

مقایسه اثرات تزریق هورمون‌های اوپریم، HCG و عصاره هیپوفیز ماهی باربوس روی پارامترهای اسپرم شناختی ماهی قرمز (*Carassius auratus gibelio*)

ایمان صابری اصل^{*}، وحید تقی‌زاده^۱، محمدرضا ایمانپور^۱

۱- گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران،

صندوق پستی: ۴۱۹۳۴ ۹۶۷۳۱

تاریخ دریافت: ۸ اسفند ۱۳۹۶

تاریخ پذیرش: ۲۹ خرداد ۱۳۹۷

چکیده

در این مطالعه اثرات تزریق هورمون‌های اوپریم، HCG و هیپوفیز باربوس بر روی پارامترهای اسپرم شناختی (طول دوره حرکت اسپرم، درصد تحرک اسپرم، اسپرماتوکریت، تراکم اسپرم، حجم اسپرم، pH) و مقایسه کیفیت اسپرم بین تیمارهای مختلف مولدین نر ماهی قرمز (*Carassius auratus gibelio*) مورد بررسی قرار گرفت. هورمون‌های اوپریم (تیمار دوم)، HCG (تیمار سوم) و عصاره هیپوفیز باربوس (تیمار چهارم) به ترتیب با دوزهای تزریقی (۲ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، ۱۵۰۰ واحد بین‌المللی به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و ۳ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به ترتیب) مورد استفاده قرار گرفتند. pH در بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). بیشترین میزان pH در تیمارهای دوم و سوم مشاهده شد (به ترتیب 7.245 ± 0.368 و 7.76 ± 0.7). در فاکتور درصد اسپرم‌های متحرک بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P < 0.05$)، به گونه‌ای که در تیمارهای سوم و دوم بالاترین درصد تحرک مشاهده شد (96.60 ± 4.68 و 93.48 ± 9.48)، در صورتی که بین طول دوره تحرک اسپرم در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$). بین میانگین اسپرماتوکریت در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌دار وجود داشت و در تیمار دوم بالاترین درصد اسپرماتوکریت مشاهده شد (48.45 ± 11.80). همچنین تراکم اسپرم بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($P < 0.05$) و در تیمار دوم بالاترین تراکم اسپرم مشاهده شد (137.71 میلیون در میلی‌لیتر مایع منی). همچنین حجم اسپرم بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P < 0.05$)، در تیمار چهارم و دوم بالاترین حجم اسپرم مشاهده شد (به ترتیب 163.590 ± 0.321 و 0.470 ± 0.0). نتایج این تحقیق نشان داد که هورمون‌های اوپریم و HCG نسبت به هیپوفیز و تیمار دما در شرایط اسارت تأثیر بیشتری روی پارامترهای اسپرم شناختی ماهی قرمز دارند.

کلمات کلیدی: ماهی قرمز (*Carassius auratus gibelio*)، اوپریم، HCG، عصاره هیپوفیز، پارامترهای اسپرم شناختی.

مقدمه

ماهی قرمز (*Carassius auratus gibelio*) از خانواده کپور ماهیان (Cyprinidae) است و از لحاظ شرایط زیستی و تغذیه‌ای شبیه کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) است (و ثوقی و مستجیر، ۱۳۸۵). این ماهی به عنوان یکی از معروف‌ترین ماهیان زینتی دنیا شناخته شده می‌شود که سالیان متمادی است که مهمان تنگ‌های بلورین منازل ایرانیان به‌ویژه در ایام عید باستانی نوروز است و نیاز به آن هر ساله بیشتر احساس می‌شود (ایمان پور و کمالی، ۱۳۸۵). این ماهی نسبت به سایر ماهیان زینتی از پیشینه نسبتاً طولانی‌تری در راستای مراقبت و نگهداری توسط بشر برخوردار بوده است و با گسترش علم و تجاری‌سازی آن در عرصه آبی پروری به‌ویژه ماهیان زینتی، همه‌ساله شاهد ظهور ارقام تجاری مختلفی از ماهی قرمز در بازار جهانی هستیم که در کشورهای مختلف به‌ویژه کشور-های جنوب شرق آسیا، نمایشگاه‌ها و فستیوال‌های تخصصی این ماهی جهت معرفی نژادهای جدید، انتخاب ماهیان برتر و زیباتر و معرفی تولیدکنندگان نمونه و جذب گردشگر صورت می‌گیرد؛ که خود بر اهمیت و جایگاه ماهی قرمز در زندگی بشر امروز می‌افزاید (دادگر، ۱۳۸۹). ماهی قرمز به صورت گسترده در مطالعات تولیدمثلی و کنترل هورمونی مورد استفاده قرار می‌گیرد. (Bjerselius and Zheng, 1995). در شرایط اسارت اسپرم ریزی و تخم‌ریزی به صورت کامل صورت نمی‌گیرد و تزریق هورمون برای القای اسپرم ریزی و تخم‌ریزی و همزمانی آزادسازی گامت‌ها ضروری است (Zohar and Mylonas, 2001). یکی از مهمترین مشکلات در تکثیر مصنوعی کپور ماهیان به دست آوردن گامت‌هایی با کیفیت بالا از مولدین

تزریق شده است (Billard, 1992). در شرایط استرس‌زا هورمون LH از هیپوفیز آزاد نمی‌شود در نتیجه باعث عدم توانایی اسپرم ریزی در نرها و کاهش کیفیت و کمیت اسپرم می‌شود (Lim et al., 2004). در صنعت آبی پروری توجه به کیفیت تخم یا لارو نسبت به اسپرم بیشتر است از آنجا که اسپرم با کیفیت مناسب بر روی کیفیت لاروهای تولیدشده اثرگذار است و کارایی لقاح و تکثیر مصنوعی را در ماهیان افزایش می‌دهد (Rurangwa et al., 2004) و استفاده از تکنیک‌هایی جهت افزایش کمیت و کیفیت اسپرم موجب افزایش راندمان تولید خواهد شد. هورمون GnRH^۱ در ماهیان آب‌شور و شیرین باعث بهبود کمیت و کیفیت اسپرم گردیده است (Zohar and Mylonas, 2001; Garcia, 1993; King and Young, 2001; Lim et al., 2002). به همراه یک آنتی‌دوپامین به دلیل قیمت مناسب نسبت به هیپوفیز جهت تزریق به ماهیان مولد مورد استفاده قرار می‌گیرد (Zohar and Mylonas, 2001). اوپریم ترکیبی از هورمون‌های آزادکننده آزادماهیان (sGnRH^۲) و یک ضد دوپامین دومپریدون است (Leelapatra, 1988 Nandeesh et al., 1990). این هورمون به صورت موفقیت‌آمیزی جهت القای اسپرم ریزی در ماهی کپور معمولی مورد استفاده قرار گرفته است (سیفی و همکاران، ۱۳۹۰) هورمون GnRH با اثر بر روی غده هیپوفیز باعث افزایش GTH^۳ و در نتیجه حجم اسپرم و رهاسازی اسپرماتوزوآ به درون لوله اسپرم بر می‌شود (Mylonas et al., 1997). در میان گنادوتروپین‌های پستانداران HCG^۴ تأثیر بسزایی در

^۱ - Gonadotropin Releasing Hormone

^۲ - Salmon Gonadotropin Releasing Hormone analog

^۳ - Gonadotropin hormone

^۴ - Human Chorionic Gonadotropin

القای اسپرم سازی و اسپرم ریزی در ماهیان دارد (Schiavone et al., 2006). طی مطالعاتی که صورت گرفت تزریق یک مرحله ای HCG باعث سرعت بخشیدن به فرآیند اسپرم سازی و تزریق مکرر این هورمون باعث افزایش سطح هورمون استروژن در نتیجه افزایش طول مدت اسپرم سازی و بهبود کیفیت اسپرم می شود؛ که این هورمون به صورت موفقیت آمیز جهت القای اسپرم ریزی در بسیاری از ماهیان از جمله قزل آلا (Oncorhynchus mykiss)^۱ و مارماهی اروپایی (Anguila anguila)^۲؛ (Donaldson and Hunter, 1983; Asturiano et al., 2006) مورد استفاده قرار گرفته است. غده هیپوفیز به طور گسترده در مطالعاتی مورد استفاده قرار می گیرد و به نحو مؤثری اسپرم ریزی را در کپور ماهیان تحریک می کند که دارای قیمت بالایی است و همیشه در دسترس نیست (Zohar and Mylonas, 2001). روش های ارزیابی کیفیت اسپرم شامل (طول دوره حرکت اسپرم، اسپرماتوکریت، درصد تحرک اسپرم، تراکم اسپرم، حجم اسپرم و pH) اسپرم است. در آزاد ماهیان برای ارزیابی کیفیت اسپرم نسبت بین تراکم اسپرم و اسپرماتوکریت مورد بررسی قرار می گیرد (Harald et al., ; Aas et al., 1991; Billard, 1978). طی مطالعه ای در ماهی قزل آلا رنگین کمان مورد بررسی قرار گرفت تزریق GnRH به مقدار کمتر از ۴ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن بعد از اسپرم کشی می تواند به صورت معنی داری سبب جلوگیری از کاهش مقدار اسپرم جمع آوری شده بعد از ۷ روز شود بدون اینکه عوارض جانبی بر روی کیفیت اسپرم ایجاد

کند (Heyrati et al., 2010). هدف از این مطالعه بررسی اثرات هورمون های اوپریم، HCG و عصاره هیپوفیز باربوس روی پارامترهای اسپرم شناختی (طول دوره حرکت اسپرم، اسپرماتوکریت، درصد تحرک اسپرم، تراکم اسپرم، حجم اسپرم و pH) و مقایسه کیفیت اسپرم بین تیمارهای مختلف مولدین نر ماهی قرمز است.

مواد و روش ها

این تحقیق در طی ماه های اردیبهشت و خرداد ۱۳۹۴ در مرکز تحقیقات آبزی پروری شهید ناصر فضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صورت گرفت. تعداد ۴۰ قطعه ماهی مولد نر با میانگین وزن 50 ± 5 گرم جهت انجام مراحل آزمایش از مراکز تکثیر ماهیان زینتی در استان گلستان تهیه شد و به سالن و نیرو دانشکده شیلات منتقل گردید. ماهیان در حوضچه های فایر گلاس با هوادهی ملایم به مدت ۲ ماه با غذای تجاری انرژي در ۲ وعده و به میزان ۳٪ درصد وزن بدن تغذیه گردیدند. در نهایت ماهیان به ۴ تیمار شاهد (تیمار اول)، تزریق اوپریم (تیمار دوم)، تزریق هورمون HCG (تیمار سوم) و تزریق عصاره هیپوفیز باربوس (تیمار چهارم) تقسیم شدند و تیمارها از نظر رسیدگی جنسی مورد بررسی قرار گرفتند بیضه ها به رنگ سفید بوده، فاقد عروق خونی و مملو از اسپرم مایع می باشند که با فشار آوردن به شکم ماهی، چند قطره اسپرم از منفذ تناسلی ماهی خارج و در صورت برش عرضی بیضه، کناره های آن بلافاصله گرد گردیده و برش بلافاصله با اسپرم مایع پر می گردد (فریدپاک، ۱۳۹۲) (شکل ۱). به تیمار سوم به میزان ۱۵۰۰ واحد بین المللی بر کیلوگرم HCG و به تیمار دوم

به مدت یک دقیقه تحرکات اسپرم مورد بررسی قرار گرفت و زمان‌های متفاوتی که اسپرم‌ها در تیمارهای مختلف تحرکشان متوقف شد گرفت و ثبت شد (Kime, 1996).

برای اندازه‌گیری، پس از سانتریفیوژ کردن سمن با دور ۳۰۰۰ دور در ۸ دقیقه در لوله‌های میکرو با استفاده از درصد اسپرم به پلاسمای سیمنال اندازه‌گیری شد، بدین منظور میانگین ۱۰ نمونه اسپرم در سه تکرار به‌عنوان مقدار اسپرماتوکریت ثبت شد (Fitzpatrick et al., 2005).

این آزمایش در غالب یک طرح کاملاً تصادفی تنظیم شد و پس از تست نرمال بودن داده‌ها برای مقایسه بین تیمارهای آزمایش از آزمون واریانس یک‌طرفه (ANOVA) دانکن استفاده شد. آنالیز واریانس با استفاده از نرم‌افزار SPSS در محیط ویندوز انجام شد.

نتایج

پارامترهای اسپرم شناختی، اسپرم ماهی قرمز در جدول ۱ آمده است.

نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میانگین pH بین تیمارهای مختلف ماهی قرمز در جدول ۱ نشان داده شده است. همان‌گونه که در جدول مشاهده می‌شود بین pH در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($P < 0.05$) بیشترین میزان pH در تیمار دوم (اوپریم) مشاهده شد.

بین درصد اسپرم‌های متحرک در تیمارهای مختلف ماهی قرمز اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($P < 0.05$)، به‌گونه‌ای که در تیمار دوم (اوپریم) و سوم (HCG) بالاترین درصد تحرک مشاهده شد،

۰/۲ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن اوپریم (ایمان پور و کمالی، ۱۳۸۵) و تیمار چهارم عصاره هیپوفیز ماهی باربوس به میزان ۳ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تزریق شد (Zohar and Mylonas, 2001) و بعد از گذشت ۱۲ ساعت از زمان تزریق HCG و گذشت ۱۲ ساعت از زمان تزریق عصاره هیپوفیز، جابجایی ماهیان به کمک بیهوشی با اسانس گل میخک با غلظت ۶۰-۴۰ میلی گرم در لیتر صورت گرفت (ستاری، ۱۳۸۱) و پس از بیهوشی ماهیان توسط آب شستشو داده شدند زیرا برخی مواد بیهوش کننده، مانند عصاره گل میخک قادرند قدرت تحرک اسپرم و کیفیت تخمک را کاهش دهند (ستاری، ۱۳۸۱). بعد از خشک کردن منفذ تناسلی بدون آلودگی یا ادرار، با فشار ملایم به ناحیه شکمی از ماهیان مولد نر اسپرم‌گیری به عمل آمد (Asturiano et al., 2006). نمونه‌های منی با دقت و بدون اینکه با آب، ادرار یا خون آلوده شوند جمع‌آوری شد و در سرنگ‌های استریل و مجاورت هوا (نسبت حجم هوا به سمن ۲ به ۱) به وسیله فلاکس محتوای یخ، در کمتر از ۴ ساعت به آزمایشگاه پاتوبیولوژی کاوش واقع در گرگان جهت اندازه‌گیری پارامترهای موردنظر انتقال داده شد (Secer et al., 2004).

در طول این آزمایش اثرات HCG و Ovaprim و هیپوفیز ماهی باربوس بر شاخص‌های اسپرم شناختی ماهی قرمز (*Carassius auratus gibelio*) شامل آنالیزهای حرکتی، اندازه‌گیری تراکم اسپرم، pH اسپرم و حجم اسپرم با سیستم ارزیابی اسپرم توسط کامپیوتر کاسا^۱ مورد بررسی قرار گرفت. اسپرم با آب مقطر به نسبت ۱ به ۲۰۰۰ ترکیب شد زیر مدت زمان ۷ ثانیه مورد بررسی قرار گرفت و توسط دستگاه ثبت گردید و

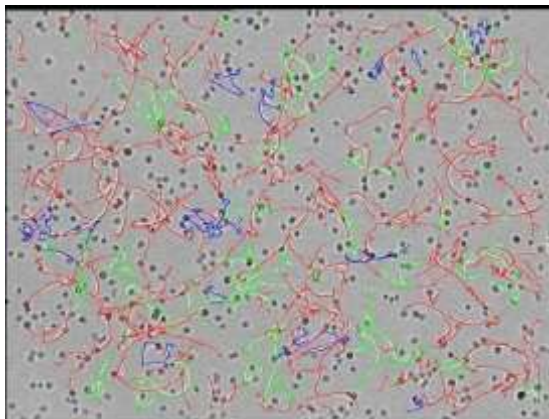
در صورتی که طول دوره حرکت اسپرم در تیمارهای مختلف ماهی قرمز اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($P>0/05$).

همان گونه که در جدول زیر نشان داده شده، بین میانگین اسپرماتوکریت در تیمارهای مختلف اختلاف معنی داری وجود داشت ($P<0/05$)، به گونه ای که در تیمار دوم (اوپریم) بالاترین درصد اسپرماتوکریت و بالاترین میزان تراکم اسپرم مشاهده شد؛ که در شکل های زیر (۲، ۳، ۴ و ۵) نشان داده شده است.

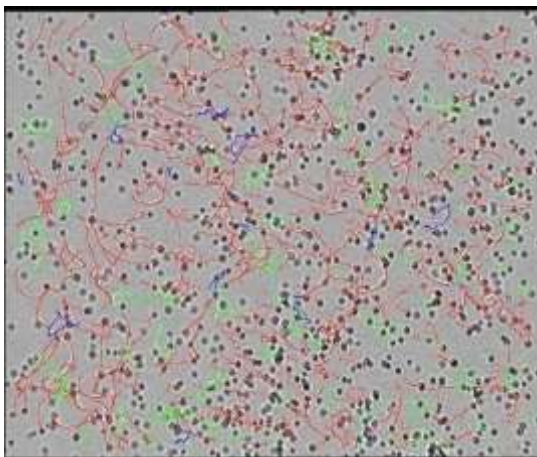
نتایج آنالیز واریانس و مقایسه حجم اسپرم بین تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز در جدول ۱ نشان داده شده است که بین حجم اسپرم در تیمارهای مختلف اختلاف معنی داری مشاهده شده است ($P<0/05$). به گونه ای که در تیمار چهارم هیپوفیز و دوم (اوپریم) به ترتیب بالاترین حجم مشاهده شده است.



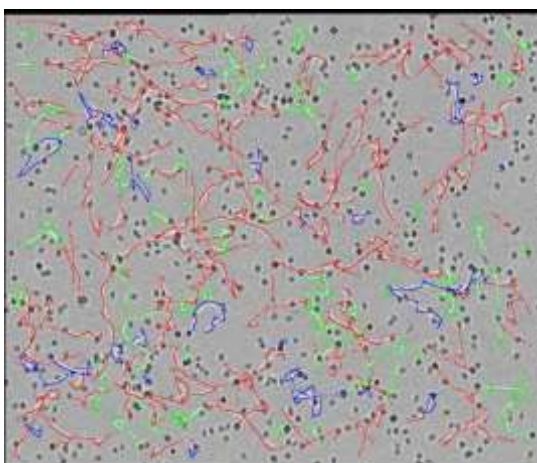
شکل ۱: گنادهای ماهی قرمز در مرحله ۴ رسیدگی جنسی



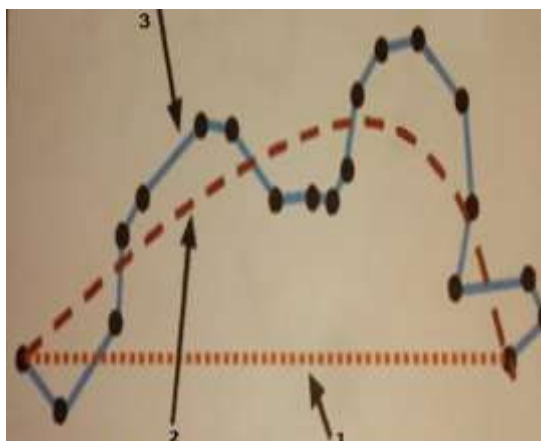
شکل ۲: بیشترین تعداد اسپرم در تیمار چهارم (۱۱۳,۲۳ میلیون در میلی لیتر)



شکل ۳: بیشترین تعداد اسپرم در تیمار دوم (۱۹۲,۸۸ میلیون در میلی لیتر)

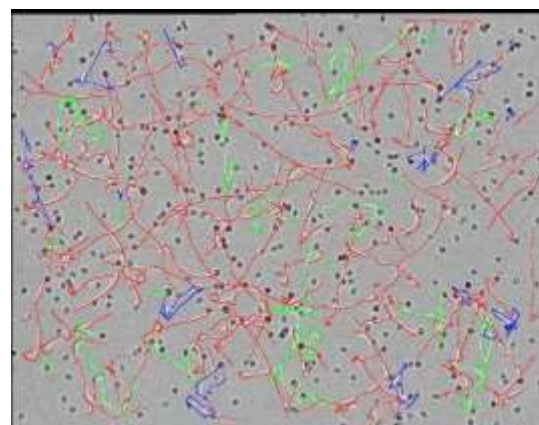


شکل ۴: بیشترین تعداد اسپرم در تیمار دوم (۱۴۳,۲۳ میلیون در میلی لیتر)



شکل ۶: نمایش حرکت اسپرم در مسیرهای مختلف توسط سیستم CASA در تیمار دوم

- ۱- اسپرم در خط مستقیم حرکت می کند
- ۲- اسپرم به صورت منحنی حرکت می کند
- ۳- اسپرم به صورت دورانی حرکت می کند



شکل ۵: بیشترین تعداد اسپرم در تیمار اول (۱۲۳,۲۳ میلیون در میلی لیتر)

جدول ۱: داده های پارامترهای اسپرم شناختی سمن در ماهی قرمز در بین تیمارها

تیمار	تیمار ۱ (شاهد)	تیمار ۲ (اوپریم)	تیمار ۳ (HCG)	تیمار ۴ (هیپوفیز)
pH	$6/50 \pm 2/42^b$	$7/77 \pm 0/368^a$	$7/76 \pm 0/24^a$	$7/65 \pm 0/34^a$
طول دوره حرکت	$32/30 \pm 12/27^a$	$36/70 \pm 12/26^a$	$41/0 \pm 7/43^a$	$35/60 \pm 14/05^a$
درصد اسپرم متحرک	$78/72 \pm 18/71^b$	$93/48 \pm 9/48^a$	$96/60 \pm 4/68^a$	$90/65 \pm 12/40^a$
اسپرماتوکریت	$33/92 \pm 2/98^a$	$48/45 \pm 11/80^b$	$42/5 \pm 10/42^b$	$33/11 \pm 4/70^a$
تراکم اسپرم $10^9 \times$	$70/05 \pm 27/13^b$	$137/71 \pm 38/46^a$	$119/4 \pm 40/5^a$	$82/79 \pm 29/11^b$
حجم اسپرم	$0/280 \pm 0/147^b$	$0/470 \pm 0/163^{ab}$	$0/460 \pm 0/254^{ab}$	$0/590 \pm 0/321^a$

حروف غیرمشابه در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی دار است ($p < 0.05$).

بحث

معنی داری باعث افزایش pH مایع سمنال در ماهی قرمز شدند (به ترتیب $7/77 \pm 368$ ، $7/76 \pm 24$ و $7/65 \pm 34$). که با تحقیقات Zadmajid و همکاران (۲۰۰۸) و Miura و همکاران (۱۹۹۱) همخوانی دارد. Billard و همکاران (۱۹۷۸) گزارش کردند pH مهم ترین مشخصه پلاسمای سمنال است که روی پتانسیل حرکتی در اسپرم کپور ماهیان تأثیر می گذارد. پارامترهای مختلفی از قبیل غلظت یونها (پتاسیم، سدیم و کلسیم)، فشار

در سیستم پرورشی مدرن برای تولید گامت هایی باکیفیت بالا و افزایش تولید نیازمند مولدین نر و ماده باکیفیت بالا است (Heyrati et al., 2010). مطالعه حاضر نشان داد هورمون های اوپریم، HCG و عصاره هیپوفیز تأثیر معنی داری روی پارامترهای اسپرم شناختی در ماهی قرمز دارند. طبق مشاهدات این تحقیق هورمون های اوپریم، HCG و عصاره هیپوفیز به طور

اسمزی، pH، درجه حرارت و نسبت رقیق کننده روی حرکت اسپرم مؤثرند (Alavi and Cosson, 2006). pH سلولی بخش مهمی از مسیرهای سیگنالینگ است بنابراین بر تحرک اسپرم تأثیر گذار است. افزایش pH داخل اسپرماتوزوآ به طور مستقیم بر تحرک اسپرماتوزوآ از طریق مهار فعالیت دین^۱، تأثیر می گذارد. مبدل $(\text{NHE})\text{NH}^+/\text{H}^+$ از یک خانواده از پروتئین های درگیر در تنظیم pH درون سلولی تشکیل می شود و مشارکت NHE در فعالیت اسپرماتوزوآ در کپور معمولی گزارش شده است (Dzyuba and Cosson, 2014). Marian و همکاران (۱۹۹۷) نشان دادند که تنظیم NHE بستگی به اسمولاریته دارد علاوه بر این تبادل Na^+/H^+ ممکن است مسئول مشارکت یون های سدیم در تحرک اسپرماتوزوای قزل آلا ی رنگین کمان است درحالی که خود کانال های سدیمی نقش مهمی را بازی نمی کنند. نتایج مطالعات Krasznai و همکاران (۲۰۰۳) مربوط به مهار تحرک اسپرماتوزوای کپور معمولی به وسیله مسدود کننده های کانال های کلسیمی نشان می دهد که Ca^{2+} از طریق کانال های کلسیمی می شود و در نتیجه باعث افزایش قابل توجه یون کلسیم در داخل سلول و تحرک اسپرماتوزوای کپور معمولی می شود که عملکرد کانال های کلسیمی ممکن است با فعالیت کانال های پتاسیمی همراه شود و باز یا بسته بودن کانال های پتاسیم در غشای پلاسمایی اسپرماتوزوآ تحت کاهش فشار اسمزی ناشی از شروع تحرک منجر به هیپرپلاریزاسیون یا دی پلاریزاسیون غشای پلاسمایی می شود که چنین دی پلاریزاسیون گذرایی ممکن است کانال های Ca^{2+} را باز کند و نتیجه آن ورود یون پتاسیم و فعالیت تحرک تاژک اسپرماتوزوای کپور می شود

(Tanimoto and Morisawa, 1988). علاوه بر این دخالت یون های پتاسیم و کلسیم در شروع تحرک نیز در قزل آلا ی رنگین کمان نشان داده شده است (Krasznai et al., 2003). برخی تحقیقات به نقش معنی دار بودن یون های سدیم-کلسیم در تحرک اسپرماتوزوای چندین گونه ماهی تأکید می کند که نشان می دهد بیپریدیل^۲ یک مسدود کننده ی مبدل یون های سدیم-کلسیم است که از تحرک اسپرماتوزوای کپور معمولی جلوگیری می کند (Krasznai et al., 2003; Vines et al., 2002). فضای داخل اسپرماتوزوآ محدود است، اما یک لایه نازک سیتوپلاسمی که مرتبط با مناطق و حاوی واسطه هایی است به سلول اجازه می دهد تا سیگنال های دریافتی را رمزگشایی کند و آن ها را به سایت های مناسب تحویل دهد برای مثال افزایش غلظت یون های داخل سلولی ممکن است سیکلاز آدنین می شود که به نوبه خود شروع تحرک اسپرم را توسط مکانیسم وابسته به CAMP^3 تنظیم می کند (Zilli et al., 2011). در این مطالعه بین درصد اسپرم های متحرک اختلاف معنی دار مشاهده شد ($P < 0.05$) به گونه ای که به ترتیب تیمار دوم و سوم و چهارم بالاترین درصد تحرک نسبت به شاهد مشاهده شد طی مطالعه ای نشان داده شد که mGnRHa بر درصد تحرک اسپرم قزل آلا ی رنگین کمان تأثیر ندارد که نتایج مشابه توسط Sorbera و همکاران (۱۹۹۶) در باس دریایی (Seabass) گزارش شده است. در برخی از گونه ها از قبیل فلاندر دم زرد (Yellow tail flounder)، هورمون mGnRHa^۴ با افزایش pH پلاسمای سیمنال باعث افزایش تحرک اسپرم می شود

^۲. bepridil

^۳. cyclic adenosine monophosphate

^۴. mammals Gonadotropin Releasing Hormone analog

^۱. Dynein

(Clearwater and Crim, 1998). یک رابطه خطی مثبت بین pH سمینال پلاسما و درصد تحرک اسپرم در کپور ماهیان وجود دارد (Lahnsteiner et al., 1996) که با یافته‌های این تحقیق همخوانی دارد. بین طول دوره تحرک اسپرم در تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد که با مطالعات صورت گرفته Bushman و همکاران (۲۰۰۳) و Zadmajid و همکاران (۲۰۰۸) همخوانی دارد که این محققین به ترتیب نشان دادند که تزریق هورمون HCG روی طول دوره‌ی تحرک اسپرم در گونه With Sager (*Stizostedion candense*)، تزریق GnRH روی طول دوره حرکت اسپرم در گونه هالیوت اقیانوس اطلس (*H. hippogiossus*) تأثیری ندارد تحرک اسپرم در ماهیان آب شیرین به وسیله یک غلظت اسمزی پایین‌تر از خون فعال می‌شود. اسپرم ماهیان آب شیرین طول عمر نسبتاً کوتاهی را با توجه به نیازهای انرژی بالای آن و میزان پایینی از تولیدات آدنوزین تری فسفات (ATP) که ظرفیت آن‌ها را برای گرفتن ATP محدود می‌کند. اسپرم بعضی از ماهیان دریایی و آب شیرین طول عمر استثنایی را نشان می‌دهد؛ که در ماهی توربوت (*Scophthalmus maximus*) طول عمر بالا مکانیسمی است برای تولید اسپرم کمتر و همچنین در ماهی تیلاپیا طول اسپرم تیلاپیا برای ساعت‌ها محدود است (Browne et al., 2015). اسپرماتوزوای آزاد ماهیان و کپور ماهیان دارای فسفوکرآتین (PCr) و کراتین کیناز (CK) هستند که فرم ATP را از آدنوزین دی فسفات (ADP) کاتالیز می‌کند (Smith and Yang, 2004; Saudrais et al., 1998). بنابراین اسپرماتوزوای ATP را توسط PCr و ADP تولید شده توسط تحرک را از طریق CK باز تولید

می‌کند بنابراین شروع تحرک اسپرماتوزوای کپور معمولی همراه با افزایش حجم سلول است (Dzuba et al., 1997; Perchec et al., 2001). اسپرم کپور همچنین تحمل اسمزی کمی را هنگامی که فعال شده، کاهش سرعتشان را سریع در آب مقطر نشان می‌دهد که یک تورم رو به رشد خود را متوقف می‌کند و تاژک کوتاه می‌شود و اثبات شده که وابستگی دما و گونه‌های خاص به احتمال زیاد منجر به اختلاف آشکار در مطالعات شده است (Browne et al., 2015). امواج با یک فرایند پیچشی که ممکن است در نوک تاژک‌ها به صورت کانون‌مند به وسیله استرس‌های اسمزی توسعه پیدا کند، با این وجود بعضی تغییرات در طول عمر با یک طیف از افزایش اسمولاریته می‌تواند در ماهی کپور و پاروپایان مشاهده شود (Browne et al., 2015). سرعت نسبتاً بالا و طول عمر کم اسپرم ماهی دارای لقاح خارجی نشان می‌دهد که سرعت نسبت به طول عمر برتر است (Alavi et al., 2008). تخمین صحیح غلظت اسپرم برای بسیاری از آزمایش‌ها در رابطه با لقاح ماهی و نگهداری اسپرم ضروری است، برای تخمین سریع‌تر و عملی‌تر تراکم اسپرم از نرم‌افزار CASA استفاده می‌شود (Kime, 1996). در مطالعه حاضر بین میانگین اسپرماتوکریت در تیمارهای مختلف ماهی قرمز اختلاف معنی‌دار دارد ($P < 0.05$) به گونه‌ای که در تیمار دوم بالاترین درصد اسپرماتوکریت مشاهده شد که از تیمار هیوفیز، HCG و شاهد بیشتر بوده که با نتایج Viveiros و همکاران (۲۰۰۲) مطابقت دارد ($48/45 \pm 11/80$) و بین تراکم اسپرم در تیمارهای مختلف ماهی قرمز اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($P < 0.05$). به گونه‌ای که در تیمار دوم بالاترین تراکم اسپرم مشاهده شد که با مطالعات صورت گرفته توسط

معمولی و مارماهی ژاپنی (*Anguila japonica*) همخوانی دارد. در شرایط اسارت استفاده از هورمون‌ها جهت فرآیند تولیدمثل به‌طور معنی‌داری در افزایش سطح ۱۷-آلفا-۲۰ بتا - دی‌هیدروکسی پروژسترون دخالت دارند. همچنین ۱۷-آلفا-۲۰ بتا - دی-هیدروکسی پروژسترون به‌صورت معنی‌داری باعث افزایش حجم اسپرم در ماهی قرمز می‌شود (Bjerselius *et al.*, 1995). نتایج این تحقیق نشان داد اوپریم و HCG نسبت به هیپوفیز تأثیر معنی‌داری روی پارامترهای اسپرم شناختی ماهی قرمز دارد و به‌طور موفقیت‌آمیزی فرایند اسپرم‌سازی و اسپرم‌ریزی را در این گونه تحریک می‌کند.

سپاسگزاری

از مسئول محترم سالن و نیرو دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مهندس علی جعفر به دلیل در اختیار دادن امکانات و راهنمایی‌های لازم، مسئولین محترم آزمایشگاه هیستوپاتولوژیکی کاوش و از مهندس حامد آزادی، مهندس امید امیری و مهندس میثم دهقانی قمشانی جهت همکاری کمال تشکر رادارم.

منابع

- ایمان پور، م.ر.، کمالی، ا.، ۱۳۸۵. بررسی تکثیر مصنوعی و پرورش لارو ماهی قرمز *Carassius auratus gibelio* توسط HCG. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ۱۳(۲)، ۱۶۵-۱۷۲.
- دادگر، ش.، ۱۳۸۹. راهنمای مراقبت از ماهی قرمز، چاپ اول، تهران: انتشارات موج سبز، صفحه ۳.

Billard و Linhart (۱۹۹۴) همخوانی ندارد. در مطالعه‌ای که روی ماهی بنی (*Barbus sharpeyi*) صورت گرفت عصاره هیپوفیز کپور معمولی تراکم کمتری از اسپرم را نسبت به LHRHA2 تولید کرد (کلباسی و همکاران، ۱۳۹۱) که با مطالعه حاضر همخوانی دارد. طی مطالعاتی که روی هالیوت اطلس (*H. hippoglossus*) صورت گرفت GnRH باعث افزایش تراکم اسپرم شده بود (Harald *et al.*, 2001). ماهیانی که در آب‌های باز اسپرم و تخمک رها می‌کنند تراکم بیشتری از اسپرم و تخمک را تولید می‌کنند اسپرم برای لقاح باید به سمت اووسیت حرکت کند و برای پیدا کردن میکروپیل و نفوذ به درون تخمک رقابت کند (Browne *et al.*, 2015). در این تحقیق HCG نسبت به اوپریم تراکم کمتری از اسپرم را تولید کرد ولی نسبت به عصاره‌ی هیپوفیز تراکم بیشتری از اسپرم را آزاد کرد که تولید اسپرم با تراکم کمتر از اوپریم با تحقیقات Zadmajid و همکاران (۲۰۰۸)، سیفی و همکاران (۱۳۸۹) و Asturiano و همکاران (۲۰۰۶) همخوانی دارد. همچنین Asturiano و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند استفاده از هورمون HCG در گونه مارماهی اروپایی تأثیر کمی روی تراکم اسپرم دارد ولی در مقایسه با هیپوفیز تراکم بیشتر تولید کرد که از این نظر با تحقیقات افراد ذکر شده همخوانی ندارد. در مطالعه حاضر بین حجم اسپرم در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($P < 0.05$). به‌گونه‌ای که در تیمار چهارم (عصاره‌ی هیپوفیز) و تیمار دوم (اوپریم) بالاترین حجم اسپرم نسبت به تیمار شاهد و HCG مشاهده شد که با تحقیقات Zadmajid و همکاران (۲۰۰۸)، سیفی و همکاران (۱۳۸۹) و Ohta و Tanaka (۱۹۹۷) که به ترتیب روی ماهی قرمز، کپور

- semen quality. *Theriogenology*, 66, 1012-1020.
12. Billard, R., 1978. Changes in structure and fertilizing ability of marine and freshwater fish spermatozoa diluted in media of various salinities. *Aquaculture*, 14, 187-198.
 13. Billard, R., 1992. Reproduction in rainbow trout: Sex differentiation, dynamic of gametogenesis, biology and preservation of gametes. *Aquaculture* 100, 263-298
 14. Bjerselius, R., Olsen, K.H., Zheng, W., 1995. Endocrine, gonadal and behavioral responses of male crucian carp *Carassius carassius* to the hormonal pHeromone 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one. *Chem. Senses*, 20, 221-230.
 15. Browne, R. K., Kaurova, S. A., Uteshev, V. K., Shishova, N. V., McGinnity, D., Figiel, C. R., Cosson, J., 2015. Sperm motility of externally fertilizing fish and amphibians. *Theriogenology*, 83(1), 1-13.
 16. Bushman, R.B., Edwin J. Hansen, E.J., Petges, R.P., 2003. Enhancement of semen production in sauger with human chorionic gonadotropin, *Transactions of the Illinois State Academy of Science*, 96, 229-233.
 17. Clearwater, S.J., Crim, L.W., 1998. Gonadotropin releasing hormone-analogue treatment increases sperm motility, seminal plasma pH and sperm production in yellowtail flounder *Pleuronectes ferrugineus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 19, 349-357
 18. Donaldson, E.M., and Hunter, G.A., 1983. Induced final maturation, ovulation, and spermiation in cultured fish. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. (Eds.), *Fish physiology*. Academic Press, New York, USA, pp. 351-403.
 19. Dzuba, B.B., Bozhok, G.A., Rudenko, S.V., 2001. A study of the dynamics of volume changes during the period of active motility in carp, *Cyprinus carpio* L., spermatozoa. *Aquaculture Research*, 32(1), 51-6
 20. Dzyuba, V., & Cosson, J., 2014. Motility of fish spermatozoa: from external signaling to flagella response. *Reproductive biology*, 14(3), 165-175.
 ۳. ستاری، م.، ۱۳۸۱. ماهی شناسی (۱) تشریح فیزیولوژی. انتشارات نقش مهر، صفحه ۴۲۵.
 ۴. سیفی، ت.، ایمانپور، م.ر.، جعفری، و.، مخدومی، چ.، ۱۳۹۰. مقایسه اثرات تزریق هورمون اووپریم، HCG و عصاره هیپوفیز بر کیفیت اسپرم تولیدی در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus Carpio*). نشریه شیلات، مجله منابع طبیعی ایران. ۶۴(۱)، ۵۵ تا ۶۳.
 ۵. فریدپاک، ف.، ۱۳۹۲. دستورالعمل اجرایی تکثیر مصنوعی و پرورش ماهیان گرمابی. چاپ هفتم، انتشارات علمی آریان، ۳۰۸ صفحه.
 ۶. کلباسی، م.ر.، لرستانی، ر.، غفله مرمزی، ج.، ۱۳۹۱. تاثیر هورمونهای LHRHA 2 و عصاره غده هیپوفیز کپور معمولی بر برخی از شاخص های لقاح و کیفیت اسپرماتوزوای ماهی بنی *Barbus sharpeyi*. مجله علمی شیلات ایران. ۲۱(۲)، ۹۹-۱۱۴.
 ۷. وثوقی، غ. ح.، مستجیر، ب.، ۱۳۸۵. ماهیان آب شیرین. انتشارات دانشگاه تهران. ۳۱۷ صفحه.
 8. Aas, G.H., Refstie, T., and Gjerde, B., 1991. Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. *Aquaculture*, 95, 125-132.
 9. Alavi, S.M.H., Rodina, M., Policar, T., Cosson, J., Kozak, P., Psenicka, M., Linhart., 2008. Physiology and behavior of stripped and testicular sperm in *Perca fluviatilis* L. 1758. *Cybiu*, 32(2), 162-163
 10. Alavi, S.M.H., and Cosson, J. 2006. Sperm motility in fishes. II. Effects of ions and osmolality: a review, *cell biology international*, 30, 1-14
 11. Asturiano, J.F., Mrco-Jimenez, F., Perez, L., Balasch, S., Garzon, D.L., Penaranda, D.S., Vicente, J.S., Viudes-de-Castro, M.P., and Jover, M., 2006. Effect of HCG as spermiation inducer on European eel

- Aquaculture International Congress and Exposition, Vancouver. Pp. 331-337.
30. Lim, H.K., Pankhurst, N.W., and Fitzgibbon, Q.P., 2004. Effects of slow release gonadotropin releasing hormone analog on milt characteristics and plasma levels of gonadal steroids i greenback flounder J (*Rhombosolea tapirina*). Aquaculture, 240, 505–516
 31. Linhart, O., Billard, R., 1994. Spermiation and sperm quality of European catfish (*Silurus glanis*) after implantation of GnRH analogues and injection of carp pituitary extract. Journal of Applied Ichthyology, 10, 182– 188.
 32. Marian, T., Krasznai, Z., Balkay, L., Balazs, M., Emri, M., Tron, L., 1997. Role of extracellular and intracellular pH in carp sperm motility and modifications by hyperosmosis of regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger. Cytometry, 27(4), 374–82
 33. Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., Nagahama, Y., 1991. The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish. Journal of Experimental Zoology, 261, 35963.
 34. Mylonas, C.C., Gissis, A., Magnus, Y., and Zohar, Y., 1997. Hormonal changes in male white bass (*Morone chrysops*) and evaluation of milt quality after treatment with a sustained-release GnRHa delivery system. Aquaculture, 153, 301– 313
 35. Nandeesh, M.C., Rao, K.G., Jayanna, R.N., Parker, N.C., Varghese, T.J., Keshavanath, P., Shetty, H.P.C., 1990. Induced spawning of Indian major carps through single application of Ovaprim-C. In: The Second Fisheries Forum. (Eds. Hirano, R. and Hanyu, I.), Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. 991 pp.
 36. Ohta, H., Tanaka, H., 1997. Relationship between serum levels of human chorionic gonadotropin HCG and 11-ketotestosterone after a single injection of HCG and induced maturity in the male Japanese eel, *Anguilla japonica*. Aquaculture, 153, 123– 134.
 37. Percec, P, G., Gatti, J.L., Cosson, J., Jeulin, C., Fierville, F., Billard, R., 1997. Effects of extracellular environment on the osmotic signal transduction involved in
 21. Fitzpatrick, J.L., Henry, J.C., Leily, N.R., Devlin, R.H., 2005. Sperm characteristics and fertilization success of masculinized Coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. Aquaculture. 249, 459-468.
 22. Garcia, L.M.B., 1993. Sustained production of milt in rabbit fish, *Siganus guttatus* Bloch, by weekly injection of luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LHRHa). Aquaculture, 113, 261–267.
 23. Harald, B.T., Tillmann, J.B., Deborah, J.M.R., Joanne, P., 2001. The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. Aquaculture, 194, 191– 200.
 24. Heyrati, F. P., Amiri, B. M., Dorafshan, S., 2010. Effect of GnRHa injection on milt volume in recently stripped rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture Research, 41(10), e487-e492.
 25. Kime, D.E., 1996. Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish; application to effects of heavy metals. Aquatic toxicology, 36(3-4), 223-237.
 26. King, H.R., and Young, G., 2001. Milt production by non-permeating male Atlantic salmon (*Salmo salar*) after injection of a commercial gonadotropin releasing hormone analog preparation, 17 α dihydroxy- 4-pregnen-3-one, alone or in combination. Aquaculture, 193, 179– 195.
 27. Krasznai Z, Morisawa M, Morisawa S, Krasznai ZT, Tron L, Gaspar R, Marian T. 2003. Role of ion channels and membrane potential in the initiation of carp sperm motility. Aquatic Living Resources, 16(5), 445–9.
 28. Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., Patzner, R.A., 1996. Motility of spermatozoa of *Alburnus alburnus* (Cyprinidae) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism. Fish Physiology and Biochemistry, 15, 167– 179
 29. Leelapatra, W., 1988. Carp culture in Thailand with particular emphasis on induced spawning. In Proceedings of the

- bass. Journal of Experimental Zoology, 276, 361-368.
44. Tanimoto, S., Morisawa, M., 1988. Roles for potassium and calcium channels in the initiation of sperm motility in rainbow trout. Dev Growth Differ; 30(2), 117-24.
 45. Vines, C.A., Yoshida, K., Griffin, F.J., Pillai, M.C., Morisawa, M., Yanagimachi, R., Cherr, G.N., 2002. Motility initiation in herring sperm is regulated by reverse sodium-calcium exchange. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 99(4), 2026-31.
 46. Viveiros, A.T.M., Fesehay, Y., ter Veld, M., Schulz, R.W., Komen, J., 2002. Hand-stripping of semen and semen quality after maturational hormone treatments, in African catfish *Clarias gariepinus*. Aquaculture, 213, 373-386.
 47. Zadmajid, V., Imanpoor, M.R., Sudagar, M., Shabani, A., 2008. Comparison the injection effects of GnRHa, HCG and pituitary extract on Spermatological parameters in goldfish (*Carassius auratus*). Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources, 15(1), 1- 9.
 48. Zilli, L., Beirao, J., Schiavone, R., Herraes, M.P., Cabrita, E., Storelli, C., Vilella, S., 2011. Aquaporin inhibition changes protein phosphorylation pattern following sperm motility activation in fish. Theriogenology, 76(4), 737-44.
 49. Zohar, Y., Mylonas, C.C., 2001. Endocrine manipulation of spawning in cultured fish: from hormones to genes. Aquaculture, 197, 99-136.
 - activation of motility of carp spermatozoa. Journal of Reproduction & Infertility, 110 (2), 315-27.
 38. Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollivier, F., and Nash, J.P., 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquaculture 234, 1-28.
 36. Zohar, Y., and Mylonas, C.C. 2001.
 39. Saudrais, C., Fierville, F., Loir, M., Le, Rumeur, E., Cibert, C., Cosson, J., 1998. The use of phosphocreatine plus ADP as energy source for motility of membrane-deprived trout spermatozoa. Cell Motility and the Cytoskeleton, 41(2), 91-106.
 40. Secer, S., Tekin, N., Bozkurt, Y., 2004. Correlation between biochemical and spermatological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Bamidgeh, 56, 274-280.
 41. Schiavonea, R., Zillia, L., Vilella, S., Fauvelb, C., 2006. Human chorionic gonadotropin induces spermatogenesis and spermiation in 1-year-old European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Assessment of sperm quality. Aquaculture, 255(1-4), 522-531.
 42. Smith, E.F., Yang, P., 2004. The radial spokes and central apparatus: mechanochemical transducers that regulate flagellar motility. Cell Motility and the Cytoskeleton, 57(1), 8-17.
 43. Sorbera, L.A., Mylonas, C.C., Zanuy, S., Carrilo, M., Zohar, Y., 1996. Sustained administration of GnRHa increase milt volumewithout altering spermcounts in sea