



اثرات هورمون اووفاکت (GnRHa) بر برخی خصوصیات زیست‌شناسی منی ماهیان *Carassius auratus gibelio* قرمز ساده، دم چادری، چهاردم و چهاردم دم چادری

• وحید زادمجید

دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان (نویسنده مسئول)

• محمدرضا ایمانپور

عضو هیات علمی گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان

• محمد سوداگر

استادیار، عضو هیات علمی گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان

• علی شعبانی

عضو هیات علمی گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان

تاریخ دریافت: اردیبهشت ماه ۱۳۸۶ تاریخ پذیرش: آبان ماه ۱۳۸۶

تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۴۴۸۲۴۲۲۵

Email: zadmajid@gmail.com

چکیده

در این مطالعه اثرات تزریق اووفاکت (GnRHa) بر برخی خصوصیات زیست‌شناسی منی (طول دوره تحرک اسپرم، درصد تحرک اسپرم، اسپرما توکریت، تراکم اسپرم، حجم اسپرم، pH، سدیم، پتاسیم، کلسیم، منیزیم، پروتئین کل، کلسترول و گلوکز) در زیر گونه‌های ماهیان *Carassius auratus gibelio* قرمز ساده، دم چادری، چهاردم و چهاردم دم چادری از هر تیمار ۱۰ مولد مورد بررسی قرار گرفت. هورمون GnRHa مخلوط شده با دامپریدون به میزان ۱۰ میکروگرم به ازای کیلوگرم وزن بدن مورد استفاده قرار گرفت. بین pH در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P > 0.01$)، به گونه‌ای که در تیمار اول (ساده) بالاترین pH اندازه‌گیری شد (8.11 ± 0.42). بین طول دوره حرکت و درصد اسپرم‌های متحرک در تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P > 0.05$)، به گونه‌ای که طول دوره حرکت و درصد تحرک در تیمار اول (ساده) نسبت به سایر تیمارها بالا تر بود (83.65 ± 21.05 و 88.19 ± 5.65 به ترتیب)، در صورتی که اسپرما توکریت (%) و تراکم اسپرم ($10^6 \times$ عدد) در تیمارهای سوم (چهاردم) و چهارم (چهاردم دم چادری) نسبت به سایر تیمارها بالا تر بود (53.38 ± 5.66 و 7.81 ± 1.58 به ترتیب). همچنین بالاترین حجم اسپرم در تیمار اول اندازه‌گیری شد (0.92 ± 0.46 میلی‌لیتر). بین غلظت یون‌های سدیم، پتاسیم و کلسیم در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0.05$). در صورتی که بالاترین غلظت یون منیزیم در تیمار چهارم اندازه‌گیری شد (1.57 ± 0.26 میلی‌مول در لیتر). همچنین بین میزان کلسترول و پروتئین کل در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$). در صورتی که بالاترین میزان گلوکز در تیمار چهارم اندازه‌گیری شد (0.30 ± 0.33 میلی‌گرم در دسی‌لیتر). از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت هورمون GnRHa تاثیر معنی‌داری روی ترکیبات منی در ماهی قرمز ساده و چهاردم دم چادری نسبت به دم چادری و چهاردم دارد.

کلمات کلیدی: ماهی قرمز، اووفاکت، منی؛ پارامترهای اسپرم شناختی، پارامترهای بیوشیمیایی

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 83 pp: 9-17

The effects of ovafact (GnRH_a) on biological characteristics of semen in commons, comets, wakins and fantails goldfish (*Carassius auratus gibelio*)

By: Vahid Zadmajid, Dept. of Fisheries, Faculty of Sciences, Gorgan, University of Agricultural Science and Natural Resources, (Corresponding Author, Tel: +989144824228) M. R. Imanpoor, Dept. of Fisheries, Faculty of Sciences, Gorgan, University of Agricultural Science and Natural Resources, M. Sudagar, Dept. of Fisheries, Faculty of Sciences, Gorgan, University of Agricultural Science and Natural Resources, A. shabany, Dept. of Fisheries, Faculty of Sciences, Gorgan, University of Agricultural Science and Natural Resources

In this study, the effect of hormone Ovafact (GnRH_a) on biological semen characteristics (motility duration, percentage of motile spermatozoa, spermocrit, sperm density, milt volume, pH, Na⁺, K⁺, Ca⁺, Mg²⁺, total protein, cholesterol and glucose) in sub species commons, comets, wakins and fantail goldfish (*Carassius auratus gibelio*) males was compared. From each treatment ten males has been investigated. Fish injected with with 10µg kg⁻¹ GnRH_a combined with domperidone. There was a highly significant difference of seminal plasma pH among treatments (p<0/01), as the highest value of pH observed in commons treatment (8.88±0.42). There were a highly significant difference in percentage of motile spermatozoa and motility duration among treatments (p<0/05) as the highest value percentage of motile spermatozoa and motility duration observed in commons treatment (83.65± 21.05, 88.19±5.65 respectively). While the highest value of spermocrit (%) and sperm density (×10⁹ number) observed in waking and fantail treatments (53.38± 5.66, 7.81± 1.58 respectively). Also the highest value of milt volume observed in commons treatment (0.92± 0.46 ml). But there were no significant difference in Na⁺, K⁺, Ca⁺ among treatments (p>0/05), While the highest value of Mg²⁺ observed in fantail (1.57±0.26 mmol/l). Likewise there were no significant difference in total protein and cholesterol among treatments (p>0/05), While the highest value of glucose observed in fantail (0.3± 0.33 mg/dl). The present study demonstrated that GnRH_a have been more effective on biological characteristics of semen in commons and fantail than comet and wakins.

Keywords: Glucose, Insulin, Food intake, Chicken.

مقدمه

ماهی *Carassius auratus gibelio* از خانواده کپور ماهیان می باشد، خانواده ماهی قرمز بسیار متنوع و از انواع زیادی تشکیل شده است و بیشترین طرفداران این ماهی ها در ژاپن و چین هستند. سرسختی، مقاومت و زیبایی این ماهی ها باعث شده است روز به روز طرفداران بیشتری پیدا کنند و هر روز کارشناسان پرورش ماهی با استفاده از علم ژنتیک و وراثت، نژادها و گونه های جدیدی را تولید می کنند. تا کنون حدود ۱۰۰ نوع ماهی طلایی بوجود آمده است. که فقط چند گونه از آنها به ایران آورده شده اند که تمام آنها با موفقیت تکثیر و پرورش یافته اند، از این ماهی نژادهای فراوانی گرفته شده است. از آن جمله می توان به دم چادری، سر شیری، سر مرواریدی، چشم تلسکوپی و چندین گونه دیگر اشاره کرد. ماهی قرمز با فرهنگ و عقاید مردم در سراسر جهان عجین شده و یک ماهی بسیار مهم به لحاظ اقتصادی می باشد (۱). در بسیاری از ماهیان اوولاسیون، اسپرم ریزی و تخم ریزی در شرایط پرورشی به صورت کامل صورت نمی گیرد و تزریق هورمون برای القای تخم ریزی و اسپرم ریزی و همزمانی آزاد سازی گامت ها در کارگاه های پرورش ماهی امری ضروری می باشد (۲۳). عملکرد ناقص تولید مثلی ممکن است در نتیجه شرایط نامناسب محیطی نظیر استرس باشد، که

باعث عدم رهاسازی هورمون GTH از هیپوفیز در نتیجه عدم توانایی اسپرم ریزی در نرها و کاهش کیفیت و کمیت اسپرم می گردد (۱۳). راهکارهای زیادی برای غلبه بر این ناتوانی تولید مثلی در ماهیان وجود دارد از جمله دستکاری سیستم درون ریز که با استفاده از انواع هورمون ها هم چون GnRH، HCG، ۱۱کتوتستوسترون، استروژن، پروژسترون و عصاره هیپوفیز امکان پذیر می باشد. GnRH از دسته هورمون های پپتیدی می باشد، که تاثیر بسیار زیادی روی رهاسازی هورمون های گنادوتروپین (GTHs) دارد (۲۳). هورمون GnRH به صورت موفقیت آمیزی در ماهیان آب شیرین و دریایی در ایران و سایر نقاط جهان مورد استفاده قرار گرفته است. (۲، ۳، ۱۸، ۲۳). تحقیق صورت گرفته توسط درافشان و همکاران (۱۳۸۱)، در قزل آلی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) نشان داد که GnRH_a ترکیبی فعال و موثر جهت القای رسیدگی و همزمانی رسیدگی در مولدین این گونه می باشد (۲). همچنین مطالعات Paykan Hyrati و همکاران، نشان داد که هورمون GnRH_a موجبات تکثیر موفقیت آمیز ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) را فراهم می آورد (۱۸). مطالعات صورت گرفته توسط Lim و همکاران، ۲۰۰۴ نشان می دهد که هورمون GnRH از طریق تاثیر بر غده هیپوفیز باعث افزایش GTH و در

مراحل آزمایش از مراکز تکثیر ماهیان زینتی در استان گلستان تهیه شده، در ۱۵ اسفند ماه به مرکز تحقیقات آبی پروری دانشکده شیلات منتقل گردید و ماهیان در حوضچه‌های و نیرو با هوادهی ملایم تا اوایل اردیبهشت نگهداری شدند. در نهایت ماهیان به چهار تیمار قمرزساده، دم چادری، چهاردم و چهاردم دم چادری تقسیم شده و در هر تیمار ۱۰ ماهی بطور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. به همه گروه‌ها به میزان ۱۰ میکروگرم به ازای کیلوگرم وزن بدن هورمون اووافاکت (Glu-His-), (GnRHa), (NH₂ Tyrp-Ser-Tyr-Gly-Trp-Leu-Pro-Gly) به صورت عضلانی و در ناحیه پشتی تزریق بعمل آمد [۲۳]. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از زمان تزریق پس از خشک کردن منفذ تناسلی بدون آلودگی با آب یا ادار، با فشار ملایم به ناحیه شکمی از ماهیان مولد نر اسپرم گیری بعمل آمد (۷).

آنالیز حرکتی اسپرم

برای شروع حرکت، اسپرم با محلول فعال کننده (آب مقطر) به نسبت ۱:۴۰۰۰ رقیق شد و پارامترهای حرکتی اسپرم بلافاصله (با تاخیر 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 نرم افزار Adobe premeier هر ثانیه به ۶ 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 زمانی که همه اسپرم‌ها از حرکت باز ایستادند اندازه‌گیری شد (۲۲) و مشاهدات در دمای اتاق (۲۲-۲۰ سانتی‌گراد) صورت گرفت.

اندازه‌گیری اسپرماتوکریت

برای اندازه‌گیری اسپرماتوکریت، سمن در دستگاه سانتریفیوژ (USA, ۲۷۵.CAT.NO) با ۳۰۰۰ دور در دقیقه در مدت زمان ۸ دقیقه در لوله‌های میکرو سانتریفیوژ شده سپس با استفاده از هماتوکریت خوان (U.S.A, ۲۲۰۱.I.E.C.CAT.NO) درصد اسپرم به پلاسما سمینال اندازه‌گیری شد (۱۰). برای این منظور میانگین ۱۰ نمونه اسپرم (در سه تکرار) به عنوان مقدار اسپرماتوکریت ثبت شد (۲۰).

اندازه‌گیری تراکم اسپرم

تراکم اسپرم با روش استاندارد هماسیتومتر با رقیق کردن اسپرم به نسبت ۱:۲۰۰۰ و با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست (Leica- Gallen-III. CCD-Gp۲۴۰) زمینه سیاه با درشت‌نمایی ۱۰ اندازه‌گیری شد و با واحد $\times 10^9$ در هر میلی‌لیتر سمن محاسبه شد.

اندازه‌گیری pH مایع اسپرمی

نمونه‌های اسپرم درون ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد. نمونه‌ها ابتدا در دور ۵۰۰ به مدت ۲ دقیقه و بعداً در دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (England ۱۳-۱ sigma) شدند (۱۴)، بعد از سانتریفیوژ، پلاسما مای منی که در قسمت بالای ویال قرار گرفته بود (سوپرناتنت) به درون ویال‌های جدید ۱ میلی‌لیتر ریخته شد و pH بوسیله پی‌اچ متر

نتیجه افزایش حجم اسپرم می‌شود (۱۳). در بسیاری از ماهیان از جمله خانواده کپور ماهیان دوپامین به عنوان عامل ممانعت‌کننده تکثیر نقش مهمی در جلوگیری از آزادسازی GnRH از هیپوفیز دارد و یا توانایی GnRH تجویز شده برای افزایش رهاسازی GnRH-II از طریق کاهش حساسیت گیرنده‌های سلولی در سطح هیپوفیز را شدیداً کاهش می‌دهد. برای غلبه بر این مشکل می‌توان به همراه تزریق GnRHa از آنتی دوپامین‌های پیموزاید، دامپریدون و متوکلوپرامید استفاده کرد (۲۳). در صنعت آبی پروری توجه به کیفیت تخم یا لارو نسبت به اسپرم بیشتر می‌باشد این درحالی است که کیفیت هر دو گامت (اسپرم و تخمک) روی موفقیت لقاح و بقای لاروها موثر می‌باشد (۱۹). یکی از مهمترین مشکلات در پرورش کپور ماهیان بدست آوردن گامت‌های با کیفیت بالا است. با مطالعه صورت پذیرفته توسط Tekin و همکاران در سال ۲۰۰۳ مشخص شد که کیفیت بالای گامت‌ها در تولید لاروهای با کیفیت مناسب در تفریخگاه‌های ماهی بسیار موثر است و می‌تواند راندمان لقاح و تکثیر مصنوعی در ماهیان را افزایش دهد (۲۱).

سمن یا میل از اسپرماتوزا و پلاسما منی تشکیل شده است، پلاسما منی دارای ترکیباتی می‌باشد که بعضی از این ترکیبات از اسپرماتوزا نگهداری می‌کنند و بعضی دیگر رابط بین سیستم تولید مثل و اسپرماتوزا هستند (۱۸). پلاسما منی محیطی را برای تغذیه، حفاظت و تکامل اسپرماتوزید بوجود می‌آورد که خود توسط بیضه و لوله‌های اسپرم بر ساخته می‌شود. در پستانداران ترکیبات پلاسما منی به خوبی مطالعه شده است اما مطالعه روی ترکیبات منی در ماهیان در دهه‌های اخیر شروع شده است. دانش تفاوت کیفی بین اسپرم در ماهیان نر می‌تواند به مدیریت سلامت ژنتیکی مولدین به کار رفته کمک کند به همین دلیل بهتر است قبل از لقاح، خصوصیات اسپرم هر ماهی نر مشخص باشد (۲۱).

برای این کار می‌بایست بیومارکرهای کیفی اسپرم که مستقیماً روی توانایی لقاح موثرند، مشخص شود. این پارامترها شامل اسپرماتوکریت، تراکم اسپرم، اسیدیته، ترکیب شیمیایی پلاسما سمینال، طول دوره حرکت و چندین مولفه دیگر می‌باشد (۱۹).

هدف از این مطالعه بررسی اثر اووافاکت (GnRHa) بر برخی خصوصیات زیست‌شناسی منی (طول دوره تحرک اسپرم، درصد تحرک اسپرم، اسپرماتوکریت، تراکم اسپرم، حجم اسپرم، pH، سدیم، پتاسیم، کلسیم، منیزیم، پروتئین کل، کلسترول و گلوکز) در زیرگونه‌های ماهیان *Carassius auratus gibelio* قمرزساده، دم چادری، چهاردم و چهاردم دم چادری می‌باشد، تا بتوانیم مدیریت بهتری در هنگام تکثیر این زیرگونه‌های با ارزش داشته باشیم.

مواد و روش‌ها

مولدین و تهیه نمونه

این تحقیق در طی ماه‌های اسفند ۱۳۸۵ و فروردین، اردیبهشت و خرداد ۱۳۸۶ در مرکز تحقیقات آبی پروری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده شیلات واقع در پردیس صورت گرفت. تعداد ۱۰۰ عدد ماهی مولد قمرز نر هم سن (با میانگین طول کل ۱/۷۵ $\pm ۲۲/۳$ سانتی‌متر و با میانگین وزن $۵۶/۱۶ \pm ۲۲/۰۷$ گرم) جهت انجام

اندازه گیری گلوکز، کلاسترول (طول موج ۵۴۶ نانومتر)
جدول ۴- روش آماده کردن نمونه (استاندارد) و بلانک جهت اندازه گیری گلوکز، کلاسترول
مایع اسپرمی ماهی قرمز

عامل	بلانک (میکرولیتر)	نمونه یا استاندارد (میکرولیتر)
پلاسمای اسپرمی یا استاندارد	-	۱۰
آب مقطر	۱۰	-
معرف	۱۰۰۰	۱۰۰۰

۱۰۰× (جذب استاندارد / جذب نمونه) = غلظت گلوکز پلاسمای اسپرمی
۲۰۰× (جذب استاندارد / جذب نمونه) = غلظت کلاسترول پلاسمای اسپرمی

اندازه گیری ترکیبات بیوشیمیایی پلاسمای منی

برای اندازه گیری کلسیم، منیزیم، گلوکز، کلاسترول و پروتئین از دستگاه اسپکتروفتومتر (UV/VIS, Cambridge-WPA-S2000) (UK) با استفاده از کیت‌های کلسیم، منیزیم، پروتئین کل، گلوکز و کلاسترول (شرکت پارس آزمون) مطابق جداول زیر عمل شد (۲۰).
برای اندازه گیری سدیم و پتاسیم از دستگاه فلیم فتومتر (England, Jenway pfp) استفاده شد، برای این کار ابتدا میزان جذب شعله تحت تاثیر غلظت‌های مختلف استاندارد خوانده شد و توسط نرم افزار Excel معادله رگرسیونی آن ترسیم و غلظت‌های سدیم و پتاسیم در پلاسمای اسپرمی محاسبه شد.

روش تجزیه و تحلیل

شیوه نمونه برداری به صورت تصادفی و در قالب طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت. داده‌های به دست آمده در ارتباط با مدت زمان و درصد حرکت اسپرم، pH مایع اسپرمی، اسپرماتوکریت، تراکم اسپرم، حجم اسپرم، سدیم، پتاسیم، کلسیم، منیزیم، پروتئین کل، کلاسترول و گلوکز در چهار گروه قرمز ساده، دم چادری، چهاردم و چهاردم دم چادری به کمک آزمون دانت در سطح ۹۵ درصد ($\alpha = 0.05$) توسط آنالیز واریانس یک طرفه، با استفاده از نرم افزار SPSS با یکدیگر مقایسه شدند.

نتایج

پارامترهای اسپرم شناختی (خصوصیات فیزیکی) و بیوشیمیایی منی ماهی سیم در جداول ۱، ۲، ۳ نمایش داده شده است.

پارامترهای اسپرم شناختی منی pH

نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میانگین pH بین تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز در جدول ۵ نشان داده شده است. همانگونه که در جدول مشاهده می‌شود بین pH در تیمارهای مختلف اختلاف معنی داری وجود داشت ($P > 0.01$)، به گونه‌ای که در تیمار اول (ساده) بالاترین pH مشاهده شد.

(Iran, T.S.CO, pH-۴۶۲) اندازه گیری گردید.

اندازه گیری حجم اسپرم‌دهی

برای این منظور با استفاده از سرنگ انسولین یک میلی لیتر حجم اسپرم‌دهی ماهیان اندازه گیری شد.

اندازه گیری یون کلسیم (طول موج ۵۷۵ نانومتر)

جدول ۱- روش آماده کردن نمونه، شاهد و استاندارد جهت اندازه گیری یون کلسیم مایع اسپرمی ماهی قرمز

عامل	نمونه (میکرولیتر)	استاندارد (میکرولیتر)	شاهد (میکرولیتر)
پلاسمای اسپرمی	۲۰	-	-
استاندارد	-	۲۰	-
معرف رنگزا	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

۱۰× (جذب استاندارد / جذب نمونه) = غلظت کلسیم پلاسمای اسپرمی

اندازه گیری یون منیزیم (طول موج ۵۲۰ نانومتر)

جدول ۲- روش آماده کردن نمونه، شاهد و استاندارد جهت اندازه گیری یون منیزیم مایع اسپرمی ماهی قرمز

عامل	نمونه (میکرولیتر)	استاندارد (میکرولیتر)	شاهد (میکرولیتر)
پلاسمای اسپرمی	۱۰	-	-
استاندارد	-	۱۰	-
آب مقطر	-	-	۱۰
محلول آماده به کار	۱۰۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰

۲× (جذب استاندارد / جذب نمونه) = غلظت منیزیم پلاسمای اسپرمی

اندازه گیری پروتئین کل (طول موج ۵۴۰ نانومتر)

جدول ۳- روش آماده کردن نمونه، شاهد و استاندارد جهت اندازه گیری پروتئین کل مایع اسپرمی ماهی قرمز

عامل	نمونه (میکرولیتر)	استاندارد (میکرولیتر)	شاهد (میکرولیتر)
استاندارد	۲۰	-	-
پلاسمای اسپرمی	-	۲۰	-
معرف مخلوط شده	۱۰۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰

۶× (جذب استاندارد / جذب نمونه) = غلظت پروتئین پلاسمای اسپرمی

جدول ۵- آمار توصیفی پارامترهای اسپرم شناختی منی در ماهیان *Carassius auratus gibelio* قرمزساده، دم چادری، چهاردم و چهاردم دم چادری

متغیرها	pH	حجم اسپرم (میلی لیتر)	طول دوره حرکت (ثانیه)	تراکم اسپرم $\times 10^4$	درصد اسپرم متحرک (%)	اسپرماتوکریت (%)
تیمار ۱ (ساده)	a ۸/۸۸ ± ۰/۴۲	a ۰/۹۲ ± ۰/۴۶	a ۸۳/۶۵ ± ۲۱/۰۵	ab ۷/۳۸ ± ۳/۶۷	a ۸۸/۱۹ ± ۵/۶۵	c ۳۹/۹۵ ± ۱۰/۰۸
تیمار ۲ (دم چادری)	ab ۸/۶۱ ± ۰/۲۶	bc ۰/۴۹ ± ۰/۴۲	ab ۷۹/۳۰ ± ۱۱/۲۷	b ۵/۱۰ ± ۲/۹۰	b ۷۲/۹۸ ± ۱۶/۰۳	bc ۴۲/۹۲ ± ۱۱/۳۴
تیمار ۳ (چهاردم)	b ۸/۴۳ ± ۰/۳۹	ab ۰/۶۰ ± ۰/۴۳	b ۶۳/۳۸ ± ۹/۶۲	b ۵/۰۳ ± ۲/۲۴	ab ۸۳/۸۲ ± ۱۱/۵۳	a ۵۳/۳۸ ± ۵/۶۶
تیمار ۴ (چهاردم دم چادری)	b ۸/۳۳ ± ۰/۲۸	c ۰/۲۲ ± ۰/۱۲	ab ۷۰/۸۹ ± ۲۱/۸۷	a ۷/۸۱ ± ۱/۵۸	b ۷۱/۷۸ ± ۲۱/۲۹	ab ۴۹/۳۰ ± ۹/۹۲

به سایر تیمارها بالاتر بود.

طول دوره تحرک اسپرم و درصد اسپرم‌های متحرک

همانگونه که در جدول ۵ مشاهده می‌شود بین طول دوره حرکت و درصد اسپرم‌های متحرک در تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($P > 0.05$)، به گونه‌ای که طول دوره حرکت و درصد تحرک در تیمار اول (ساده) نسبت به سایر تیمارها بالاتر بود.

اسپرماتوکریت و تراکم اسپرم

همانگونه که در جدول ۵ مشاهده می‌شود بین اسپرماتوکریت و تراکم اسپرم در تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($P > 0.05$)، به گونه‌ای که اسپرماتوکریت و تراکم اسپرم در تیمارهای سوم (چهاردم) و چهارم (چهاردم دم چادری) به ترتیب نسبت

حجم اسپرم‌دهی

نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میانگین حجم اسپرم بین تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز در جدول ۵ نشان داده شده است. همانگونه که در جدول مشاهده می‌شود بین حجم اسپرم در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P > 0.05$)، به گونه‌ای که در تیمار اول (ساده) بالاترین حجم اسپرم مشاهده شد.

پارامترهای بیوشیمیایی پلاسمای اسپرمی

غلظت یون‌های سدیم و پتاسیم

نتایج آنالیز واریانس و مقایسه غلظت یون‌های سدیم و پتاسیم

جدول ۶- آمار توصیفی ترکیبات یونی پلاسمای اسپرمی در ماهیان *Carassius auratus gibelio* قرمزساده، دم چادری، چهاردم و چهاردم دم چادری

متغیرها	سدیم (میلی مول در لیتر)	پتاسیم (میلی مول در لیتر)	کلسیم (میلی مول در لیتر)	منیزیم (میلی مول در لیتر)
تیمار ۱ (ساده)	a ۲۱۲/۱۰ ± ۳۳/۷۲	a ۱۸/۶۵ ± ۱۲/۰۴	a ۰/۸۱ ± ۰/۴۸	b ۱/۲۴ ± ۰/۳۲
تیمار ۲ (دم چادری)	a ۱۹۵/۲۰ ± ۵۳/۰۸	a ۲۳/۴۰ ± ۸/۶۴	a ۰/۸۳ ± ۰/۵۲	ab ۱/۵۰ ± ۰/۲۶
تیمار ۳ (چهاردم)	a ۱۸۱/۰ ± ۱۷/۲۱	a ۱۸/۴۹ ± ۸/۰۵	a ۰/۸۸ ± ۰/۲۴	ab ۱/۴۸ ± ۰/۲۸
تیمار ۴ (چهاردم دم چادری)	a ۲۲۰/۲۰ ± ۶۵/۵۶	a ۱۶/۶۳ ± ۹/۷۶	a ۰/۴۹ ± ۰/۴۱	a ۱/۵۷ ± ۰/۲۶

جدول ۷- آمار توصیفی ترکیبات آلی پلاسمای اسپرمی در ماهیان *Carassius auratus gibelio* قرمزساده، دم چادری، چهاردم و چهاردم دم چادری

متغیرها	پروتئین کل (گرم در دسی لیتر)	گلوکز (میلی گرم در دسی لیتر)	کلسترول (میلی گرم در دسی لیتر)
تیمار ۱ (ساده)	a ۰/۰۱۰±۰/۰۳	b ۰/۰۲۰±۰/۰۵	a ۰/۰۹۰±۰/۰۳
تیمار ۲ (دم چادری)	a ۰/۱۳۰±۰/۰۸	b ۰/۰۲۰±۰/۰۴	a ۰/۰۹±۰/۰۷
تیمار ۳ (چهاردم)	a ۰/۰۶±۰/۰۲	b ۰/۱۳±۰/۱۷	a ۰/۱۸±۰/۱۸
تیمار ۴ (چهاردم دم چادری)	a ۰/۰۲±۰/۰۳	a ۰/۳۰±۰/۳۳	a ۰/۱۴±۰/۰۹

پروتئین کل

نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میانگین میزان پروتئین کل بین تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز در جدول ۷ نشان داده شده است. همانگونه که در جدول مشاهده می‌شود، بین میزان پروتئین کل در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0/05$).

بحث

مطالعه حاضر نشان داد هورمون GnRHa تاثیر معنی‌داری روی ترکیبات اسپرمی در وارپته‌های مختلف ماهی قرمز دارد. طبق مشاهدات این تحقیق هورمون GnRHa بطور معنی‌داری باعث افزایش pH مایع سمینال در تیمار اول (ساده) شد ($8/88 \pm 0/42$). که با تحقیقات Miura و همکاران، ۱۹۹۱ هم‌خوانی دارد، این محققین نشان دادند که در گونه *Oncorhynchus masou* هورمون ۱۷ آلفا-۲۰ بتا-دی هیدروکسی -۴ پرگنن-۳ و ۱ (20β -DP, 17α) باعث افزایش pH در مجرای اسپرم بر می‌شود که در نهایت موجب افزایش CAMP در اسپرم شده و زمینه شروع حرکت اسپرم را فراهم می‌نماید (۱۵). همچنین Clearwater و Crim (۱۹۹۸) گزارش کردند که تزریق هورمون GnRHa در ماهی کفشک زرد باله (*Pleuronectes ferruineus*) باعث افزایش pH پلاسمای سمینال می‌شود (۹). بنظر می‌رسد در این تحقیق هورمون اووافاکت از مسیر افزایش هورمون دی هیدروکسی پروژسترون تحت تاثیر آزادسازی GTH-II باعث افزایش pH پلاسمای اسپرمی ماهی قرمز می‌شود. در مجموع ماهیان مختلف عکس

پلاسمای اسپرمی بین تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز در جدول ۶ نشان داده شده است. همانگونه که در جدول مشاهده می‌شود، بین غلظت یون‌های سدیم و پتاسیم در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0/05$).

غلظت یون‌های کلسیم و منیزیم

نتایج آنالیز واریانس و مقایسه غلظت یون‌های کلسیم و پتاسیم پلاسمای اسپرمی بین تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز در جدول ۶ نشان داده شده است. همانگونه که در جدول مشاهده می‌شود، بین غلظت یون کلسیم در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0/05$). در صورتی که بین غلظت یون منیزیم در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P > 0/05$)، به گونه‌ای که بالاترین غلظت منیزیم در تیمار اول مشاهده شد.

گلوکز و کلسترول

نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میزان گلوکز و کلسترول پلاسمای اسپرمی بین تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز در جدول ۷ نشان داده شده است. همانگونه که در جدول مشاهده می‌شود، بین میزان گلوکز در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P < 0/05$)، به گونه‌ای که بالاترین میزان گلوکز در تیمار چهارم مشاهده شد. در صورتی که بین میزان کلسترول در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0/05$).

Mylonas (۲۰۰۱)، نشان داد تزریق یک مرحله‌ای GnRH باعث کوتاه مدت شدن دوره اسپرم سازی می‌شود در صورتی که تزریق دو مرحله‌ای این هورمون باعث طولانی شدن دوره اسپرم‌سازی و در نتیجه افزایش حجم اسپرم‌دهی می‌شود و ثابت شده اسپرمی با حجم بالا اگر چه رقیق می‌باشد ولی در صد تحرک بالایی خواهد داشت (۲۴). Lim و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند که هورمون GnRH از طریق تاثیر بر غده هیپوفیز باعث افزایش GTH و در نتیجه افزایش حجم اسپرم می‌شود (۱۳). در این تحقیق بین غلظت یون‌های سدیم، پتاسیم و کلسیم در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0.05$). در صورتی که بین غلظت یون منیزیم در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P > 0.05$), به گونه‌ای که بالاترین غلظت منیزیم در تیمار چهار اندازه‌گیری شد (1.57 ± 0.26 میلی مول در لیتر). مطالعات Kowalski و همکاران (۲۰۰۶) در گونه اسملت اروپایی (*Osmelus eperlamus L.*) نشان داد، تزریق هورمون HCG تاثیر روی یون‌های سدیم و پتاسیم مایع سمینال در این گونه ندارد (۱۲). اطلاعات در رابطه با عملکرد یون منیزیم در اسپرم ماهیان محدود می‌باشد، در مورد ماهیان خاویاری ثابت شده، اگر غلظت یون منیزیم به ۱۵ میلی مول در لیتر برسد تاثیر منفی روی تحرک اسپرم خواهد داشت (۴). می‌توان بیان کرد در زیرگونه چهار دم چادری به علت pH پایین و منیزیم بالا طول دوره تحرک نسبت به سایر زیرگونه‌ها پایین‌تر می‌باشد. روابط آشکاری بین ترکیب پلاسما سمینال، اسمولاریته و مدت زمان تحرک اسپرم در ماهیان وجود دارد. پارامترهای مختلفی مثل غلظت یون‌ها (پتاسیم، سدیم و کلسیم) فشار اسمزی، pH، دما و نسبت رقیق‌سازی روی حرکت اسپرم مؤثرند (۵). مطالعات Morisawa و همکاران در سال ۱۹۸۳ نشان داد عامل اصلی ممانعت‌کننده تحرک اسپرم در آزاد ماهیان و ماهیان خاویاری پتاسیم خارج سلولی می‌باشد، در صورتی که یون‌های پتاسیم سرعت حرکت اسپرم را در کپور معمولی افزایش می‌دهند، این نتایج اساساً نشان می‌دهد که اسپرم کپور ماهیان نسبت به آزاد ماهیان به یون پتاسیم حساسیت کمتری دارد، یون‌هایی مانند سدیم، کلسیم و منیزیم اثر بازدارندگی یون پتاسیم را خنثی کرده و کاتیون‌های دو ظرفیتی نسبت به سدیم بسیار مؤثرترند (۱۷). همچنین در این مشاهده شد بین میزان کلسترول و پروتئین کل در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0.05$). در صورتی که بین گلوکز در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P > 0.05$), به گونه‌ای که بالاترین میزان گلوکز در تیمار چهار اندازه‌گیری شد (0.30 ± 0.33 میلی گرم در دسی لیتر). اطلاعات در مورد ترکیبات آلی اسپرم ماهیان محدود می‌باشد، به گونه‌ای که Secer و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند نقش پروتئین، گلوکز و کلسترول در اسپرم ماهیان ناشناخته می‌باشد. اندک اطلاعات صورت گرفته نشان می‌دهد پروتئین و کلسترول می‌توانند نقش حفاظتی در اسپرم داشته باشد بخصوص در مورد تغییرات دمایی، زمانی اسپرم از مجرای اسپرم بر وارد محیط بیرونی می‌شود، در صورتی که گلوکز به عنوان یک منبع انرژی‌زا در طی فرایند اسپرم‌سازی می‌تواند نقش داشته باشد. همچنین مطالعات این محققین در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) نشان داد،

عمل‌های متفاوتی نسبت به pH از خود نشان می‌دهند، به گونه‌ای که Alavi و Cosson (۲۰۰۵)، گزارش کردند که pH مهم‌ترین مشخصه پلاسما سمینال می‌باشد که روی پتانسیل حرکتی در اسپرم کپور ماهیان تاثیر می‌گذارد (۴). بین طول دوره حرکت و درصد اسپرم‌های متحرک در تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($P > 0.05$), به گونه‌ای که طول دوره حرکت و درصد تحرک در تیمار اول (ساده) نسبت به سایر تیمارها بالاتر بود ($21/05 \pm 83/65$ و $5/65 \pm 88/19$ به ترتیب)، در صورتی که اسپرماتوکریت و تراکم اسپرم در تیمارهای سوم (چهاردم) و چهارم (چهاردم دم چادری) نسبت به سایر تیمارها بالاتر بود ($53/38 \pm 5/66$ و $7/81 \pm 1/58$ به ترتیب). همچنین بالاترین حجم اسپرم در تیمار اول اندازه‌گیری شد ($0.92 \pm 1/46$ میلی لیتر). Mylonas و همکاران نشان دادند، استفاده از هورمون GnRH فرایند اسپرم ریزی را بطور معنی‌داری در گونه‌های مختلف ماهیان بدون اینکه باعث کاهش تراکم، تحرک و ظرفیت لقاح اسپرماتوزوا شود تحریک می‌کند (۱۶). در این تحقیق مشاهده شد زیرگونه چهاردم دم چادری پایین‌ترین حجم اسپرم را نسبت به سایر زیرگونه‌ها دارد، در نتیجه بالاترین تراکم اسپرم را خواهد داشت، که با تحقیقات Alavi و همکاران هم‌خوانی دارد، این محققین نشان دادند در گونه‌هایی که حجم اسپرم پایین می‌باشد معمولاً جهت جبران حجم کم اسپرم واجد اسپرمی با تراکم بالا می‌باشند (۶). از طرفی دیگر Vermeirssen و همکاران بیان کردند تراکم بالای اسپرم در شرایط اسارت می‌تواند پدیده‌ای مشکل ساز باشد زیرا چسبندگی اسپرم بالا می‌رود و در هنگام ترکیب با آب جداسازی و شرایط تحرکی اسپرم با مشکل مواجه می‌شود و چون طول دوره تحرک اسپرم پایین می‌باشد، در نتیجه اسپرم زمان کافی برای تحرک در این شرایط چسبندگی بالا پیدا نخواهد کرد در نهایت از بین می‌رود و تعداد محدودی که باقی می‌مانند به شرایط مورفولوژیکی ناقصی دچار می‌شوند و توانایی ورود به میکروپیل یا انتقال صفات ژنتیکی را از دست می‌دهند (۲۳). مطالعات Harald و همکاران (۲۰۰۱) در گونه‌های لیپوت اقیانوس اطلس (*Hippoglossus hippoglossus*)، نشان داد که تزریق هورمون GnRH باعث افزایش تراکم اسپرم از 2×10^{11} به 6×10^{11} اسپرماتوزوا در میلی لیتر سمن می‌شود (۱۱). در این مطالعه مشاهده شد که گونه قرمز ساده در مقایسه با زیرگونه‌های دم چادری، چهاردم و چهاردم دم چادری بالاترین در صد تحرک را دارا می‌باشد که این تحرک بالا می‌تواند در نتیجه حجم بالای اسپرم و بالا بودن pH اسپرم این گونه نسبت به سایر گونه‌ها باشد. همچنین در این تحقیق به دلیل دو مرحله ای بودن تزریق GnRH به فاصله زمانی ۱۲ ساعت حجم اسپرم افزایش معنی‌داری داشت. تحقیقات درافشان و همکاران (۱۳۸۱)، در قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که دو تزریق متوالی از هورمون GnRH به فاصله زمانی ۱۲ ساعت به منظور حصول بهترین نتیجه مناسب می‌باشد، در این حالت احتمالاً اثر تزریق مقدماتی با تزریق نهایی تشدید و تقویت می‌شود. افزایش غلظت تستوسترون سرم در ۲۴ ساعت پس از اولین تزریق که بیانگر اثر محرک GnRH به تحریک ترشح GTH و در نتیجه تحریک گنادها به تولید استروئیدهای جنسی (تستوسترون) می‌باشد موید این مسئله است (۲). مطالعات Zohar و

Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freash water fishes. WAS, Baton Roug.p.20-48

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- Fitzpatrick, J. L., Henry, J. C., Leily, N. R. and Devlin, R. H. (2005). Sperm characteristics and fertilization success of masculinized Coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Aquaculture* 249, 459-468.

11- 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.

12- Kowalski, R.K., Hliwa, A., Andronowska, A., Król, J., Dietrich, G.J., Wojtczak, M., Stabiński, R., and Ciereszko, A. (2006). Semen biology and stimulation of milt production in the European smelt (*Osmerus eperlanus* L.). *Aquaculture* 261, 760-770.

13- 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 in greenback flounder (*Rhombosolea tapirina*). *Aquaculture* 240, 505-516.

14- Linhart, O., Slechta, V. and Slavik, T. (1991). Fish sperm composition and biochemistry. *Bull Inst Zool Acad Sin Monogr* 16:285-311.

15- 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: 353-363.

16- 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.

17- Morisawa, M., Suzuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S. and Yasuda, K., (1983). Effect of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *J Exp Zool* 107:95-103.

18- Paykan Heyrati, F., Mostafavi, H., Toloei, H., and Dorafshan, S., (2007). Induced spawning of kutum, *Rutilus frisii* kutum (Kamenskii, 1901) using (D-Ala⁶, Pro⁹-NET) GnRHa combined with domperidone. *Aquaculture* 265, 288-293.

19- Rurangwa, E., Kime, D.E., Olivier, F. and Nash, J.P., (2004). The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* 234, 1-28.

همبستگی مثبتی بین گلوکز با طول دوره تحرک وجود دارد (۲۰). از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت هورمون GnRHa تاثیر معنی داری روی ترکیبات منی در ماهی قرمز ساده و چهاردم دم چادری نسبت به چهار دم و دم چادری دارد، به گونه‌ای که مجموعه این عوامل موجب افزایش طول دوره تحرک و در صد اسپرم‌های متحرک به خصوص در ماهی قرمز ساده شده است. احتمالاً تفاوت‌های موجود از لحاظ میزان پاسخ‌دهی مولدین نسبت به تزریقات هورمونی به لحاظ متفاوت بودن وضعیت رسیدگی جنسی و همچنین اثرات استرس‌زای تزریقات مکرر و متوالی می‌باشد.

سیاس‌گذاری

از مسئولین آزمایشگاه مرکزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان بخصوص از کارشناسان محترم خانم مهندس ماهرخ شربت‌خوری و مینو رستگار به دلیل در اختیار قرار دادن امکانات و راهنمایی‌های لازم در این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- ۱- ایمانپور، م.ر. و کمالی، ا. (۱۳۸۵). بررسی تکثیر مصنوعی و پرورش لارو های ماهی قرمز *Carassius auratus gibelio* توسط HCG. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، سال (۱۳)، شماره (۲).
- ۲- درافشان، س.، مجازی امیری، ب.، حاجی زاده، ع.، مصطفوی، ح. و پیکان حیرتی، ف. (۱۳۸۱). القاء تکثیر جنس ماده قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از هورمون سنتز شده GnRHa. مجله علمی شیلات ایران، شماره ۳، سال یازدهم، صفحات ۲۳-۳۸.
- ۳- وزیرزاده، آ.، حاجی مرادلو، ع.، اسماعیلی، ح.ر. و اخلاقی، مصطفی، (۱۳۸۶). بررسی امکان رسانش پایدار هورمون GnRHa با استفاده از آدجوانت ناقص فروند (FIA) در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران، شماره ۲، سال شانزدهم، صفحات ۱۴۵-۱۵۲.
- 4- Alavi, S.M.H., and Cosson, J. (2005). Sperm motility and fertilizing ability in the Persian sturgeon *Acipenser persicus*. *Aquacult Res* 36, 841-850.
- 5- 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.
- 6- Alavi, S.M.H., Rodina, M., Policar, T., Kozak, P., Psenicka, M. and Linhart, O. (2007). Semen of *Perca fluviatilis* L.: Sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility. *Theriogenology* 68, 276-283.
- 7- 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.
- 8- Ciereszko, A., Glogowski, J. and Dabrowski, K. J. (2000).

- 23- Vermeirssen, E.L.M.; Scott, A.P.; Mylonas, C.C., and Zohar, Y., (2000). Gonadotrophin-releasing hormone agonist stimulates milt fluidity and plasma concentrations of 7,20h-dihydroxylated and 5h-reduced, 3a-hydroxylated C21 steroids in male plaice (*Pleuronectes platessa*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 112: 163–177.
- 24- Zohar, Y. and Mylonas, C.C., (2001). Endocrine manipulation of spawning in cultured fish: From hormones to genes. *Aquaculture* 197, 99–136.
- 20- Secer, S., Tekin, N., Bozkurt, Y., Bukan, N. and Akcay. (2004). Correlation between biochemical and spermatological parameters in rainbow trout semen. *IJA*, 56:274-280.
- 21- Tekin, N., Secer, S., Akcay, E. and Bozkurt, Y., (2003). Cryopreservation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, *Bamidgeh* 55, 208-212.
- 22- Turner, E. and Montgomerie, R., (2002). Ovarian fluid enhances sperm movement in Arctic charr *Journal of Fish Biology* 56, 1570-1579.

