شماره ۸۳، تابستان ۱۳۸۸

نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)

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

• **وحید زادمجید**
دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان(نویسنده مسئول)
• **محمدرضا ایمانپور**
عضو هیات علمی گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان
• **محمد سوداگر**
استادیار، عضو هیات علمی گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان
• **علی شعبانی**
عضو هیات علمی گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان
تاریخ دریافت: اردیبهشت ماه ۱۳۸۶ تاریخ پذیرش: آبان ماه ۱۳۸۶
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۴۴۸۲۴۲۲۵
Email: zadmajid@gmail.com

چکیده

در ایـن مطالعـه اثرات تزریق اووافکت (GnRHa) بر برخی خصوصیات زیسـت شناسـی منی (طول دوره تحرک اسـپرم، درصد تحرک اسـپرم، اسـپرماتوکریت، تراکم اسـپرم، حجم اسـپرم، pH، سدیم، پتاسیم، کلسـیم، منیزیم، پروتئین کل، کلسـترول و گلوکز) در زیر گونه‌های ماهیان *Carassius auratus* gibelio قرمزسـاده، دم چادری، چهاردم و چهاردم دم چادری از هر تیمار ۱۰ مولد مورد بررسـی قرار گرفت. هورمون GnRHa مخلوط شده با دامپریدون به میزان ۱۰ میکروگرم به ازای کیلوگرم وزن بدن مورد استفاده قرار گرفت. بین pH در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشـت (P >۰/۰۱)، به گونه‌ای که در تیماراول(سـاده) بالاترین pH اندازه گیری شـد (۸/۸۸ ±۰/۴۲). بین طول دوره حرکت و درصد اسـپرم‌های متحرک در تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز اختلاف معنی‌داری مشـاهده شد (P >۰/۰۵)، به گونه‌ای که طول دوره حرکت و درصد تحرک در تیمار اول (ساده) نسبت به سایر تیمارها بالا تر بود (۸۳/۶۵ ±۲۱/۰۵ و ۸۸/۱۹ ±۵/۶۵ به ترتیب)، در صورتی که اسپرماتوکریت (٪) و تراکم اسپرم ($۱۰^{۹}$× عدد) در تیمارهای سوم (چهاردم) و چهارم (چهاردم دم چادری) نسـبت به سـایر تیمارها بالا تر بود (۵۳/۳۸±۵/۶۶ و ۷/۸۱ ±۱/۵۸ به ترتیب). همچنین بالاترین حجم اسـپرم در تیمار اول اندازه گیری شـد (۰/۹۲ ±۰/۴۶ میلی‌لیتر). بین غلظت یون‌های سـدیم، پتاسیم و کلسـیم در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P >۰/۰۵). در صورتی که بالاترین غلظت یون منیزیم در تیمار چهار اندازه گیری شد (۱/۵۷±۰/۲۶ میلی مول در لیتر). همچنین بین میزان کلسـترول و پروتئین کل در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری مشـاهده نشـد (P >۰/۰۵). در صورتی که بالاترین میزان گلوکزدر تیمار چهار اندازه گیری شد (۰/۳۰ ±۰/۳۳ میلی گرم در دسی لیتر). از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت هورمون GnRHa تاثیر معنی‌داری روی ترکیبات منی در ماهی قرمز ساده و چهاردم دم چادری نسبت دم چادری و چهاردم دارد.

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

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

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

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

In this study, the effect of hormon Ovafact (GnRHa) on biological semen characteristics (motility duration, percentage of motile spermatozoa, spermatocrit, sperm density, milt volume, pH, Na^+, K^+, Ca^+, Mg^{2+}, total protein, cholesterol and glucose) in sub species commons, comets, wakins and fantail goldfish (*Carassius auratus* gibelio) males was compared. From each treatment ten males has been investigated. Fish injected with with 10µg kg^{-1} GnRHa combined with domperidone. There was a highly significant difference of seminal plasma pH among treatments (p<0/01), as the highest value of pH observed in commons treatment (8.88±0.42). There were a highly significant difference in percentage of motile spermatozoa and motility duration among treatments (p<0/05) as the highest value percentage of motile spermatozoa and motility duration observed in commons treatment (83.65± 21.05, 88.19±5.65 respectively). While the highest value of spermatocrit (%) and sperm density ($\times 10^9$ number) observed in waking and fantail treatments (53.38± 5.66, 7.81± 1.58 respectively). Also the highest value of milt volume observed in commons treatment (0.92± 0.46 ml). But there were no significant difference in Na+, K+, Ca+ among treatments (p>0/05), While the highest value of Mg^{2+} observed in fantail (1.57±0.26 mmol/l). Likewise there were no significant difference in total protein and cholesterol among treatments (p>0/05), While the highest value of glucose observed in fantail (0.3± 0.33 mg/dl). The present study demonstrated that GnRHa have been more effective on biological characteristics of semen in commons and fantail than comet and wakins.

Keywords: Glucose, Insulin, Food intake, Chicken.

مقدمه

ماهـی *Carassius auratus* gibelio از خانـواده کپـور ماهیان می‌باشـد، خانواده ماهی قرمز بسیار متنوع و از انواع زیادی تشکیل شده است و بیشترین طرفداران این ماهی‌ها در ژاپن و چین هستند. سرسختی، مقاومـت و زیبایی این ماهی‌ها باعث شـده اسـت روز بـه روز طرفداران بیشـتری پیدا کنند و هر روز کارشناسان پرورش ماهی با استفاده از علم ژنتیـک و وراثت، نژادها و گونه‌های جدیـدی را تولید می‌کنند. تا کنون حدود ۱۰۰ نوع ماهی طلایی بوجود آمده است. که فقط چند گونه از آنها به ایران آورده شـده‌اند که تمام آنها با موفقیت تکثیر و پرورش یافته‌اند، از این ماهی نژادهای فراوانی گرفته شـده اسـت. از آن جمله می‌توان به دم چادری، سـر شیری، سر مرواریدی، چشـم تلسکوپی و چندین گونه دیگر اشـاره کرد. ماهی قرمز با فرهنگ و عقاید مردم در سراسـر جهان عجین شـده و یک ماهی بسـیار مهـم به لحاظ اقتصادی می‌باشـد(۱). در بسـیاری از ماهیان اوولاسـیون، اسـپرم ریزی و تخم‌ریزی در شرایط پرورشـی به صورت کامل صورت نمی‌گیـرد و تزریق هورمون برای القای تخم‌ریزی و اسـپرم ریزی و همزمانی آزاد سـازی گامت‌ها در کارگاه‌های پرورش ماهی امری ضروری می‌باشـد(۲۳). عملکـرد ناقص تولید مثلی ممکن اسـت در نتیجه شرایط نامناسب محیطی نظیر استرس باشد، که باعث عدم رهاسـازی هورمونGTH از هیپوفیـز در نتیجه عدم توانایی اسـپرم ریزی در نرهـا و کاهش کیفیت و کمیت اسـپرم می‌گردد(۱۳). راهکردهـای زیادی برای غلبه بر این ناتوانی تولید مثلی در ماهیان وجود دارد از جمله دستکاری سیستم درون ریز که با استفاده از انواع هورمون‌ها هم‌چون HCG ،GnRH، ۱۱کتوتستوسـترون، استروژن، پروژسترون و عصـاره هیپوفیز امکان‌پذیر می‌باشـد. GnRH ازدسـته هورمون‌های پپتیدی می‌باشـد، که تاثیر بسـیار زیادی روی رهاسـازی هورمون‌های گنادوتروپیـن (GTHs) دارد (۲۳). هورمـون GnRH بـه صـورت موفقیت‌آمیـزی در ماهیان آب شـیرین و دریایی در ایران و سـایر نقاط جهان مورد اسـتفاده قرار گرفته اسـت. (۲، ۳، ۱۸، ۲۳). تحقیق صورت گرفته توسـط درافشـان و همکاران (۱۳۸۱)، در قزل آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) نشـان داد که GnRHa ترکیبی فعال و موثر جهت القای رسـیدگی و همزمانی رسـیدگی در مولدین این گونه می‌باشد (۲). همچنین مطالعات Paykan Hyrati و همکاران، نشان داد که هورمون GnRHa موجبات تکثیر موفقیت آمیز ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) را فراهـم مـی آورد(۱۸). مطالعات صورت گرفتـه توسـط Lim و همـکاران، ۲۰۰۴ نشـان می‌دهد کـه هورمون GnRH از طریـق تاثیـر بر غده هیپوفیـز باعث افزایـش GTH و در

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

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

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

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

مواد و روش‌ها

مولدین و تهیه نمونه

این تحقیق در طی ماه‌های اسفند ۱۳۸۵ و فروردین، اردیبهشت و خرداد ۱۳۸۶ در مرکز تحقیقات آبزی پروری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده شیلات واقع در پردیس صورت گرفت. تعداد ۱۰۰ عدد ماهی مولد قرمز نر هم سن (با میانگین طول کل ۱/۷۵ ± ۲۲/۳ سانتی‌متر و با میانگین وزن ۲۲/۰۷ ± ۵۶/۱۶ گرم) جهت انجام مراحل آزمایش از مراکز تکثیر ماهیان زینتی در استان گلستان تهیه شده، در ۱۵ اسفند ماه به مرکز تحقیقات آبزی پروری دانشکده شیلات منتقل گردید و ماهیان در حوضچه‌های و نیرو با هوادهی ملایم تا اوایل اردیبهشت نگهداری شدند. در نهایت ماهیان به چهار تیمار قرمزساده، دم چادری، چهاردم و چهاردم دم چادری تقسیم شده و در هر تیمار ۱۰ ماهی بطور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. به همه گروه ها به میزان ۱۰ میکروگرم به ازای کیلوگرم وزن بدن هورمون اووافکت (GnRHa)،(Glu-His-Tyrp-Ser-Tyr-Gly-Trp-Leu-Pro-Gly-NH۲) به صورت عضلانی و در ناحیه پشتی تزریق بعمل آمد [۲۳]. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از زمان تزریق پس از خشک کردن منفذ تناسلی بدون آلودگی با آب یا ادرار، با فشار ملایم به ناحیه شکمی از ماهیان مولد نر اسپرم گیری بعمل آمد(۷).

آنالیز حرکتی اسپرم

برای شروع حرکت، اسپرم با محلول فعال کننده (آب مقطر) به نسبت ۱:۲۰۰۰ رقیق شد و پارامترهای حرکتی اسپرم بلافاصله (با تاخیر زمانی کمتر از۷ ثانیه) بعد از شروع فعالیت اسپرم تا زمانیکه ۱۰۰ درصد اسپرم‌ها غیرمتحرک شدند توسط میکروسکوپ متصل به دوربین (استرئومیکروسکوپ) ثبت و روی صفحه مانیتور نشان داده شد، در ادامه با استفاده از نرم افزار Adobe premeier هر ثانیه به ۶ فریم تبدیل شد و با مقایسه دو فریم متوالی، درصد اسپرم‌های متحرک محاسبه شد. برای اندازه‌گیری مدت زمان حرکت اسپرم، زمان تحرک از لحظه فعال شدن تا زمانی‌که همه اسپرم‌ها از حرکت باز ایستادند اندازه‌گیری شد(۲۲) و مشاهدات در دمای اتاق (۲۲-۲۰ سانتی‌گراد) صورت گرفت.

اندازه‌گیری اسپرماتوکریت

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

اندازه‌گیری تراکم اسپرم

تراکم اسپرم با روش استاندارد هماسیتومتری با رقیق کردن اسپرم به نسبت ۱:۲۰۰۰ و با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست (Leica- Gallen-III. CCD-Gp۲۴۰) زمینه سیاه با درشت نمایی ۱۰ اندازه‌گیری شد و با واحد $۱۰^{۹}$× در هر میلی لیتر سمن محاسبه شد.

اندازه گیری pH مایع اسپرمی

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

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

اندازه‌گیری حجم اسپرم‌دهی

برای این منظور با اســتفاده از ســرنگ انسولین یک میلی لیتر حجم اسپرم‌دهی ماهیان اندازه‌گیری شد.

اندازه گیری یون کلسیم (طول موج ۵۷۵ نانومتر)

جدول ۱- روش آماده کردن نمونه، شــاهد و اســتاندارد جهت اندازه گیری یون کلســیم مایع اسپرمی ماهی قرمز

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

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

اندازه گیری یون منیزیم (طول موج ۵۲۰ نانومتر)

جدول۲- روش آماده کردن نمونه، شــاهد واســتانداردجهت اندازه گیــری یون منیزیم مایع اسپرمی ماهی قرمز

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

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

اندازه گیری پروتئین کل (طول موج ۵۴۰ نانومتر)

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

عامل	استاندارد (میکرولیتر)	نمونه (میکرولیتر)	شاهد (میکرولیتر)
استاندارد	۲۰	-	-
پلاسمای اسپرمی	-	۲۰	-
معرف مخلوط شده ۱و۲	۱۰۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰

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

اندازه گیری گلوکز،کلسترول (طول موج ۵۴۶ نانومتر)

جدول۴- روش آماده کردن نمونه (اســتاندارد) و بلانک جهت اندازه‌گیری گلوکز،کلســترول مایع اسپرمی ماهی قرمز

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

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

۲۰۰× (جذب استاندارد / جذب نمونه) = غلظت کلسترول پلاسمای اسپرمی

اندازه‌گیری ترکیبات بیوشیمیایی پلاسمای منی

برای اندازه گیری کلســیم، منیزیم، گلوکز، کلســترول و پروتئین از دستگاه اســپکتروفتومتر (UV/VIS,Cambridge--WPA-S۲۰۰۰ UK) با اســتفاده از کیت‌های کلســیم، منیزیــم، پروتئین کل، گلوکز و کلسترول (شرکت پارس آزمون) مطابق جداول زیر عمل شد (۲۰).

بــرای اندازه‌گیــری ســدیم و پتاســیم از دســتگاه فلیــم فتومتــر (England ,۷ Jenway pfp) اســتفاده شد، برای این کار ابتدا میزان جذب شــعله تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اســتاندارد خوانده شــد و توسط نرم افزارExcel معادله رگرسیونی آن ترسیم و غلظت‌های سدیم و پتاسیم در پلاسمای اسپرمی محاسبه شد.

روش تجزیه و تحلیل

شیوه نمونه‌برداری به صورت تصادفی و در قالب طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت. داده‌های به دســت آمده در ارتباط با مدت زمان و درصد حرکت اســپرم، pH مایع اسپرمی، اسپرماتوکریت، تراکم اسپرم، حجم اسپرم، سدیم، پتاسیم، کلسیم، منیزیم، پروتئین کل، کلسترول و گلوکز در چهار گروه قرمزســاده، دم چادری، چهاردم و چهاردم دم چادری به کمک آزمون دانت در سطح ۹۵ درصد (α= ۰/۰۵) توسط آنالیز واریانس یک طرفه، با استفاده از نرم‌افزار SPSS با یکدیگر مقایسه شدند.

نتایج

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

پارامترهای اسپرم شناختی منی

pH

نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میانگین pH بین تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز در جدول ۵ نشــان داده شــده اســت. همانگونه که در جدول مشــاهده می‌شــود بین pH در تیمارهــای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P >۰/۰۱)، به گونه‌ای که در تیمار اول (ساده) بالاترین pH مشاهده شد.

جدول۵- آمار توصیفی پارامترهای اسپرم شناختی منی در ماهیان *Carassius auratus* gibelio قرمزساده، دم چادری، چهاردم و چهاردم دم چادری

متغیرها	pH	حجم اسپرم (میلی لیتر)	طول دوره حرکت (ثانیه)	تراکم اسپرم ۱۰^۹×	درصداسپرم متحرک(٪)	اسپرماتوکریت (٪)
تیمار۱ (ساده)	a ۸/۸۸± /۴۲	a ۰/۹۲± /۴۶	a ۸۳/۶۵± ۲۱/۰۵	ab ۷/۳۸± ۳/۶۷	a ۸۸/۱۹± ۵/۶۵	c ۳۹/۹۵± ۱۰/۰۸
تیمار۲ (دم چادری)	ab ۸/۶۱ ±۰/۲۶	bc /۴۹ ±۰/۴۲	ab ۷۹/۳۰ ±۱۱/۲۷	b ۵/۱۰ ±۲/۹۰	b ۷۲/۹۸ ±۱۶/۰۳	bc ۴۲/۹۲ ±۱۱/۳۴
تیمار ۳ (چهاردم)	b ۸/۴۳±/۳۹	ab /۶۰ ±۰/۴۳	b ۶۳/۳۸±۹/۶۲	b ۵/۰۳±۲/۲۴	ab ۸۳/۸۲±۱۱/۵۳	a ۵۳/۳۸±۵/۶۶
تیمار۴ (چهاردم دم چادری)	b ۸/۳۳ ±/۲۸	c ۰/۲۲ ±/۱۲	ab ۷۰/۸۹ ±۲۱/۸۷	a ۷/۸۱ ±۱/۵۸	b ۷۱/۷۸ ±۲۱/۲۹	ab ۴۹/۳۰ ±۹/۹۲

طول دوره تحرک اسپرم و درصد اسپرم‌های متحرک

همانگونه که در جدول ۵ مشاهده می‌شود بین طول دوره حرکت و درصد اسپرم‌های متحرک در تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($P > ۰/۰۵$)، به گونه‌ای که طول دوره حرکت و درصد تحرک در تیمار اول (ساده) نسبت به سایر تیمارها بالاتر بود.

اسپرماتوکریت و تراکم اسپرم

همانگونه که در جدول ۵ مشاهده می‌شود بین اسپرماتوکریت و تراکم اسپرم در تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($P > ۰/۰۵$)، به گونه‌ای که اسپرماتوکریت و تراکم اسپرم در تیمارهای سوم (چهاردم) و چهارم (چهاردم دم چادری) به ترتیب نسبت به سایر تیمارها بالاتر بود.

حجم اسپرم‌دهی

نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میانگین حجم اسپرم بین تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز در جدول ۵ نشان داده شده است. همانگونه که در جدول مشاهده می‌شود بین حجم اسپرم در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P > ۰/۰۱$)، به گونه‌ای که در تیمار اول (ساده) بالاترین حجم اسپرم مشاهده شد.

پارامترهای بیوشیمیایی پلاسمای اسپرمی

غلظت یون‌های سدیم و پتاسیم

نتایج آنالیز واریانس و مقایسه غلظت یون‌های سدیم و پتاسیم

جدول۶- آمار توصیفی ترکیبات یونی پلاسمای اسپرمی در ماهیان *Carassius auratus* gibelio قرمزساده، دم چادری، چهاردم و چهاردم دم چادری

متغیرها	سدیم (میلی مول در لیتر)	پتاسیم (میلی مول در لیتر)	کلسیم (میلی مول در لیتر)	منیزیم (میلی مول در لیتر)
تیمار۱ (ساده)	a ۲۱۲/۱۰± ۳۳/۷۲	a ۱۸/۶۵± ۱۲/۰۴	a ۰/۸۱± ۰/۴۸	b ۱/۲۴ ±۰/۳۲
تیمار۲ (دم چادری)	a ۱۹۵/۲۰ ±۵۳/۰۸	a ۲۳/۴۰ ±۸/۶۴	a ۰/۸۳ ±۰/۵۲	ab ۱/۵۰±۰/۲۶
تیمار ۳ (چهاردم)	a ۱۸۱/۰±۱۷/۲۱	a ۱۸/۴۹±۸/۰۵	a ۰/۸۸±۰/۲۴	ab ۱/۴۸±۰/۲۸
تیمار۴ (چهاردم دم چادری)	a ۲۲۰/۲۰ ±۶۵/۵۶	a ۱۶/۶۳ ±۹/۷۶	a ۰/۴۹ ±۰/۴۱	a ۱/۵۷±۰/۲۶

جدول۷- آمار توصیفی ترکیبات آلی پلاسمای اسپرمی در ماهیان *Carassius auratus* gibelio قرمزساده، دم چادری، چهاردم و چهاردم دم چادری

متغیرها	پروتئین کل (گرم در دسی لیتر)	گلوکز (میلی گرم در دسی لیتر)	کلسترول (میلی گرم در دسی لیتر)
تیمار۱ (ساده)	a ۰/۰۱۰±۰/۰۳	b ۰/۰۲۰±۰/۰۵	a ۰/۹۰ ±۰/۰۳
تیمار۲ (دم چادری)	a ۰/۱۳۰±۰/۰۸	b ۰/۰۲۰±۰/۰۴	a ۰/۰۹ ±۰/۰۷
تیمار ۳ (چهاردم)	a ۰/۰۶±۰/۰۲	b ۰/۱۳±۰/۱۷	a ۰/۱۸±۰/۱۸
تیمار۴ (چهاردم دم چادری)	a ۰/۰۲ ±۰/۰۳	a ۰/۳۰ ±۰/۳۳	a ۰/۱۴ ±۰/۰۹

پلاسمای اسپرمی بین تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز در جدول ۶ نشان داده شده است. همانگونه که در جدول مشاهده می‌شود، بین غلظت یون‌های سدیم و پتاسیم در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P >۰/۰۵).

غلظت یون‌های کلسیم و منیزیم

نتایج آنالیز واریانس و مقایسه غلظت یون‌های کلسیم و پتاسیم پلاسمای اسپرمی بین تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز در جدول ۶ نشان داده شده است. همانگونه که در جدول مشاهده می‌شود، بین غلظت یون کلسیم در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P >۰/۰۵). در صورتی که بین غلظت یون منیزیم در تیمارهای مختلف اختلاف معنی داری وجود داشت (P >۰/۰۵)، به گونه‌ای که بالاترین غلظت منیزیم در تیمار اول مشاهده شد.

گلوکز و کلسترول

نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میزان گلوکز و کلسترول پلاسمای اسپرمی بین تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز در جدول ۷ نشان داده شده است. همانگونه که در جدول مشاهده می‌شود، بین میزان گلوکز در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P <۰/۰۵)، به گونه‌ای که بالاترین میزان گلوکز در تیمار چهار مشاهده شد. در صورتی که بین میزان کلسترول در تیمارهای مختلف اختلاف معنی داری وجود نداشت(P >۰/۰۵).

پروتئین کل

نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میانگین میزان پروتئین کل بین تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز در جدول۷ نشان داده شده است. همانگونه که در جدول مشاهده می‌شود، بین میزان پروتئین کل در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P >۰/۰۵).

بحث

مطالعه حاضر نشان داد هورمون GnRHa تاثیر معنی‌داری روی ترکیبات اسپرمی در واریته‌های مختلف ماهی قرمز دارد. طبق مشاهدات این تحقیق هورمون GnRHa بطور معنی داری باعث افزایش pH مایع سمینال در تیمار اول (ساده) شد (۸/۸۸± ۰/۴۲). که با تحقیقات Miura و همکاران، ۱۹۹۱ هم‌خوانی دارد، این محققین نشان دادند که در گونه *Oncorhynchus masou* هورمون ۱۷ آلفا-۲۰ بتا-دی هیدروکسی -۴ پرگنن- ۳ و ۱ (۲۰β-DP,۱۷α) باعث افزایش pH در مجرای اسپرم بر می‌شود که در نهایت موجب افزایش cAMP در اسپرم شده و زمینه شروع حرکت اسپرم را فراهم می‌نماید(۱۵). همچنین Clearwater و Crim (۱۹۹۸) گزارش کردند که تزریق هورمون GnRHa در ماهی کفشک زرد باله (*Pleuronectes.ferruineus*) باعث افزایش pH پلاسمای سمینال می‌شود(۹). بنظر می‌رسد در این تحقیق هورمون اووافکت از مسیر افزایش هورمون دی هیدروکسی پروژسترون تحت تاثیر آزادسازی GTH-II باعث افزایش pH پلاسمای اسپرمی ماهی قرمز می‌شود. در مجموع ماهیان مختلف عکس

العمل‌های متفاوتی نسبت به pH از خود نشان می‌دهند، به گونه‌ای که Alavi و Cosson (۲۰۰۵)، گزارش کردند که pH مهم‌ترین مشخصه پلاسمای سمینال می‌باشد که روی پتانسیل حرکتی در اسپرم کپور ماهیان تاثیر می‌گذارد(۴). بین طول دوره حرکت و درصد اسپرم‌های متحرک در تیمارهای مختلف مولدین ماهی قرمز اختلاف معنی‌دار وجود داشت (P >۰/۰۵)، به گونه‌ای که طول دوره حرکت و درصد تحرک در تیمار اول (ساده) نسبت به سایر تیمارها بالاتر بود (۲۱/۰۵ ±۸۳/۶۵ و ۵/۶۵ ±۸۸/۱۹ به ترتیب)، در صورتی که اسپرماتوکریت و تراکم اسپرم در تیمارهای سوم (چهاردم) و چهارم (چهاردم دم چادری) نسبت به سایر تیمارها بالاتر بود (۵/۶۶±۵۳/۳۸ و ۱/۵۸ ±۷/۸۱ به ترتیب). همچنین بالاترین حجم اسپرم در تیمار اول اندازه گیری شد (۴۶/ ±۰/۹۲ میلی‌لیتر). Mylonas و همکاران نشان دادند، استفاده از هورمون GnRHa فرایند اسپرم ریزی را بطور معنی‌داری در گونه‌های مختلف ماهیان بدون اینکه باعث کاهش تراکم، تحرک و ظرفیت لقاح اسپرماتوزوآ شود تحریک می‌کند (۱۶). در این تحقیق مشاهده شد زیرگونه چهاردم دم چادری پایین‌ترین حجم اسپرم را نسبت به سایر زیرگونه‌ها دارد، در نتیجه بالاترین تراکم اسپرم راخواهد داشت، که با تحقیقات Alavi و همکاران هم‌خوانی دارد، این محققین نشان دادند درگونه‌هایی که حجم اسپرم پایین می‌باشد معمولا جهت جبران حجم کم اسپرم واجد اسپرمی با تراکم بالا می‌باشند (۶). از طرفی دیگر Vermeirssen و همکاران بیان کردند تراکم بالای اسپرم در شرایط اسارت می‌تواند پدیده‌ای مشکل ساز باشد زیرا چسبندگی اسپرم بالا می‌رود و در هنگام ترکیب با آب جداسازی و شرایط تحرکی اسپرم با مشکل مواجه می شود و چون طول دوره تحرک اسپرم پایین می‌باشد، در نتیجه اسپرم زمان کافی برای تحرک در این شرایط چسبندگی بالا پیدا نخواهد کرد در نهایت از بین می‌رود و تعداد محدودی که باقی می‌مانند به شرایط مورفولوژیکی ناقصی دچار می‌شوند و توانایی ورود به میکروپیل یا انتقال صفات ژنتیکی را از دست می‌دهند (۲۳). مطالعات Harald و همکاران (۲۰۰۱) در گونه‌هالیبوت اقیانوس اطلس (*Hippoglossus hippoglossus*)، نشان داد که تزریق هورمون GnRHa باعث افزایش تراکم اسپرم از ۲×۱۰^{۱۱} به ۶×۱۰^{۱۱} اسپرماتوزوا در میلی لیتر سمن می‌شود (۱۱). در این مطالعه مشاهده شد که گونه قرمز ساده در مقایسه با زیرگونه‌های دم چادری، چهاردم و چهاردم دم چادری بالاترین در صد تحرک را دارا می‌باشد که این تحرک بالا می تواند در نتیجه حجم بالای اسپرم و بالا بودن pH اسپرم این گونه نسبت به سایر گونه‌ها باشد. همچنین در این تحقیق به دلیل دو مرحله ای بودن تزریق GnRHa به فاصله زمانی ۱۲ ساعت حجم اسپرم افزایش معنی داری داشت. تحقیقات درافشان و همکاران (۱۳۸۱)، در قزل آلای رنگین کمان نشان داد که دو تزریق متوالی از هورمون GnRHa به فاصله زمانی ۱۲ ساعت به منظور حصول بهترین نتیجه مناسب می باشد، در این حالت احتمالاً اثر تزریق مقدماتی با تزریق نهایی تشدید و تقویت می‌شود. افزایش غلظت تستوسترون سرم در ۲۴ ساعت پس از اولین تزریق که بیانگر اثر محرک GnRHa به تحریک ترشح GTH و در نتیجه تحریک گنادها به تولید استروئیدهای جنسی (تستوسترون) می‌باشد موید این مسئله است(۲). مطالعات Zohar و Mylonas (۲۰۰۱)، نشان داد تزریق یک مرحله‌ای GnRHa باعث کوتاه مدت شدن دوره اسپرم سازی می‌شود در صورتی که تزریق دو مرحله‌ای این هورمون باعث طولانی شدن دوره اسپرم‌سازی و در نتیجه افزایش حجم اسپرم‌دهی می‌شود و ثابت شده اسپرمی با حجم بالا اگر چه رقیق می باشد ولی در صد تحرک بالایی خواهد داشت (۲۴). Lim و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند که هورمون GnRH از طریق تاثیر بر غده هیپوفیز باعث افزایش GTH و در نتیجه افزایش حجم اسپرم می‌شود (۱۳). در این تحقیق بین غلظت یون‌های سدیم، پتاسیم و کلسیم در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P >۰/۰۵). در صورتی که بین غلظت یون منیزیم در تیمارهای مختلف اختلاف معنی داری وجود داشت (P >۰/۰۵)، به گونه ای که بالاترین غلظت منیزیم در تیمار چهار اندازه‌گیری شد (۰/۲۶±۱/۵۷میلی مول در لیتر). مطالعات Kowalski و همکاران (۲۰۰۶) در گونه اسملت اروپایی (*Osmelus eperlamus* L.) نشان داد، تزریق هورمون HCGتاثیری روی یون‌های سدیم و پتاسیم مایع سمینال در این گونه ندارد (۱۲). اطلاعات در رابطه با عملکرد یون منیزیم در اسپرم ماهیان محدود می باشد، در مورد ماهیان خاویاری ثابت شده، اگر غلظت یون منیزیم به ۱۵میلی مول در لیتر برسد تاثیر منفی روی تحرک اسپرم خواهد داشت (۴). می‌توان بیان کرد در زیرگونه چهار دم دم چادری به علت pH پایین و منیزیم بالا طول دوره تحرک نسبت به سایر زیرگونه‌ها پایین‌تر می‌باشد. روابط آشکاری بین ترکیب پلاسمای سمینال، اسمولاریته و مدت زمان تحرک اسپرم در ماهیان وجود دارد. پارامترهای مختلفی مثل غلظت یون‌ها (پتاسیم، سدیم و کلسیم) فشار اسمزی، pH، دما و نسبت رقیق‌سازی روی حرکت اسپرم موثرند(۵). مطالعات Morisawa و همکاران در سال ۱۹۸۳ نشان داد عامل اصلی ممانعت‌کننده تحرک اسپرم در آزاد ماهیان و ماهیان خاویاری پتاسیم خارج سلولی می‌باشد، در صورتی که یون‌های پتاسیم سرعت حرکت اسپرم را در کپور معمولی افزایش می‌دهند، این نتایج اساساً نشان می‌دهد که اسپرم کپورماهیان نسبت به آزادماهیان به یون پتاسیم حساسیت کمتری دارد، یونهایی مانند سدیم، کلسیم و منیزیم اثر بازدارندگی یون پتاسیم را خنثی کرده و کاتیونهای دو ظرفیتی نسبت به سدیم بسیار مؤثرترند (۱۷). همچنین در این مشاهده شد بین میزان کلسترول و پروتئین کل در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P >۰/۰۵). در صورتی که بین گلوکز در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت(P >۰/۰۵)، به گونه‌ای که بالاترین میزان گلوکز در تیمار چهار اندازه گیری شد (۰/۳۳ ±۰/۳۰ میلی گرم در دسی لیتر). اطلاعات در مورد ترکیبات آلی اسپرم ماهیان محدود می‌باشد، به گونه‌ای که Secer و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند نقش پروتئین، گلوکز و کلسترول در اسپرم ماهیان ناشناخته می‌باشد. اندک اطلاعات صورت گرفته نشان می‌دهد پروتئین و کلسترول می‌توانند نقش حفاظتی در اسپرم داشته باشد بخصوص در مورد تغییرات دمایی، زمانی اسپرم از مجرای اسپرم بر وارد محیط بیرونی می‌شود، در صورتی که گلوکز به عنوان یک منبع انرژی‌زا در طی فرایند اسپرم‌سازی می‌تواند نقش داشته باشد. همچنین مطالعات این محققین در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) نشان داد،

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

سپاس‌گزاری

از مســئولین آزمایشــگاه مرکزی دانشگاه علوم کشــاورزی و منابع طبیعی گرگان بخصوص از کارشناســان محتــرم خانم مهندس ماهرخ شــربت‌خوری و مینو رســتگار به دلیل در اختیار قــرار دادن امکانات و راهنمایی‌های لازم در این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

۱- ایمانپــور، م.ر. و کمالی، ا. (۱۳۸۵). بررســی تکثیر مصنوعی و پرورش لارو های ماهی قرمز *Carassius auratus* gibelio توســط HCG. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، سال (۱۳)، شماره (۲).

۲- درافشــان، س.، مجــازی امیــری، ب.، حاجــی زاده، ع.، مصطفــوی، ح. و پیــکان حیرتــی، ف.، (۱۳۸۱). القاء تکثیر جنس ماده قــزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با اســتفاده از هورمون سنتز شده GnRHa. مجله علمی شیلات ایران، شماره ۳، سال یازدهم، صفحات ۲۳-۳۸.

۳- وزیرزاده، آ.، حاجی مرادلو، ع.، اسماعیلی، ح.ر، و اخلاقی، مصطفی.، (۱۳۸۶). بررسی امکان رســانش پایدار هورمون GnRHa با استفاده از آدجوانت ناقص فروند (FIA) در ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران، شماره ۲، سال شانزدهم، صفحات ۱۴۵-۱۵۲.

4- Alavi, S.M.H., and Cosson, J. (2005). Sperm motility and fertilizing ability in the Persian sturgeon *Acipenser persicus*. *Aquacult Res* 36, 841-850.

5- Alavi., S.M.H., and Cosson,J. (2006). Sperm motility in fishes. II. Effects of ions and osmolality: A *review, cell biology international* 30, 1-14.

6- Alavi., S.M.H., Rodina, M., Policar, T., Kozak, P., Psenicka, M. and Linhart, O. (2007). Semen of *Perca fluviatilis* L.: Sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility. *Theriogenology* 68, 276–283.

7- Astu.riano, J.F., Mrco-Jimenez, F., Perez, L., Balasch, S., Garzon, D.L., Penaranda, D.S., Vicente, J.S., Viudes-de-Castro, M.P. and Jover, M. (2006). Effect of HCG as spermiation inducer on European eel semen quality. *Theriogenology* 66, 1012-1020.

8- Ciereszko, A., Glogowski, J. and Dabrowski, K. J. (2000). *Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freash water fishes*.WAS, Baton Roug.p.20-48

9- Clearwater, S.J.and Crim, L.W. (1998). Gonadotropin releasing hormone-analogue treatment increases sperm motility, seminal plasma pH and sperm production in yellowtail flounder Pleuronectes ferrugineus. *Fish Physiol. Biochem*. 19, 349–357.

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

11- Harald, B.T., Tillmann, J.B., Deborah, J.M.R. and Joanne, P. (2001). The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. *Aquaculture* 194, 191– 200.

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

13- Lim, H.K., Pankhurst, N.W.and Fitzgibbon, Q.P. (2004). Effects of slow release gonadotropin releasing hormone analog on milt characteristics and plasma levels of gonadal steroids in greenback flounder (*Rhombosolea tapirina*).*Aquaculture* 240, 505–516.

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

15- Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H. and Nagahama, Y. (1991). The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish.*J Exp Zool* 261: 353-363.

16- Mylonas, C.C., Gissis, A., Magnus, Y.and Zohar, Y. (1997). Hormonal changes in male white bass (*Morone chrysops*) and evaluation of milt quality after treatment with a sustained-release GnRHa-delivery system. *Aquaculture* 153, 301– 313.

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

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

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

20- Secer, S., Tekin, N., Bozkurt, Y., Bukan, N. and Akcay. (2004). Correlation between biochemical and spermatological parameters in rainbow trout semen. *IJA*, 56:274-280.

21- Tekin, N., Secer, S., Akcay, E. and Bozkurt, Y., (2003). Cryopreservation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss, Bamidgeh* 55, 208-212.

22- Turner, E. and Montgomerie, R., (2002). Ovarian fluid enhances sperm movement in Arctic charr *Journal of Fish Biology* 56, 1570-1579.

23- Vermeirssen, E.L.M.; Scott, A.P.; Mylonas, C.C., and Zohar, Y., (2000). Gonadotrophin-releasing hormone agoniststimulates milt fluidity and plasma concentrations of 7,20h-dihydroxylated and 5h-reduced, 3a-hydroxylatedC21 steroids in male plaice (*Pleuronectes platessa*). *Gen. Comp. Endocrinol*. 112: 163–177.

24- Zohar, Y.and Mylonas, C.C., (2001). Endocrine manipulation of spawning in cultured fish: From hormones to genes. *Aquaculture* 197, 99–136.