فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال دوازدهم، شماره اول، بهار ۱۴۰۳

مقاله پژوهشی

اثر hCG، اواپریم و اواریم بر بازدهی تکثیر مصنوعی مولدین ماهی سوف حاج طرخان (*Perca fluviatilis*)

دانیال گروهی[۱،۲]، عرفان اکبری نرگسی[۳،۴]*، بهرام فلاحتکار[۵،۶]

DOI: 10.22124/japb.2023.24539.1497
تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۲

چکیده

این بررسی به منظور تعیین اثر hCG، اواپریم و اواریم بر بازدهی تکثیر مصنوعی ماهی سوف حاج طرخان (*Perca fluviatilis*) و همچنین بررسی شاخص‌های اسپرم‌شناختی این ماهی انجام گرفت. در تیمار اول از هورمون hCG به میزان ۵۰۰ واحد بین‌المللی به ازای هر کیلوگرم وزن بدن مولدین، در تیمارهای دوم و سوم به ترتیب از هورمون‌های اواپریم و اواریم به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن مولدین و در تیمار شاهد از سرم فیزیولوژی به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر به ازای هرکیلوگرم وزن بدن مولدین استفاده شد. در هر تیمار از ۱۸ قطعه مولد ماده با میانگین وزن تقریبی ۷۸ گرم استفاده شد. القای مولدین نر نیز به وسیله تزریق هورمون hCG به میزان ۲۵۰ واحد بین‌المللی به ازای هر کیلوگرم وزن بدن مولدین انجام گرفت. طبق نتایج سریع‌ترین زمان رسیدگی مولدین ماده (۴۱۵/۶ درجه- ساعت) در تیمار hCG مشاهده شد و تفاوت قابل ملاحظه‌ای با تیمارهای دیگر نشان داد (P<۰/۰۵). بالاترین درصد پاسخ‌دهی (۱۰۰ درصد) در تیمارهای hCG و اواپریم مشاهده شد و تفاوت معنی‌داری با تیمار اواریم و شاهد نشان داد (P<۰/۰۵). در شاخص‌های دیگر تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد (P>۰/۰۵). بر اساس نتایج، میانگین حجم اسپرم، درصد تحرک اسپرم، مدت زمان فعالیت اسپرم و میزان اسپرماتوکریت به ترتیب ۱/۷±۲/۹ میلی‌لیتر، ۱۳/۴±۹۱/۱ درصد، ۱۸/۶±۸۴/۴ ثانیه و ۹/۴±۶۸/۳ درصد اندازه‌گیری شد. نتایج این بررسی نشان داد هورمون hCG برای القای تخم‌ریزی و تکثیر مصنوعی مولدین سوف حاج طرخان از هورمون‌های اواپریم و اواریم مناسب‌تر است. با توجه به اثرات مطلوب‌تر هورمون hCG توصیه می‌شود از این هورمون در القای تخم‌ریزی و تکثیر مصنوعی مولدین سوف حاج طرخان استفاده شود.

واژگان کلیدی: *اسپرم، تخم‌ریزی، لقاح، سوف‌ماهیان، مدیریت مولدین.*

۱- کارشناس ارشد شیلات، مرکز بازسازی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی ماهیان استخوانی شهید انصاری، رشت، ایران.
۲- کارشناس ارشد شیلات، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران.
۳- دکتری شیلات، بخش آبزی‌پروری، پژوهشکده آبزی‌پروری آب‌های داخلی کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، بندرانزلی، ایران.
۴- دکتری شیلات، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران.
۵- استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران.
۶- استاد گروه علوم دریایی، پژوهشکده حوضه آبی خزر، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
* نویسنده مسئول: erfanakbarinargesi@gmail.com

مقدمه

رشد و توسعه مراحل مختلف رسیدگی جنسی در بسیاری از ماهیان در شرایط اسارت به شکل مناسب رخ نمی‌دهد و همین امر سبب شده است که استحصال گامت‌های با کیفیت مناسب از مولدین یکی از مشکلات اصلی در صنعت آبزی‌پروری باشد (Akbari Nargesi et al., 2023). علاوه بر این، در برخی از گونه‌های ماهیان مشکل عدم هم‌زمانی تخم‌ریزی در شرایط اسارت مشاهده می‌شود (Mylonas et al., 2010; Akbari Nargesi et al., 2021). در نتیجه، استفاده از تیمارهای هورمونی مناسب می‌تواند روش مناسبی برای دستیابی به گامت‌های با کیفیت و ایجاد هم‌زمانی در فرآیند تخم‌ریزی باشد (Akbari Nargesi et al., 2022).

تا چندین سال قبل، رایج‌ترین روش برای القای تولیدمثل ماهی‌ها استفاده از تزریق عصاره غده هیپوفیز بود (Zohar, 2021). از جمله معایب استفاده از عصاره غده هیپوفیز می‌توان به اختلاف شدید مقدار گنادوتروپین‌های موجود در غده هیپوفیز گونه‌های مختلف و وجود هورمون‌های ناکارامد دیگر برای القای تولیدمثل در غده هیپوفیز اشاره کرد (Mylonas et al., 2010). امروزه در بسیاری از دستکاری‌های هورمونی از هورمون‌های LH (Luteinizing Hormone) و hCG (Human Chorionic Gonadotropin) که مستقیما بر روی گنادها اثر می‌گذارند یا هورمون آزاد کننده گنادوتروپین مصنوعی (GnRHa) که بر غده هیپوفیز و در نتیجه آزادسازی LH از ذخایر داخلی موثر است، استفاده می‌شود (Akbari Nargesi, 2022). هورمون آزاد کننده هورمون زرده‌ساز (LHRH) یکی از انواع هورمون‌های تجاری است که برای القای تولیدمثل ماهی‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. به دلیل خالص‌تر بودن و سرعت متابولیزه شدن کم‌تر، نوع مصنوعی LHRH (LHRHa) از نوع طبیعی آن موثرتر است (Akbari Nargesi, 2022). هورمون hCG که به خانواده هورمون‌های گلیکوپروتئینی تعلق دارد به دلیل قیمت مناسب، قابلیت تهیه با بالاترین خلوص، نیمه عمر بالا و پایداری بیشتر در گردش خون در مقایسه با عصاره غده هیپوفیز از مزایای بیشتری برخوردار است. این مزیت‌ها سبب شده است تا در بررسی‌های مختلف از این ترکیب هورمونی برای القای تولیدمثل بسیاری از گونه‌های ماهیان بویژه سوف‌ماهیان استفاده شود (Falahatkar et al., 2019). یکی دیگر از انواع

هورمون‌های تولید شده به صورت تجاری، هورمون GnRH است. تیمارهای GnRH برخلاف تیمارهای عوامل هورمونی دیگر اختصاصات گونه‌ای ندارند و به علت شباهت ساختاری زیاد با GnRH ماهیان اثرات مناسبی دارند. همچنین، به علت این که به صورت مصنوعی ساخته می‌شوند و خالص هستند برخلاف عصاره غده هیپوفیز اثر نامناسبی در گونه هدف ایجاد نمی‌کنند (Zohar, 2021). از جمله مهم‌ترین مزایای این هورمون‌ها، ساختار مولکولی مشخص، قابلیت تولید صنعتی و امکان تولید آنالوگ‌های فوق فعال آنها است (Zohar et al., 2022). لازم به ذکر است در ماهی‌هایی که اثر مهاری دوپامین (Dopamine) پس از تحریک آزادسازی GnRH، از انتشار LH جلوگیری می‌کند، استفاده از آنتاگونیست‌های دوپامین در هنگام استفاده از GnRH این اثر مهاری را برطرف کرده و اثر تحریکی GnRH بر LH را تقویت می‌کند (Zohar et al., 2022). هرچند انواع هورمون های اشاره شده پاسخ‌دهی مناسبی در بسیاری از گونه‌ها ایجاد می‌کنند، اما نمی‌توان از نتیجه بررسی بر روی یک گونه برای گونه‌های دیگر استفاده کرد، زیرا در فرآیند رسیدگی گامت‌ها عوامل دیگری از جمله استروئیدی‌های جنسی و برخی از ناقلین عصبی مانند دوپامین هم تاثیرگذار هستند. بنابراین، در برخی موارد برای دستیابی به نتایج مطلوب، تزریق هورمون به تنهایی موثر واقع نخواهد شد (Mylonas et al., 2010).

ماهی سوف حاج طرخان (*Perca fluviatilis*) گونه‌ای گوشتخوار در آب شیرین است که در بسیاری از مناطق اروپا و برخی نقاط آسیا از جمله مناطق شمالی ایران پراکنش دارد (Falahatkar et al., 2019). این گونه یکی از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی در آب شیرین قاره اروپا است. از عوامل اصلی که سبب شده است این ماهی به یک گونه مناسب برای آبزی‌پروری معرفی شود می‌توان به رشد مطلوب، خوش‌خوراکی و امکان تکثیر کنترل شده در شرایط اسارت اشاره کرد (Zarski et al., 2017). با این حال تاکنون در ایران توجه خاصی به تکثیر و پرورش این ماهی نشده است و تنها یک مطالعه در زمینه تکثیر نیمه طبیعی این ماهی در دسترس است (Falahatkar et al., 2019). در ایران عمده پراکنش طبیعی این ماهی در استان گیلان و تالاب‌های انزلی و امیرکلایه است (Akbari Nargesi, 2022) که با فشارهای صیادی و آلودگی‌های محیط زیست در خطر نابودی قرار گرفته است (Falahatkar et al., 2019). به همین دلیل، توجه به حفظ

نسل و بازسازی ذخایر این گونه ارزشمند امری ضروری به نظر می‌رسد.

امکان تکثیر کنترل شده جمعیت‌های وحشی و اهلی ماهی سوف حاج طرخان در شرایط اسارت وجود دارد (Kucharczyk et al., 2001). در همین راستا، به خوبی ثابت شده است که برای دستیابی به گامت‌های با کیفیت بالا و ایجاد همزمانی در فرآیند تولیدمثل، ضروری است از تیمار هورمونی مناسب برای القای تولیدمثل این ماهی استفاده شود (Zarski et al., 2017). در سال‌های اخیر از انواع تیمارهای هورمونی برای القای رسیدگی نهایی مولدین ماده سوف حاج طرخان استفاده شده است. به عنوان مثال، استفاده از hCG و CPE (Carp Pituitary Extract) برای القای تخم‌ریزی این ماهی در مطالعه Kucharczyk و همکاران (۱۹۹۶) مورد بررسی قرار گرفته است. آنالوگ GnRH (Kouril and Linhart, 1997; Kouril et al., 1997) و تیمار FSH+LH نیز در ترکیب با آنتی‌دوپامین (Kucharczyk et al., 1998) بر بازده تولیدمثل این ماهی مورد ارزیابی قرار گرفته است. Falahatkar و همکاران (۲۰۱۹) نیز اثر hCG و آنالوگ GnRH را در ترکیب با آنتی‌دوپامین دامپریدون بر بازده تولیدمثل نیمه طبیعی ماهی سوف حاج طرخان مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعات بیانگر این موضوع است که برای دستیابی به گامت‌ها و لاروهای با کیفیت مناسب‌ترین روش، تکثیر کنترل شده است. در نتیجه این امر ضروری است که تکثیر کنترل شده این گونه ارزشمند در داخل کشور مورد ارزیابی قرار گرفته و بیوتکنیک تکثیر مصنوعی آن در شرایط اقلیمی کشور در دسترس قرار گیرد. در همین راستا نیاز است با مد نظر قرار دادن مطالعات گذشته، تیمارهای هورمونی مختلف برای القای تولیدمثل کنترل شده این گونه در کشور مورد ارزیابی قرار گیرد.

هدف مطالعه حاضر دستیابی به بیوتکنیک تولیدمثل کنترل شده ماهی سوف حاج طرخان و تدوین راهکار مناسب تکثیر مصنوعی این ماهی در شرایط اقلیمی کشور است. بر همین اساس، در تیمارهای مختلف، القای رسیدگی نهایی مولدین ماده این ماهی با استفاده از هورمون‌های hCG، اواریم (Ovarim^{TM}: sGnRH) و اواپریم (Ovaprim^{TM}: sGnRH + دامپریدون) مورد ارزیابی قرار گرفته است. علاوه بر این، در پژوهش حاضر شاخص‌های اسپرم‌شناختی مولدین نر نیز مورد بررسی قرار گرفته است. با دستیابی به اهداف این پژوهش امکان تکثیر کنترل شده، استحصال گامت‌های

با کیفیت و تولید انبوه این گونه ارزشمند با هدف آبزی‌پروری و بازسازی ذخایر در مراکز تکثیر فراهم خواهد شد.

مواد و روش‌ها

ماهی و شرایط نگهداری

به منظور انجام بررسی حاضر، مولدین سوف حاج طرخان (*Perca fluviatilis*) به وسیله نصب تله مخروطی در نقاط مختلف حوضه غربی تالاب انزلی صید شدند و سپس به وسیله خودروی دارای مخزن اکسیژن به استخرهای خاکی (مساحت ۲۰۰۰ متر مربع) از قبل آماده‌سازی شده در مرکز بازسازی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی ماهیان استخوانی شهید انصاری منتقل شدند (مدت انتقال ۱۲۰ دقیقه). صید مولدین طی ۵ مرحله از مهر ماه تا بهمن ماه سال ۱۳۹۷ انجام پذیرفت و در مجموع ۹۷۳ قطعه مولد با میانگین وزن ۷۱ گرم به سه استخر ۲۰۰۰ متر مربعی معرفی شدند. تغذیه مولدین به وسیله بچه ماهیان طلایی انگشت‌قد که قبل از معرفی مولدین در استخرها پرورش داده شده بودند، انجام شد. از مجموع ماهی‌های صید شده ۸۷۶ قطعه مولد نر و ۹۷ قطعه مولد ماده بودند که از این تعداد به ترتیب ۱۰۰ و ۷۲ قطعه مولد نر و ماده به صورت تصادفی برای انجام آزمایش انتخاب شدند.

در زمان رسیدن دمای آب به ۹ درجه سانتی‌گراد (بهمن ماه)، مولدین صید شدند و با بررسی ظاهری (بررسی میزان نرمی سطح شکمی و بررسی منفذ تناسلی) از نظر جنسیت تفکیک شدند و سپس به مخازن فایبرگلاس ۲۰۰۰ لیتری در سالن انکوباسیون منتقل شدند. در طی زمان نگهداری در سالن انکوباسیون تمامی مولدین یک‌بار در روز با ماهی کیلکا، بچه ماهی طلایی و کرم خاکی به میزان ۱۰ درصد وزن بدن تغذیه شدند. بلافاصله پس از رسیدن دمای آب به ۱۵ درجه سانتی‌گراد، مولدین صید و هورمون‌تراپی شدند.

القای رسیدگی مولدین ماده

در این مطالعه، به منظور تعیین اثر عوامل هورمونی مختلف بر کارایی تکثیر مصنوعی ماهی سوف حاج طرخان از سه تیمار هورمونی مختلف استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱: تیمارهای هورمونی مورد استفاده برای القای تکثیر مصنوعی ماهی سوف حاج طرخان (*Perca fluviatilis*)

تیمار	تعداد مولدین (قطعه)	میانگین وزن (گرم)	میزان تزریق (به ازای کیلوگرم وزن بدن)
شاهد	۱۸	۸۱/۱±۷/۹	۰/۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی
hCG	۱۸	۷۷/۶±۵/۳	۵۰۰ واحد بین‌المللی
اواپریم	۱۸	۷۸/۹±۸/۸	۰/۵ میلی‌لیتر
اواریم	۱۸	۷۹/۲±۹/۵	۰/۵ میلی‌لیتر

در تیمار اول از هورمون hCG (Karma-hCG، همافارمد، ایران) به میزان ۵۰۰ واحد بین‌المللی به ازای هر کیلوگرم وزن بدن مولدین استفاده شد. ابتدا هورمون hCG با ۰/۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی به ازای هر کیلوگرم وزن مولدین به حجم رسانیده شد و سپس عملیات تزریق انجام گرفت. در این تیمار از ۱۸ مولد ماده با میانگین وزن ۷۷/۶±۵/۳ گرم استفاده شد. در تیمار دوم از هورمون اواپریم (Syndel، کانادا) به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن مولدین ماده استفاده شد. به منظور تعیین اثر این هورمون در این تیمار از ۱۸ مولد ماده با میانگین وزن ۷۸/۹±۸/۸ گرم استفاده شد. در تیمار سوم از هورمون اواریم (Congruent Pharmachem، هند) به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن مولدین ماده استفاده شد. به منظور تعیین اثر این هورمون در این تیمار از ۱۸ مولد ماده با میانگین وزن ۷۹/۲±۹/۵ گرم استفاده شد. در تیمار شاهد نیز از ۰/۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی به ازای هر کیلوگرم وزن بدن برای تزریق مولدین ماده استفاده شد. در تیمار شاهد نیز از ۱۸ مولد ماده با میانگین وزن ۸۱/۱±۷/۹ گرم استفاده شد. میزان تزریق هورمون‌ها طبق مطالعات قبل تعیین شد (Kucharczyk et al., 1996, 2001, 2014; Targonska et al., 2014). تمامی تزریق‌ها به صورت یک مرحله انجام گرفت (Zarski et al., 2017). در هر تیمار منفذ تناسلی تعداد ۱۶ قطعه از هر ۱۸ مولد مورد آزمایش بلافاصله بعد از تزریق دوخته شد و ۲ قطعه مولد باقی مانده در هر تیمار نیز بدون دوخته شدن منفذ تناسلی به همراه مولدین دیگر در مخازن مورد نظر قرار داده شدند. در واقع مولدینی که منفذ تناسلی آنها

دوخته نشده بود به عنوان شاخص برآورد زمان دقیق پاسخ‌دهی احتمالی به القای هورمونی در نظر گرفته شدند. در تمامی مولدین تزریق در زیر باله شکمی به صورت داخل صفاقی به وسیله سرنگ انسولین انجام گرفت. قبل از تزریق عملیات بیهوشی مولدین با استفاده از پودر گل میخک (به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) انجام گرفت (Falahatkar et al., 2019). پس از تزریق، مولدین هر تیمار به حوضچه‌های ۲۰۰۰ لیتری جداگانه منتقل شدند. ارتفاع آبگیری حوضچه‌ها ۴۰ سانتی‌متر و میانگین دبی آب ۴/۸ لیتر در دقیقه بود. میانگین دما در طی دوره ۱۵/۲±۰/۴ درجه سانتی‌گراد، میانگین اکسیژن ۸/۰±۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، pH ۷/۷±۰/۲ و دوره نوری ۱۱L:۱۳D بود.

بررسی وضعیت رسیدگی مولدین

۱۸ ساعت پس از تزریق، حوضچه‌ها به منظور مشاهده تخم‌ریزی احتمالی ماهی‌ها هر دو ساعت یک‌بار بررسی شدند. در صورت آمادگی هر ماهی برای تخم‌ریزی، زمان دقیق پاسخ‌دهی به القای هورمونی ثبت شد و سپس با فشار آرام به ناحیه شکمی عملیات تخم‌کشی دستی انجام گرفت. پس اتمام عملیات تخم‌کشی، عملیات لقاح با استفاده از مخلوط اسپرم سه مولد نر انجام شد. تمامی مراحل لقاح طبق روش Kucharczyk و همکاران (۱۹۹۶) انجام گرفت. در هر مرحله قبل از لقاح تخمک‌ها، دسته تخمک‌های هر مولد به وسیله ترازو با دقت ۰/۰۱ گرم وزن شد. مدت زمان رسیدگی مولدین (LT)، درصد پاسخ‌دهی به تزریق (R)، درصد لقاح (F) و مدت زمان تخم‌گشایی (HT) به وسیله رابطه‌های ۱ تا ۴ محاسبه شدند (Akbari Nargesi and Gorouhi, 2024).

رابطه ۱:

$$LT\ (h.°C) = t \times T$$

t: مدت زمان از لحظه تزریق تا تخم‌ریزی (ساعت)؛ T: میانگین درجه حرارت (درجه سانتی‌گراد).

رابطه ۲:

$$R\ (\%) = (E / I) \times 100$$

E: تعداد ماهی‌های تخم‌ریزی کرده؛ I: تعداد ماهی‌های تزریق شده.

رابطه ۳:

$$F\ (\%) = (N_{FE} / N_{TE}) \times 100$$

N_{FE}: تعداد تخم‌های لقاح یافته؛ N_{TE}: تعداد کل تخم‌ها.

رابطه ۴:

$$HT\ (Day.°C) = t \times T$$

t: مدت زمان از لحظه تزریق تا تخم‌ریزی (روز)؛ T: میانگین درجه حرارت (درجه سانتی‌گراد).

شاخص‌های اسپرم‌شناختی

القای مولدین نر به وسیله تزریق هورمون hCG به میزان ۲۵۰ واحد بین‌المللی به ازای کیلوگرم وزن بدن مولدین انجام گرفت. به منظور تعیین شاخص‌های اسپرم‌شناختی، تعداد ۱۰ قطعه مولد نر به صورت تصادفی صید شد (میانگین وزن ۱۳/۵±۶۵/۳ گرم) و پس از بیهوشی به وسیله عصاره پودر گل میخک با فشار آرام به ناحیه شکمی عملیات استحصال اسپرم با استفاده از سرنگ (با حجم ۵ میلی‌لیتر) انجام گرفت. سپس شاخص‌های مربوطه شامل حجم اسپرم، مدت زمان فعالیت، درصد تحرک و درصد اسپرماتوکریت طبق روش Akbari Nargesi و همکاران (۲۰۲۴) اندازه‌گیری شد. به منظور تعیین درصد و مدت زمان فعالیت از میکروسکوپ نوری (Olympus، ژاپن) و کرنومتر استفاده شد. بدین صورت که بلافاصله پس از اضافه کردن آب کارگاه به اسپرم، درصد تحرک با تخمین چشمی ارزیابی شد و مدت زمان فعالیت نیز تا زمانی که ۱۰۰ درصد اسپرماتوزوآها از حرکت ایستادند با کرنومتر ثبت شد. برای تعیین اسپرماتوکریت لوله‌های میکرواسپرماتوکریت به میزان تقریبی سه‌چهارم با اسپرم پر شد و پس از مسدود کردن انتهای لوله‌ها با خمیر مخصوص، از دستگاه میکروسانتریفیوژ (Nuve، ترکیه) برای جداسازی پلاسما از اسپرم استفاده شد (۱۰ دقیقه در دور ۳۵۰۰g)، سپس درصد اسپرماتوکریت توسط خط کش مخصوص تعیین شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنف (Kolmogorov-Smirnov) مورد بررسی قرار گرفت. سپس مقایسه میانگین‌های گروه‌های آزمایشی با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) و پس‌آزمون توکی (Tukey's Test) در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (IBM، آمریکا) نسخه ۲۳ انجام گرفت. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند.

نتایج

جدول ۲ شاخص‌های تولیدمثلی مولدین ماده سوف حاج طرخان را نشان می‌دهد.

جدول ۲: شاخص‌های تولیدمثلی مولدین ماده سوف حاج طرخان (*Perca fluviatilis*) پس از القا با هورمون‌های مختلف در محیط اسارت (میانگین ± انحراف معیار)

شاخص‌ها	تیمار			
	hCG	اواپریم	اواریم	شاهد
مدت زمان رسیدگی (درجه- ساعت)	۴۱۵/۶±۳۳/۰ [c]	۱۱۳۱/۶±۴۳۸/۷ [b]	۱۹۹۴/۲±۱۸۸/۴ [a]	-
درصد پاسخ‌دهی مولدین	۱۰۰ [a]	۱۰۰ [a]	۸۳/۳ [b]	۰ [c]
تعداد در گرم تخمک	۹۴۲/۰±۲۹/۶	۹۵۰/۴±۲۸/۵	۹۴۵/۳±۳۶/۱	-
درصد لقاح	۸۸/۳±۱۰/۶	۸۶/۷±۹/۰	۸۳/۹±۱۰/۸	-
مدت زمان تخم گشایی (درجه- روز)	۱۴۱/۰	۱۳۸/۰	۱۴۵/۵	-

حروف متفاوت در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

در مدت زمان رسیدگی تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی به دست آمد (P<۰/۰۵)، به طوری که سریع‌ترین زمان رسیدگی (۴۱۵/۶ درجه- ساعت) در تیمار hCG مشاهده شد. بالاترین درصد پاسخ‌دهی (۱۰۰ درصد) در تیمارهای hCG و اواپریم مشاهده شد و تفاوت معنی‌داری با تیمار اواریم و گروه شاهد نشان داد (P<۰/۰۵). در تعداد در گرم تخمک، درصد لقاح و مدت زمان تخم‌گشایی تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

بر اساس نتایج به دست آمده در زمینه شاخص‌های اسپرم‌شناختی، میانگین حجم اسپرم ۲/۹±۱/۷ میلی‌لیتر، میانگین تحرک اسپرم ۹۱/۱±۱۳/۴ درصد، میانگین مدت زمان فعالیت اسپرم ۸۴/۴±۱۸/۶ ثانیه و میزان اسپرماتوکریت ۶۸/۳±۹/۴ درصد برآورد شد.

بحث

تکثیر مصنوعی در شرایط اسارت امکان تولید انبوه لارو و بچه ماهی با کیفیت بالا را فراهم می‌سازد (Mylonas et al., 2010). در همین راستا، برای دستیابی به این هدف نیاز است پروتکل تکثیر مصنوعی برای هر گونه و حتی جمعیت‌ها و ذخایر مختلف یک گونه به طور جداگانه ارزیابی و برای بهره‌برداری در دسترس قرار گیرد (Kucharczyk et al., 1996). بر همین اساس، در پژوهش حاضر اثر

تیمارهای هورمونی مختلف برای دستیابی به پروتکل تکثیر کنترل شده ماهی سوف حاج طرخان در شرایط اسارت مورد سنجش قرار گرفت.

در مطالعه حاضر، بالاترین درصد پاسخ‌دهی مولدین به تزریق (۱۰۰ درصد) در تیمارهای hCG و اواپریم مشاهده شد و تفاوت معنی‌داری را با تیمار اواریم و گروه شاهد نشان داد. ثابت شده است که استفاده از آنتی‌دوپامین به همراه هورمون GnRH می تواند سبب بهبود اثرات این هورمون شود. در همین راستا، نتایج مطالعه حاضر نیز بیانگر این موضوع است که استفاده از sGnRH به همراه آنتی‌دوپامین دامپریدون (هورمون اواپریم) اثرات مناسب‌تری در مقایسه با استفاده از sGnRH بدون آنتی‌دوپامین (هورمون اواریم) دارد. با این حال، ثابت شده است که در سوف‌ماهیان اثرات مهاری دوپامین وجود ندارد و این اثرات مناسب‌تر می تواند با کیفیت هورمون اواپریم در ارتباط باشد. در زمینه کارایی و اثربخشی هورمون hCG در سوف‌ماهیان مطالعات متعددی انجام گرفته است (Zarski et al., 2017). نتایج این مطالعات نشان می‌دهد که هورمون hCG کاربردی‌ترین هورمون برای القای رسیدگی نهایی در سوف‌ماهیان از جمله ماهی سوف حاج طرخان است. مطالعه حاضر نیز اثرات مناسب این هورمون را در القای رسیدگی نهایی ماهی سوف حاج طرخان نشان داد. هم‌راستا با گزارش Zarski و همکاران (۲۰۱۷)، اثرگذاری ۱۰۰ درصدی هورمون hCG در مطالعه حاضر نیز بیانگر این موضوع است که در این ماهی اثر مهاری دوپامین وجود ندارد. با توجه به این موضوع، استفاده از هومون hCG می‌تواند رویکرد مناسب‌تری برای القا رسیدگی نهایی در ماهی سوف حاج طرخان باشد.

سریع‌ترین زمان پاسخ‌دهی مولدین به تزریق در پژوهش حاضر در تیمار hCG مشاهده شد و در تیمارهای دیگر تفاوت زمانی زیادی در رسیدگی مولدین مشاهده شد. این نتایج هم‌راستا با مطالعه Falahatkar و همکاران (۲۰۱۹) و Kucharczyk و همکاران (۲۰۰۱) است که پس از القای مولدین ماهی سوف حاج طرخان با تیمارهای مختلف هورمونی (از جمله hCG و GnRH)، سریع‌ترین زمان پاسخ‌دهی به تزریق را در مولدین القا شده با hCG مشاهده کردند. تفاوت مدت زمان پاسخ‌دهی به تزریق در ماهیان القا شده با هورمون‌های مختلف در بسیاری از مطالعات دیگر نیز گزارش شده است. این تفاوت بیانگر این مسئله است که برخی از هورمون‌های القا کننده در سطح غده هیپوفیز

اثر می‌گذارند و ترشح هورمون‌های موثر در سطح تخمدان در این حالت یک فرآیند متوالی است. در حالی که پاسخ تخمدان به برخی دیگر از هورمون‌های القا کننده یک فرآیند تک مرحله‌ای و واحد است و این هورمون‌ها به طور مستقیم در سطح تخمدان اثر می‌گذارند. در همین راستا، در مطالعه حاضر hCG با اثرگذاری تک مرحله‌ای روی تخمدان باعث رسیدگی سریع‌تر مولدین سوف حاج طرخان شد. در حالی که، نتایج استفاده از دو عامل هورمونی دیگر که حاوی GnRH بودند (اواپریم و اواریم) نشان می‌دهد که استفاده از این عوامل هورمونی (با توجه به اثرگذاری متوالی روی تخمدان) سبب رسیدگی دیرتر مولدین نسبت به القا با هورمون hCG می‌شوند.

درصد لقاح در تمامی تیمارهای القا شده با هورمون قابل قبول و بیشتر از ۸۰ درصد بود. البته درصد لقاح مناسب‌تر (۸۸/۳ درصد) در تیمار hCG مشاهده شد. همان طور که در مطالعه حاضر مشاهده شد، در مطالعه Kucharczyk و همکاران (۲۰۰۱) نیز گزارش شده است که پاسخ‌دهی سریع‌تر مولدین پس از القا هومونی، ممکن است سبب بهبود درصد بازماندگی جنین و لارو شود. در واقع می‌توان این گونه استنباط کرد که استفاده از القای هورمونی مناسب سبب استحصال مواد تناسلی مولدین در زمان مناسب و در نتیجه افزایش درصد لقاح و بازماندگی در ماهی سوف حاج طرخان می‌شود.

در این بررسی میانگین حجم اسپرم ماهی سوف حاج طرخان ۲/۹ میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. Alavi و همکاران (۲۰۰۷) میانگین حجم اسپرم ماهی سوف حاج طرخان را ۲/۷ میلی‌لیتر عنوان کردند. در بررسی دیگری Alavi و همکاران (۲۰۱۰) در ماهی سوف حاج طرخان که تغییرات فصلی اسپرم این ماهی را بررسی کردند، میانگین حجم اسپرم را در بازه ۰/۸۵-۰/۱۲ میلی‌لیتر گزارش کردند. در مطالعه Falahatkar و همکاران (۲۰۱۹) نیز میانگین حجم اسپرم ماهی سوف حاج طرخان ۱/۳ میلی‌لیتر گزارش شده است. در مطالعه حاضر، میانگین تحرک اسپرم ۹۱/۱ درصد و میانگین مدت زمان فعالیت اسپرم ۸۴/۴ ثانیه اندازه‌گیری شد. در مطالعه Falahatkar و همکاران (۲۰۱۹) روی ماهی سوف حاج طرخان، میانگین تحرک اسپرم ۸۰/۵ درصد و میانگین مدت زمان فعالیت اسپرم ۱۵۵/۴ ثانیه گزارش شده است. Krol و همکاران (۲۰۰۶) نیز فعالیت اسپرم در ماهی سوف حاج طرخان را در بازه ۸۶/۷-۲۷/۵ درصد گزارش کردند. در این مطالعه در ماهی

سوف حاج طرخان میانگین اسپرماتوکریت ۶۸/۳ درصد اندازه‌گیری شد. در همین راستا، Falahatkar و همکاران (۲۰۱۹) میانگین اسپرماتوکریت در ماهی سوف حاج طرخان را ۸۴/۳ درصد گزارش کردند. در مطالعه Henrotte و همکاران (۲۰۱۰) نیز درصد اسپرماتوکریت در ماهی سوف حاج طرخان در بازه ۸۰-۶۰ درصد گزارش شده است. با توجه به موارد بیان شده تفاوت‌های مشاهده شده در برخی از شاخص‌های اسپرم‌شناختی می‌تواند با اثر تیمار هورمونی، زمان و نحوه نمونه‌برداری، سن و مرحله رسیدگی جنسی مولدین، تفاوت دمایی و شرایط نگهداری در ارتباط باشد.

در مجموع، بر اساس نتایج پژوهش حاضر، با توجه به پاسخ‌دهی مناسب‌تر و همچنین رسیدگی سریع‌تر مولدین القا شده با هورمون hCG، توصیه می‌شود در مراکز تکثیر از این هورمون برای القای تکثیر مصنوعی ماهی سوف حاج طرخان با هدف حفظ و بازسازی ذخایر و همچنین آبزی‌پروری این گونه ارزشمند استفاده شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از تمامی همکارانی که سبب پیشبرد اهداف این پژوهش شدند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

Akbari Nargesi E. 2022. Reproductive performance and physiological changes of the Caspian roach, *Rutilus caspicus* broodstocks under controlled conditions after induction with Ovopel and Ovaprim (In Persian). Ph.D. Thesis, University of Guilan, Iran. 119P.

Akbari Nargesi E. and Gorouhi D. 2024. Ovarian lavage/artificial insemination method as an alternative approach for controlled reproduction of the northern pike (*Esox lucius*). Animal Reproduction Science, 263: 1–8 (107454). doi: 10.1016/j.anireprosci. 2024.107454

Akbari Nargesi E., Falahatkar B. and Zarski D. 2022. Artificial reproduction of Caspian roach, *Rutilus caspicus* following stimulating ovulation with Ovaprim, Ovopel, and their combinations under controlled conditions. Animal Reproduction Science, 238: 1–9 (106932). doi: 10.1016/j.anireprosci.2022.106932

Akbari Nargesi E., Falahatkar B., Zarski D. and Gorouhi D. 2023. The effectiveness of Ovaprim, Ovopel, and their combinations in artificial reproduction of common rudd *Scardinius erythrophthalmus* under controlled conditions. Theriogenology, 199: 114–120. doi: 10.1016/j.theriogenology.2023.01.014

Akbari Nargesi E., Gorouhi D. and Falahatkar B. 2021. The effect of oil-emulsified Ovaprim™ on spawning induction and artificial reproduction of bream (*Abramis brama*) female broodstock (In Persian). Aquatic Physiology and Biotechnology, 8: 1–18. doi: 10.22124/japb.2021.12181.1301

Akbari Nargesi E., Gorouhi D. and Falahatkar B. 2024. Efficacy of sGnRHa in combination with domperidone on the sperm quality, seminal fluid metabolites, and fertilization ability of spermatozoa in Caspian kutum, *Rutilus frisii*. Aquaculture International, 32: 817–832. doi: 10.1007/s10499-023-01189-2

Alavi S.M.H., Rodina M., Hatef A., Stejskal V., Policar T., Hamackova J. and 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.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. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.05.045

Falahatkar B., Akbari Nargesi E., Gorouhi D. and Efatpanah I. 2019. Effect of Ovaprim™ and hCG on spawning induction of Eurasian perch (*Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758) female broodstock (In Persian). Aquaculture Sciences, 6: 13–22.

Henrotte E., Kaspar V., Rodina M., Psenicka M., Linhart O. and 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. doi: 10.1111/j.1365-2109.2009.02452.x

Kouril J. and Linhart O. 1997. Temperature effect on hormonally induced spawning in perch (*Perca fluviatilis*). Polskie Archiwum Hydrobiologii, 44: 197–202.

Kouril J., Linhart O. and Reiot P. 1997. Induced spawning of perch by means of a GnRH analogue. Aquaculture International, 5: 375–377. doi: 10.1023/A:1018372309232

Krol J., Glogowski J., Demska-Zakes K. and 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. doi: 10.17221/3932-CJAS

Kucharczyk D., Kujawa R., Mamcarz A., Skrzypczak A. and Wyszomirska E. 1998. Induced spawning in perch, *Perca fluviatilis* L. using FSH+LH with pimozide or metoclopramide. Aquaculture Research, 29: 131–136. doi: 10.1046/j.1365-2109.1998.00949.x

Kucharczyk D., Kujawa R., Murmurz A., Skrzypczak A. and Wyszomirska E. 1996. Induced spawning in perch, *Perca fluviatilis* L. using carp pituitary extract and hCG. Aquaculture Research, 27: 847–852. doi: 10.1046/j.1365-2109.1996.t01-1-00802.x

Kucharczyk D., Szczerbowski A., Luczynski M.J., Kujawa R., Mamcarz A., Wyszomirska E., Szabo T. and Ratajski S. 2001. Artificial spawning of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L. using ovopel. Fisheries and Aquatic Life, 9: 39–49.

Kucharczyk D., Targonska K. and Chwaluczyk R. 2014. Application of Ovaprim in artificial reproduction of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L. under controlled conditions. Iranian Journal of Ichthyology, 1: 7–11. doi: 10.22034/iji.v1i1.10

Mylonas C.C., Fostier A. and Zanuy S. 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. General and Comparative Endocrinology, 165: 516–534. doi: 10.1016/j.ygcen.2009.03.007

Targonska K., Szczerbowski A., Zarski D., Luczynski M.J., Szkudlarek M., Gomułka P. and Kucharczyk D. 2014. Comparison of different spawning agents in artificial out-of-season spawning of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L. Aquaculture Research, 45: 765–767. doi: 10.1111/are.12010

Zarski D., Horvath A., Bernath G., Krejszeff S., Radoczi J., Palinska-Zarska K., Bokor Z., Kupren K. and Urbanyi B. 2017. Controlled Reproduction of Wild Eurasian Perch: A Hatchery Manual. Springer International Publishing, Switzerland. 102P. doi: 10.1007/978-3-319-49376-3

Zohar Y. 2021. Fish reproductive biology- Reflecting on five decades of fundamental and translational research. General and Comparative Endocrinology, 300: 1–15 (113544). doi: 10.1016/j.ygcen.2020.113544

Zohar Y., Zmora N., Trudeau V.L., Munoz-Cueto J.A. and Golan M. 2022. A half century of fish gonadotropin-releasing hormones: Breaking paradigms. Journal of Neuroendocrinology, 34: 1–33 (e13069). doi: 10.1111/jne.13069

Aquatic Physiology and Biotechnology

Vol. 12, No. 1, Spring 2024

Research Paper

Effect of hCG, Ovaprim™ and Ovarim™ on the efficiency of artificial reproduction of European perch (*Perca fluviatilis*) broodstock

Danial Gorouhi[1,2], Erfan Akbari Nargesi[3,4]*, Bahram Falahatkar[5,6]

Received: May 2023 Accepted: September 2023

Abstract

The present study was performed to determine the effect of hCG, Ovaprim, and Ovarim on the efficiency of artificial reproduction in European perch (*Perca fluviatilis*), as well as the examination of the spermatological parameters of this fish. In the first treatment, hCG was used at 500 IU per kg body weight (BW) of broodstock. In second and third treatments, Ovaprim and Ovarim were used at 0.5mL per kg BW, respectively. The control group was injected with physiological saline at 0.5mL per kg BW. Eighteen female broodstocks with an average weight of approximately 78g were used in each treatment. Male broodstock was induced by injection of hCG at a dose of 250 IU per kg BW. According to the results, the fastest latency time (415.6 degree-hour) was observed in the hCG treatment and showed a significant difference with other treatments ($P<0.05$). The highest ovulation rate (100%) was observed in hCG and Ovaprim treatments and showed significant differences with Ovarim and control groups ($P<0.05$). The experimental treatments did not show any significant differences in other parameters ($P>0.05$). Based on the results, the mean volume of semen, spermatozoa activity, motility time and spermatocrit value of European perch were 2.9±1.7mL, 91.1±13.4%, 84.4±18.6s and 68.3±9.4%, respectively. Results of this study showed that hCG is more suitable than Ovaprim and Ovarim for the induction of spawning and artificial reproduction of European perch. Due to the more favorable effects of hCG, it is recommended to use this hormone in spawning induction and artificial reproduction of European perch broodstock.

Key words: *Sperm, Spawning, Fertilization, Percidae, Broodstock Management.*

1- M.Sc. in Fisheries, Shahid Ansari Teleost Fish Restocking and Genetic Conservation Center, Rasht, Iran.
2- M.Sc. in Fisheries, Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Iran.
3- Ph.D. in Fisheries, Department of Aquaculture, Inland Water Aquaculture Research Centre, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agriculture Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar-e Anzali, Iran.
4- Ph.D. in Fisheries, Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Iran.
5- Professor in Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Iran.
6- Professor in Department of Marine Sciences, The Caspian Sea Basin Research Center, University of Guilan, Rasht, Iran.

*Corresponding Author: erfanakbarinargesi@gmail.com