تاثیر هورمونهای LHRHA2 و عصاره غده هیپوفیز کپور معمولی بر برخی از شاخص‌های لقاح و کیفیت اسپرماتوزوآی ماهی بنی *Barbus sharpeyi*

محمد رضا کلباسی[۱]*؛ رضا لرستانی[۲] و جاسم غفله مرمضی[۳]

Kalbassi_m@modares.ac.ir

۱و۲ - دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور صندوق پستی: ٤٦٤١٤

۳- پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور، اهواز صندوق پستی: ٨٦٦/٦١٦٤٥

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۱

چکیده

در تحقیق حاضر اثر هورمون LHRHA2 در مقادیر ۲/۵، ۵ و ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم و همچنین اثر آنتی دوپامین متوکلوپرامید بر اسپرمیشن ماهی بنی، پارامترهای کیفی و لقاحی اسپرم، ترکیبات شیمیایی (سدیم، پتاسیم و کلسیم)، بیوشیمیایی (آلکالین فسفاتاز، گلوکز و تری گلیسرید) و فشار اسمزی پلاسمای منی در مقایسه با تزریق عصاره غده هیپوفیز بررسی شد. نتایج بدست آمده نشان داد که تزریق ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم LHRHA2 به اضافه ۲/۵ میلی‌گرم متوکلوپرامید، بیشترین بازماندگی انکوباسیون، تخم‌گشایی، حجم اسپرم تولیدی و دوره تحرک اسپرماتوزوآ و همچنین کمترین میزان بدشکلی لارو را نسبت به سایر تیمارهای مورد بررسی داشته است. میانگین (± انحراف معیار) سطح فشار اسمزی در تیمار یاد شده معادل ۳۲۴/۳۳±۷/۳۱ میلی‌اسمول بر کیلوگرم بود که بالاترین سطح فشار اسمزی را در بین تیمارهای دیگر نشان داده است. همچنین بیشترین سطح سدیم نیز در تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم LHRHA2 به اضافه ۲/۵ میلی‌گرم متوکلوپرامید، ارزیابی شد. نتایج نشان داد که تزریق عصاره غده هیپوفیز به مولدین سبب بالاترین میزان بدشکلی، اسپرماتوکریت و پتاسیم در مقایسه با سایر تیمارهای مورد مطالعه شده است. جمع‌بندی نهایی موید آن است که استحصال اسپرم از مولدین نر ماهی بنی در فاصله ۸ ساعت پس از هورمون‌تراپی توسط ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم LHRHA2 به اضافه ۲/۵ میلی‌گرم متوکلوپرامید، مناسبترین کیفیت اسپرم را ایجاد می‌نماید. همچنین تیمار یاد شده سبب افزایش بازماندگی انکوباسیون و کاهش میزان بدشکلی لاروهای ماهی بنی خواهد شد.

لغات کلیدی: غده هیپوفیز، اسپرم، پلاسما ، ماهی بنی، ایران

* نویسنده مسئول

مقدمه

ماهی بنی *Barbus sharpeyi* یکی از مهمترین ماهیان بومی و با ارزش اقتصادی بالا در تالاب‌های حوزه دجله و فرات محسوب می‌شود (Alavi *et al*., 2010; Richardson & Hussain, 2006). طی ۱۰ سال گذشته، ذخائر طبیعی این ماهی به شدت کاهش یافته و مناسبترین شیوه دستیابی به بچه ماهی جهت بازسازی ذخائر از دست رفته و همچنین پرورش مصنوعی آن، انجام تکثیر مصنوعی و موفق آن از طریق تزریق عصاره هیپوفیز می‌باشد (Al Mukhtar *et al*., 2009).

کیفیت لارو در ماهیان نیز مرتبط با خصوصیات والدین از قبیل سن، وزن و یا کیفیت گامتهای آنها می‌باشد که بطور قطع، رشد آنها و ویژگی‌های تولید مثلی آنها را پس از بلوغ تحت تاثیر قرار خواهد داد (Cejko *et al*., 2008; Bobe & Labbé, 2010). جهت حصول لاروهای با کیفیت، دسترسی به گامت‌های با کیفیت ضروری است و کیفیت اسپرم یکی از فاکتورهای با اهمیت درخصوص کسب لقاح مصنوعی با کارایی بالا می‌باشد (Verma *et al*., 2009). تفاوت در کیفیت اسپرم ماهیان متفاوت، مهمترین فاکتور محدود کننده در لقاح مصنوعی ماهیان می‌باشد (Ciereszko & Dabrowski, 1994).

توسعه تکثیر گونه‌های متفاوت کپور ماهیان در جهان، استفاده از غده هیپوفیز را افزایش داده است که این عامل سبب توسعه و ابداع انواع فرم‌های هورمون LHRH و آنالوگ‌های آن شده است (Arabac *et al*., 2001). از طرف دیگر جهت القاء رسیدگی جنسی مولدین توسط هیپوفیز، باید از وجود مقادیر کافی GtH در آن اطمینان داشت (Arabac *et al*., 2001) در حالی که استفاده از هورمون‌های سنتتیک، مقادیر ثابتی از هورمون را به مولدین عرضه می‌نمایند.

بکارگیری موفق هورمون LHRH و آنالوگ‌های آن جهت القاء هورمونی تولید مثل ماهیان، در مطالعات متعددی گزارش شده است. در این رابطه Silla (۲۰۱۱)، عنوان نمود که تزریق تک مرحله‌ای هورمون LHRHa سبب القاء هورمونی کارآمد ماهیان نر *Pseudophryne guentheri* شده است. همچنین Kahkesh و همکاران (۲۰۱۰) عنوان کردند که بهترین تیمار هورمونی برای ماهیان ماده بنی *B. sharpeyi*، ترکیب LHRHA2 و عصاره غده هیپوفیز است و LHRHA2 به تنهایی قادر به القاء هورمونی جنس ماده ماهی بنی نمی‌باشد. از طرف دیگر، Caille و همکاران (۲۰۰۶) بیشترین میزان اسپرمیشن لای ماهی *Tinca tinca* را با اعمال مقادیر ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر کیلوگرم از هورمون LHRHa گزارش کردند. همچنین، کوهی لای و همکاران (۱۳۸۹)، اثر هورمون LHRHA2 و ترکیب آن با متوکلوپرامید و کلرپرومازین را در ماهی سیم ماده *Abramis brama* مورد بررسی قرار دادند و بهترین مقدار LHRHA2، متوکلوپرامید و کلرپرومازین را در ماهی سیم بترتیب معادل ۳ میکروگرم درکیلوگرم، ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم و ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم گزارش کردند. بطور کلی، تحرک، غلظت، حجم و ترکیبات بیوشیمیایی پلاسمای منی، پارامترهای معمول جهت ارزیابی کیفی اسپرم در ماهیان بشمار می‌روند (Bozkurt *et al*., 2009). در این خصوص ترکیبات بیوشیمیایی پلاسمای منی و فشار اسمزی آن، اندیکاتورهای ارزشمندی برای درک مکانیسم نحوه آغاز فعالیت اسپرماتوزوآی ماهی محسوب می‌شوند (Alavi *et al*., 2010)، از طرف دیگر طول دوره تحرک اسپرماتوزآی ماهیان نیز پارامتر کلیدی جهت مشخص نمودن موفقیت در لقاح است (Linhart *et al*., 2008) که همگی این عوامل می‌توانند تحت تاثیر نوع هورمون، مقدار هورمون و نحوه‌ی هورمون‌تراپی قرار گیرند (Caille *et al*., 2006; Hajirezaee *et al*., 2010; Mylonas *et al*., 2010; Cejko *et al*., 2011).

از سوی دیگر، بدشکلی در لاروها ماهیان بدلایل متعددی از قبیل اعمال تیمارهای هورمونی (Bonnet *et al*., 2007)، تماس مستقیم با آلودگی‌ها (Von Westernhagen *et al*., 1988)، عوامل ژنتیکی مولدین، شرایط تکثیر مصنوعی (Jezierska *et al*., 2000) و شرایط محیطی (Mis *et al*., 1995) ایجاد شود.

هدف از انجام تحقیق حاضر بررسی اثر هورمون LHRHA2 (در مقادیر ۲/۵، ۵ و ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم) و همچنین ترکیب آن با آنتی دوپامین متوکلوپرامید (۲/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم)، در مقایسه با عصاره غده هیپوفیز (۲ میلی‌گرم در کیلوگرم) بر پارامترهای لقاحی و کیفی اسپرماتوزوآ و همچنین ترکیبات شیمیایی، بیوشیمیایی و فشار اسمزی پلاسمای منی ماهی بنی بود.

مواد و روش کار

عملیات میدانی تحقیق حاضر از ابتدای اسفند ماه سال ۱۳۸۹ آغاز و تا پایان اردیبهشت ماه ۱۳۹۰ ادامه داشت. محل انجام تحقیق در مرکز تکثیر باربوس ماهیان جنوب کشور واقع در دشت

آزادگان استان خوزستان بود. کل دوره زمانی اجرای تحقیق ۱۲ ماه بطول انجامید. جهت این امر تعداد ۲۴ مولد نر با میانگین (± انحراف معیار) طول کل ۱/۳۷±۴۱/۸۱ سانتیمتر و میانگین (± انحراف معیار) وزن ۴۶/۳۸±۸۱۰/۵۴ انتخاب شدند.

مولدین انتخاب شده فاقد جراحت، قارچ زدگی و آسیب دیدگی مشهود بودند که بوسیله تگ پلاستیکی نشان‌دار شده و در ۸ تیمار و به شرح جدول ۱، مورد تزریق قرار گرفتند.

حجم هر یک از تزریق‌ها معادل ۱ سی سی بر کیلوگرم وزن بدن مولدین محاسبه شد و اعمال شد. در هر گروه هورمونی ۳ مولد نر مورد تزریق قرار گرفتند.

مولدین ماده نیز به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن به میزان ۴ میلی‌گرم هیپوفیز تزریق شدند که این تزریق در دو مرحله و به فاصله ۱۲ ساعت انجام شد. تزریق اول به میزان ۱۰ درصد هیپوفیز محاسبه شده کل و تزریق دوم همزمان با تزریق نرها و به میزان ۹۰ درصد هیپوفیز محاسبه شده کل اعمال شد. همچنین دمای آب کارگاه در روز آزمایش ۲۳ درجه سانتیگراد بود.

هشت ساعت پس از تزریق تیمارهای متفاوت هورمونی، مولدین نر توسط MS_{222} با مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیهوش شدند و توسط ماساژ محوطه شکمی، استحصال اسپرم بصورت انفرادی از آنها صورت پذیرفت. در ادامه مولدین ماده نیز بیهوش شدند و جهت یکسان شدن شرایط آزمایش، تخمک های استحصال شده با هم ادغام شدند.

لقاح به روش خشک انجام شد و جهت انجام لقاح در هر یک از تکرارها میزان ۱۰ میلی لیتر تخمک با ۱۰ میکرولیتر اسپرم ترکیب شد و سپس جهت تکمیل فرآیند لقاح در هر یک از تکرارهای مورد مطالعه میزان ۱ سی‌سی آب کارگاه به آن اضافه شد.

پس از انجام لقاح، جهت رفع چسبندگی تخم‌ها مطابق روش کارگاه (از آب رودخانه کرخه) استفاده شد و بدین منظور پس از تکمیل لقاح، تخم ها، با استفاده از آب کارگاه به مدت ۳۰ دقیقه شستشو شده و سپس برای رفع چسبندگی نهایی، تخم‌های لقاح یافته ۲ بار، و هر بار به مدت ۲۰ ثانیه در محلول اسید تانیک قرار گرفتند (Horváth, *et al*., 2007). پس از رفع چسبندگی، جهت تفریخ، تخم‌ها به انکوباتور منتقل شدند. جهت انکوباسیون تخم‌های لقاح یافته تحقیق حاضر، ۲۴ انکوباتور با ظرفیت ۲ لیتر و قطر ۹ سانتیمتر طراحی و ساخته شد. دبی آب در انکوباتورهای مذکور بطور میانگین (± انحراف معیار) ۳۸/۴۴±۵۴۳/۳۳ سی‌سی در دقیقه بود.

جدول ۱: خلاصه تیمارهای مورد استفاده برای القاء هورمونی مولدین نر در ماهی بنی

ردیف	تیمارهای متفاوت هورمونی	منبع
۱	۲/۵ میکروگرم در کیلوگرم وزن بدن LHRHA2	Caille *et al*., 2006
۲	۵ میکروگرم در کیلوگرم وزن بدن LHRHA2	Caille *et al*., 2006
۳	۱۰ میکروگرم در کیلوگرم وزن بدن LHRHA2	Caille *et al*., 2006
٤	۲/۵ میکروگرم در کیلوگرم وزن بدن LHRHA2 به اضافه ۲/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم متوکلوپرامید	Horváth *et al*., 2007, Caille *et al*., 2006
۵	۵ میکروگرم در کیلوگرم وزن بدن LHRHA2 به اضافه ۲/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم متوکلوپرامید	Horváth *et al*., 2007, Caille *et al*., 2006
٦	۱۰ میکروگرم در کیلوگرم وزن بدن LHRHA2 به اضافه ۲/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم متوکلوپرامید	Horváth *et al*., 2007, Caille *et al*., 2006
۷	گروه کنترل مثبت: ۲ میلی گرم در کیلوگرم عصاره غده هیپوفیز	Farahi & Sudagar, 2011
۸	Sham: سرم فیزیولوژی	Farahi & Sudagar, 2011

در تحقیق حاضر، بازماندگی انکوباسیون (Linhart *et al.*, 2008)، میزان تفریخ تخم‌ها (Caille *et al.*, 2006; Ottesen & Babiak, 2007) و درصد بدشکلی لاروها (Krejai & Palikova, 2006) از طریق معادلات ۱، ۲ و ۳ ارزیابی شدند.

معادله (۱)

بازماندگی انکوباسیون(درصد) = تعداد کل تخم‌های برداشته شده - (تعداد کل تخم‌های برداشته شده/ تعداد تخم‌های تلف) × ۱۰۰

معادله (۲)

میزان تفریخ (درصد) = تعداد کل لاروهای تفریخ شده / تعداد کل تخم‌های قرار گرفته در انکوباتور × ۱۰۰

معادله (۳)

میزان بدشکلی (درصد) = تعداد کل لاروهای بد شکل / تعداد کل لاروها × ۱۰۰

سنجش پارامترهای تحرک اسپرم در نمونه های مورد بررسی از روش Bozkurt و همکاران (۲۰۰۶) و Alavi و همکاران (۲۰۰۹a) استفاده شد و در این خصوص پس از قرار دادن یک قطره اسپرم بر روی لام، یک قطره آب برای رقیق‌سازی و آغاز تحرک اضافه شد و مدت زمان تحرک کل با استفاده از میکروسکوپ تا متوقف شدن حرکت موجی شکل و همچنین توقف ۹۵ و ۹۹ درصد سلولهای اسپرماتوزوآ ارزیابی گردید.

به منظور محاسبه میزان اسپرماتوکریت از اسپرم انفرادی مولدین نر نمونه‌برداری انجام شد (Hatef *et al.*, 2007) و سپس بوسیله دستگاه سانتریفیوژ میکروهماتوکریت مدل Behdad HAEMATOKRIT به مدت ۵ دقیقه و با دور ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ شد (Verma *et al.*, 2009; Alavi *et al.*, 2009b). سپس میزان اسپرماتوکریت هر نمونه بوسیله خط کش مخصوص مشخص گردید.

برای جداسازی پلاسمای منی از سلول‌های اسپرماتوزوآ توسط دستگاه میکروسانتریفیوژ مدل Spectrafuge 16 M Labnet و براساس روش (Alavi *et al.*, 2009b) انجام شد و در این خصوص اسپرم استحصالی از مولدین نر ابتدا با دور ۳۰۰۰ و به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس با جداسازی مایع منی، سانتریفیوژ مجدد آن با دور ۱۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و سپس میزان مواد معدنی، آلی و آنزیمی پلاسمای منی توسط دستگاه یورولایزر و فلیم فتومتر ارزیابی شد (Bozkurt *et al.*, 2006; Bozkurt *et al.*, 2009).

سنجش فشار اسمزی محلول‌های مورد بررسی با استفاده از دستگاه اسمومتر OSMOMAT 030 مدل MOMATOS 030 ساخت کشور ژاپن صورت گرفت (Wilson-Leedy *et al.*, 2009; Alavi *et al.*, 2009a) و بدین منظور پس از تنظیم دستگاه اسمومتر در فشار اسمزی صفر با استفاده از آب مقطر و فشار اسمزی ۳۰۰ میلی اسمول بر کیلوگرم با استفاده از محلول استاندارد، مقدار ۱۵ میکرولیتر از هر نمونه در ۳ تکرار در اپندروف ۰/۵ میلی‌لیتری قرار داده شده و پس از قرار دادن آن بر روی سنسور دستگاه اسمومتر، فشار اسمزی در نمونه‌ها سنجش شد.

اطلاعات جمع‌آوری شده از بررسی‌ها و مطالعات میدانی و آزمایشگاهی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در ابتدا تائید نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون کولموگراف- اسمیرنوف صورت گرفت. برای سنجش اثر تیمارهای متفاوت هورمونی بر پارامترهای کیفی و لقاحی اسپرماتوزوآ، فشار اسمزی و ترکیبات بیوشیمیایی پلاسمای منی ماهی بنی از آنالیز واریانس یکطرفه استفاده شد. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۹۵ درصد استفاده گردید. جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۰۳ استفاده شد.

نتایج

نتایج نشان داد که بالاترین دوره تحرک اسپرماتوزآ مربوط به مولدین تزریق شده با تیمار هورمونی ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید بود. همچنین تیمارهای هیپوفیز و ۲/۵ میکروگرم بر کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید با هم اختلاف آماری نداشته و در سطح بعدی قرار گرفتند ($P \geq ۰/۰۵$). پائین ترین دوره تحرک اسپرماتوزوآ مربوط به مولدین نر تزریق شده با تیمارهای هورمونی ۲/۵، ۵ و ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم LHRHA2 بود که هر سه تیمار یاد شده با یکدیگر اختلاف نداشتند ولی دارای اختلاف معنی‌دار آماری با سایر گروههای مورد مطالعه بودند ($P \leq 0.05$). همچنین بالاترین دوره تحرک موجی شکل اسپرماتوزوآها مربوط به تیمار هورمونی ۵ میکروگرم بر کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید بود که تیمار یاد شده، اختلاف معنی‌دار آماری را با تیمار ۲/۵ میکروگرم بر کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید نداشت ولی با سایر گروههای

دیگر، دارای اختلاف معنی‌دار آماری بود (P≤0.05). کمترین طول دوره تحرک موجی شکل اسپرماتوزوآها نبز مربوط به تیمار ۲/۵ میکروگرم بر کیلوگرم LHRHA2 بود (P≤0.05) (جدول ۲).

نتایج آزمون دانکن درخصوص اثر آب مقطر بر دوره تحرک کل اسپرماتوزوآی ماهی بنی نشان داد که تیمار ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید، بالاترین دوره تحرک کل اسپرماتوزوآ را نسبت به تیمارهای دیگر ایجاد نموده است و تیمار یاد شده، با تیمارهای هورمونی عصاره غده هیپوفیز و ۲/۵ میکروگرم بر کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید، تفاوت معنی‌دار آماری را نشان نداد، ولی با سایر تیمارهای هورمونی مورد تحقیق دارای اختلاف معنی‌دار آماری بود (P≤0.05). کمترین طول دوره تحرک اسپرماتوزوآی ثبت شده در تیمارهای هورمونی ۲/۵ و ۵ میکروگرم بر کیلوگرم LHRHA2 و ۵ میکروگرم بر کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید مشاهده شد که هر سه تیمار یاد شده، اختلاف معنی‌دار آماری را با هم نشان ندادند (جدول ۲).

بررسی نتایج حاصل از اثر آب مقطر بر طول دوره تحرک موجی شکل اسپرماتوزوآی ماهی بنی مشخص نمود که تیمارهای هورمونی ۲/۵ و ۵ میکروگرم بر کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید، بالاترین طول دوره تحرک موجی شکل اسپرماتوزوآ را در ماهی بنی سبب شد و تیمارهای یاد شده فوق با تیمارهای ۲/۵ و ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم LHRHA2 دارای اختلاف معنی‌دار آماری بود (P≤0.05). همچنین قابل ذکر است که تیمارهای هورمونی ۲/۵ و ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم LHRHA2، دارای اختلاف معنی‌دار آماری با هم نبودند و کمترین طول دوره تحرک موجی شکل را در بین سایر تیمارهای مورد آزمایش سبب شدند (جدول ۲).

مولدین نر تزریق شده با هیپوفیز، بالاترین میزان اسپرماتوکریت را دارا بودند که با مولدین تزریق شده با ۲/۵ و ۵ میکروگرم بر کیلوگرم LHRHA2 واجد اختلاف معنی‌دار آماری بودند (P≤0.05). همچنین نتایج نشان داد کمترین سطح اسپرماتوکریت، مربوط به مولدین تزریق شده با ۵ میکروگرم بر کیلوگرم LHRHA2 بوده است که با دیگر تیمارهای مورد بررسی اختلاف آماری داشت. بالاترین حجم اسپرم تولید شده در ارتباط با مولدین تزریق شده با تیمار ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید بود که تیمار یاد شده با تیمارهای ۲/۵ و ۵ میکروگرم بر کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید، اختلاف معنی‌داری را نشان نداد، ولی با سایر تیمارهای هورمونی دارای اختلاف معنی‌دار آماری بود (P≤0.05). همچنین نتایج نشان دادند که کمترین حجم اسپرم تولید شده نیز مربوط به مولدین نر تزریق شده با ۲/۵ میکروگرم بر کیلوگرم LHRHA2 بود (جدول ۲).

نتایج حاصل از آزمون چند دامنه‌ای دانکن درخصوص بازماندگی انکوباسیون تخم‌های ماهی بنی نشان داد، بالاترین بازماندگی انکوباسیون مربوط به تیمار ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید بود که با تیمار ۵ میکروگرم بر کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید، اختلاف آماری نداشت، ولی در سطح ۹۵ درصد با دیگر تیمارهای مورد مطالعه، واجد اختلاف معنی‌دار آماری بود (P≤۰/۰۵). همچنین نتایج نشان دادند که مولدینی که توسط هیپوفیز تزریق شده بودند با مولدین تیمار ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم LHRHA2 اختلاف معنی‌دار آماری نداشتند. پائین‌ترین بازماندگی انکوباسیون با تزریق ۲/۵ میکروگرم بر کیلوگرم LHRHA2، ۵ میکروگرم بر کیلوگرم LHRHA2 و ۲/۵ میکروگرم بر کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید حاصل شد که سه تیمار یاد شده کمترین بازماندگی انکوباسیون را داشته و با یکدیگر اختلاف معنی‌داری را از لحاظ آماری نشان ندادند (P≤0.05) (نمودار ۱).

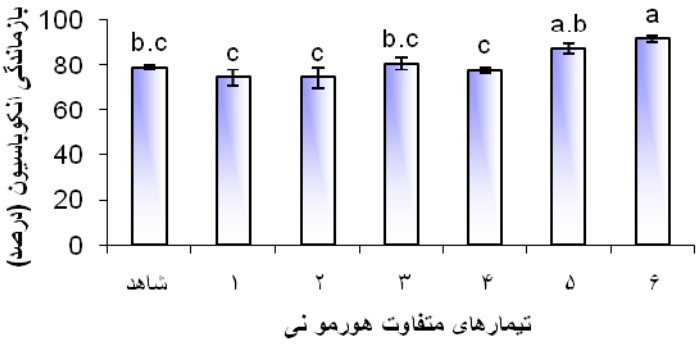
در مقایسه با تیمارهای متفاوت هورمونی تحقیق حاضر، درصد تخم‌گشایی مولدین تزریق شده با ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید، بالاترین میزان بوده و با تیمار ۵ میکروگرم در کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید، اختلاف آماری نشان نداد، ولی دارای اختلاف معنی‌دار آماری با سایر گروههای مورد مطالعه بود (P≤0.05). نتایج نشان دادند که میزان تخم‌گشایی در تیمارهای هورمونی عصاره غده هیپوفیز، ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم LHRHA2 و ۲/۵ میکروگرم در کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید اختلاف معنی‌داری را با هم نشان ندادند. همچنین پایین‌ترین میزان تخم‌گشایی، مربوط به تیمارهای هورمونی ۲/۵ و ۵ میکروگرم در کیلوگرم LHRHA2 بود که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری را با هم نشان ندادند (P≤ 0.05) (نمودار ۲).

بالاترین میزان بدشکلی مربوط بـه مولـدین تزریـق شـده بـا عصاره غـده هیپـوفیز بـود. همچنـین کمتـرین میـزان بدشـکلی لاروهای حاصله مربوط به مولدین نر تزریق شـده بـا تیمـار ۲/۵ میکروگرم در کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید بود که اختلاف معنی داری را با تیمارهـای عصـاره غـده هیپـوفیز و ۱۰ میکروگـرم در کیلـوگرم LHRHA2 نشـان داد، ولـی بـا سـایر تیمارهای مورد مطالعه، اختلاف معنی دار آمـاری را نشـان نـداد ($P\leq 0.05$) (نمودار ۳).

جدول ۲: اثر تیمارهای متفاوت هورمونی پارامترهای کیفی و لقاحی اسپرماتوزوآی ماهی بنی

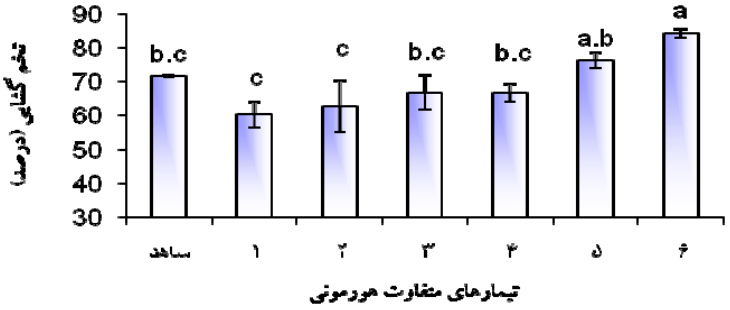
	هیپوفیز (۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	LHRHA2			LHRHA2 + ۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم متوکلوپرامید		
		۲/۵ (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۵ (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۱۰ (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۲/۵ (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۵ (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۱۰ (میلی‌گرم بر کیلوگرم)
تحرک کل اسپرماتوزوآ با آب کارگاه (ثانیه)	٦٠/٦٦±٠/٦٦ b	٤٩±٤/٥٨ c	٥٠±٥/٧٧ c	٤٩/٣٣±٣/٤٨ c	٦١±١/٥٢ b	٥٥/٣٣±١/٨٥ b.c	٧١/٣٣±٠/٨٨ a
تحرک موجی شکل اسپرماتوزوآ با آب کارگاه (ثانیه)	١٨/٦٦±٢/٠٨ bc	١٣/٦٦±٣/٢٨ c	٢٢±٢/٦٤ b.c	١٧±٣/٠٥ b.c	٢٦/٣٣±٣/٢٨ a.b	٣٣±٣/٥١ a	٢١±٢/٠٨ b.c
تحرک کل اسپرماتوزوآ با آب مقطر (ثانیه)	٥٥/٦٦±٠/٦٦ a.b	٤١/٦٦±٤/٤ c	٤٤±٣/٢١ c	٤٨/٦٦±٥/٢ b.c	٥٤/٣٣±٢/٩٦ a.b	٤٢±١/٥٢ c	٦١/٦٦±١/٦٦ a
تحرک موجی شکل اسپرماتوزوآ با آب مقطر (ثانیه)	١٤/٣٣±٣/٤٨ a.b	٨/٦٦±١/٢ b	١٤±١/٧٣ a.b	١١±٢/٠٨ b	١٨/٣٣±٠/٨٨ a	١٩/٦٦±٢/١٨ a	١٤/٦٦±٢/٧٢ a.b
اسپرماتوکریت (درصد)	٥٩/٣٣±٢/٩٦ a	٤٥/٦٦±٤/٠٥ b.c	٤٠±٢/٨٨ c	٤٩±٢/٥١ a.b.c	٤٩/٦٦±٣/٥٢ a.b.c	٥٠±٢/٠٨ a.b.c	٥٥/٦٦±٣/٤٨ a.b
حجم اسپرم (میلی لیتر)	٢/١٣±٠/٢٧ b.c	١/١٦±٠/٠٣ c	١/٦٨±٠/١٤ b.c	١/٧٨±٠/٢٢ b.c	٢/٣٦±٠/٣٨ a.b	٢/٧٦±٠/٦٦ a.b	٣/٣٥±٠/٣٤ a

حروف غیرمشابه در یک ردیف نشان‌دهندی اختلاف معنی‌دار می باشد ($P<0.05$).



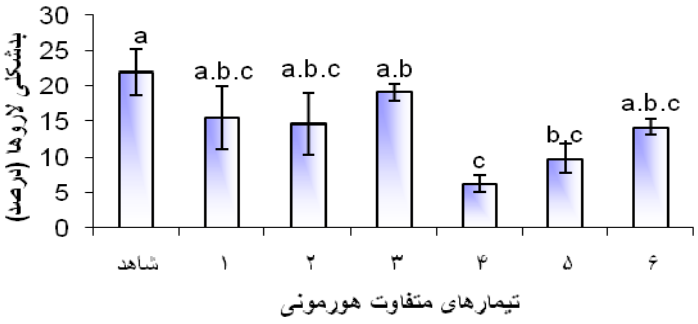
نمودار ۱: اثر تیمارهای متفاوت هورمونی بر میزان بازماندگی انکوباسیون ماهی بنی

گروه شاهد (عصاره غده هیپوفیز)، ۱-٦ تیمارهای هورمون **LHRHA2** شامل: ۱) ۲/۵ میکروگرم در کیلوگرم ۲) ۵ میکروگرم در کیلوگرم ۳) ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم ٤) ۲/۵ میکروگرم در کیلوگرم + متوکلوپرامید ۵) میکروگرم در کیلوگرم + متوکلوپرامید ٦) ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم + متوکلوپرامید



نمودار ۲: اثر تیمارهای متفاوت هورمونی بر میزان تخم گشایی ماهی بنی

گروه شاهد (عصاره غده هیپوفیز)، ۱-٦ تیمارهای هورمون **LHRHA2** شامل: ۱) ۲/۵ میکروگرم در کیلوگرم ۲) ۵ میکروگرم در کیلوگرم ۳) ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم ٤) ۲/۵ میکروگرم در کیلوگرم + متوکلوپرامید ۵) ۵ میکروگرم در کیلوگرم + متوکلوپرامید ٦) ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم+ متوکلوپرامید



نمودار ۳: اثر تیمارهای متفاوت هورمونی بر میزان بدشکلی لاروهای ماهی بنی

گروه شاهد (عصاره غده هیپوفیز) ،۱-٦ تیمارهای هورمون **LHRHA2** شامل: ۱) ۲/۵ میکروگرم در کیلوگرم ۲) ۵ میکروگرم در کیلوگرم ۳) ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم ٤) ۲/۵ میکروگرم در کیلوگرم+ متوکلوپرامید ۵) ۵ میکروگرم در کیلوگرم+ متوکلوپرامید ٦) ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم + متوکلوپرامید

نتایج نشان داد که بالاترین میزان سدیم پلاسمای منی در تیمارهای هورمونی ۵ و ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید حاصل شده است که تیمارهای یاد شده، اختلاف معنی‌دار آماری را با تیمار ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم LHRHA2 نشان ندادند، ولی با سایر تیمارهای مورد مطالعه، دارای اختلاف معنی داری آماری بودند ($P\leq0.05$). همچنین بررسی نتایج نشان داد که کمترین سطح سدیم پلاسمای منی، درخصوص ماهیان نر تزریق شده با عصاره غده هیپوفیز بود (جدول ۳).

نتایج آزمون دانکن نشان داد که تیمارهای هورمونی مورد مطالعه، اختلاف معنی‌داری را از لحاظ آماری درخصوص سطح پتاسیم پلاسمای منی ایجاد نکردند (جدول ۳).

بالاترین نسبت سدیم به پتاسیم در تیمارهای هورمونی ۵ و ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید حاصل شده است که اختلاف معنی‌داری را با مولدین نر تزریق شده با ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم LHRHA2 نشان ندادند، ولی با سایر تیمارهای مورد بررسی دارای اختلاف معنی‌دار آماری بودند ($P\leq0.05$). همچنین بین تیمارهای ۲/۵ میکروگرم در کیلوگرم LHRHA2 و تیمار ۲/۵ میکروگرم در کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید اختلاف معنی‌داری از لحاظ نسبت سدیم به پتاسیم دیده نشد. همچنین پائین‌ترین نسبت سدیم به پتاسیم در مولدین تزریق شده با عصاره غده هیپوفیز حاصل شده است (جدول ۳).

بالاترین سطح سدیم به کلسیم مربوط به مولدین تزریق شده با تیمار هورمونی ۵ میکروگرم در کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید بود که تیمار یاد شده، اختلاف معنی‌داری را با دو تیمار هورمونی ۲/۵ و ۱۰ میکروگرم در کیلوگرمLHRHA2 نشان نداد، ولی با سایر گروههای مورد بررسی دارای اختلاف معنی‌دار آماری بود ($P\leq0.05$). همچنین نتایج تحقیق حاضر نشان داد که کمترین سطح سدیم به کلسیم ارزیابی شده در مولدین تزریق شده با عصاره غده هیپوفیز بدست آمده است (جدول ۳).

بیشترین میزان کلسیم، در مولدین نر تزریق شده با دو تیمار هورمونی عصاره غده هیپوفیز و ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید دیده شد که دو تیمار یاد شده دارای اختلاف معنی‌دار آماری با تیمارهای هورمونی ۲/۵ و ۵ میکروگرم درکیلوگرم LHRHA2 و ۵ میکروگرم در کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید بود ($P\leq0.05$). کمترین سطح کلسیم محاسبه شده، در پلاسمای منی مولدین تزریق شده با ۲/۵ میکروگرم در کیلوگرم LHRHA2 ارزیابی شده است (جدول ۳).

بیشترین میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز، در مولدین نر تزریق شده با ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید دیده شد که این تیمار با گروه مولدین تزریق شده با ۵ میکروگرم در کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید، اختلاف معنی‌دار آماری نداشت، اما با سایر تیمارهای مورد بررسی، دارای اختلاف معنی‌داری آماری بود ($P\leq0.05$). همچنین نتایج نشان داد که کمترین سطح آنزیم آلکالین فسفاتاز برآورد شده در تیمارهای مورد مطالعه، در خصوص مولدین تزریق شده با عصاره غده هیپوفیز بوده است. مشاهده نتایج آزمون دانکن درخصوص میزان گلوکز پلاسمای منی نشان داد که اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری در میان تیمارهای مورد بررسی وجود ندارد (جدول ۳).

بالاترین میزان تری گلیسرید پلاسمای منی در تیمارهای عصاره غده هیپوفیز، ۲/۵ میکروگرم در کیلوگرم LHRHA2، ۵ و ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید ارزیابی شده است که اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری بین تیمارهای یاد شده وجود نداشت، ولی دارای اختلاف آماری با مولدین تزریق شده با ۵ میکروگرم بر کیلوگرم LHRHA2 بودند ($P\leq0.05$). همچنین نتایج نشان داد که کمترین سطح تری گلیسرید پلاسمای منی در مولدین تزریق شده با ۵ میکروگرم در کیلوگرم LHRHA2 ارزیابی شده است (جدول ۳).

بیشترین فشار اسمزی پلاسمای منی نیز در مولدین تزریق شده با و ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید دیده شده است که دارای اختلاف معنی دار آماری با سایر گروههای مورد بررسی بود ($P\leq0.05$). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که کمترین سطح فشار اسمزی ارزیابی شده در پلاسمای منی مولدین نر در خصوص مولدین نر تزریق شده با ۲/۵ میکروگرم در کیلوگرم LHRHA2 بوده است (جدول ۳).

جدول ۳: اثر تیمارهای متفاوت هورمونی بر ترکیبات بیوشیمیایی پلاسمای منی در ماهی بنی

	هیپوفیز (۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	LHRHA2			LHRHA2 + ۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم متوکلوپرامید		
		۲/۵ میکروگرم بر کیلوگرم	۵ میکروگرم بر کیلوگرم	۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم	۲/۵ میکروگرم بر کیلوگرم	۵ میکروگرم بر کیلوگرم	۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم
سدیم (میلی‌مول بر لیتر)	٦٥/٣٣±٧/٣١ c	٧٦/٦٦±٤/٤ b.c	٧٣±٢/٥١ b.c	٨٦±٣/٠٥ a.b	٧٨/٣٣±٣/٣٣ b.c	٩٤±٢/٦٤ a	٩٨/٣٣±٤/٤٠ a
پتاسیم (میلی‌مول بر لیتر)	٣٢/٩±١/٠٥ a	٣٠/٥٣±٠/١٢ a	٣١/٤٠±٠/٣٠ a	٣١/٧٣±٠/١٤ a	٣٠/٠٦±١/١٥ a	٣٠/٠٦±٠/٢٥ a	٣١/٥٠±٠/٦٥ a
سدیم/ پتاسیم (میلی‌مول بر لیتر)	١/٩٨±٠/٢١ c	٢/٥١±٠/١٥ b	٢/٣٢±٠/٠٩ b.c	٢/٧١±٠/١٠ a.b	٢/٦١±٠/١٣ b	٣/٠٧±٠/١١ a	٣/١٢±٠/١٣ a
سدیم/ کلسیم (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	١/٥٧±٠/٢ d	٢/٦٧±٠/١٢ a.b	٢/٠٩±٠/٠٣ b.c.d	٢/٣٦±٠/٣١ a.b.c	١/٩٦±٠/٠٧ c.d	٢/٩٣±٠/٠٧ a	٢/٢٥±٠/٢٣ b.c
کلسیم (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	٩/٢٠±٠/٤١ a	٦/٣٠±٠/١٥ d	٧/٦٦±٠/١٢ b.c.d	٨/٢٣±٠/٨٧ a.b.c	٨/٧٦±٠/٢٣ a.b	٧/٠٦±٠/٢٦ c.d	٩/٧٠±٠/٦٠ a
آلکالین فسفاتاز (واحد بین‌المللی بر لیتر)	٢٣/٤٠±١/٤٠ c	٦٠±٢٠/٨١ b.c	٤٣/٢٠±١٥/٩٧ b.c	٤٠/٧٦±٢/١١ b.c	٤٣/٤٣±١٥/٢٩ b.c	١١٩/٢٣±١٦/٠٨ a.b	١٧٠/٤٠±٥٦/٠٥ a
گلوکز (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	٦/٨٣±٠/٧٣ a	٥/٥٠±٠/١٧ a	٥/٨٠±٠/١٥ a	٥/٩٦±٠/٣٧ a	٧/٥٣±١/٥٣ a	٧/٤٠±١/٩٥ a	٥/٨٦±٠/٢٩ a
تری‌گلیسرید (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	٦٦/٨٣±٠/٥٢ a	٦٨/٦٣±٠/٥٢ a	٦٢/٨٣±١/٥٦ b	٦٥/٦٦±٠/٨٨ a.b	٦٥/٧٣±١/٢٦ a.b	٦٨/٣٠±١/٧٦ a	٦٨±٠/٦٤ a
فشار اسمزی (میلی اسمول بر کیلوگرم)	٢٨٤/٣٣±٦/٢٢ c.d	٢٨١/٣٣±٤/٩١ d	٢٨٤/٣٣±٤/٤٨ c.d	٣٠٠/٦٧±٢/٩٦ b.c	٢٩١/٣٣±٣/٨٤ b.c.d	٣٠٤/٣٣±٤/٣٣ b	٣٢٤/٣٣±٧/٣١ a

حروف غیرمشابه در یک ردیف نشان‌دهندی اختلاف معنی‌دار می باشد ($P<0.05$).

بحث

تاکنون، اطلاعاتی درخصوص تاثیر غلظت‌های متفاوت هورمونی بر پارامترهای کیفی و لقاحی اسپرماتوزوآ و همچنین تاثیر بر ترکیبات بیوشیمیایی پلاسمای منی در ماهی بنی منتشر نشده است. تحقیق حاضر نخستین گزارش درخصوص تاثیر غلظت‌های متفاوت هورمون LHRHA2 و آنتی دوپامین متوکلوپرامید بر پارامترهای کیفی، لقاحی و ترکیبات بیوشیمیایی اسپرم ماهی بنی می‌باشد و اطلاعات مفیدی را در تکمیل دانش لقاح مصنوعی این گونه ارائه می‌دهد.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تزریق ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم LHRHA2 به اضافه ۲/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم متوکلوپرامید بطور معنی‌داری بازماندگی انکوباسیون و تخم گشایی را نسبت به مولدین تزریق شده با هیپوفیز افزایش داده است. Rodina و همکاران (۲۰۰۴) میزان لقاح و تخم‌گشایی حاصل از مولدین نر لای ماهی تزریق شده با هیپوفیز را در حدود ۴۰ درصد گزارش کردند. همچنین Hashim و همکاران (۲۰۰۶) عنوان نمودند که تزریق هورمون Ovaprim به مولدین نر ماهی بنی در مقایسه با عصاره غده هیپوفیز بسیار کارآمدتر است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تزریق ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید در مقایسه با عصاره غده هیپوفیز بر مولدین نر ماهی بنی کارآمدتر بوده است. طول دوره تحرک اسپرم مولدین تزریق شده با ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید بالاتر از سایر گروه‌های مورد مطالعه بوده است. بالاتر تر بودن طول دوره تحرک اسپرم نیز می‌تواند شانس انجام لقاح را افزایش دهد (لرستانی و همکاران، ۱۳۸۷). بدین ترتیب، یکی از دلایل بالاتر بودن بازماندگی انکوباسیون و میزان تخم‌گشایی در تیمار ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید را می‌توان، بالاتر بودن طول دوره تحرک اسپرم حاصل از آن دانست.

Brzuska (۲۰۰۳) گزارش کرد که تزریق هورمون‌های ساخته شده (مصنوعی) سبب افزایش درصد بدشکلی در لاروها می‌شود. در این خصوص یافته‌های پژوهش حاضر نشان داده است که تزریق عصاره غده هیپوفیز و غلظت‌های بالای هورمون LHRHA2 افزایش سطح بدشکلی لاروهای ماهی بنی را در پی داشته است. در این خصوص، بنظر می‌رسد که بکارگیری متوکلوپرامید، سطح بد شکلی لاروهای ماهی بنی را تا حدودی نسبت به تیمارهای فاقد آنتی دوپامین، کاهش داده است. شاید وجود آنتی دوپامین، سیکل منظم‌تری را از فرآیند اسپرماتوژنز القاء کرده باشد که تیمارهای فاقد متوکلوپرامید، این اثر را نداشته باشند.

محققین متفاوت عنوان نمودند که تزریق هورمون و غلظت‌های متفاوت آن به مولدین، می‌تواند حجم اسپرم، درصد سلول‌های متحرک اسپرماتوزوآ (Lihart *et al.*, 2000; Caille *et al.*, 2006; Mylonas *et al.*, 2010; Cejko *et al.*, 2011)، تعداد سلول‌های اسپرماتوزوآ در واحد حجم (Caille *et al.*, 2006; Cejko *et al.*, 2010)، فشار اسمزی پلاسمای منی (Lin *et al.*, 1996)، سرعت، تحرک و همچنین قابلیت لقاحی آن برای تخمک‌ها، را تحت تاثیر قرار دهد (Caille *et al.*, 2006). همچنین Park و همکاران (۲۰۰۲) عنوان کردند استفاده از آنالوگ‌های LHRH بر اسپرمیشن ماهیان تاثیر گذار است و تزریق ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم آن سبب افزایش تولید اسپرم در ماهی کپور معمولی شده است. در این بررسی نیز تیمار هورمونی ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم LHRHA2 به اضافه ۲/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم متوکلوپرامید بالاترین حجم اسپرم را در مقایسه با سایر گروه‌های دیگر تولید نموده است. در این خصوص Lin و همکاران (۱۹۹۶) عنوان نمود که تیمارهای متفاوت هورمونی تفاوتهای زیادی را از لحاظ حجم اسپرم، فشار اسمزی پلاسمای منی و تحرک در ماهیان ایجاد می‌کنند که نتایج حاصل از تحقیق حاضر نیز این امر را تائید می‌نماید.

از سوی دیگر سطوح سدیم و پتاسیم در پلاسمای منی ماهی بنی بالا ارزیابی گردید که احتمالا نقش مهار کنندگی تحرک اسپرماتوزوآ را از طریق فشار اسمزی ایفا می‌نمایند. فشار اسمزی پلاسمای منی نقش مهمی را در تحرک اسپرماتوزوآ بر عهده داشته و در توسعه رقیق کننده‌های اسپرم در ماهیان، جهت عدم فعالیت اسپرماتوزوآ نقش کلیدی را ایفا می‌نماید (Verma *et al.*, 2009). بطور معمول اسپرم رقیق نشده ماهیان در محدوده ۲۷۰ تا ۳۰۰ میلی اسمول در کیلوگرم غیر فعال است. Alavi و همکاران (۲۰۱۰) میزان سدیم، پتاسیم، کلسیم، گلوکز و فشار اسمزی پلاسمای منی ماهی بنی را در مولدین تزریق شده با ۳ تا ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم هیپوفیز بترتیب معادل ۳/۴±۷۰، ۰/۹±۲۸/۸، ۰/۱±۲/۱، ۴/۳±۷۶/۷ میلی‌مول در لیتر و ۹±۲۷۴/۵ میلی‌اسمول در کیلوگرم ارزیابی کرد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که میزان فشار اسمزی

پلاسمای منی مولدین تزریق شده با ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم هیپوفیز منطبق با نتایج حاصل از تحقیق Alavi و همکاران (۲۰۱۰) است، ولی در مولدین تزریق شده با تیمارهای متفاوت LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید و همچنین تیمار ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم LHRHA2، سطح فشار اسمزی نسبت به هیپوفیز افزایش یافته، بطوریکه مقادیر بالاتر LHRHA2 سبب افزایش فشار اسمزی پلاسمای منی شدند که این افزایش در ارتباط نزدیک با سطح سدیم پلاسمای منی بود. مشاهدات میکروسکوپی سلولهای اسپرماتوزوئید در طی تحقیق حاضر نشان داد که در تیمارهای با مقدار تزریق بالاتر، برخی از سلولهای اسپرماتوزوآ متورم تر شده‌اند. از جمله دلایل احتمالی افزایش فشار اسمزی در تیمارهای با مقدار تزریق بالا، می‌توان به ترکیدن بعضی از سلولهای اسپرم در حین سانتریفیوژ و انتشار یون‌های داخل سلولی آنها به درون پلاسمای منی اشاره نمود که نتیجه آن افزایش فشار اسمزی پلاسمای منی خواهد بود. بنابراین علت افزایش درصد اسپرماتوکریت تیمار ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید در مقایسه با تیمارهای دیگر هورمون LHRHA2، ممکن است متورم شدن ناحیه سر برخی سلولهای اسپرماتوزوآ باشد.

Morisawa (۱۹۸۵) عنوان کرد میزان سدیم و پتاسیم در پلاسمای منی ماهیان استخوانی بترتیب معادل ۷۵ تا ۱۷۵ و ۳۲ تا ۸۶ میلی مول در لیتر است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که مشابه سایر کپور ماهیان، سدیم و پتاسیم، عمده یون‌های موجود در پلاسمای منی ماهی بنی می‌باشد. پایین‌ترین سطح سدیم پلاسمای منی با میزان میانگین (± انحراف معیار) ۷/۳۱±۶۵/۳۳ میلی مول در لیتر، در مولدین تزریق شده با ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم هیپوفیز پس از ۸ ساعت از القاء هورمونی ارزیابی شد و بالاترین میزان آن در مولدین تزریق شده با ۱۰ میکرو گرم در کیلوگرم LHRHA2 به اضافه ۲/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم متوکلوپرامید محاسبه شد. در تیمارهای متفاوت هورمونی تحقیق حاضر، میزان سدیم پلاسمای منی ماهی بنی، پایین‌تر از میزان سنجش شده در سوف (۱۲۴ میلی‌مول در لیتر، Lahnsteiner *et al*., 1995) و گربه ماهی (۱۶۴ میلی‌مول در لیتر، Tan-Fermin *et al*., 1999) و بالاتر از ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (۴۶/۲۱، Bozkurt *et al*., 2011) بوده است. غلظت یون پتاسیم پلاسمای منی در کپور ماهیان متفاوت بوده و از ۱/۹۳ میلی‌مول بر لیتر در لای ماهی (Linhart *et al*., 2003) تا ۹۸ میلی‌مول بر لیتر در *Barbus Barbus* (Psenicka *et al*., 2008; Alavi *et al*., 2009b) متغیر می‌باشد. بعلاوه سطح پتاسیم پلاسمای منی در ماهی بنی بیشتر از سوف ماهی (۱۰ میلی‌مول بر لیتر، Lahnsteiner *et al*., 1995) و گربه ماهی (۱۸ میلی مول بر لیتر، Tan-Fermin *et al*., 1999) و کمتر از قزل‌آلای رنگین کمان (۴۶ میلی‌مول بر لیتر، Bozkurt *et al*., 2011) و کپور معمولی (۷۰ میلی مول بر لیتر، Morisawa *et al*., 1983) می‌باشد. همچنین سطوح پتاسیم پلاسمای منی ماهی بنی در تحقیق حاضر مشابه نتایج Alavi و همکاران (۲۰۱۰) است.

اگرچه بالا بودن مقادیر آنزیم آلکالین فسفاتاز پلاسمای منی (بیش از ۱۰ واحد بین‌المللی در لیتر) می‌تواند بعنوان شاخص حضور مدفوع در نمونه و در نتیجه میزان آلودگی اسپرم مورد استفاده قرار گیرد (Ciereszko & Dabrowski, 1994; Lahnsteiner *et al*., 1996)، اما براساس نتایج تحقیق حاضر بالاترین سطح آنزیم آلکالین فسفاتاز در بالاترین مقدار تزریقی هورمون LHRHA2 به اضافه متوکلوپرامید حاصل گردید در حالی که تیمار اخیر واجد بالاترین دوره تحرک اسپرم و میزان لقاح نیز بوده است. لذا تحقیق حاضر نشان داد که در ماهی بنی بالا بودن آنزیم آلکالین فسفاتاز، دلیل افت کیفیت اسپرم و کسب لقاح پایین محسوب نمی‌شود.

حضور گلوکز در پلاسمای منی در ارتباط با نیاز بالای انرژی بیضه طی اسپرماتوژنزیز و یا سنتز لیپید در اسپرماتوزآ می‌باشد (Bozkurt *et al*., 2006) و همچنین نقش حفاظتی غشاء اسپرماتوزوآ را بر عهده دارد (Verma *et al*., 2009).

میزان تری گلیسرید پلاسمای منی انرژی اسپرماتوزوئیدها را در دوره قبل از تحرک مشخص می‌نماید که مقادیر کم تری گلیسرید پلاسمای منی، عدم ذخیره کافی انرژی، کاهش تحرک اسپرماتوزوآ و کاهش قابلیت لقاح را می‌تواند در پی داشته باشد (Bozkurt *et al*., 2009). بررسی سطح گلوکز و تری‌گلیسرید پلاسمای منی در تیمارهای متفاوت هورمونی تحقیق حاضر نشان داد که بالاترین میزان بازماندگی انکوباسیون و تخم‌گشایی حاصل شده، منطبق با بالاترین سطح گلوکز و تری گلیسرید نمی‌باشد.

تغییر در پارامترهای بیوشیمیایی پلاسمای منی و فشار اسمزی آن در ارتباط با فصل تکثیر، دفعات اسپرم‌گیری از مولدین و نحوه هومون‌تراپی برای اسپرمیشن است (Alavi *et al*., 2010) که بررسی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تیمارهای متفاوت هورمونی، تغییراتی را در پارامترهای

بیوشیمیایی پلاسمای منی ماهی بنی ایجاد نموده است و در این خصوص براساس مقدار تزریقی و نحوه هورمون‌تراپی، می‌توان به بهترین کیفیت اسپرم دست یافت.

بعنوان جمع‌بندی نهایی می‌توان عنوان نمود که استحصال اسپرم از مولدین نر ماهی بنی در فاصله ۸ ساعت پس از هورمون‌تراپی توسط ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم LHRHA2 به اضافه ۲/۵ میلی‌گرم متوکلوپرامید، مناسبترین کیفیت اسپرم را ایجاد می‌نماید که این تیمار سبب افزایش بازماندگی انکوباسیون و کاهش میزان بدشکلی لاروهای ماهی بنی خواهد شد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از آقای دکتر مغینمی ریاست محترم اداره کل شیلات استان خوزستان و مهندس علی سواری رئیس کارگاه تکثیر و پرورش دشت آزادگان بدلیل فراهم آوردن شرایط لازم برای انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود. بعلاوه از آقای دکتر Brian Coad و مهندس Al-Mukhtar برای راهنمایی‌های علمی تشکر می‌گردد.

منابع

کوهی‌لای، س.؛ عریان، ش. و حسین‌زاده صحافی، ه.، ۱۳۸۹. بررسی تعیین بهترین دوز تزریقی هورمون LHRHa2 و ترکیبات متوکلوپرامید و کلرپرومازین از طریق سنجش GTH II در ماهی سیم ماده *Abramis brama*. مجله منابع طبیعی ایران، دوره ۶۳، شماره ۱، صفحات ۲۹تا ۳۷.

لرستانی، ر.؛ احمدی، م. ر. و احمدی، م. ر. ، ۱۳۸۷. بررسی اثر متقابل سن مولدین نر و محلول های فعال کننده اسپرم بر میزان چشم‌زدگی تخم قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله منابع طبیعی ایران، دوره ۶۳، شماره ۵، صفحات ۳۴۵ تا ۳۵۰.

Al-Mukhtar M.A., Saleh J.H., Jaber A.A. and Hatam A., 2009. Artificial propagation and fingerlings production of *Barbus sharpeyi* (Gunther 1874) in basrah during the spring of 2006. Iraqi Journal of Agriculture, (Special Issue), 14:187-193.

Alavi S.M.H., Rodina M., Viveiros A.T.M., Cosson J., Gela D., Boryshpolets S. and Linhart O., 2009a. Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius* L.). Theriogenology, 72:32-43.

Alavi S.M.H., Rodina M., Policar T. and Linhart O., 2009b. Relationship between semen characteristics and body size in *Barbus barbus* L. (Teleostei: Cyprinidae) and effects of ions and osmolality on sperm motility. Comparative Biochemistry and Physiology, 153:430-437.

Alavi S.M.H., Jorfi E., Hatef A. and Mortazavi S.A.S., 2010. Sperm motility and seminal plasma characteristics in *Barbus sharpeyi* (Gu¨nther, 1874). Aquaculture Research, 41:688-694.

Arabac M., Cagirgan H. and Sari M., 2001. Induction of Spawning in Common Carp (*Cyprinus carpio*) Using LHRHa ([D-Ser (tBu)^{6}, Pro^{9}-NEt]-LHRH) Combined with Haloperidol: Effects of Different Treatment Time and Determination of Latency Period Dependence on Temperature. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1:1-5.

Bobe J. and Labbé C., 2010. Egg and sperm quality in fish. General and Comparative Endocrinology, 165(3):535-548.

Bonnet, E., Fostier, A. and Bobe, J., 2007. Characterization of rainbow trout egg quality: A case study using four different breeding protocols, with emphasis on the incidence of embryonic malformations. Theriogenology, 67:786-794.

Bozkurt Y., Ogrctmen F., Secer F.S. and Ercin U., 2009. Relationship between seminal plasma composition and spermatological parameters in

parameters of milt of ide *Leuciscus idus* L. Aquaculture Research, 41(6): 804–813.

Cejko B., Kowalski R.K., Kucharczyk D., Zarski D., Targonska K. and Glogowski J., 2011. Effect of time after hormonal stimulation on semen quality indicators of common carp, *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes: Cyprinidae). ACTA Ichthyologica et Piscatoria, 41(2):75-80.

Ciereszko A. and Dabrowski K., 1994. Relationship between biochemical constituents of fish semen and fertility: the effect of short-term storage. Fish Physiology and Biochemistry, 12:357-367.

Farahi A. and Sudagar M., 2011. Effects of ovaprim (sGnRH+Dampridon) and Luteotropin Releasing Hormoned-Ala Analog (LRHA2) on artificial reproduction of captive Caspian brown trout *salmo trruta caspius* Kessler, 1870. Journal of Reproduction and Infertility, 2(1):8-12.

Hajirezaee S., Mojazi Amiri B. and Mirvaghefi A., 2010. Fish milt quality and major factors influencing the milt quality parameters: A review. African Journal of Biotechnology, 9:9148-9154.

Hashim Al., Hussain A.N.A., Wazir A.R., Hamid W.A. and Balasem A., 2006. The new eden master plan for integrated water resource management in the marshland areas–Volume **1**, Book 4–Agriculture: Overview of present conditions and current use of the water in the marshland area. Italy-Iraq: New Eden Group, 256P.

Hatef A., Niksirat H., Mojazi Amiri B., Alavi S.M.H. and Karami M., 2007. Sperm density, seminal plasma composition and their scaly carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Animal and Veterinary Advances, 8(12):2745-2749.

Bozkurt Y., Ogretmen F., Kokcu O. and Ercin U., 2011. Relationships between seminal plasma composition and sperm quality parameters of the *Salmo trutta macrostigma* (Dumeril, 1858) semen: with emphasis on sperm motility. Czech Journal of Animal Science, 56(8):355–364.

Bozkurt Y., Secer S., Bukan N., Akcay E. and Tekin N., 2006. Relationship between body condition, sperm quality parameters and fertilization success in rainbow trout (*Salmo trutta fario*) sperm. Pakistan Journal of Biological Sciences, 9:940-944.

Brzuska E., 2003. Artificial propagation of African catfish (*Clarias gariepinus*): differences between reproduction effects after stimulation of ovulation with carp pituitary homogenate or GnRH-a and dopaminerdic inhibitor. Czech Journal of Animal Science, 48:181-190.

Caille N., Rodina M., Kocour M., Gela D., Hans F.M. and Linhart O., 2006. Quantity, motility and fertility of tench *Tinca tinca* (L.) sperm in relation to LHRH analogue and carp pituitary treatments. Aquaculture International, 14:75–87.

Cejko B.I., Kucharczyk D., Targonska K., Kubiak D., Sarosiek B. and Glogowski J., 2008. Quality parameters and selected biochemical markers of ASP, *Aspius Aspius* (L.), semen obtained after hormonal stimulation with ovaprim or ovopel. Archives of Polish Fisheries, 16:179-188.

Cejko B.I., Kowalski R.K., Kucharczyk D., Targońska K., Krejszeff S., Żarski D. and Glogowski J., 2010. Influence of the length of time after hormonal stimulation on selected

physiological relationship in the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). Aquaculture Research, 38:1175-1181.

Horváth A., Miskolczi E., Mihalffy S., Osz K., Szabo K. and Urbanyi B., 2007. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm in 1.2 and 5 ml straws and occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm. Cryobiology, 54:251–257.

Jezierska B., Lugowska K., Witeska M. and Sarnowski P., 2000. Malformation of newly hatched common carp larvae. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities. Available via http://www.ejpau.media.pl/ volume3 /issue2/fisheries/art-01.html.

Jimenez-Linan M., Robin B.S. and King J.C., 1997. Examination of guinea pig luteinizing hormone-releasing hormone gene reveals a unique decapeptide and existence of two transcripts in the brain. Endocrinology, 138:4123–4130.

Kahkesh F.B., Yooneszadeh Feshalami M., Amiri F. and Nickpey M., 2010. Effect of Ovaprim, Ovatide, HCG, LHRH-A2, LHRHA2+CPE and Carp Pituitary in Benni (*Barbus sharpeyi*) Artificial Breeding. Global Veterinaria, 5:209-214.

Krejai R. and Palikova M., 2006. Potassium dichromate as a reference substance for embryonic tests of toxicity in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). ACTA Vet Brno, 75:259–263.

Lahnsteiner F., Berger B., Weismann T. and Patzner R., 1995. Fine structure and motility of spermatozoa and composition of the seminal plasma in the perch. Journal of Fish Biology, 47:492-508.

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 Physiology and Biochemistry, 15:167-179.

Lin F., Ciereszko A. and Dabrowski K., 1996. Sperm production and cryopreservation in muskellunge after carp pituitary extract and human chorionic gonadotropin injection. The Progressive Fish Culturist, 58:32-37.

Linhart O., Alavi S.M.H., Rodina M., Gela D. and Cosson J., 2008. Comparison of sperm velocity, motility and fertilizing ability between firstly and secondly activated spermatozoa of common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Applied Ichthyology, 24: 386-396.

Linhart O., Mims S.D., Boris Gomelsky B., Hiott A.E., Shelton W. L. and Cosson, J., 2003. Ionic composition and osmolality of paddlefish (*Polyodon spathula,* Acipenseriformes) seminal fluid. Aquatic International, 11:357-68.

Linhart O., Rodina M. and Cosson J., 2000. Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos. Cryobiology, 41:241–250.

Mis J., Bieniarz K., Epler P., Sokolowska-Mikolajczyk M. and Chyb J., 1995. Incubation of fertilized common carp (*Cyprinus carpio* L.) eggs in different concentrations of copper. Polish Arch Hydrobiology, 42:269-276**.**

Morisawa M., 1985. Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. Zoology Science, 2:605-615.

Morisawa M., Suzuki K. and Morisawa S., 1983. Effects of potassium and osmolality on spermatozoan motility of salmonid fishes. Journal of Experimental Biology, 107:105-113.

Mylonas C.C., Fostier A. and Zanuy S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. General and Comparative Endocrinology, 165:516-534.

Ottesen O.H. and Babiak I., 2007. Parental effects on fertilization and hatching success and development of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus L.*) embryos and larvae. Theriogenology, 68:1219–1227.

Park I.S., Choi G.C., Nam Y.K. and Kim D.S., 2002. The effect of exogenous hormone treatment on spermiation in *Rhynchocypris oxycephalus* (Sauvage and Dabry). Journal of the World Aquaculture Society, 33:494-500.

Psenicka M., Alavi S.M.H., Rodina M., Cicova Z., Gela D., Cosson J., Nebesarova J. and Linhart O., 2008. Morphology, chemical contents and physiology of chondrostean fish sperm: a comparative study between Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and starlet (*Acipenser ruthenus*). Journal of Applied Ichthyology, 24:371–377.

Richardson C.J. and Hussain N.A., 2006. Restoring the garden of eden: An ecological assessment of the marshes of Iraq. Bioscience, 56:477-489.

Rodina M., Cosson J., Gela D. and Linhart O., 2004. Kurokura solution as immobilizing medium for spermatozoa of tench (*Tinca tinca* L.). Aquaculture International, 12:119–131.

Silla A.J., 2011. Effect of priming injections of luteinizing hormone-releasing hormone on spermiation and ovulation in Günther's Toadlet, *Pseudophryne guentheri*. Reproductive Biology and Endocrinology, 9:1-9.

Tan-Fermin J.D., Miura T., Adachi S. and Yamauchi K., 1999. Seminal plasma composition, sperm motility and milt dilution in the Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Gunther). Aquaculture, 171:323- 338.

Verma D.K., Routray P., Dash C., Dasgupta S. and Jena J.K., 2009. Physical and biochemical characteristics of semen and ultrastructure of spermatozoa in six carp species. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 9:67-76.

Von Westernhagen, H., Hoar, W.S. and Randall, D.J., 1988. Sublethal effects of pollutants on fish eggs and larvae. Fish Physiology, 11:253-346.

Wilson-Leedy J.G., Kanuga M.K. and Ingermann R.L., 2009. Influence of osmolality and ions on the activation and characteristics of zebrafish sperm motility. Theriogenology, 71:1054–1062.

Effect of LHRHA2 and carp pituitary extract hormone on some spermatozoa fertility and quality indices in *Barbus sharpeyi*

Kalbassi M.R[(1)]*; Lorestani R. [(2)] and Ghafleh Marammazi J. [(3)]

kalbassi_m@modares.ac.ir

1, 2- Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, P.O.BOX: 46414 Noor, Iran

3- South Aquaculture Research Center, P.O.BOX: 866-61645 Ahvaz, Iran

Received: March 2011 Accepted: August 2012

Keywords: Pituitary gland, Sperm, Plasma, *Barbus sharpeyi*, Iran

Abstract

Effects of LHRHA2 hormone in 2.5, 5 and 10µg/kg doses and anti-dopamine metoclopramide on *Barbus sharpeyi* spermiation, spermatozoa quality and fertility indices, chemical (Na^+, K^+ and Ca^{+2}) and biochemical component (Alkaline phosphates, Glucose and Triglyceride) of seminal plasma and its osmotic pressure were assessed in comparison to Carp pituitary extract treatment. Results indicated that the highest incubation survival, hatching rate, sperm volume, duration of sperm motility as well as the lowest larval deformity were achieved by injection of LHRHA2 (10µg/kg +2.5mg/kg metoclopramide) and it was significantly different to others groups. Application of above mentioned treatment had the highest osmotic pressure with about (Mean ±SD) 324±7.31mOsmol kg^{-1} among other groups. Also, the highest level of Na^+ was assessed by injection of LHRHA2 (10µg/kg +2.5mg/kg metoclopramide). Result showed that injection of Carp pituitary extract caused the highest spermatocrit, K^+ value and larval deformity in comparison to other treatments. In conclusion, optimum sperm quality can be produced by injection of LHRHA2 (10µg/kg + 2.5mg/kg metoclopramide) in males of *B. sharpeyi* at 8 hour following hormonal stimulation. Also, above mentioned treatment caused increasing of incubation survival and decrease of larval deformity in *B. sharpeyi*.

*Corresponding author