اثر Ovaprim™ و hCG بر القای تولید مثل مولدین ماده سوف حاج طرخان (*Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758)

بهرام فلاحتکار*[۱،۲]، عرفان اکبری نرگسی[۱]، دانیال گروهی[۱]، ایرج عفت پناه[۳]

[۱]گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران.

[۲]گروه علوم دریایی، پژوهشکده حوضه آبی خزر، دانشگاه گیلان، رشت، گیلان.

[۳]مرکز بازسازی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی ماهیان دریایی شادروان دکتر یوسف‌پور، سیاهکل، گیلان.

*نویسنده مسئول: falahatkar@guilan.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۶/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۷/۹/۱۴

چکیده

پژوهش حاضر به منظور تعیین اثر دو هورمون Ovaprim™ و hCG در القای تولید مثل ماهی سوف حاج طرخان (*Perca fluviatilis*) در محیط اسارت و همچنین بررسی پارامترهای اسپرم‌شناختی این ماهی انجام گرفت. در تیمار اول از ۱۴ مولد ماده با میانگین وزن ۱۷/۴±۹۹/۳ گرم استفاده شد و مولدین با دوز ۰/۵ میلی‌لیتر به ازای کیلوگرم وزن بدن با هورمون Ovaprim™ تزریق شدند. در تیمار دوم از ۵ مولد ماده با میانگین وزن ۱۹/۸±۱۰۳/۸ گرم استفاده شد و مولدین با دوز ۵۰۰ واحد بین المللی هورمون hCG به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تزریق شدند. در هر دو تیمار آزمایشی در مولدین نر هیچ‌گونه تزریقی انجام نشد. به‌منظور تعیین پارامترهای اسپرم شناختی نیز از ۱۰ قطعه مولد نر با میانگین وزن ۱۳/۱ ± ۹۲/۰ گرم استفاده شد. طبق نتایج، سریع‌ترین زمان رسیدگی مولدین (۱۵۸۶/۴ درجه- ساعت) و بالاترین درصد جوابدهی (۱۰۰ درصد) در تیمار hCG مشاهده گردید ($P<0/05$)، در حالی‌که درصد جوابدهی در مولدین تیمار Ovaprim™ ۶۴/۳ درصد بود. در میانگین وزن تخم آبکشیده به ازای هر ماهی، میانگین تعداد در گرم تخم آبکشیده، درصد لقاح و مدت زمان تخم گشایی تفاوت معنی‌داری بین دو تیمار آزمایشی مشاهده نشد ($P>0/05$). بر اساس نتایج میانگین حجم اسپرم ماهی سوف حاج طرخان ۱/۳±۱/۱ میلی لیتر، میانگین تحرک اسپرم ۱۵/۳۱±۸۰/۵ درصد، میانگین مدت زمان فعالیت اسپرم ۵۷/۷±۱۵۵/۴ ثانیه، میانگین اسپرماتوکریت ۱۱/۴±۸۴/۳ درصد و میانگین غلظت اسپرماتوزوئید میلی لیتر/$۱۰^{۹}$× ۲۹/۷±۴۱/۹ به‌دست آمد. نتایج نشان داد هورمون hCG برای القای تخم ریزی مولدین سوف حاج طرخان در شرایط اسارت از هورمون Ovaprim™ مناسب‌تر است. با توجه به اثرات مطلوب تر هورمون hCG توصیه می‌شود از این هورمون در القای تخم‌ریزی مولدین سوف حاج طرخان استفاده شود.

واژگان کلیدی: اسپرم، تخم ریزی، لقاح، سوف ماهیان.

مقدمه

رشد و توسعه آبزی‌پروری گونه‌های مختلف از یک سو و تهدید گونه‌های وحشی آبزی از سوی دیگر سبب افزایش نیاز به تولیدمثل و تولید بچه‌ماهیان با کیفیت شده است. توجه به گونه‌های جدید و مناسب برای آبزی‌پروری و پرورش آن‌ها در محیط های بسته مستلزم درک دقیق از شرایط تولیدمثلی و نیازمندی-های پرورشی است. امروزه استفاده از روش‌های القای هورمونی و محرک‌های مختلف برای افزایش بازدهی و همزمانی تکثیر مصنوعی موفقیت‌های زیادی را در تولید انبوه گونه‌های مختلف در شرایط کنترل شده ایجاد نموده است (Żarski *et al.*, 2015).

ماهی سوف حاج طرخان (*Perca fluviatilis*) گونه‌ای گوشتخوار در آب‌شیرین بوده که در بسیاری از مناطق اروپا و برخی نقاط آسیا از جمله مناطق شمالی ایران پراکنش دارد. با توجه به رشد مطلوب، خوش خوراکی و امکان تکثیر در اسارت، توسعه آبزی‌پروری این ماهی در کشورهای مختلف اروپایی رو به گسترش است (Kestemont *et al.*, 2015; Żarski *et al.*, 2017). در ایران عمده پراکنش طبیعی این ماهی در استان گیلان و تالاب های انزلی و امیرکلایه است (خارا و همکاران، ۱۳۸۴) که با فشارهای صیادی و آلودگی های محیط زیست در خطر نابودی قرار گرفته است. به‌همین دلیل، توجه به حفظ نسل و بازسازی ذخایر

این گونه ارزشمند ضروری است.

در بسیاری از گونه‌ها، مولدین صید شده از محیط-های طبیعی و یا پرورش یافته در محیط اسارت به‌دلیل شرایط نامناسب موجود قادر به تولیدمثل نمی‌باشند (Zohar and Mylonas, 2001). این عدم موفقیت در تولیدمثل اغلب به‌علت تغذیه نامناسب، فشار استرس ناشی از اسارت و فراهم نشدن محیط مناسب برای تخم‌ریزی مولدین بروز می‌کند (Merrifield and Ringø, 2014). این موضوع خصوصاً در گونه های حساس به استرس می‌تواند منجر به عدم اوولاسیون ماده ها و یا عدم اسپرم‌ریزی و کیفیت پایین اسپرم در نرها گردد (Donaldson and Hunter, 1983).

برای افزایش راندمان تکثیر مصنوعی و همزمانی تکثیر، استفاده از تیمارهای هورمونی و روش‌های مناسب می‌تواند منجر به ارتقای این صنعت گردد. هورمون‌های مختلفی نظیر آنالوگ های سنتتیک آزاد کننده گنادوتروپین ($GnRH_a$) و گنادوتروپین‌های خاص سبب اوولاسیون و اسپرم‌ریزی موفق در بسیاری از گونه‌های آب شیرین و دریایی شده است. با وجود اثرگذاری مطلوب GnRH در تحریک تولیدمثل در بسیاری از مهره داران، حضور دوپامین به‌عنوان عامل جلوگیری کننده عمل گنادوتروپین‌ها در برخی ماهیان استخوانی، عملکرد این هورمون در تکثیر مصنوعی را با عدم موفقیت همراه کرده است. بنابراین استفاده از آنتاگونیست‌های دوپامینی در کنار این هورمون برای القای تولیدمثل چنین گونه‌هایی الزامی است (Lin *et al.*, 1986; Peter *et al.*, 1988). این روش که Linpe نام دارد امروزه در بسیاری از گونه‌ها از جمله کپورماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Drori *et al.*, 1994: Dorafshan *et al.*, 2003: Heyrati *et al.*, 2007). تاکنون از هورمون‌های مختلفی برای همزمانی اوولاسیون و یا تکثیر خارج از فصل در گونه سوف حاج طرخان استفاده شده است (Kouril and Hamackova, 1999; Kucharczyk *et al.*, 1996; Kucharczyk *et al.*, 2001; Rónyai and Lengyel, 2010; Żarski *et al.*, 2017).

اوواپریم هورمونی مایع حاوی آنالوگ هورمون آزاد کننده گنادوتروپینی ماهی آزاد (sGnRH = Salmon Gonadotropin-Releasing Hormone) به مقدار ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و دارای آنتی دوپامین دامپریدون به مقدار ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر است که قابل استفاده به‌صورت تزریق داخل عضلانی یا داخل صفاقی است و به‌طور مستقیم بر روی هیپوفیز اثر می‌گذارد. امروزه این هورمون در بسیاری از گونه‌ها با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته است. هورمون کوریونیک گنادوتروپین انسانی (hCG = Human Chorionic Gonadotropin) نیز هورمونی با هدف القای ترشح هورمون لوتئینیزه کننده (LH = Luteinizing Hormone) در انسان مورد استفاده قرار می‌گیرد اما تجربیات موفقی در القای تولیدمثل در گونه‌های مختلف ماهی خصوصاً راسته سوف ماهیان و گونه‌های دریایی وجود دارد (Targońska *et al.*, 2014).

با توجه به اهمیت حفاظت از گونه‌های در معرض خطر و عدم موفقیت تکثیر مصنوعی در محیط‌های اسارت، استفاده از هورمون‌های مناسب و دستیابی به نرماتیوهای تکثیر در هر گونه امری ضروری تلقی می‌گردد. این مطالعه به مقایسه بررسی اثر القای تکثیر مصنوعی با استفاده از دو هورمون Ovaprim™ و hCG بر عملکرد تکثیر ماهی سوف حاج طرخان پرداخته است تا با بهینه‌سازی روش تکثیر در محیط های کنترل شده بتوان به تولید انبوه این ماهی با هدف بازسازی ذخایر آن اقدام نمود. همچنین پارامترهای اسپرم‌شناختی جنس نر سوف حاج طرخان در این تحقیق در زمان تکثیر مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

ماهی و شرایط نگهداری: بررسی حاضر در اسفند ماه سال ۱۳۹۶ در مرکز بازسازی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی ماهیان دریایی شادروان دکتر یوسف پور سیاهکل انجام پذیرفت. ابتدا مولدین سوف حاج

طرخان به‌وسیله نصب تله مخروطی در مسیر رودخانه-های منتهی به تالاب انزلی صید شدند و سپس به‌وسیله خودروی دارای مخزن اکسیژن به مرکز منتقل شدند (مدت انتقال ۱۵۰ دقیقه). مولدین نر و ماده به‌مدت ۲ هفته قبل از بررسی میزان آمادگی برای تکثیر در شرایط کارگاه و در دو مخزن بتونی با حجم آبگیری ۸۰۰ لیتر با دبی آب ۱۵-۱۰ لیتر در دقیقه به‌صورت جداگانه نگهداری شدند. در طی هفته اول سازگاری با شرایط کارگاه، از غذای زنده برای تغذیه مولدین استفاده شد (۲ قطعه بچه ماهی انگشت‌قد فیتوفاگ به ازای هر مولد). پس از پایان دوره تطابق، آمادگی مولدین ماده با بررسی ظاهری، بررسی میزان نرمی سطح شکمی و بررسی منفذ تناسلی سنجیده شد (Żarski *et al.*, 2017). پس از انتخاب مولدین ماده، ۳ مولد به‌صورت تصادفی انتخاب شد و پس از بیهوشی کامل به‌وسیله عصاره پودر گل میخک (دوز ۲۰۰ میلی گرم در لیتر) با برش ناحیه شکمی وضعیت گناد مورد بررسی قرار گرفت و با نمونه‌برداری از تخمدان تعداد در گرم تخمک هر سه مولد به‌وسیله وزن کردن ۱ گرم تخمک با ترازوی دارای دقت ۰/۰۰۱ گرم و شمارش تعداد تخمک‌ها تعیین گردید. میزان آمادگی مولدین نر با بررسی منفذ تناسلی و فشار آرام به ناحیه شکمی تعیین گردید (Żarski *et al.*, 2017).

القای هورمونی و تعیین شاخص‌های تکثیر: در این مطالعه به‌منظور تعیین اثر هورمون‌های مختلف بر تکثیر نیمه مصنوعی ماهی سوف حاج طرخان از دو تیمار هورمونی مختلف استفاده شد. در تیمار اول از هورمون Ovaprim™ (Syndel, Nanaimo, Canada) با دوز ۰/۵ میلی‌لیتر به ازای کیلوگرم وزن بدن مولدین ماده استفاده شد. به منظور تعیین اثر این هورمون در این تیمار از ۱۴ مولد ماده با میانگین وزن ۱۷/۴±۹۹/۳ گرم و ۲۸ مولد نر با میانگین وزن ۱۴/۱±۸۳/۶ گرم استفاده گردید. در تیمار دوم از هورمون hCG (Karma-hCG, Tehran, Iran) با دوز ۵۰۰ واحد بین المللی به ازای کیلوگرم وزن بدن مولدین ماده استفاده شد. ابتدا هورمون hCG با ۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی به ازای کیلوگرم وزن مولدین به حجم رسانیده شد و سپس عملیات تزریق انجام گرفت. در این تیمار از ۵ مولد ماده با میانگین وزن ۱۹/۸±۱۰۳/۸ و ۱۰ مولد نر با میانگین وزن ۱۵/۵±۸۶/۰ گرم استفاده شد. در هر دو تیمار، تزریق در زیر باله شکمی به‌صورت داخل صفاقی به‌وسیله سرنگ انسولین انجام گرفت. به‌دلیل آمادگی مولدین نر هیچ‌گونه تزریقی برای آن‌ها انجام نگرفت. پس از تزریق، مولدین هر تیمار به حوضچه‌های بتونی مدور با قطر ۱۸۵ سانتی‌متر، سطح ۲/۷ متر مربع و ارتفاع ۵۰ سانتی‌متر منتقل گردیدند. ارتفاع آب در حوضچه‌ها ۳۰ سانتی‌متر و میزان دبی آب ۱۰-۵ لیتر در دقیقه بود. بلافاصله پس از پایان تزریق مولدین ماده، مولدین نر به حوضچه‌ها اضافه شدند. در حوضچه تیمار Ovaprim از ۳ لانه تخم‌ریزی و در تیمار hCG از ۲ لانه تخم‌ریزی استفاده شد. میانگین دما در طی دوره ۰/۴±۱۳/۲ درجه سانتی‌گراد، میانگین اکسیژن ۰/۸±۱۱/۱ میلی‌گرم در لیتر، pH ۷/۴-۷/۱ و دوره نوری ۱۲L:۱۲D بود.

در طی دوره پس از تزریق، حوضچه‌ها به‌منظور مشاهده تخم‌ریزی احتمالی ماهی‌ها از روز سوم تا هفتم پس از تزریق هر ۱۲ ساعت یک‌بار بررسی می‌شدند (Targońska *et al.*, 2014). در صورت مشاهده تخم‌ریزی هر ماهی، زمان دقیق تخم‌ریزی ثبت گردیده و سپس دسته تخم‌ها به آرامی به‌وسیله توری چشمه ریز به سطل دارای آب اضافه شده و به‌وسیله ترازوی با دقت ۰/۰۱ گرم وزن می‌شدند. در ادامه پس از اندازه گیری میانگین وزن تخم آبکشیده به ازای هر ماهی، میانگین تعداد در گرم تخم آبکشیده به‌وسیله وزن کردن ۱ گرم تخم آبکشیده با ترازو دارای دقت ۰/۰۰۱ گرم و شمارش تعداد تخم‌ها تعیین گردید. مدت زمان رسیدگی مولدین، درصد جوابدهی به تزریق، درصد لقاح و مدت زمان تخم‌گشایی به‌وسیله فرمول‌های زیر محاسبه شدند (Pankhurst *et al.*, 1996):

مدت زمان رسیدگی (درجه- ساعت) = میانگین درجه حرارت × مدت زمان از لحظه تزریق تا تخم ریزی بر

حسب ساعت

درصد جوابدهی مولدین = ۱۰۰ × (تعداد ماهی‌های تزریق شده / تعداد ماهی‌های تخم‌ریزی کرده)

درصد لقاح = ۱۰۰ × (تعداد کل تخم‌ها / تعداد تخم های لقاح یافته)

مدت زمان تخم‌گشایی (درجه-روز) = میانگین درجه حرارت × مدت زمان از لحظه لقاح تا تخم‌گشایی بر حسب روز

تعیین شاخص‌های اسپرم شناختی: به‌منظور تعیین پارامترهای اسپرم شناختی، تعداد ۱۰ قطعه مولد نر به‌صورت تصادفی از مخزن مولدین صید گردید و پس از بیهوشی به‌وسیله عصاره پودر گل میخک با فشار آرام به ناحیه شکمی عملیات اسپرم‌گیری انجام شد. سپس پارامترهای مربوطه شامل حجم اسپرم، مدت زمان فعالیت، درصد تحرک، درصد اسپرماتوکریت و غلظت اسپرم مورد بررسی قرار گرفت. حجم اسپرم توسط سرنگ ۲ میلی‌لیتر تعیین شد. به‌منظور تعیین درصد و مدت زمان فعالیت از میکروسکوپ نوری (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) و کرنومتر استفاده شد. بدین صورت که بلافاصله پس از اضافه کردن آب کارگاه به اسپرم، درصد تحرک به‌وسیله تخمین چشمی ارزیابی شد و مدت زمان فعالیت نیز تا زمانی که ۱۰۰ درصد اسپرماتوزوآها از حرکت ایستادند با کرنومتر ثبت گردید (Alavi *et al.*, 2010). برای تعیین اسپرماتوکریت لوله‌های میکرواسپرماتوکریت به میزان سه چهارم با اسپرم پر گردید و پس از مسدود کردن انتهای لوله‌ها با خمیر مخصوص، از دستگاه میکروسانتریفیوژ (Hawksley, Marlborough, England) برای جداسازی پلاسما از اسپرم استفاده شد (۱۰ دقیقه در دور g ۳۵۰۰)، سپس درصد اسپرماتوکریت توسط خط‌کش مخصوص تعیین شد. برای تعیین غلظت اسپرم از لام هماسیتومتر نئوبار و میکروسکوپ نوری استفاده شد. برای این منظور اسپرم هر ماهی به نسبت ۱ به ۱۰۰۰۰ با سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد مخلوط گردید و ۱۰ میکرولیتر از آن به لام هماسیتومتر اضافه شد و شمارش با بزرگنمایی ۴۰× میکروسکوپ نوری انجام گرفت (Alavi *et al.*, 2007).

تحلیل داده‌ها: ابتدا نرمال بودن داده ها با استفاده از تست کولموگروف-اسمیرنف (Kolmogorov-Smirnov) مورد بررسی قرار گرفت. سپس مقایسه میانگین‌های دو گروه با استفاده از آزمون t مستقل (Independent-Samples T-Test) در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام گرفت. تمامی آنالیزها با استفاده از نرم افزار SPSS (IBM Corporation, New York, USA) نسخه ۲۳ انجام گرفت. تمامی داده‌های درون متن به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان گردیده اند.

نتایج

در جدول ۱ پارامترهای تولیدمثلی مولدین ماده سوف حاج طرخان ارائه شده است. طبق نتایج، در مدت زمان رسیدگی تفاوت معنی‌داری بین دو تیمار آزمایشی به دست آمد ($P<۰/۰۵$)، به‌طوری‌که سریع‌ترین زمان رسیدگی (۱۵۸۶/۴ درجه-ساعت) در تیمار hCG مشاهده گردید. همچنین بالاترین درصد جوابدهی (۱۰۰ درصد) در تیمار hCG مشاهده شد و تفاوت معنی‌داری با تیمار Ovaprim™ نشان داد ($P<۰/۰۵$). در تعداد در گرم تخمک، میانگین وزن تخم آبکشیده به ازای هر ماهی، میانگین تعداد در گرم تخم آبکشیده، درصد لقاح و مدت زمان تخم‌گشایی تفاوت معنی‌داری بین دو تیمار آزمایشی مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$).

جدول ۲ نتایج مربوط به پارامترهای اسپرم شناختی مولدین سوف حاج طرخان را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج میانگین حجم اسپرم ماهی سوف حاج طرخان در آزمایش حاضر ۱/۱±۱/۳ میلی‌لیتر اندازه گیری شد. همچنین میانگین تحرک اسپرم ۱۵/۳۱±۸۰/۵ درصد و میانگین مدت زمان فعالیت اسپرم ۵۷/۷±۱۵۵/۴ ثانیه بود. بر طبق مشاهدات میانگین اسپرماتوکریت ۱۱/۴±۸۴/۳ درصد و میانگین غلظت اسپرماتوزوئید (میلی‌لیتر /$۱۰^{۹}$×۲۹/۷±۴۱/۹) به‌دست آمد.

جدول ۱- مقایسه پارامترهای تولیدمثلی مولدین ماده سوف حاج طرخان (*Perca fluviatilis*) پس از القا با دو هورمون Ovaprim™ و hCG در محیط اسارت (میانگین ± انحراف معیار).

شاخص ها	تیمار	
	Ovaprim	**hCG**
تعداد ماهی	۱۴	۵
میانگین وزن (گرم)	۹۹/۳ ± ۱۷/۴	۱۰۳/۸ ± ۱۹/۸
میزان تزریق	۰/۵ ml/kg	۵۰۰ IU/kg
مدت زمان رسیدگی (درجه- ساعت)	۲۴۸۱/۶*	۱۵۸۶/۴
درصد جوابدهی مولدین	۶۴/۳	۱۰۰*
تعداد در گرم تخمک	۹۵۸/۳ ± ۲۷/۵	۹۴۲/۷ ± ۲۵/۰
میانگین وزن تخم آبکشیده به ازای هر ماهی (گرم)	۳۸ ± ۶/۲	۴۱ ± ۶/۳
میانگین تعداد در گرم تخم آبکشیده	۳۱۵/۳ ± ۴/۵	۳۱۰/۳ ± ۳/۵
درصد لقاح	۹۳/۳ ± ۲/۹	۹۶/۷ ± ۴/۲
مدت زمان تخم گشایی (درجه-روز)	۱۴۳/۰	۱۳۷/۵

علامت * بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

جدول ۲- پارامترهای اسپرم شناختی مولدین سوف حاج طرخان (*Perca fluviatilis*) نگهداری شده در محیط اسارت (n=۱۰) طی فصل تکثیر.

پارامترها	کمترین	بیشترین	میانگین	انحراف معیار
میانگین وزن (گرم)	۶۵	۱۱۱	۹۲/۰	۱۳/۱
حجم اسپرم (میلی لیتر)	۰/۱	۳/۸	۱/۳	۱/۱
فعالیت اسپرم (درصد)	۵۰	۱۰۰	۸۰/۵	۱۵/۳
مدت زمان فعالیت (ثانیه)	۵۹	۲۷۱	۱۵۵/۴	۵۷/۷
اسپرماتوکریت (درصد)	۷۰/۱	۹۶/۱	۸۴/۳	۱۱/۴
غلظت اسپرماتوزوئید (میلی لیتر/$۱۰^{۹}$×)	۱۲/۵	۹۰/۰	۴۱/۹	۲۹/۷

بحث

در مطالعه حاضر القای تولیدمثل ماهی سوف حاج طرخان در محیط اسارت با دو هورمون Ovaprim™ و hCG مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به پاسخ سریع‌تر به تزریق و جوابدهی ۱۰۰ درصدی مولدین القاء شده با هورمون hCG، می‌توان این‌گونه استنباط نمود که این هورمون برای القای تخم‌ریزی در ماهی سوف حاج طرخان از هورمون Ovaprim™ مناسب تر می‌باشد. تاکنون از هورمون‌های مختلفی برای القای تولیدمثل ماهی سوف حاج طرخان استفاده شده است (Żarski *et al.*, 2015). براساس آخرین نتایج ارائه شده، بالاترین نرخ بازدهی در القای تولیدمثل ماهی سوف حاج طرخان بعد از استفاده از آنالوگ‌های هورمون GnRH (GnRHa) و هورمون hCG به‌دست آمده است (Żarski *et al.*, 2017). Kucharczyk و همکاران (۲۰۱۵) اثر هورمون Ovaprim™ را در تکثیر مصنوعی ماهی سوف حاج طرخان بررسی نمودند و میانگین درصد جوابدهی مولدین به هورمون را طبق مرحله رسیدگی بین ۵۰ تا ۸۵ درصد گزارش نمودند. در این تحقیق نیز درصد جوابدهی مولدین به القاء با هورمون Ovaprim™ ۶۴/۳ درصد بود که با نتایج این محققین هم‌خوانی دارد. Targonska و همکاران (۲۰۱۲) پس از القای مولدین ماده سوف حاج طرخان با هورمون‌های Ovopel™ (آنالوگ GnRH +

آنتاگونیست دوپامین + حامل‌ها)، CPH (Carp Pituitary Homogenate)، Ovaprim™ و hCG، تفاوت معنی‌داری در مدت زمان رسیدگی در تیمارهای هورمونی مختلف گزارش کردند و سریع‌ترین زمان رسیدگی را در تیمار hCG مشاهده نمودند. همچنین Kucharczyk و همکاران (۱۹۹۶) اثر دو هورمون CPE (Carp Pituitary Extract) و hCG را در تیمارهای مختلف در القای تخم‌ریزی ماهی سوف حاج طرخان مورد بررسی قرار دادند و سریع‌ترین زمان رسیدگی را در تیمار hCG گزارش نمودند. هم‌راستا با این نتایج در مطالعه حاضر نیز پس از القای مولدین با هورمون hCG نتایج مطلوب‌تری در مدت زمان رسیدگی و درصد جوابدهی مشاهده گردید. با این حال در میانگین وزن تخم آبکشیده، میانگین تعداد در گرم تخم آبکشیده، درصد لقاح و مدت زمان تخم‌گشایی بین دو تیمار آزمایشی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. این نتایج نشان می‌دهد مولدینی که با هورمون Ovaprim™ القاء می‌شوند در صورتی که به تزریق پاسخ مثبت دهند میزان لقاح و کیفیت تخم آنها تفاوت قابل توجهی با مولدین القاء شده با هورمون hCG نخواهد داشت، به عبارتی دیگر طبق نتایج این پژوهش القای مولدین با هورمون Ovaprim™ اثر سوئی بر کیفیت تخم‌ها نمی‌گذارد. با این حال درصد مولدینی که به این هورمون پاسخ می دهند کمتر از هورمون hCG بوده که استفاده از این هورمون را محدود خواهد ساخت. براساس Żarski و همکاران (۲۰۱۷) برای القاء رسیدگی مولدین سوف حاج طرخان نیازی به استفاده از آنتاگونیست‌های دوپامین نمی‌باشد و استفاده از هورمون hCG یا GnRH به تنهایی برای القای تخمک‌گذاری این ماهی کافی است. طبق گزارشات این محققین، استفاده از آنتاگونیست‌های دوپامین تاکنون در القاء ماهی سوف حاج طرخان اثرات مثبتی در پی نداشته است، بر همین اساس هم راستا با نتایج بررسی حاضر به‌نظر می‌رسد هورمون Ovaprim™ که دارای آنتاگونیست‌های دوپامین می‌باشد برای القای تولیدمثل این ماهی به اندازه هورمون hCG کاربردی نیست، چرا که هورمون hCG مستقیماً روی گناد اثر می‌گذارد و نیازی به ذخایر LH و یا فعالیت گنادوتروپین‌های هیپوفیزی ندارد. در واقع مکانیسم عمل هورمون hCG از طریق افزایش فعالیت ترشح سلول‌های اپیتلیال فولیکولی و افزایش سنتز هورمون های جنسی استروئیدی است که به‌تبع آن موجب افزایش رشد اووسیت ها در مولدین تزریق شده می‌شود (Hodson and Sullivan, 1993). در نتیجه در بررسی حاضر، این هورمون باعث تحریک سریع تر گناد (نسبت به هورمون‌های دارای مشتقات GnRH) و پاسخ مناسب‌تر در مولدین سوف حاج طرخان شده است. بر همین اساس علاوه بر موارد بیان شده قبلی، اثرات مناسب‌تر هورمون hCG نسبت به هورمون Ovaprim™ در این پژوهش را می‌توان به تفاوت در عملکرد این هورمون نیز نسبت داد.

در این بررسی میانگین حجم اسپرم ماهی سوف حاج طرخان ۱/۱±۱/۳ میلی لیتر اندازه‌گیری شد. Alavi و همکاران (۲۰۰۷) میانگین حجم اسپرم ماهی سوف حاج طرخان را ۰/۵۱±۲/۷ میلی‌لیتر عنوان کرده اند. در بررسی دیگری Alavi و همکاران (۲۰۱۰) در ماهی سوف حاج طرخان که تغییرات فصلی اسپرم این ماهی را بررسی نمودند، میانگین حجم اسپرم را در بازه ۰/۸۵-۰/۱۲ میلی‌لیتر گزارش کرده اند. بر اساس نتایج تحقیق حاضر میانگین تحرک اسپرم ۱۵/۳۱±۸۰/۵ درصد و میانگین مدت زمان فعالیت اسپرم ۵۷/۷±۱۵۵/۴ ثانیه بود. طبق مطالعات Alavi و همکاران (۲۰۰۷، ۲۰۱۰) بیشترین درصد تحرک اسپرم در ماهی سوف حاج طرخان در ۴۵ ثانیه اول مشاهده می‌شود و درصد تحرک اسپرم این ماهی در ثانیه ۶۰ کمتر از ۲۰ درصد می‌باشد. همچنین Krol و همکاران (۲۰۰۶) درصد فعالیت اسپرم در ماهی سوف حاج طرخان را در بازه ۸۶/۷۱-۲۷/۵ گزارش نمودند. Kucharczyk و همکاران (۱۹۹۸) نیز میانگین تحرک اسپرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در ماهی سوف حاج طرخان را ۰/۶±۱۹/۶ درصد عنوان کرده‌اند. در این مطالعه در ماهی سوف حاج طرخان

میانگین اسپرماتوکریت ۱۱/۴±۸۴/۳ درصد و میانگین غلظت اسپرماتوزوئید میلی لیتر/$۱۰^{۹}$× ۲۹/۷±۴۱/۹ اندازه‌گیری شد. در مطالعه Henrotte و همکاران (۲۰۱۰) درصد اسپرماتوکریت در سوف حاج طرخان در بازه ۸۰-۶۰ و میانگین غلظت اسپرماتوزوئید میلی لیتر /$۱۰^{۹}$×۵۸/۹-۴۶/۱ گزارش شد. در همین راستا، Alavi و همکاران (۲۰۰۷) میانگین غلظت اسپرماتوزوئید در سوف حاج طرخان را میلی‌لیتر /$۱۰^{۹}$× ۳/۱±۲۹/۲ گزارش نمودند. Wirtz و Steinmann (۲۰۰۶) نیز میانگین غلظت اسپرماتوزوئید در سوف حاج طرخان را بین $۱۰^{۹}$×۱۲۷/۵-۱۸/۸ در هر میلی لیتر اندازه‌گیری نمودند. با توجه به موارد بیان شده تفاوت در پارامترهای اسپرم شناختی در مطالعات مختلف می‌تواند به‌علت تفاوت در زمان و نوع نمونه برداری، سن و مرحله رسیدگی مولدین، تفاوت‌های دمایی و شرایط نگهداری و همچنین اثر تیمارهای مختلف آزمایشی و استفاده از تیمارهای هورمونی مختلف باشد.

نتایج این مطالعه اطلاعات مناسبی در زمینه پارامترهای اسپرم شناختی ماهی سوف حاج طرخان تالاب انزلی در اختیار محققین قرار می‌دهد. با این حال برای تکمیل این نتایج لازم است پژوهش‌های آتی در زمینه بررسی خصوصیات کمی، کیفی و بیوشیمیایی اسپرم و تاثیر این پارامترها بر موفقیت تکثیر این ماهی انجام گیرد. در زمینه القای ماهی سوف حاج طرخان در شرایط اسارت با دو هورمون Ovaprim™ و hCG نیز نتایج نشان داد که مولدین القاء شده با هورمون hCG پاسخ مناسب‌تری به تزریق داشته‌اند. با توجه به جوابدهی ۱۰۰ درصدی و همچنین تخم‌ریزی سریع‌تر مولدین القا شده با هورمون hCG، توصیه می‌شود از این هورمون برای القای تولیدمثل ماهی سوف حاج طرخان در مراکز تکثیر ماهی با هدف تولید انبوه این ماهی در جهت حفظ ذخایر ارزشمند جمعیت‌های آن استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این پژوهش بر خود لازم می دانند از پرسنل مرکز بازسازی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی ماهیان دریایی شادروان دکتر یوسف پور سیاهکل به خصوص مهندس بهمن مکنت خواه و مهدی رحمتی تشکر و قدردانی نمایند. همچنین بدین وسیله از سایر دوستانی که نقش به سزایی در پیشبرد اهداف در این تحقیق داشتند قدردانی می گردد.

منابع

خارا، ح.، نظامی، ش.، ستاری، م.، موسوی، س.ع.، موسی پور، م.، حاجی پور، ع. ۱۳۸۴. بررسی میزان شیوع و شدت آلودگی های انگلی ماهی سوف حاج طرخان (*Perca fluviatilis* L. 1785) در تالاب امیرکلایه لاهیجان. پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان ۶۷: ۹۲-۱۰۳.

Alavi S., Rodina M., Hatef A., Stejskal V., Policar T., Hamáčková J., Linhart O. 2010. Sperm motility and monthly variations of semen characteristics in *Perca fluviatilis* (Teleostei: Percidae). *Czech Journal of Animal Science* 55, 174-182.

Alavi S., Rodina M., Policar T., Kozak P., Psenicka M., 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.

Donaldson E.M., Hunter G.A. 1983. Induced Final Maturation, Ovulation, and Spermiation in Cultured Fish. *In*: Hoar W.S., Randall D.J., Donaldson E.M. (ed), Fish Physiology, Vol. 9, Elsevier. pp. 351-403.

Dorafshan S., Mostafavi H., Mojazi A.B. 2003. Induction of spawning in common carp *Cyprinus carpio*, using pituitary extract and GnRH analogue in combination with Domperidone. *Iranian Journal of Biotechnology* 1, 213-217.

Drori S., Ofir M., Levavi-Sivan B., Yaron Z. 1994. Spawning induction in common carp (*Cyprinus carpio*) using pituitary

29, 131-136.

Kucharczyk D., Szczerbowski A., Luczynski M.J., Kujawa R., Mamcarz A., Wyszomirska E., Szabó T., Ratajski S. 2001. Artificial spawning of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L. using Ovopel. *Archives of Polish Fisheries* 9, 39-49.

Kucharczyk D., Targońska K., Chwaluczyk R. 2015. Application of Ovaprim in artificial reproduction of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L. under controlled conditions. *Iranian Journal of Ichthyology* 1, 7-11.

Lin H., Van Der Kraak G., Liang J., Peng C., Li G., Lu L., Zhou X., Chang M., Peter R. 1986. The effects of LHRH analogue and drugs which block the effects of dopamine on gonadotropin secretion and ovulation in fish cultured in China, In: Aquaculture of Cyprinids (ed. by R. Billard., J. Marcel), pp. 139-150. INRA, Paris.

Merrifield D.L., Ringø E. 2014. Aquaculture nutrition: gut health, probiotics and prebiotics. Wiley-Blackwell, UK. 488 p.

Pankhurst N., Purser G., Van Der Kraak G., Thomas P., Forteath G. 1996. Effect of holding temperature on ovulation, egg fertility, plasma levels of reproductive hormones and in vitro ovarian steroidogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 146, 277-290.

Peter R.E., Lin H.-R., Van Der Kraak G. 1988. Induced ovulation and spawning of cultured freshwater fish in China: advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonists. *Aquaculture* 74, 1-10.

Rónyai A., Lengyel S.A. 2010. Effects of hormonal treatments on induced tank spawning of Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.). *Aquaculture Research* 41, 345-347.

Targońska K., Szczerbowski A., Żarski D., Łuczyński M.J., Szkudlarek M., Gomułka P., Kucharczyk D. 2014. Comparison of different spawning agents in artificial out-of-season extract or GnRH superactive analogue combined with metoclopramide: analysis of hormone profile, progress of oocyte maturation and dependence on temperature. *Aquaculture* 119, 393-407.

Henrotte E., Kaspar V., Rodina M., Psenicka M., Linhart O., Kestemont P. 2010. Dietary n-3/n-6 ratio affects the biochemical composition of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) semen but not indicators of sperm quality. *Aquaculture Research* 41, 31-38.

Heyrati F.P., Mostafavi H., Toloee H., 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.

Hodson R.G., Sullivan, C.V. 1993. Induced maturation and spawning of domestic and wild striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum), broodstock with implanted GnRH analogue and injected hCG. *Aquaculture Research* 24, 389-398.

Kestemont P., Dabrowski K., Summerfelt, R.C. 2015. Biology and culture of percid fishes: principles and practices. Springer. 901 p.

Kouril J., Hamackova J. 1999. Artificial propagation of European perch (*Perca fluviatilis*) by means of a GnRH analogue. *Czech Journal of Animal Science* 44, 309-316.

Krol J., Glogowski J., Demska-Zakes K., Hliwa P. 2006. Quality of semen and histological analysis of testes in Eurasian perch *Perca fluviatilis* L. during a spawning period. *Czech Journal of Animal Science* 51, 220-226.

Kucharczyk D., Kujawa R., Murmurz A., Skrzypczak A., Wyszomirska E. 1996. Induced spawning in perch, *Perca fluviatilis* L. using carp pituitary extract and HCG. *Aquaculture Research* 27, 847-852.

Kucharczyk D., Kujawa R., Skrzypczak A., Wyszomirska E. 1998. Induced spawning in perch, *Perca fluviatilis* L., using FSH+LH with pimozide or metoclopramide. *Aquaculture Research*

spawning of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L. *Aquaculture Research* 45, 765-767.

Wirtz S., Steinmann P. 2006. Sperm characteristics in perch *Perca fluviatilis* L. *Journal of Fish Biology* 68, 1896-1902.

Żarski D., Horváth Á., Bernáth G., Krejszeff S., Radóczi J., Palińska-Żarska K., Bokor Z., Kupren K., Urbányi B. 2017. Controlled reproduction of wild Eurasian Perch: a hatchery manual. Springer International Publishing, Switzerland. 102 p.

Żarski D., Horváth A., Held J., Kucharczyk D. 2015. Artificial reproduction of percid fishes. In: *Biology and Culture of Percid Fishes* (ed. by P. Kestemont., K. Dabrowski., R.C. Summerfelt). pp. 123-161. Springer. New York.

Zohar Y., Mylonas C.C. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. In: *Reproductive Biotechnology in Finfish Aquaculture* (ed. by E.M. Donaldson., C.S. Lee). pp. 99-136. Elsevier. Netherlands.

Effect of Ovaprim™ and hCG on spawning induction of Eurasian perch (*Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758) female broodstock

Bahram Falahatkar[*1,2], Erfan Akbari Nargesi[1], Danial Gorouhi[1], Iraj Efatpanah[3]

[1]Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Iran.
[2]Department of Marine Sciences, The Caspian Sea Basin Research Center, University of Guilan, Rasht, Iran.
[3]Siahkal Dr. Yousefpour Marine Fishes Restocking and Genetic Conservation Center, Siahkal, Iran.
*Corresponding author: falahatkar@guilan.ac.ir
Received: 2018/9/5 Accepted: 2018/12/5

Abstract

This study was conducted to determine the effect of Ovaprim™ and hCG hormones on induction of *Perca fluviatilis* in captivity, as well as examination of spermatological parameters of this fish. In the first treatment, 14 females with an average weight of 99.3±17.4 g were injected with a dose of 0.5 ml kg^{-1} body weight with Ovaprim™ hormone. In the second treatment, 5 females with an average weight of 103.8±19.8 were injected at the dose of 500 international units per kg body weight with hCG hormone. In both experimental treatments, injections not performed in male broodstock. In order to determine the spermatological parameters, 10 males with an average weight of 92.0±13.1 g were used. According to the results, the fastest maturation time (1586.4 degree-hour) and the highest percentage of response (100%) were observed in hCG treatment (P<0.05). While the percentage of response in ovaprim™ treatment was 64.3%. The significant differences were not observed between two treatments in the average weight of swollen egg per fish, the average number of swollen egg per gram, percentage of fertilization, and hatching duration (P>0.05). Based on the results of this study, mean sperm volume of *Perca fluviatilis* was 1.3±1.1 ml, mean sperm activity was 80.5±15.31%, mean motility time was 155.4±57.7 seconds, mean percentage of spermatocrit was 84.3±11.4, and the mean spermatozoid concentration was 41.9±29.7×10^9 ml^{-1}. The results of this study showed that to induce spawning of *Perca fluviatilis* broodstock in captivity hCG is more suitable than ovaprim™. Considering the desirable effects of hCG, it is recommended that to induce spawning of *Perca fluviatilis* broodstock this hormone can be used.

Keywords: Fertilization, Percidae, Spawning, Sperm.