Archive of SID

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
جلد پانزدهم، شماره اول، ویژه‌نامه منابع طبیعی
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

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

*وحید زادمجید[1]، محمدرضا ایمانپور[2]، محمد سوداگر[2] و علی شعبانی[2]

[1]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[2]استادیار گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه شیلات

تاریخ دریافت: ۸۶/۶/۲۰؛ تاریخ پذیرش: ۸۶/۱۱/۲۴

چکیده

در این مطالعه اثرات تزریق هورمون‌های GnRHa، HCG، و عصاره هیپوفیز 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 GnRHa، HCG، و عصاره هیپوفیز با دوزهای تزریقی (۱۰ میکروگرم به ازای کیلوگرم وزن بدن، ۱۵۰۰ واحد بین‌المللی بر کیلوگرم و ۳ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌ترتیب) مورد استفاده قرار گرفتند. pH در بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P<$ ۰/۰۱)، به گونه‌ای که در تیمار دوم (GnRHa) و چهارم (هیپوفیز) بالاترین pH مشاهده شد (۰/۳۰± ۹/۲۶ و ۰/۲۰± ۸/۳۶ به‌ترتیب). درصد اسپرم‌های متحرک در بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($P<$ ۰/۰۱)، به گونه‌ای که در تیمار دوم و چهارم بالاترین درصد تحرک مشاهده شد (۹/۵۶±۹۰/۶۰ و ۳/۲۰±۸۵/۰۷ به‌ترتیب)، در صورتی‌که بین طول دوره حرکت اسپرم در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P>$ ۰/۰۵). بین میانگین اسپرماتوکریت در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P<$ ۰/۰۵) و تیمار چهارم بالاترین درصد اسپرماتوکریت مشاهده شد (۱۰/۹۶±۵۹/۹۰). همچنین بین تراکم اسپرم در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P<$ ۰/۰۱)، و در تیمار چهارم بالاترین تراکم اسپرم مشاهده شد ($۱۲/۵۰\times۱۰^{۹}$ اسپرماتوزوا در میلی‌لیتر سمن). بین حجم اسپرم در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P<$ ۰/۰۵)، و در تیمار دوم و چهارم بالاترین حجم اسپرم مشاهده شد (۰/۴۰± ۱/۲۶و۱۳/± ۱/۰۵ به‌ترتیب). نتایج این تحقیق نشان داد که هورمون‌های GnRHa و عصاره هیپوفیز نسبت به HCG تأثیر معنی‌داری روی پارامترهای اسپرم شناختی در ماهی قرمز دارند.

واژه‌های کلیدی: ماهی قرمز؛ GnRHa؛ HCG؛ عصاره هیپوفیز، پارامترهای اسپرم شناختی

مقدمه

ماهی قرمز *(Carassius auratus gibelio)* از خانواده کپور ماهیان *(Cyprinidae)* می‌باشد و به لحاظ شرایط زیستی و تغذیه‌ای شبیه کپور معمولی *(Cyprinus carpio)* است (وثوق و مستجیر، ۱۹۹۵). تکثیر و پرورش این ماهی به منظور تأمین ماهی کوچک موردنیاز سفره هفت سین نوروزی و نیز علاقه‌مندان به نگهداری ماهی قرمز در آکواریوم چندین سال است که

* مسئول مکاتبه: zadmajid@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

رونق یافته و نیاز به آن هر سال بیشتر احساس می‌شود (ایمانپور و کمالی، ۲۰۰٦). ماهی قرمز گونه‌ای می‌باشد که به‌صورت گسترده در مطالعات تولید مثلی و کنترل هورمونی مورد استفاده قرار می‌گیرد (بجرسلیوس و همکاران، ۱۹۹۵). در بسیاری از ماهیان اوولاسیون،[1] اسپرم‌ریزی و تخم‌ریزی در شرایط پرورشی به‌صورت کامل صورت نمی‌گیرد و تزریق هورمون برای القای تخم‌ریزی و اسپرم‌ریزی و همزمانی آزادسازی گامت‌ها در کارگاه‌های پرورش ماهی امری ضروری می‌باشد (زوهر و میلوناس، ۲۰۰۱). عملکرد ناقص تولید مثلی ممکن است در نتیجه شرایط نامناسب محیطی همچون استرس باعث عدم رهاسازی هورمون LH[2] از هیپوفیز در نتیجه عدم توانایی اسپرم‌ریزی در نرها و کاهش کیفیت و کمیت اسپرم گردد (لیم و همکاران، ۲۰۰٤). با مطالعه صورت پذیرفته توسط تکین و همکاران (۲۰۰۳) مشخص شد که کیفیت بالای گامت‌ها در تولید لاروهای با کیفیت مناسب در تفریخگاه‌های ماهی بسیار مؤثر است و می‌تواند راندمان لقاح و تکثیر مصنوعی در ماهیان را افزایش دهد. رورانگوا و همکاران (۲۰۰٤) گزارش کردند که ارزیابی کیفیت اسپرم برای بهبود روش‌های لقاح مصنوعی، نگهداری گامت‌های نر و مطالعه اثر آلاینده‌های زیست محیطی روی موفقیت تکثیر در ماهیان صورت می‌پذیرد. هورمون GnRH[3] به‌صورت موفقیت‌آمیزی هم در ماهیان آب شیرین و هم در ماهیان دریایی و باعث بهبود کیفیت و کمیت اسپرم گردیده است (گارسیا، ۱۹۹۳؛ هار مین و کرایم، ۱۹۹۳؛ زوهر و میلوناس، ۲۰۰۱؛ کینگ و یانگ، ۲۰۰۱؛ لیم و همکاران، ۲۰۰۲). این هورمون به‌صورت موفقیت‌آمیزی جهت القای اسپرم‌ریزی در بسیاری از ماهیان از جمله، هالیبوت اقیانوس اطلس *(Hippoglossus hippoglossus)*، باس اروپایی *(Dicentrarchus labrax)*، کفشک پشت آبی *(Rhombosolea tapirina)*، *(Solea senegalesis)* Senegalese sole (هارالد و همکاران، ۲۰۰۱؛ سیموناو همکاران، ۲۰۰۳؛ لیم و همکاران، ۲۰۰٤؛ ماریا و همکاران، ۲۰۰۷) مورد استفاده قرار گرفته است. مطالعات صورت گرفته توسط لیم و همکاران (۲۰۰٤) نشان می‌دهد که هورمون GnRH از طریق تأثیر بر غده هیپوفیز باعث افزایش GTH[4] و در نتیجه افزایش حجم اسپرم می‌شود. GTH باعث افزایش حجم اسپرم و رهاسازی اسپرماتوزوآ به درون لوله اسپرم بر می‌شود (میلوناس و همکاران، ۱۹۹۷). هورمون HCG به‌منظور بلوغ در ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرد. این هورمون توسط جفت انسان ساخته و در ادرار خانم‌های باردار وجود دارد (گلن و همکاران، ۲۰۰۳). در میان گنادوتروپین‌های پستانداران HCG[5] تأثیر بسزایی در القای اسپرم‌سازی و اسپرم‌ریزی در ماهیان دارد (روبرتا و همکاران، ۲۰۰٦). مطالعات صورت گرفته توسط استریانوو و همکاران (۲۰۰٦) نشان داد که تزریق یک مرحله‌ای HCG باعث تسریع فرآیند اسپرم‌سازی می‌شود در صورتی‌که تزریق مکرر این هورمون باعث افزایش سطح هورمون استروژن در نتیجه افزایش طول مدت اسپرم‌سازی و بهبود کیفیت اسپرم می‌شود. این هورمون به‌صورت موفقیت‌آمیزی جهت القای اسپرم‌ریزی در بسیاری از ماهیان از جمله قزل‌آلای رنگین کمان *(Oncorhinchus mykiss)*؛ ماهی قرمز *(Carassius auratus)*؛ باس اروپایی *(Dicentrarchus labrax)*، مار ماهی ژاپنی *(Anguilla anguilla)*؛ (دونالدسون و هانتر، ۱۹۸۳؛ روبرتا و همکاران، ۲۰۰٦؛ استریانوو و همکاران، ۲۰۰٦) مورد استفاده قرار گرفته است. غده هیپوفیز به‌طور گسترده جهت القای تولید مثل در کپور ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرد، و به‌طور مؤثری عمل اسپرم‌ریزی را در کپور ماهیان تحریک می‌کند (زوهر و میلوناس، ۲۰۰۱). تکنیک‌های ارزیابی کیفیت اسپرم شامل، اندازه‌گیری تراکم اسپرم، اسپرماتوکریت، طول دوره تحرک و چند ین پارامتر دیگر می‌باشد، که در آزاد ماهیان جهت ارزیابی

1- Ovulation
2- Luteinzing hormone
3- Gonadotropin releasing hormone
4- Gonadotropin hormone
5- Human Chorionic Gonadotropin

www.SID.ir

Archive of SID

کیفیت اسپرم نسبت بین تراکم اسپرم و اسپرماتوکریت به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد (بیلارد، ۱۹۷۸؛ آس و همکاران، ۱۹۹۱؛ هارالد و همکاران، ۲۰۰۱).

هدف از این مطالعه بررسی اثرات هورمون‌های GnRHa، HCG، و عصاره هیپوفیز روی پارامترهای اسپرم‌شناختی (طول دوره تحرک اسپرم، درصد تحرک اسپرم، اسپرماتوکریت، تراکم اسپرم، حجم اسپرم، pH) و مقایسه کیفیت اسپرم بین تیمارهای مختلف مولدین نر ماهی قرمز می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مولدین و تهیه نمونه: این تحقیق در طی ماه‌های اسفند ۱۳۸۵، فروردین، اردیبهشت و خرداد ۱۳۸٦ در مرکز تحقیقات آبزی‌پروری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده شیلات واقع در پردیس صورت گرفت. تعداد ٤٠ قطعه ماهی مولد قرمز نر(با طول کل ۲۲- ۱۹ سانتی‌متر و با وزن ٦٦-٦٠ گرم) جهت انجام مراحل آزمایش از مراکز تکثیر ماهیان زینتی در استان گلستان تهیه شد و در ۱۵ اسفند ماه به سالن رونیرو دانشکده شیلات منتقل گردید و ماهیان در حوضچه‌های رونیرو با هوادهی ملایم تا اوایل اردیبهشت نگهداری شدند.

در نهایت ماهیان به چهار تیمار شاهد (تیمار اول)، تزریق HCG (تیمار دوم)، تزریق GnRH (تیمار سوم) و تزریق عصاره هیپوفیز (تیمار چهارم) تقسیم شدند و در هر تیمار ۱۰ ماهی مورد بررسی قرار گرفتند. به ماهیان گروه شاهد تنها سرم فیزیولوژی تزریق گردید. به گروه دیگر HCG به‌میزان ۱۵۰۰ واحد بین‌المللی بر کیلوگرم[1] (ایمانپور و کمالی، ۲۰۰٦) در عضله و زیر باله پشتی تزریق به‌عمل آمد (باتاگلن و تالبوت، ۱۹۹٤). به گروه سوم به‌میزان ۱۰ میکروگرم به ازای کیلوگرم وزن بدن هورمون GnRHa+ دامپریدون (Glu-His-Tyrp-Ser-Tyr-Gly-Trp-Leu-Pro-Gly(NH2)) تزریق گردید (زوهر و میلوناس، ۲۰۰۱)، و به گروه چهارم عصاره هیپوفیزکاراس به میزان ۳ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تزریق به‌عمل آمد (زوهر و میلوناس، ۲۰۰۱). بعد از گذشت ۱۲ ساعت از زمان تزریق با HCG و گذشت ٢٤ ساعت از زمان تزریق با GnRHa و عصاره هیپو فیز، بعد از خشک کردن منفذ تناسلی بدون آلودگی با آب یا ادرار، با فشار ملایم به ناحیه شکمی از ماهیان مولد نر اسپرم‌گیری به‌عمل آمد (استوریانوو و همکاران، ۲۰۰٦).

اندازه‌گیری حرکت اسپرم

آنالیز حرکتی: برای شروع حرکت، اسپرم با محلول فعال‌کننده (آب مقطر) به نسبت ۱:۲۰۰۰ رقیق شد و پارامترهای حرکتی اسپرم بلافاصله (با تأخیر زمانی کمتر از ۷ ثانیه) بعد از شروع فعالیت اسپرم تا زمانی‌که ۱۰۰ درصد اسپرم‌ها غیرمتحرک شدند توسط میکروسکوپ متصل به دوربین (استرئومیکروسکوپ) ثبت و روی صفحه مانیتور نشان داده شد، در ادامه با استفاده از نرم‌افزار Adobe premeier هر ثانیه به ٦ فریم تبدیل شد و با مقایسه دو فریم متوالی، درصد اسپرم‌های متحرک محاسبه شد. برای اندازه‌گیری مدت زمان حرکت اسپرم، زمان تحرک از لحظه فعال شدن تا زمان عدم حرکت اسپرم‌ها اندازه‌گیری شد و مشاهدات در دمای اتاق (۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد) صورت گرفت (تورنر و مو نت جومری، ۲۰۰۲).

اندازه‌گیری اسپرماتوکریت: برای اندازه‌گیری اسپرماتوکریت، پس از سانتریفیوژ کردن سمن در دستگاه سانتریفیوژ با ۳۰۰۰ دور در ۸ دقیقه در لوله‌های میکرو با استفاده از هماتوکریت خوان درصد اسپرم به پلاسمای سمینال اندازه‌گیری شد، بدین‌منظور میانگین ۱۰ نمونه اسپرم در سه تکرار به‌عنوان مقدار اسپرماتوکریت ثبت شد (فتزپاتریک، ۲۰۰۵).

اندازه‌گیری تراکم اسپرم: تراکم اسپرم با روش استاندارد هماسیتومتری با رقیق کردن اسپرم به نسبت ۱:۲۰۰۰ و با استفاده از میکروسکپ فاز کنتراست زمینه سیاه با درشت نمایی ۱۰ اندازه‌گیری شد و با واحد $10^{9}\times$ در هر میلی‌لیتر سمن محاسبه شد.

1- International units

www.SID.ir

Archive of SID

اندازه‌گیری pH مایع اسپرمی: نمونه‌های اسپرم درون ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد. نمونه‌ها ابتدا در دور ۵۰۰ به‌مدت ۲ دقیقه و بعدا در دور ۳۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ[1] شدند (لینهارت و همکاران، ۱۹۹۱)، بعد از سانتریفیوژ، پلاسمای منی که در قسمت بالای ویال قرار گرفته بود (سوپر نتنت)[2] به درون ویال‌های جدید ریخته شد و pH به‌وسیله pH متر[3] اندازه‌گیری گردید.

روش تجزیه و تحلیل: شیوه نمونه‌برداری به‌صورت تصادفی و در قالب طرح کاملا تصادفی بود. داده‌های به‌دست آمده در ارتباط با مدت زمان و درصد حرکت اسپرم، pH مایع اسپرمی، اسپرماتوکریت، تراکم اسپرم و حجم اسپرم در چهار گروه شاهد، تزریق HCG، GnRHa و تزریق عصاره هیپوفیز به کمک آزمون دانت در سطح ۹۵ درصد (α= ۰/۰۵) توسط آنالیز واریانس یک طرفه[4]، با استفاده از نرم‌افزار SPSS با یکدیگر مقایسه شدند.

نتایج

پارامترهای اسپرم شناختی (خصوصیات فیزیکی) اسپرم ماهی قرمز در جدول ۱ آمده است.

پارامترهای اسپرم شناختی سمن

pH: نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میانگین pH بین تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز در این جدول ۱ نشان داده شده است. همانگونه که در جدول مشاهده می‌شود بین pH در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P <۰/۰۱)، به گونه‌ای که در تیمار دوم (GnRHa) و چهار (هیپوفیز) بالاترین pH مشاهده شد.

طول دوره تحرک اسپرم و درصد اسپرم‌های متحرک: همانگونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود بین درصد اسپرم‌های متحرک در تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P <۰/۰۱)، به گونه‌ای که در تیمار دوم (GnRHa) و چهار (هیپوفیز) بالاترین درصد تحرک مشاهده شد. در صورتی‌که بین طول دوره حرکت اسپرم در تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P >۰/۰۵).

اسپرماتوکریت و تراکم اسپرم: همانگونه که در جدول ۱ آمده است، بین میانگین اسپرماتوکریت در تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P <۰/۰۵)، به‌طوری‌که در تیمار چهارم (هیپوفیز) بالاترین درصد اسپرماتوکریت مشاهده شد. همچنین بین تراکم اسپرم در تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P <۰/۰۱)، به گونه‌ای که در تیمار چهارم (هیپوفیز) بالاترین تراکم اسپرم مشاهده شد.

حجم اسپرم: نتایج آنالیز واریانس و مقایسه حجم اسپرم بین تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز در جدول ۱ نشان داده شده است. در این جدول بین حجم اسپرم در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P <۰/۰۵)، به گونه‌ای که در تیمار دوم (GnRHa) و چهارم (هیپوفیز) بالاترین حجم اسپرم مشاهده شد.

بحث

در شرایط پرورشی به‌دلیل کاهش هورمون‌های استروئیدی عملکرد تولید مثلی ماهیان مختل می‌شود، در نتیجه دستکاری‌های هورمونی می‌تواند از طریق افزایش هورمون‌های جنسی همچون تستوسترون و ۱۱ کتوتستوسترون بر این عملکرد ناقص غلبه کند (لیم و همکاران، ۲۰۰٤). مطالعه حاضر نشان داد که هورمون‌های GnRHa، HCG و عصاره هیپوفیز تأثیر معنی‌داری روی پارامترهای اسپرم شناختی در ماهی قرمز دارند. طبق مشاهدات این تحقیق هورمون‌های GnRHa، و عصاره هیپوفیز به‌طور معنی‌داری باعث افزایش pH مایع سمینال در ماهی قرمز شدند (۰/۳۰± ۹/۲٦ و ۰/۲۰± ۸/۳٦ به‌ترتیب)، که با تحقیقات میورا و همکاران (۱۹۹۱) همخوانی دارد.

1- Sigma 1-13 England
2- Supernatant
3- pH-462 ,Iran, T.S.CO
4- One-Way ANOVA

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- داده‌های پارامترهای اسپرم شناختی منی در ماهی قرمز (*Carassius auratus gibelio*) در بین تیمارها.

تیمار	تیمار ۱ (شاهد)	تیمار ۲ (GnRHa)	تیمار ۳ (HCG)	تیمار ٤ (هیپوفیز)
pH	۸/۳٦± ۰/۲۰^{b}	۹/۲٦ ±۰/۳۰^{a}	۸/٦٦±۰/۰٥^{b}	۸/۳٦ ±۰/۲۰^{a}
طول دوره حرکت (ثانیه)	۳٤/۲٥±٥۷/۰۰^{a}	۱۱/٤٥±۸۲/٥۰^{a}	۱٥/۷۸±٥۷/۱٦^{a}	۳٤/۲٥±٥۷/۰۰^{a}
درصداسپرم متحرک (درصد)	۳۹/٥۱±۲۲/۹۲^{b}	۹/٥٦±۹۰/٦۰^{a}	۱۹/۰۳±٤۹/٤۸^{b}	۳/۲۰±۸٥/۰۷^{a}
اسپرماتوکریت (درصد)	٤٤/٥٦±٦/۳٤^{b}	٦/۷٦±۳٤/۹۷^{b}	٤۲/٥٦±۳/۳۰^{b}	۱۰/۹٦±٥۹/۹۰^{a}
تراکم اسپرم $\times 10^{9}$	٤/۲۲±۰/۹۰^{c}	۲/٥٦±۸/۷۱^{ab}	٦/۳۱±۲/۲۰^{bc}	۱۲/٥۰±۲/٥٦^{a}
حجم اسپرم (cc)	۰/۳۱± /۲۰^{b}	۱/۲٦ ±۰/٤۰^{a}	۰/۷۰±/٥۲^{ab}	۱/۰٥ ±/۱۳^{a}

این محققین نشان دادند که در گونه *Oncorhynchus masou* هورمون ۱۷ آلفا -۲۰ بتا- دی هیدروکسی -٤ پرگنن- ۳ و ۱ (17α,20β-DP) باعث افزایش pH در مجرای اسپرم‌بر می‌شود که در نهایت موجب افزایش cAMP[1] در اسپرم شده و زمینه شروع حرکت اسپرم را فراهم می‌نماید. همچنین، کلیرواتر و کرایم (۱۹۹۸) گزارش کردند که تزریق هورمون GnRHa در ماهی کفشک زرد باله (*Pleuronectes.ferruineus*) باعث افزایش pH پلاسمای سمینال می‌شود. در مجموع ماهیان مختلف عکس‌العمل‌های متفاوتی نسبت به pH از خود نشان می‌دهند، به گونه‌ای که بیلارد و همکاران (۱۹۹٥)، گزارش کردند که pH مهمترین مشخصه پلاسمای سمینال می‌باشد که روی پتانسیل حرکتی در اسپرم کپور ماهیان تأثیر می‌گذارد. هبستگی‌های واضحی بین ترکیب پلاسمای سمینال، اسمولاریته و مدت زمان حرکت اسپرم وجود دارد. پارامترهای مختلفی از قبیل غلظت یون‌ها (پتاسیم، سدیم و کلسیم)، فشار اسمزی، pH، درجه حرارت و نسبت رقیق‌کننده روی حرکت اسپرم مؤثرند (علوی و کوسون، ۲۰۰٦). در این مطالعه بین درصد اسپرم‌های متحرک در تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P < ۰/۰۱$)، به گونه‌ای که در تیمار دوم (GnRHa) و تیمار چهارم (هیپوفیز) بالاترین درصد تحرک نسبت به تیمار دوم (HCG) و گروه شاهد مشاهده شد. لانستینر و همکاران (۱۹۹٦)، گزارش کردند که همبستگی خطی و مثبتی بین pH پلاسمای سمینال و درصد اسپرم‌های متحرک در کپور ماهیان وجود دارد. بین طول دوره حرکت اسپرم در تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد، که با مطالعات صورت گرفته توسط ریچارد و همکاران (۲۰۰۳) و هارالد و همکاران (۲۰۰۱) همخوانی دارد، مشاهدات این محققین به‌ترتیب نشان داد که تزریق هورمون HCG روی طول دوره حرکت اسپرم در گونه *Stizostedion canadense* (with Sauger) و تزریق هورمون GnRHa روی طول دوره حرکت اسپرم در گونه هالیبوت اقیانوس اطلس (*H. hippoglossus*) تأثیری ندارد. در صورتی‌که کلیرواتر و کرایم (۱۹۹۸)، گزارش کردند که تزریق هورمون GnRHa باعث افزایش درصد اسپرم‌های متحرک از ۲۰ درصد به ٤۰ تا ۹۰ درصد و افزایش طول دوره تحرک اسپرم از طریق افزایش غلظت هورمون آندروژن در گونه کفشک زرد باله (*P.ferruineus*) می‌شود. مطالعات صورت گرفته توسط بیلارد و همکاران (۱۹۹٥)، نشان داد که درصد اسپرم‌های متحرک و طول دوره تحرک از مهمترین بیومارکرهای کیفی اسپرم بشمار می‌روند. تراکم اسپرم در مایع سمینال عموما برای ارزیابی کیفیت اسپرم استفاده می‌شود و ارتباط معنی‌داری بین اسپرماتوکریت و تراکم اسپرم وجود دارد (هارالد و همکاران، ۲۰۰۱). تخمین صحیح غلظت اسپرم برای بسیاری آزمایش‌ها در رابطه با لقاح ماهی و نگهداری

1- Adenosine mono phosphate

www.SID.ir

Archive of SID

اسپرم ضروری است و برای تخمین سریع‌تر و عملی‌تر تراکم اسپرم هر دو روش سانتریفیوژ برای تعیین اسپرماتوکریت (درصد نسبت حجم ماده سفید به کل میلت × ۱۰۰) و اسپکتوفتومتری برای تعیین تراکم چمشی با سرعت بیشتر استفاده می‌شود (رورانگوا و همکاران، ۲۰۰٤). در مطالعه حاضر بین میانگین اسپرماتوکریت در تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P <$ ۰/۰۵) به گونه‌ای که در تیمار چهارم (هیپوفیز) بالاترین درصد اسپرماتوکریت مشاهده شد (۱۰/۹٦±۵۹/۹۰). بین تراکم اسپرم در تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P <$ ۰/۰۱)، به گونه‌ای که در تیمار چهارم (هیپوفیز) بالاترین تراکم اسپرم مشاهده شد ($۱۲/۵۰\times۱۰^{۹}$ اسپرماتوزوا در میلی‌لیتر سمن)، که با مطالعات صورت گرفته توسط لینهارت و بیلارد (۱۹۹٤) همخوانی دارد. مطالعات این محققین در گونه گربه ماهی اروپایی *(Silurus glanis)* نشان داد که تعداد کل اسپر ماتوزوا به‌دست آمده حاصل از تزریق به‌وسیله عصاره هیپوفیز به‌طور معنی‌داری نسبت به تزریق بوسیله هورمون GnRHa بالاتر بود. همچنین تراکم اسپرم در تیمار دوم (GnRHa) نسبت به تیمار سوم (HCG) و گروه شاهد بالاتر بود ($۸/۷۱\times۱۰^{۹}$ اسپرماتوزوا در میلی‌لیتر سمن)، که با مطالعات صورت گرفته توسط هارالد و همکاران (۲۰۰۱) همخوانی دارد، مطالعات این محققین روی گونه هالیبوت اقیانوس اطلس (*H. hippoglossus*)، نشان داد که تزریق هورمون GnRHa باعث افزایش غلظت اسپرم از ۲×۱۰^{۱۱} به ٦×۱۰^{۱۱} اسپرماتوزوا در میلی‌لیتر سمن می‌شود. همچنین این محققین ذکر کردند تراکم اسپرم در ماهیان تابعی از محل تخم‌ریزی، هم‌آوری و سایز تخمک گونه می‌باشد به گونه‌ای که بعضی از ماهیان که در اعماق زندگی می‌کنند به‌دلیل کدورت بیشتر و کمبود روشنایی، جهت حفظ بقا هم‌آوری بالایی دارند. در نتیجه جهت بالا بردن درصد لقاح گونه نر نیز در چنین محیطی واجد اسپرمی با تراکم بالا می‌باشد، در کل بین تراکم اسپرم و موفقیت لقاح همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود دارد. در این مطالعه مشاهده شد که HCG نسبت به سایر هورمون‌ها تأثیر کمی روی تراکم اسپرم دارد ($٦/۳۱\times۱۰^{۹}$)، که با مطالعات صورت گرفته توسط استریانوو و همکاران (۲۰۰٦)، همخوانی دارد. این محققین نشان دادند که استفاده از هورمون HCG در گونه مارماهی اروپایی *(A. anguilla)* تأثیر کمی روی تراکم اسپرم دارد در صورتی‌که در گونه‌های نابالغ از طریق افزایش تولید آندروژن در گناد باعث تسریع فرایند اسپرم‌سازی می‌شود. در مطالعه حاضر، بین حجم اسپرم در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P <$ ۰/۰۵)، به گونه‌ای که در تیمار دوم (GnRHa) و چهار (هیپوفیز) نسبت به تیمار سوم (HCG) و گروه شاهد بالاترین حجم اسپرم مشاهده شد، که با مطالعات صورت گرفته توسط اووتا و تافاکا (۱۹۹۷) همخوانی دارد، این محققین نشان دادند که هورمون HCG روی حجم اسپرم در گونه مار ماهی ژاپنی (*Anguilla japonica*) تأثیر کمی دارد. از طرفی مطالعات کلمنس و گرنت (۱۹٦۵) و بیلارد و مارسل (۱۹۸۰)، به‌ترتیب روی کپور معمولی *(Cyprinus carpio)* و اردک ماهی شمالی (*Esox lucios*)، نشان داد که عصاره هیپوفیز تأثیر معنی‌داری روی حجم اسپرم در این گونه‌ها دارد. لیم و همکاران (۲۰۰٤) گزارش کردند که هورمون GnRH از طریق تأثیر بر غده هیپوفیز باعث افزایش GTH و در نتیجه افزایش حجم اسپرم می‌شود. در ماهی قرمز افزایش هورمون ۱۷ آلفا- ۲۰ بتا- دی‌هیدروکسی پروژسترون نقش مهمی در افزایش هورمون GTHII دارد که در نهایت باعث افزایش حجم اسپرم می‌شود. در شرایط اسارت استفاده از هورمون‌ها جهت فرایند تولید مثل به‌طور معنی‌داری در افزایش سطح ۱۷ آلفا -۲۰ بتا- دی هیدروکسی پروژسترون دخالت دارند (بجرسلیوس و همکاران، ۱۹۹۵). زیانگ و همکاران (۱۹۹۷)، گزارش کردند که استفاده از هورمون ۱۷آلفا -۲۰ بتا- دی

www.SID.ir

Archive of SID

هیدروکسی پروژسترون به‌صورت معنی‌داری باعث افزایش حجم اسپرم در ماهی قرمز می‌شود.

نتایج این تحقیق نشان داد که هورمون‌های GnRHa و عصاره هیپوفیز نسبت به HCG تأثیر معنی‌داری روی پارامترهای اسپرم شناختی در ماهی قرمز دارند و به‌طور موفقیت‌آمیزی فرایند اسپرم‌سازی و اسپرم‌ریزی را در این گونه تحریک می‌کنند.

سپاسگزاری

از مسئولین آزمایشگاه مرکزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به‌دلیل در اختیار قرار دادن امکانات و راهنمایی‌های لازم در این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1.Aas, G.H., Refstie, T., and Gjerde, B. 1991. Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. Aquaculture 95, 125– 132.
2.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.
3.Astu riano, 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 semen quality. Theriogenology 66, 1012-1020.
4.Battaglene, S.C., and Talbot, R.B. 1994. Hormone injection and larval rearing of muloway Argvrosomus hololepidotus (Pisces: Sciaenidae). Aquaculture 129, 73-81.
5.Billard, R., Cosson, G., Perchec, G., and Linhart, O. 1995b. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. Aquaculture 129, 95– 112.
6.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.
7.Billard, R., and Marcel, J. 1980. Stimulation of spermiation and induction of ovulation in pike *Esox lucius* .Aquaculture 21, 181–195.
8.Bjerselius, R., Olsen, K.H., and Zheng, W. 1995. Endocrine,gonadal and behavioral responses of male crucian carp *Carassius carassius* to the hormonal pheromone 17_,20_-dihydroxy-4-pregnen-3-one.Chem. Senses 20, 221_230.
9.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, 349–357.
10.Clemens, H.P., and Grant, F.B. 1965. The seminal thinning response in carp *Cyprinus carpio* and rainbow trout *Salmo gairdneri* after injections of pituitary extracts. Copeia 1965, 174–177.
11.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.
12.Fitzpatrick, J.L., Henry, J.C., Leily, N.R., and Devlin, R.H. 2005. Sperm characteristics and fertilization success of masulinized Coho salmon *oncorhynchus kisutch*. Aquaculture 249, 459-468.
13.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.
14.Glen, V.D.K., John, P., and Jans, D.M. 2003. The physiology of fishes. Reproduction: 465-480.
15.Harald, B.T., Tillmann, J.B., Deborah, J.M.R., and Joanne, P. 2001. The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. Aquaculture 194, 191– 200.
16.Harmin, S.A., and Crim, L.W. 1993. Influence of gonadotropin hormone-releasing hormone analog GnRH-a on plasma sex steroid profiles and milt production in male winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). Fish Physiol. Biochem. 10, 399–407.
17.Imanpoor, M.R., and Kamali, A. 2006. The investigation of induced breeding and larval rearing of goldfish *Carassius carassius gibelio* with HCG. J. Agric. Resour., 13(2).

www.SID.ir

Archive of SID

18.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, 17a-dihydroxy-4-pregnen-3-one, alone or in combination. Aquaculture 193, 179– 195.
19.Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., and Patzner, R.A. 1996. Motility of spermatozoa of Alburnus alburnus (*Cyprinidae*) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism. Fish Physiol.Biochem. 15, 167– 179.
20.Lim, H.K., Han, H.S., and Chang, Y.J. 2002. Effects of gonadotropin-releasing hormone analog on milt production enhancement in starry flounder *Platichthys stellatus*. Fish. Sci. 68, 1197–1204.
21Lim, 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 in greenback flounder (*Rhombosolea tapirina)*.Aquaculture 240, 505–516.
22.Linhart, O., Slechta, V., and Slavik, T. 1991. Fish sperm composition and biochemistry. Bull Inst Zool Acad Sin Monogr; 16:285e311.
23.Linhart, O., and Billard, R. 1994. Spermiation and sperm quality of European catfish (*Silurus glanis)* after implantation of GnRH analogues and injection of carp pituitary extract. J. Apple. Ichthyol. 10, 182– 188.
24.Maria, J.A., Alexander, P.S., Neil, D., Constantinos, C.M., and Joan, C. 2007. Treatment of GnRHa-implanted Senegalese sole (*Solea senegalensis*) with 11-ketoandrostenedione stimulates spermatogenesis and increases sperm motility. Aquaculture 215, 67-77.
25.Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., and Nagahama, Y. 1991. The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish.J Exp Zool, 261: 35963.
26.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. Aquaculture153, 301– 313.
27.Ohta, H., and Tanaka, H. 1997. Relationship between serum levels of human chorionic gonadotropin HCG and11-ketotestosterone after a single injection of HCG and induced maturity in the male Japanese eel, *Anguillajaponica. Aquaculture* 153, 123–134.
28.Richard, P., Bushman, J., and Randall, P. 2003. Enhancement of semen production in sauger with human chorionic gonadotropin 96, 229-233.
29.Roberta, S., Loredana, Z., Sebastiano, V., and Christian, F. 2006. Human chorionic gonadotropin induces spermatogenesis and spermiation in 1- year – old European sea bass (*Dicentrarchu s labrax*): Assessment of sperm quality Aquaculture 255, 522-531.
30.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, 1-28.
31.Simona, R., Constantinos, C.M., Yiannos, K., and Pascal, D. 2003. Enhancement in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) at the end of the reproductive season using GnRHa implants. Aquaculture 219, 873– 890.
32.Tekin, N., Secer, S., Akcay, E., and Bozkurt, Y. 2003. Cryopreservation of rainbow trout oncorhynchus mykiss, Bamidgeh 55(3), 208-212.
33.Turner, E., and Montgomerie, R. 2002. Ovarian fluid enhances sperm movement in Arctic charr Journal of Fish Biology 1570-1579
34.Vesogh, Gh.H., and Mostageer, B., 1995. Fresh water fish. Press Tehran University .pp, 317.
35.Zheng, W., Strobeck, C., and Stacey, N.E. 1997. The steroid pheromone 17_, 20_-idhydroxy-4-pregnen-3-one increases fertility and paternity in goldfish. J. Exp.Biol. 200, 2833_2840.
36.Zohar, Y., and Mylonas, C.C. 2001. Endocrine manipulation of spawning in cultured fish: from hormones to genes. Aquaculture 197, 99–136.

www.SID.ir

Archive of SID

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 15(1), Apr -May 2008 Special issue
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

Comparison the injection effects of GnRHa, HCG and pituitary extract on Spermatological parameters in goldfish (*Carassius auratus*)

[*]V. Zadmajid[1], M.R. Imanpoor[2], M. sudagar[2] and A. Shabany[2]
[1]M.Sc. student, Dept. of Fisheries, Gorgan, University of Agricultural Sciences and Natural Resourses, Iran,
[2]Assistant Prof., Dept. of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciecnes and Natural Respurces, Iran

Abstract

In this study the effects of GnRHa, HCG and pituitary extract injection on spermatological parameters (motility duration, percentage of motile spermatozoa, spermatocrit, sperm density, milt volume, pH) and sperm quality was compared in goldfish *(Carassius auratus)* males. Fish injected with hormonal GnRHa, HCG and pituitary extract with 10μg kg^{-1}, 1500 IU/Kg^{-1}, $3mg/Kg^{-1}$ respectively. There were a highly significant difference of seminal plasma pH among treatments ($P<0.01$), as the highest value of pH observed in treatments GnRHa and pituitary extract (9.26±0.30, 8.36±0.20) respectively. There were a highly significant difference for percentage of motile spermatozoa among treatments ($P<0.01$) as the highest value percentage of motile spermatozoa observed in treatments GnRHa and pituitary extract (85.07±3.20, 90.60±9.56) respectively, but there was no significant difference ($P>0.05$) for motility duration among treatments. There was a significant difference of spermatocrit among treatments ($P<0.05$), as the highest value of spermatocrit observed in treatment of pituitary extract (59.90±10.96). Likewise there were significant difference of sperm density among treatments ($p<0.01$) as the highest value of sperm density observed in treatment of pituitary extract (12.50×10^9 spermatozoa/ml semen). There was a significant difference about milt volume among treatments ($p<0.01$) as the highest value of milt volume observed in treatments GnRHa and pituitary extract (1.26±0.40, 1.05±0.13) respectively. The present study demonstrated that hormonal GnRHa and pituitary extract more effective on spermatological parameters compared with HCG treatment groups.

Keywords: Goldfish; GnRHa; HCG; Pituitary extract; Spermatological parameters

[*]-Corresponding Author; Email: zadmajid@gmail.com

www.SID.ir