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

- **احسان احمدی‌فر***: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ٤٨٧-٤٩١٧٥
- **محمدرضا ایمانپور**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ٤٨٧-٤٩١٧٥
- **وحید زادمجید**: گروه شیلات، دانشگاه کردستان، صندوق پستی: ٤١٦
- **کوروش امینی**: مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آب‌های داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، صندوق پستی: ۱۳۹
- **بهرام فلاحتکار**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، صندوق پستی: ١١٤٤

تاریخ دریافت: بهمن ١٣٩٤ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۵

چکیده

این پژوهش به‌منظور 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 ٤ تیمار(تزریق با سرم فیزیولوژی ۰/۷٪، EVAc شامل ۲۰ میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن LHRHa با ٤٠ میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن متوکلوپرماید، پلت‌های کلسترولی شامل ۲۰ میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن LHRHa با ٤٠ میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن متوکلوپرماید و تزریق ۱۰۰ میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن LHRH با ٤٠ میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن متوکلوپرماید قرارگرفتند. نتایج نشان داد فاصله زمانی تا اوولاسیون بین تیمارهای مختلف، تفاوت معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵)، 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<۰/۰۵). بالاترین طول دوره تحرک اسپرم و بالاترین درصد اسپرماتوکریت در تیمار EVAc وجود داشت و بین بقیه تیمارها تفاوت معنی‌دار وجود نداشت (p>۰/۰۵). حجم اسپرم‌دهی در تیمارهای مختلف، تفاوت معنی‌دار داشت (p<۰/۰۵) 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≤۰/۰۵)، و در روزهای ۷، ١٤ و ۲۱ روز بعد از تیمار به‌تدریج مقدار این هورمون در سرم خون مولدین نر ماهی قرمز کاهش یافت. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سطوح هورمون ۱۷- آلفا دی هیدروکسی پروژسترون (نانوگرم بر میلی‌لیتر) و هورمون ۱۷- بتا استرادیول در مولدین ماده در تیمارهای مختلف مورد بررسی تفاوت معنی‌داری با یکدیگر داشت (p<۰/۰۵) 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 ١٤ و ۲۱ 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

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: ehsan.ahmadifar@gmail.com

مقدمه

ماهی قرمز (*Carassius auratus*) از خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) می‌باشد و به لحاظ شرایط زیستی و تغذیه‌ای شبیه کپورمعمولی می‌باشد (وثوق و مستجیر، ۱۳۸۳). تکثیر و پرورش ماهی قرمز به‌منظور تامین ماهی کوچک موردنیاز سر سفره هفت سین نوروزی و اهداف تحقیقاتی چندین سال است که رونق یافته و نیاز به آن هر سال بیش‌تر احساس می‌شود (ایمانپور و کمالی، ۱۳۸۶). این ماهی به‌طور گسترده در مطالعات تولیدمثلی و کنترل هورمونی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Bjerselius و همکاران، ۱۹۹۵). در کپورماهیان هم گونه‌هایی با تخم‌ریزی سالانه و هم گونه‌هایی با تخم‌ریزی‌های مکرر در طول سال دیده می‌شود که چندین بار در طول سال اوله می‌شوند و نوع تخمدان آن‌ها از نوع غیرهم‌زمان است (Zadmajid و همکاران، ۲۰۱۲). ماهی قرمز (*Carassius auratus*) از ماهیانی است که اوولاسیون چند بار در طول سال با دستکاری‌های محیطی در آن انجام می‌شود (Kobayash و همکاران، ۱۹۸۸). دستکاری‌های هورمونی و محیطی این امکان را به پرورش‌دهندگان این ماهی داده تا تکثیر موفقی در طول سال داشته باشند (Zadmajid و همکاران، ۲۰۱۲). اگر این ماهی در دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شود، اووسیت‌های آن می‌تواند برای چندین ماه بدون اوولاسیون و یا تخریب حفظ شود و اوولاسیون می‌تواند به‌وسیله افزایش دمای آب از ۱۲ به ۲۰ درجه سانتی‌گراد همراه با تزریق هورمون اتفاق بیافتد (Yamamoto و همکاران، ۱۹۹۶؛ Stacey و همکاران، ۱۹۷۹a).

در سه دهه گذشته سیستم رسانش پایدار (GnRHa-delivery systems) به‌کار گرفته شده در انواع مختلفی از ماهیان وحشی و پرورشی، که کاربرد آن‌ها سبب افزایش سطوح هورمون LH، هم‌زمانی در تخم‌ریزی، FOM، زیاد شدن زرده سازی، کیفیت تخم، تخم‌ریزی و بازماندگی لارو در ماهیان ماده و هم‌چنین تغییرات استروئیدهای جنسی شده و در نرها هم سبب پیشرفت در اسپرم‌ریزی، افزایش میلت، تولید اسپرماتوزوآ و افزایش تحرک اسپرم به‌وسیله افزایش تولید پلاسمای سمینال شده است (Alavi و همکاران، ۲۰۰۸).

این هورمون به‌طور موفقیت آمیزی در تحریک تخم‌ریزی در بسیاری از گونه‌ها، شامل آزاد ماهیان (Mylonas و همکاران، ۱۹۹۵a)، شانک ماهی (*Githead seabream*) (Zohar و همکاران، ۱۹۸۹)، کفشک زمستانه (*Winter flounder*) (Larsson، ۱۹۹۷)، کفشک زرد باله (*Yellowtail flounder*) (Larsson، ۱۹۹۷) استفاده شده است. مشکل پروتکل‌های تزریق LHRHa ماندگاری کم این هورمون در چرخه تولیدمثلی می‌باشد. از طرفی رسیدگی نهایی اووسیت برای تکامل نیاز به زمان بیش‌تری ممکن است داشته باشد، ایمپلنت‌ها به‌نحوی طراحی شده‌اند که هورمون LHRHa را برای یک دوره چندین هفته‌ای به آرامی رها می‌کنند (Zohar، ۱۹۹۶).

با استفاده از کنترل شرایط محیطی مانند دما و دوره نوری می‌توان 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 (Billard و Berton، ۱۹۸۷). از طرفی اندازه‌گیری سطوح هورمون‌های جنسی در سرم ماهیان استخوانی شاخص مناسبی جهت بررسی روند رشد و تکامل تخمدان محسوب می‌شود (Kroon، ۲۰۰۳). در مقاله حاضر از روش‌های ایمپلنت (EVAc و پلت‌های کلسترولی) و تزریق LHRHa همراه با تغییرات دمایی و نوری برای تحریک اوولاسیون و تغییرات سطوح ۱۷- بتا استرادیول و ۱۷ آلفا دی هیدروکسی پروژسترون در تکثیر خارج از فصل ماهی قرمز استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه و توزین ماهیان: تعداد ۳۰۰ ماهی مولد قرمز با میانگین وزن ۶۷/۶+۵/۴۶ گرم و مولدین ماده با میانگین وزنی ۷۲/۲+۶/۱۲ از مرکز پرورش ماهیان آکواریومی در گرگان در سال ۱۳۹۲ گرم تهیه شدند. ماهیان در مخازن فایبرگلاس (۱ متر قطر، ۰/۵ متر عمق) قرار گرفتند. میانگین فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب بدین شرح بود: (pH: ۷/۵۲+۰/۶، اکسیژن محلول: ۷/۷+۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر، سختی کل: ۲۸۸+۱۳ میلی‌گرم بر لیتر) 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 به‌میزان 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 تنظیم‌کننده نوری و دمایی قرار گرفتند. در ابتدا یک دوره سرمایی ۱۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از کاهش دمایی به‌صورت مرحله‌ای 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 تنظیم گردید، ماهیان به‌مدت ۱۰ روز در شرایط ذکر شده نگه‌داری شدند. پس از پایان دوره سرمایی، به‌منظور تحریک اوولاسیون درجه‌حرارت آب با استفاده از افزایش تدریجی به میزان حداکثر ۲ درجه سانتی‌گراد در روز، به حدود ۲۲ درجه سانتی‌گراد افزایش داده شد (Yamamoto و همکاران، ۱۹۹۶). هم‌زمان با افزایش درجه‌حرارت دوره نوری به دامنه ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی تغییر داده شد. ماهیان به‌مدت ۲ هفته در شرایط ذکر شده نگه‌داری شدند (Aida و همکاران، ۱۹۸۸). تنظیم دوره نوری و درجه‌حرارت به‌ترتیب توسط لامپ‌های فلورسنت ۲۰ واتی متصل به یک زمان‌سنج دیجیتالی و

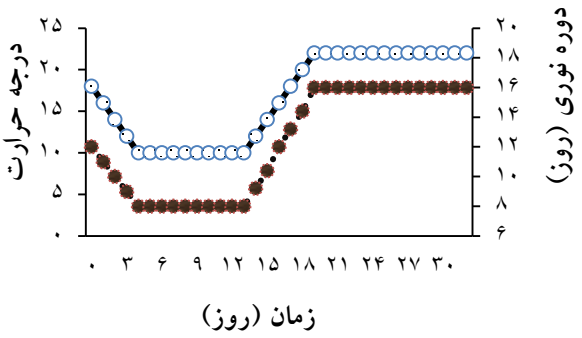
یخچال مجهز به سیستم گرمایی (هیتر) صورت گرفت. برای آماده سازی ایمپلنت‌ها از هورمون LHRHa، آلبومین سرم گاوی و اینولین (سیگما، آلمان)، اتیلن وینیل استات، کلسترول، گلوکز، کره کاکائو و... و بر طبق روش ارائه شده توسط سایر محققین انجام شد (Mylonas و Zohar، ۲۰۰۷).

تزریق و ایمپلنت ماهی قرمز: ماهیان با ۱۵ میلی‌گرم در لیتر 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 میکروگرم/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/کیلوگرم وزن بدن متوکلوپرماید) صورت گرفت. در گروه شاهد LHRH تزریق به‌صورت داخل صفاتی، اما در تیمارهای ایمپلنت، ایمپلنت‌ها با دستگاه ایمپلنتر به‌صورت داخل عضلانی انجام شد. هر گروه از تیمارها شامل ۱۰ عدد ماهی ماده بود. از متوکلوپرماید (موسسه رازی، تهران) هم به‌عنوان 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 پلاسمای خون استخراج شد و توسط جعبه یونولیت حاوی یخ به آزمایشگاه شیمی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان انتقال داده شد، در ادامه نمونه‌ها در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد جهت آنالیز هورمونی نگه‌داری گردید. هورمون تستوسترون پیش‌ساز هورمون آندروژن (۱۱-کتو تستوسترون)، که غالباً از بیضه تولید می‌شود و با روش الایزا به‌عنوان شاخص بررسی گردید. این روش متشکل از کیت الایزایی 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 اصطلاحا آنتی‌بادی مونوکلونال نام دارد. به این ترتیب که مقادیر ۲۵ میکرولیتر از سرم نمونه به همراه استاندارد و سرم کنترل در چاهک مخصوص الایزا ریخته سپس ۲۰۰ میکرولیتر آنزیم کنژوگه در چاهک‌ها ریخته شد و پس از یک ساعت محتوای چاهک‌ها خالی گردید، در ادامه ۲۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا به هرکدام از چاهک‌ها اضافه شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط آنکوبه گردید و در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده فعالیت آنزیمی به چاهک‌ها اضافه شد و با دستگاه الایزا ریدر و سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر و رسم منحنی‌های مخصوص مقادیر هورمون‌ها سنجیده شد (Guzman و همکاران، ۲۰۰۸).

هم‌چنین هورمون ۱۷- بتا استرادیول توسط کیت مونوبایند به روش الایزا اندازه‌گیری شد. جهت سنجش هورمون ۱۷- بتا استرادیول با استفاده از کیت مونوبایند ۲۵ میکرولیتر نمونه و ۲۵ میکرولیتر استاندارد در چاهک‌های مخصوص ریخته شد و به هر کدام ۲۰۰ میکرولیتر آنزیم کنژوکه افزوده شد. سپس به‌مدت ۱۲۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) آنکوبه گردید و ادامه محتوی چاهک‌ها تخلیه گردید و ۵ بار با بافر شستشو، شستشو داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا به هر کدام از چاهک‌ها افزوده گردید و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق آنکوبه گردید. در نهایت به هر کدام از چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده فعالیت آنزیمی اضافه شد و در طول موج ۴۵۰ نانومتر و رسم منحنی‌های مخصوص سنجش انجام شد (Guzman و همکاران، ۲۰۰۸).

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل آماری داده به‌دست آمده در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از نرم‌افزار SPSS و براساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ انجام پذیرفت.



شکل ۱: نمودار تغییرات دوره نوری و درجه‌حرارات در تحقیق حاضر

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

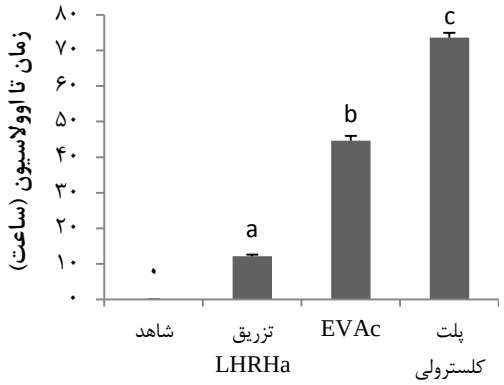
تیمارها	تعداد ماهیان	موادمصرفی	دوز مواد مصرفی
شاهد	۱۰	سرم فیزیولوژی(۰٫۷٪)	۱۰۰ میکروگرم
تزریقLHRHa	۱۰	LHRHa + متوکلوپرماید	۱۰۰میکروگرم+۱۰۰ میکروگرم
EVAc	۱۰	EVAc+ متوکلوپرماید	۲۰میکروگرم+۱۰۰ میکروگرم
پلت‌های کلسترولی	۱۰	پلت‌های کلسترولی+ متوکلوپرماید	۲۰میکروگرم+۱۰۰ میکروگرم

نتایج

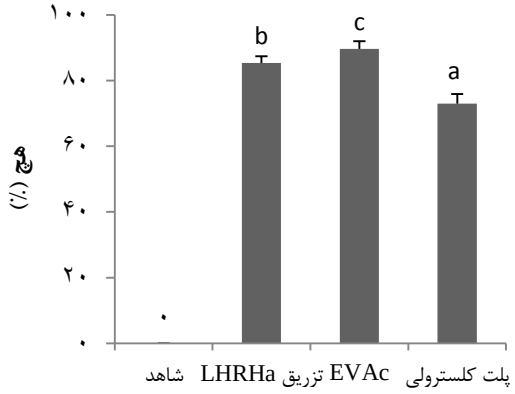
نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد فاصله زمانی تا اوولاسیون بین تیمارهای مختلف، تفاوت معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵)، به‌طوری‌که کم‌ترین فاصله زمانی اوولاسیون در تیمار تزریق LHRHa و بیش‌ترین آن در تیمار پلت کلسترولی مشاهده شد (شکل ۲). بالاترین درصد هچ تخم‌ها در تیمار EVAc و کم‌ترین آن در تیمار پلت کلسترولی وجود داشت(p<۰/۰۵)(شکل۳).شاخص گنادوسوماتیک (درصد) در بین تیمارهای مختلف و در روزهای مختلف نمونه‌برداری با یکدیگر تفاوت معنی‌داری داشت به‌طوری‌که بالاترین مقدار شاخص گنادوسوماتیک در تیمار EVAc اندازه‌گیری شد (شکل ۴). بالاترین طول دوره تحرک اسپرم (شکل ۵) و حجم اسپرم‌دهی در تیمارهای مختلف، تفاوت معنی‌دار داشت (p<۰/۰۵) به‌طوری‌که بیش‌ترین آن در تیمار EVAc و کم‌ترین آن در تیمار شاهد مشاهده شد (شکل ۶). بالاترین درصد اسپرماتوکریت در تیمار EVAc وجود داشت (شکل ۷) و بین بقیه تیمارها تفاوت معنی‌دار وجود نداشت (p>۰/۰۵). تغییرات هورمون تستوسترون در طی اسپرم‌ریزی در تیمارهای EVAc و تزریق LHRHa تفاوت معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها داشت (p≤۰/۰۵)، به‌طوری‌که در تیمار تزریق هورمون و تیمار EVAc بیش‌تر از سایر تیمارها بود و در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ روز بعد از تیمار به‌تدریج مقدار این هورمون در سرم خون مولدین نر ماهی قرمز کاهش یافت (شکل۸).

بر طبق نتایج تحقیق حاضر، سطوح هورمون ۱۷- 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 ۱۴ و ۲۱ بعد از تیمار افزایش یافتند (شکل ۹).

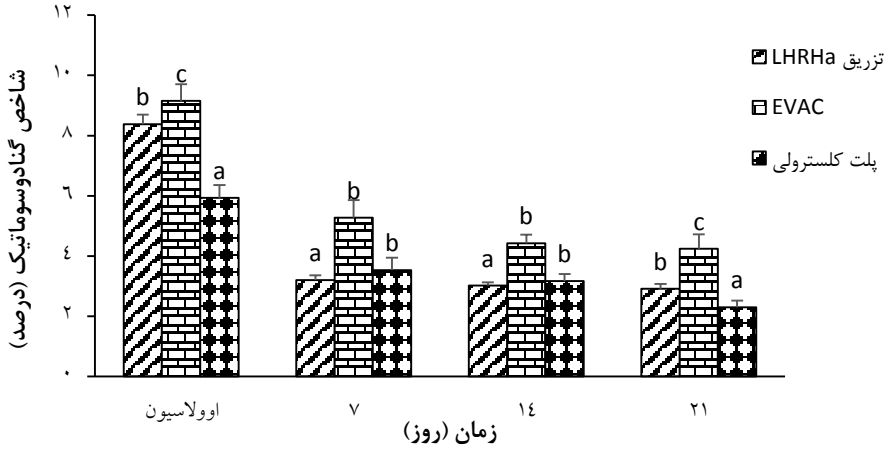
نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سطوح هورمون۱۷- آلفا دی هیدروکسی پروژسترون (نانوگرم بر میلی‌لیتر) در مولدین ماده در تیمارهای مختلف مورد بررسی تفاوت معنی‌داری با یکدیگر داشت (p<۰/۰۵) بطوریکه در تیمار EVAc بیشتر از سایر تیمارها بود. مقدار این هورمون تا روز هفتم بعد از تیمار کاهش یافت اما این هورمون‌ها در روزهای ۱۴ و ۲۱ بعد از تیمار افزایش یافتند (شکل ۱۰).



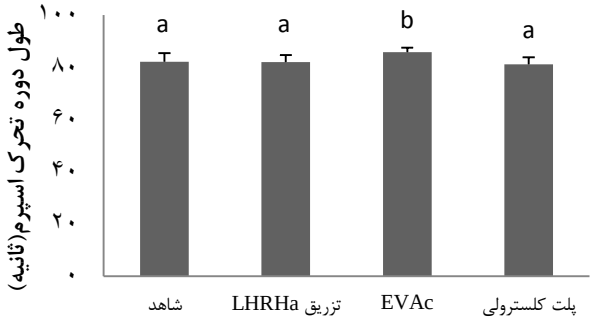
شکل ۲: فاصله زمانی تا اوولاسیون در تیمارهای مختلف



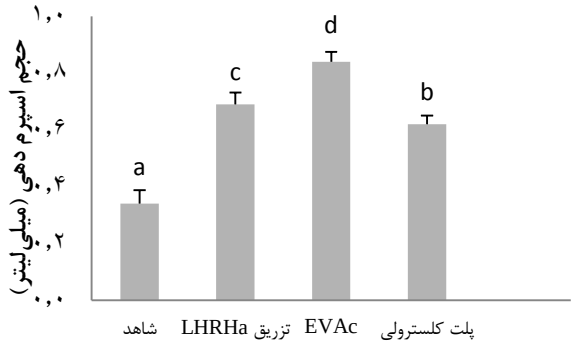
شکل ۳: درصد هچ در تیمارهای مختلف



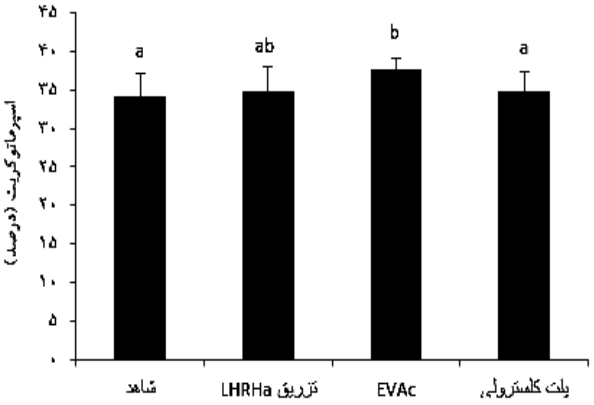
شکل ۴: شاخص گنادوسوماتیک در جنس ماده در روزهای مختلف نمونه برداری



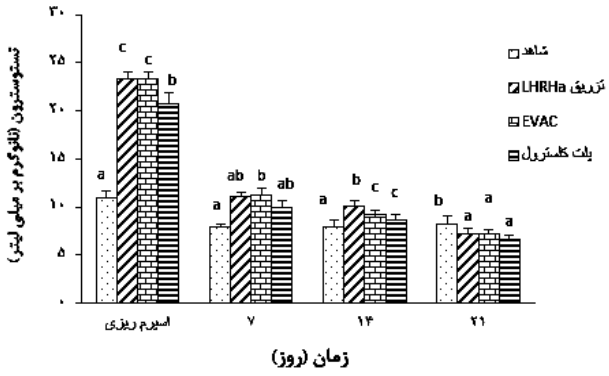
شکل ۵: طول دوره تحرک اسپرم طی اوولاسیون



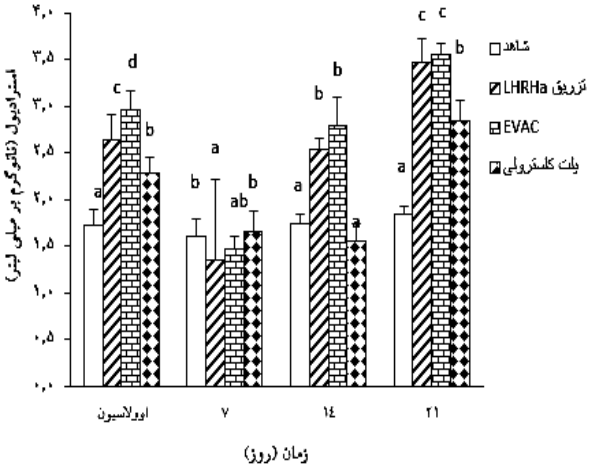
شکل ۶: حجم اسپرم دهی ماهیان نر در تیمارهای مختلف



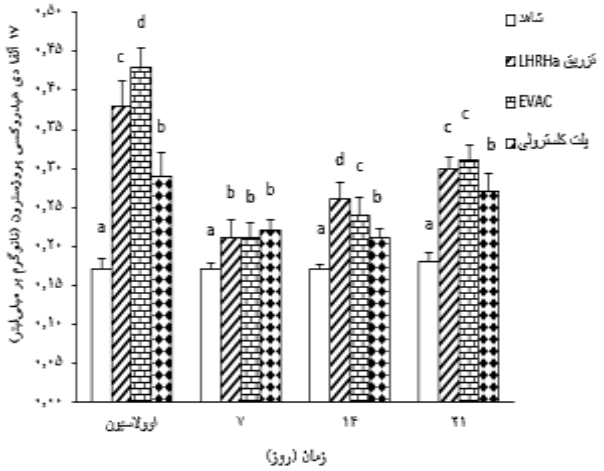
شکل ۷: درصد اسپرماتوکریت در تیمارهای مختلف



شکل ۸: مقدار هورمون تستوسترون در روزهای مختلف



شکل ۹: مقدار هورمون استرایول در روزهای مختلف



شکل ۱۰: مقدار هورمون ۱۷ 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 ۴ تیمار: (تزریق با سرم فیزیولوژی ۰/۷٪، EVAc شامل ۲۰ میکروگرم بر 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 بر کیلوگرم وزن بدن متوکلوپرماید قرار گرفتند. نتایج نشان داد فاصله زمانی تا اوولاسیون بین تیمارهای مختلف، تفاوت معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵)، 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<۰/۰۵). بالاترین طول دوره تحرک اسپرم در تیمار EVAc وجود داشت و بین بقیه تیمارها تفاوت معنی دار وجود نداشت (p>۰/۰۵). حجم اسپرم‌دهی در تیمارهای مختلف، تفاوت معنی‌دار داشت (p<۰/۰۵). به‌طوری‌که بیش‌ترین آن در تیمار EVAc و کم‌ترین آن در تیمار شاهد مشاهده شد. بالاترین درصد اسپرماتوکریت در تیمار EVAc وجود داشت (p<۰/۰۵). تغییرات هورمون تستوسترون در طی اسپرمیشن در تیمارهای EVAc و تزریق LHRHa تفاوت معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها داشت (p≤۰/۰۵)، و در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ روز بعد از تیمار به‌تدریج 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 انجام‌می‌شود و این سبب وارد آمدن استرس کم‌تر می‌شود در حالی‌که در روش‌های تزریق نیاز به ۲ تزریق داریم و طبیعتاً استرس بیش‌تری به مولدین وارد می‌شود (Suetal، ۲۰۱۳). LHRHa سبب تحریک، آزادسازی گنادوتروپین‌ها، هورمون LH، بلوغ نهایی، تخم‌ریزی و اسپرم ریزی می‌شود (Mylonas و همکاران، ۲۰۱۰). هم‌چنین فعالیت‌های LHRHa در یک سطح بالاتری از گناد-هیپوفیز- هیپوتالاموس انجام می‌شود که می‌تواند تحریک بالانس شده بیش‌تری از رویدادهای تولیدمثلی فراهم کند و به‌طور مستقیم و غیرمستقیم روی رهاسازی هورمون‌های دیگر اثر می‌گذارد (Chatakondi و همکاران، ۲۰۱۱). در تحقیق حاضر پارامترهای کیفی اسپرم در ۴ 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، ۲۰۰۴). در تحقیق حاضر، بالاترین درصد اسپرماتوکریت در تیمار EVAc وجود داشت (p<۰/۰۵) (شکل ۷). تغییرات غلظت اسپرماتوکریت در بین گونه‌های مختلف متفاوت است، از طرفی Vermeirssen و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کرد که استفاده از ایمپلنت EVAc سبب کاهش میزان اسپرماتوکریت در 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، ۱۹۹۴). 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، ۲۰۰۰).

طول دوره تحرک به‌عنوان شاخص کیفی اسپرم مطرح می‌باشد و فاکتورهای متعددی مانند غلظت یون (سدیم، پتاسیم، کلسیم و منیزیم)، فشار اسمزی، درجه‌حرارت، pH، نسبت رقیق‌سازی و پارامترهای درون سلولی روی طول دوره تحرک اسپرم اثر گذارند (علوی و همکاران، ۲۰۰۸). در تحقیق حاضر، بالاترین طول دوره تحرک اسپرم در تیمار EVAc وجود داشت و بین بقیه تیمارها تفاوت معنی‌دار وجود نداشت (p>۰/۰۵). این نتایج با مطالعه Clearwater و Crim (۱۹۹۸)، هم‌خوانی داشت که نشان داد استفاده از ایمپلنت GnRHa سبب افزایش تولید اسپرم برای ۲۹ روز بدون اثرگذاری روی چگالی اسپرم شده است، اما به‌طور معنی‌داری درصد اسپرم متحرک و طول دوره حرکتی را در ماهی فلاندر زرد (*Pleuronectes ferrugineus*) بهبود بخشید. هم‌چنین Mylonas و Zohar (۲۰۰۷) دریافتند که طول دوره تحرک اسپرم در ماهیان شاهد و ایمپلنت شده بعد از به‌کارگیری ایمپلنت GnRHa در ماهی تون اقیانوس اطلس تفاوت معنی‌داری نداشت.

هورمون‌های استروئیدی جنسی به‌عنوان یک شاخص مهم در فرآیند اسپرماتوژنز، از مرحله اسپرماتوگونیا تا اسپرمیشن فعالیت دارند و در واقع سنجش استروئیدها و شاخص گنادوسوماتیک در بسیاری از گونه‌ها به‌عنوان کلید شناسایی مراحل تکامل گناد هستند (De Valming و همکاران، ۱۹۸۲). در گونه‌های واجد تکامل گنادی غیرهم‌زمان، بررسی شاخص گنادوسوماتیک به تنهایی نمی‌تواند معیار مناسبی جهت تعیین مراحل رسیدگی گناد باشد. بنابراین سنجش استروئیدهای جنسی به‌همراه شاخص گنادوسوماتیک می‌تواند در بررسی سیکل تولیدمثلی دقیق‌تر باشد (Zadmajid و همکاران، ۲۰۱۲). 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، ۱۹۸۹).

نوسانات در حجم اسپرم ممکن است در نتیجه متغیر بودن مراحل رسیدگی جنسی بین مولدین نر، روش‌های به‌کارگیری هورمون (Piros و همکاران، ۲۰۰۲) و شرایط متفاوت محیطی و خصوصیات بیولوژیکی مولدین باشد (Rurangwa و همکاران، ۲۰۰۴). 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 تولیدمثلی استفاده و به نوعی کلید شناسایی مراحل تکامل گناد هستند (De Valming و همکاران، ۱۹۸۲). در تحقیق حاضر بالاترین شاخص گنادوسوماتیک در تیمار EVAc مشاهده شد (شکل ۴). در واقع کاهش هورمون تستوسترون پس از اسپرم‌ریزی با کاهش شاخص گنادوسوماتیک و درجه حرارت آن مطابق بود. Dabrowski و همکاران (۱۹۹۴)، 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 که با نتایج مطالعه اخیر هم‌خوانی داشت.

نتیجه این مطالعه نشان داد که ایمپلنت LHRHa به‌خصوص به روش EVAc به‌خوبی سبب افزایش تستوسترون طی دوره اسپرم‌ریزی در ماهی قرمز می‌شود (شکل ۸). در جنس نر آزاد ماهی کوهو (*Oncorhynchus kisutch*) بالاترین سطح هورمون تستوسترون (۱۰۷/۸ 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 GnRHa مشاهده گردید (Mylonas و Zohar، ۲۰۰۷).

Crim و Evans (۱۹۸۳)، Pankhurst و Van der kraak (۱۹۹۷)، Tan-Fermin و همکاران (۱۹۹۷) ، معتقدند که استفاده از LHRHa به‌صورت 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 برای انتقال هورمون LHRHa در تکثیر خارج از فصل ماهی قرمز به‌عنوان یک گونه مدل بسیار مناسب است. در شرایط طبیعی، تخم‌ریزی ماهی قرمز در فصل بهار و در درجه‌حرارت بالای ۲۰ درجه سانتی‌گراد صورت می‌پذیرد، ولی در صورتی‌که مولدین رسیده در دمای ۱۲ 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، ۱۹۹۶). در مطالعه حاضر، ماهی قرمز توسط تغییر شرایط محیطی (درجه‌حرارت و نور) و استفاده از تیمارهای هورمونی ذکر شده تکثیر گردید.

منابع

۱. **ایمانپور، م.ر. و کمالی، ا.، ۱۳۸۶.** بررسی تکثیر مصنوعی و پرورش لاروهای ماهی قرمز (*Carassius carassius gibelio*) توسط HCG. مجله علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان. سال ۱۳، شماره ۲، صفحات ۲۳ تا ۳۴.

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

۳. **Aida, K., ۱۹۸۸.** A review of plasma hormone changes during ovulation in cyprinid fishes. Aquaculture. Vol. ۷۴, pp: ۱۱-۲۱.

۴. **Alavi, S.M.H.; Cosson, J.; Coward, K. and Rafiee, G., ۲۰۰۸.** Fish spermatology Alpha Science Ltd, Oxford. ۴۶۵ p.

۵. **Bjerselius, R.; Olsen, K.H. and Zheng, W., ۱۹۹۵.** Endocrine gonadal and behavioral responses of male crucian carp to the hormonal pheromone ۱۷α, ۲۰βdihydroxy-۴pregnen-۳-one. Chemical Senses. Vol. ۲۰, pp: ۲۲۱-۲۳۰.

۶. **Chatakondi, N.; Roger Yant, D. and Kristanto, A., ۲۰۱۱.** 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. ۴۲, pp: ۸۴۵-۸۵۳.

۷. **Clearwater, S.J. and Crim, L.W., ۱۹۹۸.** 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. ۱۹, PP: ۳۴۹-۳۵۷.

۸. **Crim, L.W. and Evans, D.M., ۱۹۸۳.** Influence of testosterone and/or LHRHa on precocious sexual development in the juvenile rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). Reprod. Vol. ۲۹, pp: ۱۳۷-۱۴۲.

۹. **Dabrowski, K. and Ciereszko, A., ۱۹۹۴.** Proteinase inhibitor (s) in seminal plasma of teleost fish. Journal of Fish Biology. Vol. ۴۵, pp: ۸۰۱-۸۰۹.

۱۰. **De Valming, V.; Grossman, G. and Chapman, F., ۱۹۸۲.** On the use of the gonadosomatic index. Journal of Comparison Biochemistry and Physiology. Vol. ۷۳, pp: ۳۱-۳۹.

۱۱. **Guzman, J.M.; Norberg, B.; Ramos, J.; Mylonas, C.C. and Manano, E.L., ۲۰۰۸.** Vitellogenin, steroid plasma levels and

spawning performance of cultured female Senegalese sole (*Solea senegalensis*). General and Comparative Endocrinology. Vol. ۱۵۶, pp: ۲۸۵-۲۹۷.

۱۲. **Kobayashi, M.; Aida, K. and Hanyu, I., ۱۹۸۸.** Hormone changes during the ovulatory cycle in goldfish *Carassius auratus*. General and Comparative Endocrinology. Vol. ۶۸, No. ۲, pp: ۳۰۱-۳۰۷.

۱۳. **Kroon, F.J.; Munday, P.L. and Pankhurest, N.W., ۲۰۰۳.** Steroid hormone levels and bi-directional sex change in *Gobiodon histrio*, Journal of Fish Biology. Vol. ۶۲, pp: ۱۵۳-۱۶۷.

۱۴. **Larsson, D.G.J.; Mylonas, C.C.; Zohar, Y. and Crime, L.W. ۱۹۹۷.** 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. ۵۴, No. ۹, pp: ۱۹۵۷-۱۹۶۴.

۱۵. **Mylonas, C.C.; Tabata, Y.; langer, R. and Zohar, Y., ۱۹۹۵a.** Preparation and evaluation of polyanhydride microspheres containing gonadotropin-releasing hormone (GnRHa), for inducing ovulation and spermiation in fish. Journal of Controlled Release. Vol. ۳۵, pp: ۲۳-۳۴.

۱۶. **Mylonas, C.C.; Fostier, A. and Zanuy, S., ۲۰۱۰.** Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. General Comparative Endocrinology. Vol. ۱۶۵, pp: ۵۱۶-۵۳۴.

۱۷. **Mylonas, C.C. and Zohar, Y., ۲۰۰۷.** 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: ۴۳۳-۴۷۰.

۱۸. **Pankhurst, N.W. and Van der kraak, G., ۱۹۹۷.** 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: ۷۳-۹۳.

۱۹. **Piros, B.; Glogowski, J.; Kolman, R.; Rzemieniecki, A.; Domagala, J.; Horvath, A.; Urbani, B. and Ciereszko, A., ۲۰۰۲.** Biochemical characterization of Siberian sturgeon *Acipenser baeri* and starlet *Acipenser ruthenus* milt plasma and spermatozoa. Journal of Fish Physiology and Biochemistry. Vol. ۲۶, pp: ۲۸۹-۲۹۸.

۲۰. **Rurangwa, E.; Kime, D.E.; Olllevier, F. and Nash, J.P., ۲۰۰۴.** The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquaculture. Vol. ۲۳۴, pp: ۱-۲۸.

۲۱. **Stacey N.E.; Cook, A.F. and Peter, R.E., ۱۹۷۹a.** Ovulation surge of gonadotropin in the goldfish, *Carassius auratus*. General and Comparative Endocrinology. Vol. ۳۱, pp: ۲۴۶-۲۴۹.

۲۲. **Tan-Fermin, J.D.; Pagador, R.R. and Chavez, R.C., ۱۹۹۷.** LHRHa and pimozide- induced spawning of Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Gunther) at different times during an annual reproductive. Aquaculture. Vol. ۱۴۸, pp: ۳۲۳-۳۳۱.

۲۳. **Vermeirssen, E.L.M.; Shields, R.; Mazorra de Quero, C. and Scott, A.P., ۲۰۰۰.** Gonadotropin-releasing hormone agonist raises plasma concentrations of progettogens and enhances milt fluidity in male Atlantic halibut (*Hippoglossus hipoglossus*). Journal of Fish Physiology and Biochemistry. Vol. ۲۲, pp: ۷۷-۸۷.

۲۴. **Yamamoto, K.; Nagahama, Y. and Yamazaki, F., ۱۹۶۶.** A method to induce artificial spawning of goldfish all through the year. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. Vol. ۳۲, pp: ۹۷۷-۹۸۳.

۲۵. **Zadmajid, V.; Imanpour, M.R.; Shabani, A. and Baharloi, A., ۲۰۱۲.** Evaluation of Egg Production and Sex Steroid Profiles in Goldfish *Carassius auratus* During Four Consecutive Seasons. Global Veterinaria. Vol. ۹, Vol. ۳, pp: ۳۶۷-۳۷۵.

۲۶. **Zadmajid, V.; Imanpour, M.R.; Shabani, A. and Baharlouei, A. ۲۰۱۳.** Evaluation of sperm characteristic and plasma testosterone in the goldfish (*Carassius auratus*) during four consecutive seasons, Comparative Clinical Pathology. Vol. ۲۲, No. ۴, pp: ۷۰۳-۷۱۱.

۲۷. **Zohar, Y., ۱۹۹۶.** New approaches for the manipulation of ovulation and spawning in farmed fish. Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture Supplement. Vol. ۲, PP: ۴۳-۴۸.

۲۸. **Zohar, Y.; Goren, A.; Tosky, M.; Pagelson, G.; Leibovitz, D. and Koch, Y., ۱۹۸۹.** The bioactivity of gonadotropin-releasing hormones and its regulation in the gilthead seabream, *Sparus aurata*. In vivo and in vitro studies. Journal of Fish Physiology and Biochemistry. Vol. ۷, pp: ۵۹-۶۷.

۲۹. **Yamamoto, K.; Nagahama, Y. and Yamazaki, F., ۱۹۶۶.** A method to induce artificial spawning of goldfish all through the year, Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. Vol. ۳۲, pp: ۹۷۷-۹۸۳.