

مقاله علمی - پژوهشی:

تأثیر عصاره تخمدان ماهی صبیتی (*Sparidentex hasta*) حاوی پروستاگلاندین (PGF2α) بر نوسانات هورمون تستوسترون، شاخص GSI و تحرک اسپرم در جنس نر

همایون حسین زاده صحافی*^۱، محمود بهمنی^۱، پرستو محبی درخش^۱، محمد پور کاظمی^۱، هادی غفاری^۱، سیدرضا سیدمرتضایی^۱، مهدی گلشن^۱، محدثه احمدنژاد^۲، حسین هوشمند^۳، مجتبی ذبایح نجف آبادی^۳، منصور طرفی موزان زاده^۳، حمید سقاوی^۳، عبدالرحیم اصولی^۳، جواد منعم^۳، شاپور مهرجویان^۳

*h_hosseinzadeh@yahoo.com

- ۱- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
- ۲- پژوهشکده آبی پروری ابهای داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گیلان، بندر انزلی
- ۳- پژوهشکده آبی پروری جنوب کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، خوزستان، اهواز

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۹

چکیده

فرمونها، سیگنال‌های مولکولی هورمونی یا مشتقات آنها هستند که در محیط بیرون از بدن بر گونه‌های یکسان اثر می‌گذارند. اثر عصاره تخمدان ماهی صبیتی به عنوان ماده حاوی فرمون (PGF2α) بر القاء فرمونی و روند رسیدگی نهایی جنسی و تغییرات شاخص‌های اسپرمی جنس نر این ماهی بررسی و در تیمارهای مختلف مقایسه شده است. ماهیان نر با میانگین وزنی 45±20 گرم در حوضچه‌های فایبرگلاس 300 لیتری رهاسازی شدند و پس از آداپته شدن ماهیان با محیط (به مدت 48 ساعت)، آزمایش‌ها در 5 گروه تجربی (یک گروه تحت کنترل، یک گروه شاهد پروستا گلاندین و 3 گروه تیمار) که هر گروه شامل 9 عدد ماهی نر بالغ بود، انجام شد. غلظت‌های مختلف از عصاره تخمدان در سه تیمار 5، 10 و 15 میلی‌گرم بر لیتر به صورت حمام به آب اضافه شد. پس از 24 ساعت ماهیان بیهوش شدند و بیومتری ماهیان با اندازه‌گیری طول و وزن انجام شد. پس از انجام خونگیری، گناد ماهیان توزین شد. نتایج حاکی از القاء فرمونی عصاره‌های تخمدانی و تاثیر مثبت آنها در افزایش نرخ شاخص‌های اسپرمی بود. شاخص گنادوسوماتیک و همچنین سطح هورمون تستوسترون در تیمار 10 و 15 میلی‌گرم بر لیتر و همچنین تیمار پروستاگلاندین (PGF2α) نسبت به شاهد افزایش معنی‌دار داشت (p>0/001). تراکم اسپرم و اسپرماتوکریت در تیمار 15 میلی‌گرم بر لیتر (T3) کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد داشتند، ولی شاخص‌های سرعت تحرک اسپرم و درصد تحرک اسپرم نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری از خود نشان ندادند. حجم نسبی اسپرم دهی در کلیه تیمارها تحت تاثیر عصاره فرمونی قرار گرفت و افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد در تیمار T3 مشاهده شد (p>0/001). تجویز عصاره فرمونی منجر به کنترل تولید مثلی ماهی صبیتی نر در تمامی گروه‌های تجربی گردید.

کلمات کلیدی: ماهی صبیتی، فرمون، پروستاگلاندین، *Sparidentex hasta*

*نویسنده مسئول

مقدمه

کسب دانش در زمینه ماهیت و عملکرد ترکیبات شیمیایی و به‌ویژه فرمون‌ها بر سیستم بویایی ماهیان و نقش آنها در رفتار و فیزیولوژی ماهی می‌تواند به عنوان ابزار مدیریتی برای پرورش ماهیان دریایی محسوب گردد. امروزه فرمون‌ها در حوزه مدیریت آفت‌های کشاورزی کاربردهای فراوان دارند (Shani, 2000) و حتی در حوزه مدیریت جمعیت ماهیان هرز و ناخواسته در محیط‌های طبیعی نیز کاربرد دارند (Li *et al.*, 2002). با این وجود، در خصوص آبیان بیشترین توجه به کاربرد فرمون‌ها و فرمون‌ها در حوزه تولید مثل و تکثیر و پرورش آنها معطوف شده است (Mylonas *et al.*, 2010).

تولیدمثل در ماهیان به‌وسیله فرآیندهای درون‌زا کنترل می‌گردد. این فرآیندهای داخلی از طریق عوامل محیطی از قبیل نور، دما و عوامل غذایی تحریک می‌شوند. با توجه به اطلاعات موجود این امر آشکار گردیده است که تولید سلول جنسی در ماهیان همانند سایر مهره‌داران به‌وسیله سیستم غدد درون ریز شامل مغز (هیپوتالاموس)، غده هیپوفیز و غدد جنسی کنترل می‌گردد. سیستم کنترل غدد درون ریز تولیدمثل در ماهیان بالهدار بر اساس محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-غدد جنسی، مشابه پستانداران می‌باشد. هیپوتالاموس هورمون آزاد کننده گنادوتروپین (GnRH) (مؤثر بر هیپوفیز) را تولید می‌کند. این غده سنتز و رهاسازی هورمون‌های گنادوتروپین (GTHs)^۱ که نقش آنها کنترل غدد جنسی (تخمدان و بیضه) به سمت تولید سلول‌های جنسی می‌باشد. گنادوتروپین‌های سنتز شده در گنادوتروپ‌های غده هیپوفیز، درون چرخه خونی محیطی ترشح می‌شوند و از طریق اتصال به گیرنده‌های واقع در غدد جنسی، سبب القاء فرآیند استروئیدوز و گامتوز در ماهیان می‌گردد. به دلیل نقش عمده سیستم غدد درون ریز در تولید سلول‌های جنسی، آگاهی از عمل کنترل و تنظیم هورمونی تولیدمثل ماهیان، به استفاده بهینه از هورمون‌های مختلف در تکثیر مصنوعی ماهی کمک شایانی خواهد نمود (حسین‌زاده صحافی، ۱۳۸۰).

پروستاگلاندین‌ها به عنوان یکی از عوامل فارماکولوژیک در القاء رفتارهای تخم‌ریزی در ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرند. از این هورمون‌ها به عنوان عامل القاء کننده رفتارهای تخم‌ریزی در ماهیان ماده استفاده می‌شود. پروستاگلاندین‌ها در زمان رسیدگی اووسیت‌ها در تخمدان، از طریق بافت تخمدان سنتز و به جریان خون رها می‌شوند. در ماهیان تخم‌گذار که اوولاسیون معمولاً در تخمدان صورت می‌پذیرد و اووسیت‌های بالغ بعدها در خارج از بدن با اسپرم‌ها لقاح می‌یابند، پروستاگلاندین‌های حاصله از طریق جریان خون به مغز انتشار می‌یابند و بر گیرنده‌های حاصله در مغز مستقر می‌شوند و با فعال نمودن این گیرنده‌ها در مغز یک سلسله اثرات رفتاری را القاء می‌کنند که از جمله می‌توان به رفتارهای تخم‌ریزی اشاره نمود (Sorensen and Goetz, 1993). فعال‌سازی رفتاری و فرومونی ترشح GTH-II از هیپوفیز ماهیان امروزه در ماهیان نر کاملاً به اثبات رسیده است. هنگامی که ماهی نر همزمان با ماده‌ها در حال تخم‌گذاری، اسپرم‌های خود را خارج می‌کند، میزان GTH-II خون ماهی نر در پاسخ به سیگنال‌های فرومونی ماهیان ماده (به‌ویژه $17\beta\text{-DP}$, $1\alpha\text{-PG-F2}$)، با تأخیر ۱۲-۸ ساعت به حداکثر می‌رسد. همچنین اگر طی تجربه‌ای، نرها را در معرض ماده‌هایی که به آنها $1\alpha\text{-PG-F2}$ تزریق شده است، قرار دهید، تراکم ir-GnRH در پيازهای بویایی، تلنسفال و هیپوتالاموس آنها، بعد از ۲ ساعت افزایش می‌یابد. این موضوع هنوز مشخص نشده است که تغییرات در مقادیر ir-GnRH مغز جلویی طی تجربیات مذکور، ناشی از تأثیر مستقیم فرمون‌ها بر سیستم‌های نورونی GnRH است یا به صورت غیر مستقیم در نتیجه میانکنش‌های رفتاری با ماهیان ماده بوجود می‌آید. در این رابطه تحقیقات نشان داده‌اند که TN در ماهی طلایی نر، به محرک‌های لمسی در طول رفتار تخم‌ریزی حساس می‌باشد. از سوی دیگر، در ماهی آزاد خاور دور، مقدار sGnRH-mRNA، در عصب انتهایی در طول مهاجرت به طرف دریا افزایش می‌یابد که نشان دهنده دخالت احتمالی این سیستم نورونی در میانجی اثرات خارجی است که منجر به مهاجرت و تغییرات هورمونی خواهد شد

¹ Gonadotropin-releasing hormone

² Gonadotropin hormones

استفاده از سانتریفوژ با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و به مدت ۱۰ دقیقه فاز مایع از مواد جامد باقیمانده جداسازی شد (Prasain *et al.*, 2013). در مرحله بعد با استفاده از استون به نسبت ۵۰ درصد با مایع به دست آمده، عصاره‌گیری مجدداً با استفاده از سانتریفوژ انجام و عصاره ثانویه تهیه گردید. سپس محلول بالایی با هگزان به نسبت مساوی ترکیب گردید و محلول حاوی لیپیدها برای ارسال به آزمایشگاه جهت سنجش فرومون پروستاگلاندین بدست آمد. عصاره‌های مراحل مختلف رسیدگی جنسی ماهی ماده صبیتی برای سنجش پروستا گلاندین مورد ارزیابی قرار گرفت (Sorensen *et al.*, 2003; Prasain *et al.*, 2013).

مقادیر فرومون در عصاره‌های بافت تخمدان ماهی صبیتی با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) (با استفاده از دستگاه Agilent 1200 series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) و بر اساس روش Stephen و همکاران (۲۰۱۹) در تخلیص صورت پذیرفت. برای این منظور ۲۰۰ میکرو لیتر عصاره حاوی متانول را با اسید فرمیک ۰/۱ درصد مخلوط و دمای محیط در ۴ درجه سلسیوس نگهداری گردید. برای برقراری توازن ستون Hydro RP-C18 با اسید فرمیک ۰/۱ درصد با میزان جریان ۰/۲ میلی لیتر در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه تزریق انجام و سپس عصاره‌ها به میزان ۲۰ میکرو لیتر به ستون تزریق شدند. شکل‌ها با ترسیم منحنی استاندارد مورد آنالیز قرار گرفتند و مقادیر پروستاگلاندین در عصاره های تخمدان ماهی صبیتی در مراحل مختلف رسیدگی جنسی محاسبه گردیدند (Stephen *et al.*, 2019). معمولاً ارتباط وزن گناد یا شاخص گنادوسوماتیک^۱ نیز به عنوان یک شاخص ساده از بلوغ و مراحل رشد گناد مورد استفاده قرار می‌گیرد. شاخص بلوغ یک روش غیر مستقیم برای تخمین فصل تخم‌ریزی است. این شاخص در پایان دوره و در زمان نمونه‌گیری از مولدین بررسی شد. هدف از انجام این کار بررسی مراحل رسیدگی جنسی و رشد وزنی گناد ناشی از رسیدگی تخمدان می‌باشد.

(عریان و همکاران، ۱۳۹۶). فرومون‌ها به‌ویژه پروستا گلاندین‌ها در تخمدان و اوویداکت ماهی ساخته می‌شوند و با تاثیر بر بخش فوقانی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد رفتارهای تخم‌ریزی را در ماهیانی نظیر قزل آلا، سوف و ماهی قرمز حوض تحریک می‌کنند (Stacey and Goetz, 1982). این امر سبب تنظیم رفتارها در زمان تخم‌ریزی ماهی می‌شود و به موفقیت تولید مثلی کمک می‌کند. Yabuki و همکاران (۲۰۱۶) به تاثیر فرومون‌ها و عملکرد آنها در مغز از طریق سیستم بویایی ماهی اشاره کردند و دریافتند که در ماهی گورخری ماده، ترکیبات پروستاگلاندینی نظیر PGf2 α در تخمدان و در زمان تولید مثل افزایش می‌یابند که از طریق ادرار سبب جلب جنس مخالف (نر) می‌شوند و تحریک تولید مثلی جنس نر را بدنبال دارند. آنها ثابت کردند که این فرومون از طریق سیستم بویایی در جنس نر و تاثیر گذاری بر لوب‌های بویایی مغز، مسیرهای فیزیولوژیک را فعال می‌سازد. افزایش میزان هورمون β -P20 17 α در بدن جنس نر ناشی از افزایش سطح فرومون‌های PGF2 α و β -P20 17 α در آب، سبب رسیدگی و سیالیت اسپرمی از طریق تاثیر هورمون LH می‌شود. پژوهش حاضر با هدف بررسی تاثیر عصاره تخمدانی ماهی صبیتی بر هورمون های استروئیدی و شاخص های اسپرمی در جنس نر انجام شد.

مواد و روش کار

به منظور تهیه عصاره بافتی حاوی فرومون تعداد ۱۲۰ عدد ماهی ماده (با وزن ۹۵۰-۱۴۰ گرم) ماده صبیتی (*Sparidentex hasta*) از صیادان بومی، اسکله‌های صیادی و مراکز خرید تهیه گردید. تخمدان ماهیان پس از نمونه‌برداری (به وزن ۵-۲ گرم از هر نمونه) با هم مخلوط و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای تهیه عصاره‌های بافتی به مدت ۶۰ روز و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. عصاره‌های مورد نظر پس از یخ‌زدایی عصاره‌ها، در مراحل مختلف جنسی و خرد کردن آنها به‌وسیله مخلوط‌کن، با متانول ۱۵ درصد و بافر فسفات ۰/۱ مول (pH=۷/۵) ترکیب و با استفاده از همزن به صورت بافت همگن تهیه گردیدند. سپس عصاره‌ها با

¹ Gonadosomatic index

شدن ماهیان با محیط (به مدت ۴۸ ساعت)، آزمایش‌ها در ۵ گروه تجربی (یک گروه تحت کنترل، یک گروه شاهد پروستا گلاندین و ۳ گروه تیمار) که هر گروه شامل ۹ عدد ماهی نر بالغ بود، انجام شد. غلظت‌های مختلف از عصاره تخمدان (۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر به نام تیمارهای T₁، T₂ و T₃) به صورت حمام به آب اضافه شد.

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

برای بررسی تفاوت و اختلاف در شاخص‌های گنادو سوماتیک و هورمون استرادیول و شاخص‌های اسپرمی با استفاده از نرم افزار SPSS و از روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و برای مقایسه میانگین از آزمون دانکن (Duncan Multiple Range Test) استفاده شد. برای ترسیم شکل نیز از نرم افزار Excel استفاده گردید.

نتایج

مقادیر فرومون در عصاره‌های بافت تخمدان ماهی صبیتی (باراندمن ۹۵٪) با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نشان داد که بیشترین مقدار پروستاگلاندین معادل ۲۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد (شکل ۱).

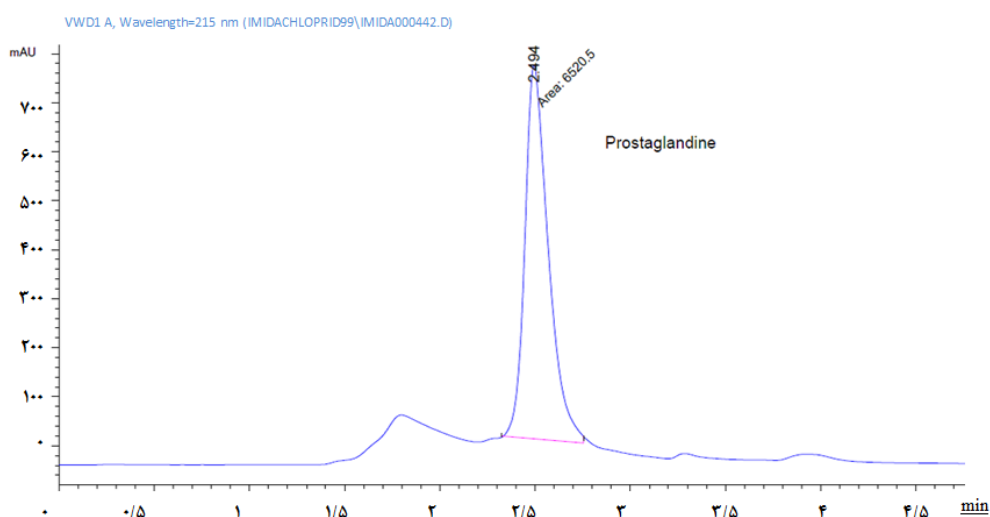
در این تحقیق درصد شاخص گنادی (GSI) براساس فرمول ذیل برای هر ماهی محاسبه گردید (Biswas, 1993):

$$GSI = \frac{WG}{W} \times 100$$

WG: وزن گناد (گرم)، W: وزن کل بدن ماهی (گرم) به منظور اندازه‌گیری سطوح استروئیدی هورمون تستوسترون از روش «رادیو ایمنو اسی» (RIA) استفاده گردید. جهت اندازه‌گیری هورمون مذکور از کیت Immunotech که براساس واکنش رقابتی بین آنتی ژن موجود در نمونه سرم (تستوسترون) جهت اتصال به آنتی بادی ضد تستوسترون موجود در فاز جامد طراحی شده است، استفاده گردید. پرتو دهی حاصل از اتصال آنتی ژن نشان‌دار (تستوسترون) با آنتی بادی فاز جامد با گاما کانتر LKB ساخت کشور فنلاند اندازه‌گیری و پردازش شد. در ضمن، برای استاندارد کردن روش از کالیبراتورهای Immunotech استفاده شد. بدین ترتیب، مقادیر هورمون‌ها برحسب نانوگرم بر میلی لیتر گزارش گردید (Ottobre *et al.*, 1989).

تیمار بندی

ماهیان نر با میانگین وزنی 200 ± 45 گرم در حوضچه‌های فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری رهاسازی شدند و پس از آدابته

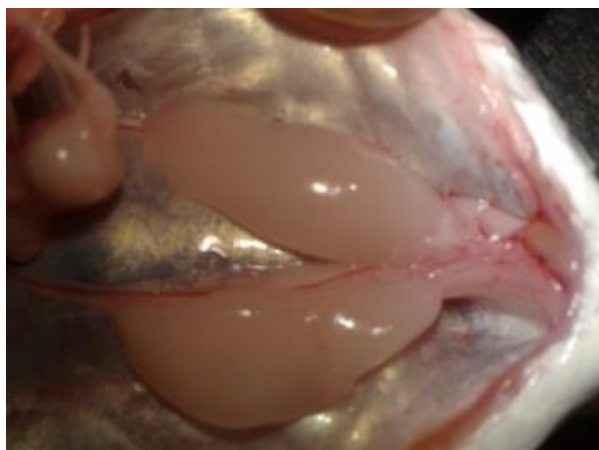


شکل ۱: نتایج کروماتوگرافی فاز مایع شناسایی پروستاگلاندین در عصاره تخمدان ماهی صبیتی

Figure 1: Results of liquid phase chromatography Identification of prostaglandins in ovarian extract of *Sparidentex hasta*

مشاهده گردید. در بیضه ماهیان مربوط به تیمار ۳ با دوز بالای پروستاگلاندین افزایش حجم در طول بیضه قابل مشاهده بود.

بررسی گناد ماهیان در تیمار های عصاره فرومونی نشان داد که حجم بیضه ماهی ها افزایش یافته است (شکل ۲). بیضه ها در تیمار شاهد رسیده بودند ولی همچنان طناب های جنسی و عروق خونی در بخش انتهایی بیضه



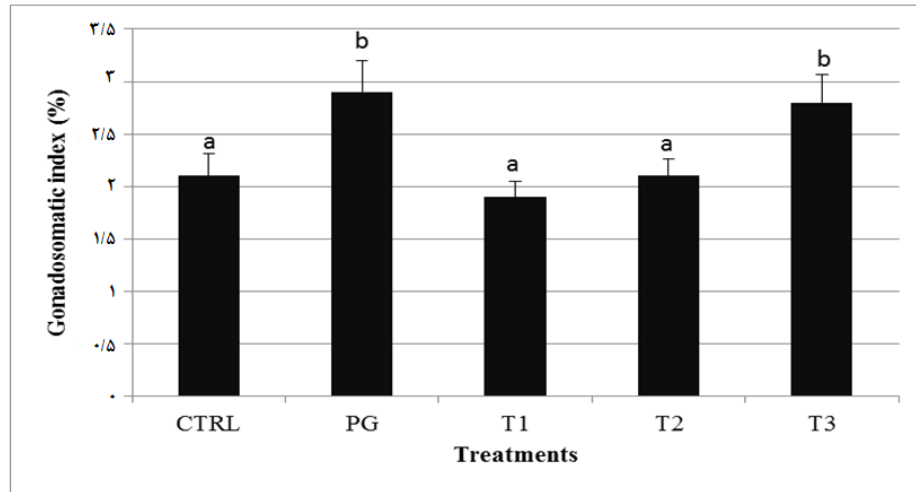
شکل ۲: بیضه ماهی نر صبیتهی پس از ۲۴ ساعت حمام با عصاره حاوی فرومون با غلظت ۱۵ میلی گرم بر لیتر بیضه ها افزایش حجم یافته و سیالیت اسپرمی با فشار اندکی قابل مشاهده است.

Figure 2: Male testis of *Sparidentex hasta* after 24 hours immersion exposed with pheromone extract (concentration of 15 mg / l). The testicles are enlarged and sperm fluid is visible with slight pressure.

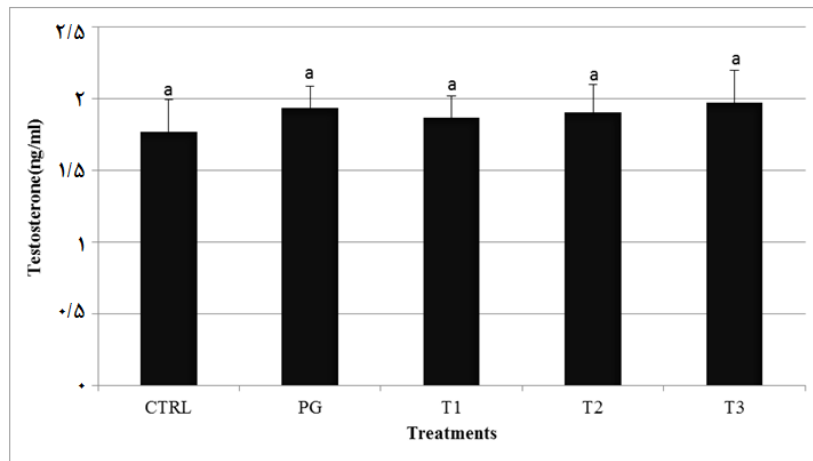
نتایج اندازه گیری پارامترهای اسپرم شناختی (اسپرماتوکریت، سرعت تحرک اسپرم، تراکم اسپرم) در شکل های ۵ الی ۷ نشان داده شده است. سرعت تحرک اسپرم در تیمار شاهد 160 ± 7 میکرو متر در ثانیه ثبت گردید. این سرعت در تیمار T2 پس از ۶ دقیقه به کمترین مقدار خود رسید (50 ± 4 میکرو متر در ثانیه). شکل ۵، بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سرعت تحرک اسپرم در دوره های زمانی مختلف بین تیمارهای دریافت کننده عصاره حاوی فرومون و تیمار شاهد می باشد ($p < 0.001$). سرعت تحرک اسپرم در دقیقه اول در تیمار T3 با تیمار شاهد اختلاف معنی دار از خود نشان نداد ($p > 0.001$). پس از ۳ دقیقه نیز سرعت تحرک اسپرمها همچنان بالا بود و اختلاف معنی دار بین تیمارهای T1 و T2 با تیمارهای شاهد و تیمار T3 مشاهده شد ($p < 0.001$). با گذشت ۶ دقیقه افت شدید در سرعت تحرک اسپرمها مشاهده شد و در تمام تیمارها به ویژه تیمار T2 اختلاف معنی داری مشاهده شد ($p < 0.001$).

نتایج نشان داد که شاخص گنادوسوماتیک در تیمار های مختلف دارای اختلاف معنی دار بود. ($p < 0.001$). بیشترین مقدار با ۲/۸ درصد مربوط به تیمار شماره ۳ (۱۵ گرم در لیتر عصاره حاوی فرومون) بود که با شاخص گنادوسوماتیک تیمار پروستا گلاندین خالص (۵ میلی گرم بر لیتر) به میزان ۲/۹ درصد اختلاف نداشت. همچنین اختلاف معنی دار بین تیمارهای ۲ و ۳ با تیمار شاهد مشاهده نشد (شکل ۳).

نتایج بررسی هورمون تستوسترون نشان دهنده عدم تغییرات قابل ملاحظه این هورمون در مواجهه ماهی با عصاره های حاوی فرومون در مقایسه با گروه شاهد و تیمار پروستا گلاندین خالص بود ($p > 0.001$). با این وجود این هورمون در تیمارهای T3 (حاوی فرومون با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر) و تیمار پروستاگلاندین نسبت به سایر تیمارها، افزایش اندک نشان داد (شکل ۴).



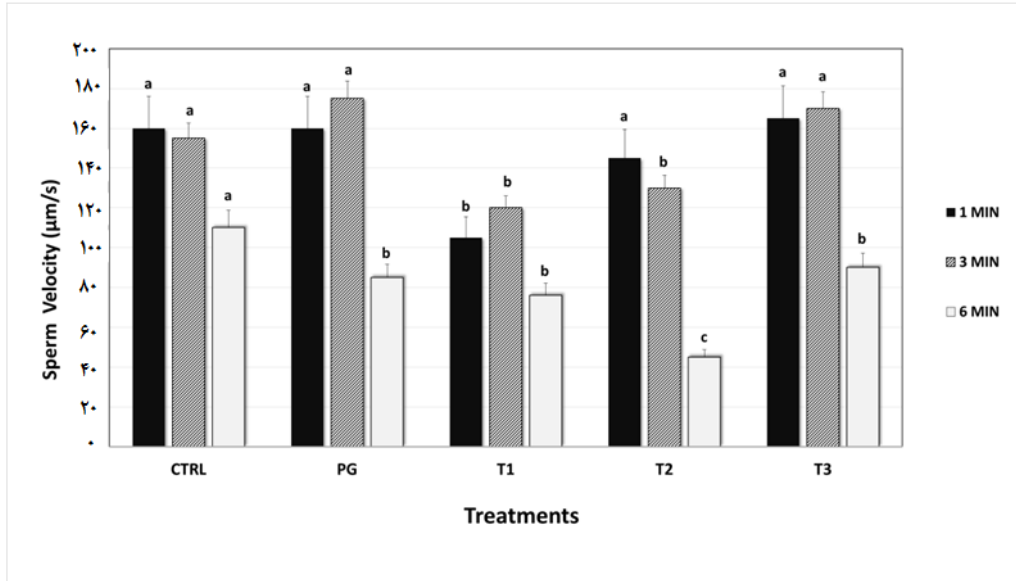
شکل ۳: مقایسه شاخص رشد گنادی (گنادو سوماتیک) در تیمارهای مختلف (حروف انگلیسی مختلف نشان دهنده وجود اختلاف معنادار در سطح ۵ درصد می‌باشد)
Figure 3: Comparison of gonadal growth index (somatic gonadal) in different treatments (Different English letters indicate a significant difference at the level of 5%)



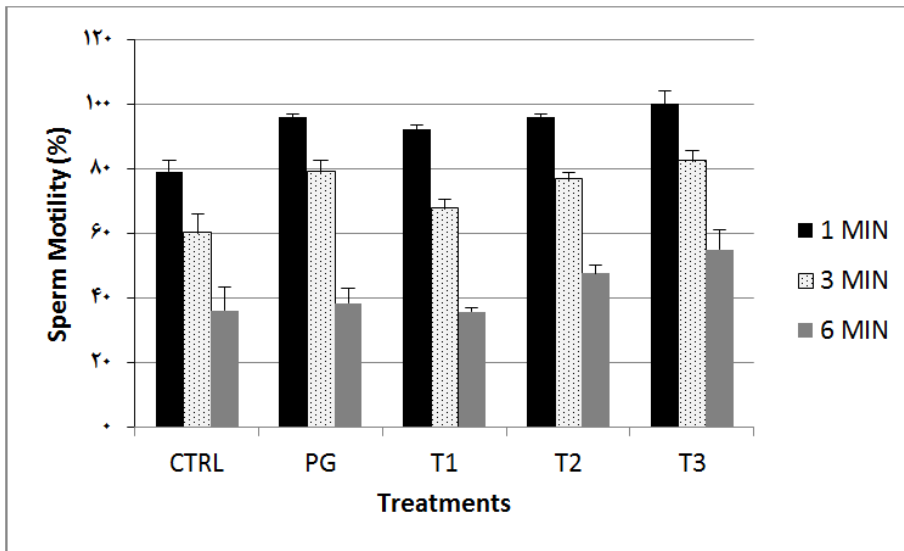
شکل ۴: مقایسه سطح تستوسترون در جنس نر ماهی صبیتی در تیمارهای مختلف (حروف انگلیسی مختلف نشان دهنده وجود اختلاف معنادار در سطح ۵ درصد می‌باشد)
Figure 4: Comparison of testosterone levels in males and females of *Sparidentex hasta* in different treatments (Different English letters indicate a significant difference at the level of 5%)

۶ نیز قابل مشاهده بود ولی درصد تحرک با گذشت زمان در تمامی تیمارها کاهش قابل ملاحظه‌ای داشت. تغییرات اسپرماتوکریت در شکل ۷ مشاهده می‌شود. نتایج نشان‌دهنده کاهش میزان اسپرماتوکریت در ماهیان صبیتی در تیمارهای T3 و PG نسبت به تیمارهای T2 و T1 و تیمار شاهد می‌باشد ($p < 0.01$).

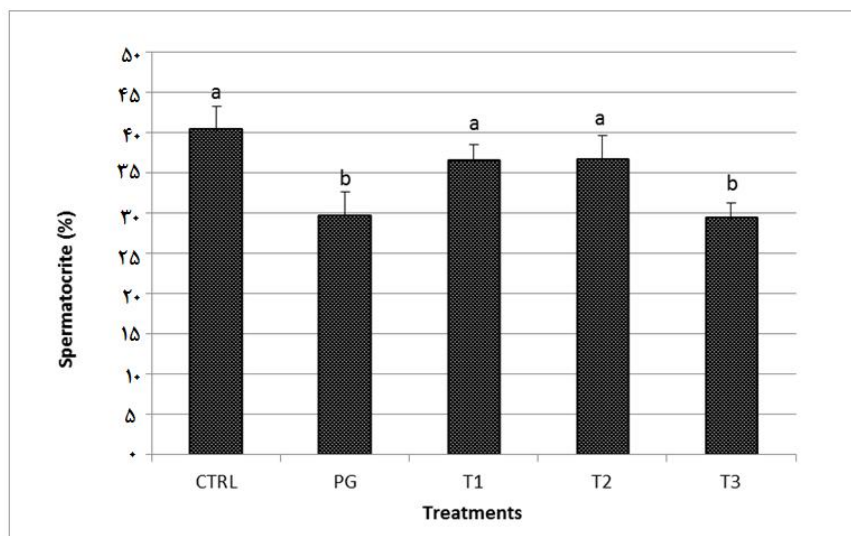
مدت زمان تحرک اسپرم ۱۱/۲ دقیقه ثبت گردید. نتایج نشان داد که بین میانگین درصد تحرک اسپرم در بین تیمارهای مختلف در ماهی صبیتی اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($p < 0.01$). درصد تحرک اسپرم در تمامی تیمارها پس از ۱ دقیقه، افزایش معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد از خود نشان داد (شکل ۶). این روند در دقایق ۳ و



شکل ۵: مقایسه سرعت تحرک اسپرم در تیمارهای مختلف (حروف انگلیسی مختلف نشان دهنده وجود اختلاف معناداری در سطح ۵ درصد می باشد)
Figure 5: Comparison of sperm motility in different treatments
 Different English letters indicate a significant difference at the level of (5%)



شکل ۶: مقایسه درصد تحرک اسپرم در تیمارهای مختلف (حروف انگلیسی مختلف نشان دهنده وجود اختلاف معناداری در سطح ۵ درصد می باشد)
Figure 6: Comparison of sperm motility in different treatments
 Different English letters indicate a significant difference at the level of (5%)



شکل ۷: مقایسه اسپرماتوکریت در تیمارهای مختلف

(حروف انگلیسی مختلف نشان دهنده وجود اختلاف معناداری در سطح)

Figure 7: Comparison of spermatocytes in different treatments (Different English letters indicate a significant difference in level)

به طوری که سبب تحریک تولید مثلی و بروز رفتارهای مربوطه برای موفقیت بیشتر در ایجاد نسل جدید می‌گردد (Sorensen and Stacey, 1999). وجود فرومون‌های جنسی در بسیاری از گونه‌ها و از جمله گونه‌های متعلق به جنس *Hypsoblennius* گزارش شده است (Losey, 1969). فرومون‌های جنسی از نوع $PGF2\alpha$ در ماهی *Paradise fish* با نام علمی *Macropodus opercularis* شناسایی و مورد مطالعه قرار گرفته اند (Villars et al., 1985). امروزه ثابت شده است که فرومون‌هایی نظیر پروستاگلاندین‌ها می‌توانند سه نقش اساسی در تولید مثل آبزیان داشته باشند: نقش اول آنها در عملکرد به عنوان هورمون‌های موضعی است که منجر به تحریک فولیکولی تخمدان می‌گردد، نقش دوم به افزایش زمان اوولاسیون و تحریک رفتارهای تخم‌ریزی تعلق دارد و نقش سوم آنها به عنوان فرومون در آب، به رسیدگی و تحریک رفتارهای جنسی در جنس نر مربوط می‌گردد (Sorensen and Goetz, 1993). پروستاگلاندین‌ها و به‌ویژه مشتق $K-PGF2\alpha_{15}$ در فرایندهای تخم‌ریزی و در بازدهی اسپرمی ماهیان نر دخالت دارند و در عین حال سبب افزایش سطح هورمون

بحث

رشد جمعیت و افزایش تقاضا برای مصرف محصولات دریایی موجب گردیده است تا صنعت آبی‌پروری ماهیان دریایی گسترش یابد و مورد توجه کشورها و سازمان‌های جهانی مسئول در بهبود وضعیت تغذیه و کاهش فقر قرار گیرد. ماهی صبیتی بومی خلیج فارس، غرب اقیانوس هند و آبهای ساحلی کشور هند است. زیستگاه این گونه آبهای ساحلی کم عمق و آبهای عمیق است و عمدتاً از مهره‌داران و سخت پوستان تغذیه می‌کند. ماهی صبیتی دارای ارزش اقتصادی و شیلاتی بوده است و تکثیر و پرورش آن در کشورهای حاشیه خلیج فارس از اهمیت خاصی برخوردار است (Hussain et al., 1981). فرایند تکثیر و پرورش آبزیان وابسته به عوامل متعدد داخلی و خارجی است که از جمله عوامل خارجی که سبب تغییرات فیزیولوژیک و رفتاری در ماهیان مولد می‌گردد، فرومون‌ها می‌باشند. بررسی‌های علمی حاکی از تکامل و تخصص یافتگی فرومون‌ها در توالی زمان است که این امر نیز به تاثیر عوامل داخلی و خارجی بر زیست جانوران بستگی دارد. برای مثال، فرومون‌های موثر در تولید مثل از سوی جانور دهنده، منافع جانور دریافت کننده فرومون را به دنبال دارد

از سویی، شواهد مبنی بر روند استفاده از برخی ترکیبات فرومونی نظیر پروستاگلاندین‌ها ($PGF2\alpha$) در تسریع روند آبیگری و رسیدگی نهایی اسپرم ها^۲ در انواع ماهیان استخوانی وجود دارد (Moore and Waring, 1996; Yabuki et al., 2016). معمولاً تعیین اسپرماتوکریت به عنوان تکنیک سریع و آسان برای ارزیابی تراکم اسپرم می‌تواند استفاده شود. در مطالعه حاضر، بالاترین درصد اسپرماتوکریت در تیمار شاهد و تیمار مربوط به پایین‌ترین دوز عصاره حاوی هورمون به‌دست آمد.

در تحقیقی که Stacey و همکاران (۱۹۹۴) انجام دادند، نتیجه گرفتند که عصاره‌ها و ترشحات فرومونی حاصل از ادرار ماهیان ماده می‌تواند بر ترشح گنادوتروپین‌ها نظیر FSH و بویژه هورمون LH از آندوهیپوفیز اثر افزایشی بگذارد (Stacey et al., 1986; Stacey et al., 1994).

عصاره تخمدان ماهی صبیتی حاوی فرومون و پروستاگلاندین بود. به طور خاص، عصاره‌های تخمدانی ماهیان دارای انواع هورمون‌های استروئیدی و پروستاگلاندین‌ها بوده که تاثیر آنها بر روند تولید مثلی و تغییرات سطوح هورمون‌های جنسی از طریق تاثیر استروئیدها بر سلول‌های گنادو تروپینی و گیرنده‌های دوپامینی ($D2$) یا تاثیر مستقیم پروستاگلاندین‌ها در بافت بیضه به عنوان هورمون‌های موضعی قبلاً به اثبات رسیده است (Sorensen and Goetz, 1993). وجود فرومون‌های جنسی در ماهیان و تاثیر آنها در بروز رفتارهای جنسی در انواع گونه‌های خانواده سالمونیده به اثبات رسیده است (Honda, 1982). در تحقیقات انجام شده موضوع افزایش میزان پروستاگلاندین‌ها به عنوان فرومون جنسی طی فرایند تکوین تخمدان و تخم‌ریزی ناشی از تحریک هیپوفیز به اثبات رسیده است (Cetta and Goetz, 1982).

Honda (۱۹۸۲) به وجود فرومون‌ها در ادرار ماهیان اشاره داشت و به دنبال آن Appelt و همکاران (۱۹۹۵) به وجود پروستاگلاندین‌ها در ادرار ماهیان به عنوان فرومون تولید مثلی پی بردند. بسیاری از ماهیان از فرومون‌ها برای همزمانی فرایند های تولید مثلی نظیر لانه‌سازی، دعوت

LH درجنس نر می‌شوند (Wyatt, 2014). همچنین رهاسازی فرومون‌هایی نظیر پروستاگلاندین ($PGF2\alpha$) و متابولیت‌های آن از طریق ادرار جنس ماده ماهی قرمز (*Carassius auratus*)، سبب جلب جنس نر ماهی برای تولید مثل می‌گردد (Appelt and Sorensen, 2007).

حسینی و لرستانی (۱۳۸۸) به افزایش میزان اسپرماتوکریت در ماهیان کپور معمولی نر نگهداری شده در مقایسه با ماهیان نر مواجهه داده شده با ماهی ماده اشاره نمودند. این امر بیانگر تاثیر فرومون ناشی از ماهیان ماده بر دستگاه تولید مثلی ماهی نر و احتمال رقیق شدن توده اسپرمی و به تبع آن کاهش میزان اسپرماتوکریت در مجاورت ماهیان ماده بوده است. در تحقیقات انجام شده میزان اسپرماتوکریت در ماهی شیروتوراکس در بهترین تیمار (تزیق اوپرایم) $36/58$ درصد ثبت گردید که با تعداد اسپرم رابطه مستقیم و با حجم آن رابطه معکوس داشت (عرب‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۵). محققین با بررسی تاثیر پروستاگلاندین‌ها و مشتقات آنها به عنوان فرومون بر ویژگی‌های تولید مثلی ماهی سالمون (*Salmo salar*) نر دریافتند که حجم اسپرم ماهی با دریافت فرومون افزایش یافت (Moore and Waring, 1996). نتایج تحقیق حاضر بیانگر وجود فرومون‌های موجود در عصاره بافت تخمدان ماهی صبیتی می‌باشد.

همچنین میزان اسپرماتوکریت در تیمار T3 که دارای بیشترین تراکم فرومونی بود، کمترین مقدار را از خود نشان داد که احتمالاً به دلیل رقیق شدن مایع منی و آبیگری آن برای آماده‌سازی نهایی اسپرم پس از مواجهه با فرومون بوده است. King و Young (۲۰۰۱) به اثر ترکیبات استروژنی $\alpha,20\beta -17$ dihydroxy -4 - pregnen -3 - one و نیز gonadotropin releasing hormone analog بر تغییرات حجم اسپرم و فرایند آماده‌سازی نهایی اسپرم از طریق آبیگری^۱ اشاره کردند. این موضوع را Cabrita و همکاران (۲۰۱۱) در خصوص تاثیر فرومون‌های موجود در ادرار جنس ماده ماهی کفشک دریایی (*S. senegalensis*) بر تغییرات اسپرماتوکریت و حجم اسپرم نیز اثبات نمودند.

² Capacitation

¹ Miltation

نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان داد، بین شاخص های اسپرم شناختی گونه ماهی صبیتی با دریافت غلظت های مختلف عصاره حاوی فرومون (۱۰،۵ و ۱۵ میلی گرم در لیتر) پروستاگلاندین (α PGF $_2$) اختلاف معنی دار ایجاد شد و تاثیر غلظت ۱۵ میلی گرم بر لیتر این ترکیب بر سیالیت اسپرمها پس از ۲۴ ساعت اثبات گردید. این نتایج با نتایج Bhatt و Sajwan (۲۰۰۱) در خصوص تاثیر عصاره های تخمدانی بر فعالیت اسپرم ماهی *Barilius bendelisis* مطابقت دارد. با توجه به همزمان نبودن رسیدگی جنسی مولدین نر و ماده ماهی صبیتی، سالانه هزینه های نگهداری زیادی به پرورش دهندگان و تکثیرکنندگان آبزیان تحمیل می شود. بنابراین، استفاده از عصاره تخمدان ماهی ماده صبیتی می تواند در همزمان سازی و فعال سازی اسپرمهای جنس نر تاثیر گذار باشد و مدیریت کارگاه های تکثیر ماهیان دریایی را تسهیل نماید.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از ستاد توسعه زیست فناوری معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری در تامین بخشی از هزینه های پروژه تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

حسین زاده صحافی، ه.، ۱۳۸۰. بیولوژی تولید مثل ماهی با تأکید بر ماهیهای ایران. مؤسسه نشر جهاد وابسته به جهاد دانشگاهی واحد تهران، ۲۷۲ص.
حسینی، س.ش. و لرستانی، ر.، ۱۳۸۸. مقایسه pH مایع منی و سرم خون در سنین متفاوت مولدین نر و اثر مولد ماده بر پارامترهای کیفی اسپرم کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). مجله علمی شیلات ایران، ۴۴-۳۵:(۴)۲۲
DOI:10.22092/isfj.2010.115530
حسینی، س.ش.، خارا، ح. و لرستانی، س.، ۱۳۸۸. اثر فواصل اسپرم گیری مولدین سنین مختلف قزل آلی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بر تحرک اسپرم، اسپرماتوکریت و چشم زدگی تخم. فصلنامه

جنس مخالف، رفتارهای جفت یابی و جفت گیری و نهایتاً لقاح موفق از طریق ایجاد اسپرمهای فعال^۱ طی فرایندهای Spermiation و Spermogenesis استفاده می کنند (Liley, 1982; Stacey *et al.*, 1986; Stacey *et al.*, 1994).

معمولاً هورمونها نقش مهمی در تنظیم تولید مثل ماهیان ایفاء می کنند. در بررسی Kidd و همکاران (۲۰۱۳) تاثیر هورمون موضعی پروستاگلاندین α PGF $_2$ بر ماهی سیچلاید (*Astatotilapia burtoni*)، رفتارهای جنس ماده و نر این ماهی را اثبات نمود. در این تحقیق ماهیان جوان فاقد فرومون عمدتاً همراه با ماهیان جوان نر همزیست بودند ولی با تجویز پروستاگلاندین، ماهیان ماده در معرض قرار داده شده تمایل به ماهیان نر بزرگتر و رسیده جنسی را نشان می دادند.

در ماهی کفشک (*S. senegalensis*) که از گونه های مهم آبزی پروری می باشد، با در معرض قرارگیری جنس نر در حضور جنس ماده و فرومونها از سطح بالاتری از درصد تحرک اسپرم، حجم اسپرم و بقاء بالاتری نسبت به ماهیان شاهد برخوردار بودند (Cabrita *et al.*, 2011; Hubbard, 2014). همچنین در معرض قرار دادن ماهیان نر قرمز حوض با فرومونهای مترشحه (α ,20 β -17) dihydroxy-4- pregnen-3-one در ادرار ماهی ماده منجر به افزایش تولید اسپرم و نیز سرعت تحرک اسپرمها می شود (DeFraipont and Sorensen, 1993). Olsén و همکاران (۲۰۰۱) نیز با بررسی و مقایسه تاثیر مایع تخمدانی، ادرار و پروستاگلاندین در ماهی سالمون (*Salmo salar*) دریافتند، نرهایی که در معرض این ترکیبات قرار گرفته بودند، همگی دارای سطح بالاتری از هورمون β -dihydroxy-4-pregnen-3-one ۱۷،۲۰ نسبت به نرهای شاهد بودند و در خصوص هورمون 17,20 β -P ketotestosterone-۱۱ بیشترین میزان در نرهای در معرض قرار گرفته با فرومونهای α PGF $_2$ و مخلوط عصاره تخمدانی و ادرار ماهی مشاهده شد (Olsén *et al.*, 2001).

¹ Capacitation

- response of Senegalese sole, *Solea senegalensis*, males maintained in captivity, 75:1-9.
DOI:10.1016/j.theriogenology.2010.07.003
- Cetta, F. and Goetz, F.W.M., 1982.** Ovarian and plasma prostaglandin E and F levels in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) during pituitary-induced ovulation. *Biology of Reproduction*, 27:1216–1221. DOI: 10.1016/0090-6980(83)90174-0.
- Honda, H., 1982.** On the female sex pheromones and courtship behaviour in the bitterlings *Rhodeus ocellatus ocellatus* and *Acheilognathus lanceolatus*. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*.
- Honda, H., 1982.** On the female sex pheromones and courtship behaviour in the salmonids, *Oncorhynchus masou* and *O. rhodurus*. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, 48: 47–49. DOI:10.2331/suisan.48.47
- Hubbard, P., 2014.** Endocrinology applied to aquaculture of finfish, Pheromones in Marine Fish with Comments on Their Possible Use in Aquaculture, Fish Pheromones and Related Cues, First Ed., Edited by Peter W. Sørensen and Brian D. Wisenden, John Wiley and Sons, Inc., pp. 237-253.
DOI:10.1016%2Fj.ygcen.2020.113544
- Hussain, N.A, Akatsu, S. and El-Zahhr, C., 1981.** Spawning, egg and early larval development, and growth of فن آوریهای نوین در توسعه آبی پروری (شیلات)، ۳(۳): ۴۱ – ۵۰.
- عرب نژاد، س.، قرایی، ا.، غفاری، م. و راهداری، ع.، ۱۳۹۵.** بررسی تغییرات کیفی اسپرم ماهی سفیدک سیستان (*Schizothorax zarudnyi* Nikolskii,) (1897) در پاسخ به القاء هورمونی. مجله پژوهش های سلولی و مولکولی ایران (مجله زیست شناسی ایران)، ۲۷(۴):۶۱۱-۶۱۷.
- عریان، ش.، راسخی، خ. و کوهی لای، س.، ۱۳۹۶.** نورواندوکرینولوژی تولیدمثل در ماهیان. موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، ۳۳۵ص.
- Appelt, C.W. and Sorensen, P.W., 2007.** Female goldfish signal spawning readiness by altering when and where they release a urinary pheromone. *Animal Behaviour*, 74: 1329–38.
DOI:10.1016/j.anbehav.2007.02.032
- Appelt, C.W., Sorensen, P.W. and Kellner, R.G., 1995.** Female goldfish appear to release pheromonally-active F-prostaglandins in urinary pulses. In: Proceedings of the 5th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Edited by F.W. Goetz, P. Thomas, 270 P. DOI:10.1007/978-1-4615-4733-4_20
- Bhatt, J.P. and Sajwan, M.S., 2001.** Ovarian steroid sulphate functions as priming pheromone in male *Barilius bendelisis* (Ham.). *Journal of Biosciences*, 26(2): 253–263. DOI:10.1007/BF02703649
- Biswas, S.P., 1993.** Manual of methods in fish biology. South Asian Publishery. New Dehli. 190 P.
- Carbita, E., Soares, F., Soares, F., Beirao, J. and Dinis, M.T., 2011,** Endocrine and milt

- Acanthopagrus cuvieri* (Sparidae). *Aquaculture*, 22: 125-136.
- Kidd, M.R., Dijkstra, P.D., Alcott C., Lavee, Ma, D.J., O'Connell, L.A. and Hofmann, H.A., 2013.** Prostaglandin F2 α facilitates female mating behavior based on male performance. *Behavioral Ecology Sociobiology*, 67: 1307–1315. DOI: 10.1007/s00265-013-1559-9.
- King, H.R. and Young, G., 2001.** Milt production by non-spermiation male Atlantic salmon (*salmo salar*) after injection of a commercial gonadotropin releasing hormone analog preparation, 17 α ,20 β – dihydroxy -4 – pregen -3 – one alone or in combination. *Aquaculture*, 193: 179 – 195. DOI: 10.1016/S0044-8486(00)00472-5
- Li, W.M., Scott, A.P., Siefkes, M.J., Yan, H.G., Lui, Q., Yun S.S. and Gage, D.A., 2002.** Bile acids secreted by male sea lamprey that acts as a sex pheromone. *Science*, 296: 138-141. DOI: 10.1126/science.1067797.
- Liley, N.R., 1982.** Chemical communication in fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39: 22-35. DOI: 10.1139/f82-005.
- Losey, G.S. Jr., 1969.** Sexual pheromone in some fishes of the genus *Hypsoblennius* Gi Science N.Y. 163, 181–183.
- Moore, A. and Waring, C.P., 1996.** Electrophysiological and endocrinological evidence that F-series prostaglandins function as priming pheromones in mature male atlantic salmon (*salmo salar*) parr. *The Journal of Experimental Biology*, 199: 2307–2316.
- Mylonas, C.C., Fostier, A. and Zanuy, S., 2010.** Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 516-534.
- Olsen, K.H., Bjerselius, R., Mayer, I. and Kindahl, H., 2001,** Ovarian Fluid and Female Urine Increase Sex Steroid Hormone Levels in Mature Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Male Parr. *Journal of Chemical Ecology*, 27, 11, pp. 2337–2349
- Ottobre, J.S., Houmard, B.S. and Ottobre, A.C., 1989.** Luteal production of steroids and prostaglandins during stimulated early pregnancy in the primate: differential regulation of steroid production by chorionic gonadotropin. *Biology of Reproduction*, 41: 393-400.
- Prasain, J.K., Hoang, H.D., Edmonds, J.W. and Miller, M.A., 2013.** Prostaglandin Extraction and Analysis in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Visualized Experiments*. 76,(e50447, doi: 10.3791/50447).
- Shani, A., 2000,** Chemical communication agents (pheromones) in integrated pest management. *Drug Development Research*, 50: 400-405.
- Sorensen, P.W. and Goetz, F.W., 1993,** Pheromonal and reproductive function of F prostaglandins and their metabolites in teleost fish. *Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling*, 6(1-3):385-93.
- Sorensen, P.W. and Stacey, N.E., 1999.** Evolution and Specialization of Fish

- Hormonal Pheromones. In: Johnston R.E., Müller-Schwarze D., Sorensen P.W. (eds) *Advances in Chemical Signals in Vertebrates*. Springer, Boston, MA, pp. 15-47.
- Sorensen, P.W., Vrieze, L.A. and Fine, J.M., 2003.** A multi-component migratory pheromone in the sea lamprey. *Fish Physiology Biochemistry*, 28, 253–257.
- Stacey, N.E. and Goetz, F.W., 1982,** Role of Prostaglandins in Fish Reproduction. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39(1): 92-98. DOI:10.1139/f82-011.
- Stacey, N.E., Kyle, A.L. and Liley, N.R., 1986.** Fish reproductive pheromones. In *Chemical Signals in Vertebrates IV*. (Ed. by D. Duvall, D. MQuer- R.M. Silverstein). New York: Plenum Press. Springer, pp. 117-133. DOI:10.1007/978-1-4613-2235-1_10.
- Stacey, N.E., Cardwell, J.R., Liley, N.R., Scott, A.P. and Sorensen, P.W., 1994.** Hormones as sex pheromones in fish, , in K. G. Davey, R. E. Peter, S. S. Tobe (eds.), *Perspectives in Comparative Endocrinology*, National Research Council of Canada, Ottawa, Canada, pp. 438–448.
- Stacey, N.E, Cardwell J.R. and Liley, N.R., 2001.** Hormones as sex pheromones in fish. Publisher: National Research Council of Canada. 17 P.
- Stephen, A., Brock, B., Thuen, T., Mikhail Y. and Golovko, 2019.** LC/MS/MS method for analysis of E2 series prostaglandins and isoprostanes. *Journal of Lipid Research*, pp.1-37.
- Wyatt, T., 2014.** Pheromones and Animal Behavior: Chemical Signals and Signatures Cambridge: Cambridge University Press, 406 P.
- Yabuki, Y., Koide, T., Miyasaka, N., Wakisaka, N., Masuda, M., Ohkura, M., Nakai, J., Tsuge, K., Tsuchiya, S., Sugimoto, Y. and Yoshihara, Y., 2016.** Olfactory receptor for prostaglandin F2 α mediates male fish courtship behavior. *Nature Neuroscience*, 9(7):897-904. DOI: 10.1038/nn.4314.

The effect of ovarian extract of *Sparidentex hasta* containing prostaglandin (PGF2 α) on testosterone fluctuations, Gonadosomatic Index and sperm motility in male

Homayoun Hosseinzadeh Sahafi H.^{1*}; Bahmani M.¹; Mohebbi Derakhsh P.¹; Pourkazemi M.¹; Ghaffari H.¹; Seyed Mortezaei S.R.¹; Golshan M.¹; Ahmadnejad M.²; Hooshmand H.³; Zabayah Najafabadi M.³; Torfi Mozanzadeh M.³; Sagha Monem A.³; Mehrjouyan Sh.³

*h-hosseinzadeh@yahoo.com

1-Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran

2-Inland Aquaculture Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Guilan, Bandar Anzali

3-Aquaculture Research Center of the South of the country, Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Khuzestan, Ahvaz

Abstract

Pheromones are molecular signals of hormones or their derivatives that affect the same species in the environment outside the body. The effect of ovary extract of psyllium as a pheromone-containing substance (PGF2 α) on pheromone induction and the process of final sexual maturation and changes in male sperm indices of this fish have been investigated and compared in different treatments. Male fish with an average weight of 45 ± 200 g were released in 300 liter fiberglass ponds and after adapting the fish to the environment (for 48 hours), the experiments were performed in 5 experimental groups (one control group, one prostate gland control group and 3 groups Treatment) in which each group consisted of 9 adult male fish. Different concentrations of ovarian extract were added to the water in three treatments of 5, 10 and 15 mg / l as a bath. After 24 hours, the fish were anesthetized and fish biometrics was performed by measuring length and weight. After blood sampling, fish gonads were weighed. The results showed that pheromone induction of ovarian extracts and their positive effect on increasing the rate of sperm counts. Gonadosomatic index as well as testosterone levels at 10 and 15 mg / l treatment and prostaglandin treatment (PGF2 α) were significantly increased compared to the control ($p < 0.001$). Sperm density and spermatocrit in the treatment of 15 mg / l (T3) had a significant decrease compared to the control, but the indices of sperm motility rate and sperm motility percentage compared to the control did not show a significant difference. Relative sperm volume in all treatments was affected by pheromone extract and a significant increase was observed compared to the control in T3 treatment ($p < 0.001$). Administration of pheromone extract resulted in control of male reproductive fish reproduction in all experimental groups.

Keywords: *Sparidentex hasta*, Pheromone, Prostaglandin.

*Corresponding author