوفیز نسبت به تحریک هورمون تحریک‌کننده گنادوتروپین از هیپوتالاموس می‌شود (Kobayashi و همکاران، 1989).

- auratus*. General and Comparative Endocrinology. Vol. 68, No. 2, pp: 301-307.
13. Kroon, F.J.; Munday, P.L. and Pankhurst, N.W., 2003. Steroid hormone levels and bi-directional sex change in *Gobiodon histrio*, Journal of Fish Biology. Vol. 62, pp: 153-167.
 14. Larsson, D.G.J.; Mylonas, C.C.; Zohar, Y. and Crime, L.W., 1997. Gonadotropin releasing hormone-analogue (GnRH-A) advances ovulation and improves the reproductive performance of a cold-water batch-spawning teleost, the yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science. Vol. 54, No. 9, pp: 1957-1964.
 15. Mylonas, C.C.; Tabata, Y.; Langer, R. and Zohar, Y., 1995a. Preparation and evaluation of polyanhydride microspheres containing gonadotropin-releasing hormone (GnRH), for inducing ovulation and spermiation in fish. Journal of Controlled Release. Vol. 35, pp: 23-34.
 16. Mylonas, C.C.; Fostier, A. and Zanuy, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. General Comparative Endocrinology. Vol. 165, pp: 516-534.
 17. Mylonas, C.C. and 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.
 18. Pankhurst, N.W. and Van der kraak, G., 1997. Effects of stress 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.
 19. 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. Journal of Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 26, pp: 289-298.
 20. Rurangwa, E.; Kime, D.E.; Ollevier, F. and Nash, J.P., 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquaculture. Vol. 234, pp: 1-28.
 21. Stacey N.E.; Cook, A.F. and Peter, R.E., 1979a. Ovulation surge of gonadotropin in the goldfish, *Carassius auratus*. General and Comparative Endocrinology. Vol. 31, pp: 246-249.
 22. Tan-Fermin, J.D.; Pagador, R.R. and Chavez, R.C., 1997. LHRHa and pimozone-induced spawning of Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Gunther) at different times during an annual reproductive. Aquaculture. Vol. 148, pp: 323-331.
 23. Vermeirssen, E.L.M.; Shields, R.; Mazorra de Quero, C. and Scott, A.P., 2000. Gonadotropin-releasing hormone agonist raises plasma concentrations of progestogens and enhances milt fluidity in male Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Journal of Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 22, pp: 77-87.
 24. 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. Vol. 32, pp: 977-983.
 25. Zadmajid, V.; Imanpour, M.R.; Shabani, A. and Baharloi, A., 2012. Evaluation of Egg Production and Sex Steroid Profiles in Goldfish *Carassius auratus* During Four Consecutive Seasons. Global Veterinaria. Vol. 9, Vol. 3, pp: 367-375.
 26. Zadmajid, V.; Imanpour, M.R.; Shabani, A. and Baharlouei, A., 2013. Evaluation of sperm characteristic and plasma testosterone in the goldfish (*Carassius auratus*) during four consecutive seasons, Comparative Clinical Pathology. Vol. 22, No. 4, pp: 703-711.

برای انتقال هورمون LHRHa در تکثیر خارج از فصل ماهی قرمز به عنوان یک گونه مدل بسیار مناسب است. در شرایط طبیعی، تخم‌ریزی ماهی قرمز در فصل بهار و در درجه‌حرارت بالای 20 درجه سانتی‌گراد صورت می‌پذیرد، ولی در صورتی که مولدین رسیده در دمای 12 درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند، از تخم‌ریزی 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 (Yamamoto و همکاران، 1996). در مطالعه حاضر، ماهی قرمز توسط تغییر شرایط محیطی (درجه‌حرارت و نور) و استفاده از تیمارهای هورمونی ذکر شده تکثیر گردید.

منابع

1. ایمانپور، م.ر. و کمالی، ا. 1386. بررسی تکثیر مصنوعی و پرورش لاروهای ماهی قرمز (*Carassius carassius gibelio*) توسط HCG. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، سال 13، شماره 2، صفحات 23 تا 34.
2. وثوقی، ع. و مستجیر، ب. 1383. ماهیان آب شیرین. انتشارات دانشگاه تهران 317 صفحه.
3. Aida, K., 1988. A review of plasma hormone changes during ovulation in cyprinid fishes. Aquaculture. Vol. 74, pp: 11-21.
4. Alavi, S.M.H.; Cosson, J.; Coward, K. and Rafiee, G., 2008. Fish spermatology Alpha Science Ltd, Oxford, 465 p.
5. Bjerselius, R.; Olsen, K.H. and Zheng, W., 1995. Endocrine gonadal and behavioural responses of male crucian carp to the hormonal pheromone 17 α , 20 β dihydroxy-4-pregnen-3-one. Chemical Senses. Vol. 20, pp: 221-230.
6. 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. Vol. 42, pp: 845-853.
7. 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*. Journal of Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 19, PP: 349-357.
8. Crim, L.W. and Evans, D.M., 1983. Influence of testosterone and/or LHRHa on precocious sexual development in the juvenile rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). Reprod. Vol. 29, pp: 137-142.
9. Dabrowski, K. and Ciereszko, A., 1994. Proteinase inhibitor (s) in seminal plasma of teleost fish. Journal of Fish Biology. Vol. 45, pp: 801-809.
10. De Valming, V.; Grossman, G. and Chapman, F., 1982. On the use of the gonadosomatic index. Journal of Comparison Biochemistry and Physiology. Vol. 73, pp: 31-39.
11. 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. Vol. 156, pp: 285-297.
12. Kobayashi, M.; Aida, K. and Hanyu, I., 1988. Hormone changes during the ovulatory cycle in goldfish *Carassius*



- aurata*. In vivo and in vitro studies. Journal of Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 7, pp: 59-67.
29. **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. Vol. 32, pp: 977-983.
27. **Zohar, Y., 1996.** New approaches for the manipulation of ovulation and spawning in farmed fish. Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture Supplement. Vol. 2, PP: 43-48.
28. **Zohar, Y.; Goren, A.; Tosky, M.; Pagelson, G.; Leibovitz, D. and Koch, Y., 1989.** The bioactivity of gonadotropin-releasing hormones and its regulation in the gilthead seabream, *Sparus*

