

تعیین رابطه سن مولدین نر با عوامل کارایی تکثیر مصنوعی در ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*, Kessler 1877)

مینا رهبر^{۱*}، شعبانعلی نظامی^۲، حسین خارا^۳، مصطفی رضوانی^۴، سمیه شمس پور^۵،
مریم کامکار^۶، رشیده موحد^۷

۱*، ۳ و ۷- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

۲- موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران، ایران، صندوق پستی: ۶۱۱۶-۱۴۱۵۵

۴ و ۵ - مرکز بازسازی ذخائر آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت، ایران، صندوق پستی: ۱۴۷-۴۶۶۶۱

۶- ایستگاه تحقیقات شیلات خیرود، خیرود، مازندران، ایران، صندوق پستی: ۴۹۸

mina.rahbar1363@gmail.com

چکیده

ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) از ماهیان با ارزش دریای خزر می‌باشد. یکی از مهمترین مسائل در پرورش این ماهی، تکثیر مصنوعی و تولید لارو است. در این بین مولدین نر نقش مهمی در فرآیند تکثیر مصنوعی دارند. به این دلیل بررسی اثر توان باروری مولدین نر ماهی آزاد دریای خزر در فصل تکثیر ۱۳۸۷، بر روی عوامل کارایی تکثیر مصنوعی ضروری به نظر رسید. برای این منظور ۳ گروه سنی از مولدین نر (۴، ۵ و ۶ ساله) با ۹ عدد مولدین ماده به صورت جداگانه لقاح داده شد. بر اساس نتایج بدست آمده، مولدین نر ۶ ساله بیشترین میانگین وزن قبل از اسپرم‌گیری ($152/75 \pm 1766/67$ گرم)، وزن بعد از اسپرم‌گیری ($152/23 \pm 1735/0$ گرم)، طول کل ($56/33 \pm 2/08$ سانتی‌متر) و حجم اسپرم ($31/83 \pm 6/22$ میلی‌لیتر) را داشته است. بین این مولدین از نظر میانگین غلظت اسپرم و درصد اسپرماتوکریت، اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد ($P > 0/05$). بر پایه نتایج بدست آمده تخم‌های حاصل از لقاح اسپرم‌های مولدین ۴ ساله با تخمک‌های مخلوط مولدین ماده بیشترین میانگین درصد لقاح ($98/5$ درصد)، درصد بازماندگی تخم تا مرحله چشم‌زدگی ($91/17$ درصد)، درصد ظهور لارو ($94/5$ درصد) و درصد بازماندگی لارو تا مرحله جذب کیسه زرده ($97/16$ درصد) را داشته است. بنابراین هم از بعد اقتصادی و هم از بعد زیست محیطی جهت تکثیر مصنوعی مولدین نر ۴ ساله بهترین گزینه می‌باشند.

کلمات کلیدی: ماهی آزاد دریای خزر، سن، مولدین نر، تکثیر مصنوعی، ایران.

مقدمه

آزاد ماهیان (Salmonidae) از مهمترین گونه‌های پرورشی ماهیان در سراسر دنیا می‌باشند و پرورش آن‌ها قرن‌هاست که در جوامع مختلف در حال انجام است (۱۷). از میان این خانواده، ماهی آزاد دریای خزر از اهمیت و ارزش زیادی از نظر کیفیت گوشت و ارزش اقتصادی (۵) همچنین از لحاظ حفظ ذخیره ژنتیکی (۴) برخوردار می‌باشد. با توجه به آلودگی دریاها، از بین رفتن زیستگاه‌های طبیعی و مناطق تخم‌ریزی، موانع موجود بر سر راه مهاجرت به هنگام تخم‌ریزی از دریا به رودخانه‌ها و حضور صیادان سودجو که اقدام به گسترده شدن دام در مسیر مهاجرت این ماهیان می‌نمایند (۲)، بقای نسل برخی گونه‌های آبرزی نظیر ماهی آزاد دریای خزر را به خطر انداخته است. با توجه به اهمیت این ماهی از سال ۱۳۶۲ در مرکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی شهید باهنر کلاردشت به منظور بازسازی ذخایر، تکثیر و پرورش مصنوعی آن انجام می‌شود. در این راستا بهبود کیفیت مواد تناسلی مولدین و کنترل تولید مثل ماهیان می‌تواند ما را در دستیابی به تقاضای روز افزون و در حال رشد آبرزی پروری در جهان کمک کند (۲۸). یکی از عوامل مهم در لقاح، کیفیت اسپرم مولدین است که مهمترین ویژگی آن عامل تحرک می‌باشد که می‌تواند سبب افزایش لقاح گردد (۷) و می‌توان از آن به عنوان عامل موثر در باروری تخمک‌ها نام برد (۱۳ و ۲۳). تحرک اسپرماتوزوا، میزان اسپرم و تراکم اسپرماتوزوا شاخص‌های خوبی برای کیفیت اسپرم هستند (۱۲ و ۲۵) و حجم اسپرم یکی از ویژگی‌های اثرگذار بر میزان اسپرم و تراکم اسپرماتوزوا است (۲۰). کارایی مولدین نر می‌تواند به زمان و شرایط رهاسازی اسپرم، توانایی

اسپرم یک ماهی نر نسبت به نرهای دیگر و به تعداد اسپرم‌های رهاسازی شده وابسته باشد (۱۳). از عوامل مهم دیگر در لقاح، سن مولدین است. Kayam (۲۰۰۴) و شمس پور (۱۳۸۷) به بررسی اثرات جفت‌گیری گروه‌های مختلف سنی مولدین قزل‌آلای رنگین‌کمان بر روی لقاح، نرخ جنسی، رشد و نرخ بقاء پرداختند. نتایج این بررسی نشان داد که مولدین نر جوان از توانایی بالاتری نسبت به مولدین مسن‌تر برخوردار می‌باشند. بنابراین با توجه به اهمیت این ماهی، به منظور افزایش درصد لقاح و بهبود کیفیت و سلامت لاروهای تفریخ شده، بحث کنترل مولدین نر این ماهی و بررسی توان باروری آن‌ها در سنین مختلف ضروری و مؤثر به نظر می‌رسد. عوامل فراوانی بر کاهش تبدیل تخم به لارو مطرح می‌باشد که تفاوت در میزان رسیدگی مولدین نر، استفاده از مولدین نارس، کیفیت پایین برخی از مولدین نر، شیوه لقاح، روش ناصحیح انتقال تخم به مراکز تفریخ و انکوباسیون را می‌توان نام برد. لذا در این تحقیق وضعیت مولدین نر از لحاظ کیفیت اسپرم و نقش پارامترهای سن، وضعیت رسیدگی و درصد تبدیل تخم استحصالی به لارو مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در فصل تکثیر ۱۳۸۷ و در مرکز بازسازی ذخائر آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت صورت گرفت، ۹ قطعه مولد نر ماهی آزاد دریای خزر در گروه‌های سنی ۴، ۵ و ۶ ساله (از هر رده سنی ۳ مولد) و ۹ قطعه مولد ماده در رده‌های سنی مختلف به صورت تصادفی انتخاب و به وسیله ساچوک از حوضچه‌های مولدین صید شدند. این مولدین ابتدا

لوله سر مخروطی مدرج ریختیم و حجم آن را برحسب سانتی متر مکعب محاسبه کردیم (۲۷).

به منظور محاسبه میزان اسپرماتوکریت از اسپرم مولدین هر گروه سنی قبل از مخلوط نمودن آنها، نمونه برداری انجام شد. نمونه برداری به وسیله لوله میکروهماتوکریت انجام گرفت (۸، ۲۱ و ۲۶). سپس نمونه‌ها به وسیله دستگاه میکروسانتریفیوژ (۸، ۱۸ و ۲۱) به مدت ۵ دقیقه و با دور ۱۴۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شدند (۲۷) و به وسیله خط کش مخصوص سنجش درصد اسپرماتوکریت، میزان اسپرماتوکریت هر نمونه خوانده شد.

برای شمارش اسپرماتوزوئیدهای جمع آوری شده از مولدین ابتدا آنها را رقیق نموده و سپس در لام مخصوص هموسیتمتر و میکروسکوپ عمل شمارش را انجام داده و تراکم اسپرماتوزوئید از طریق رابطه ذیل محاسبه گردید (۲۴).

$10^7 \times 5 \times X =$ تراکم اسپرماتوزوئید در یک سانتیمتر مکعب بصورت خالص، که X برابر با مجموع اسپرم در ۵ خانه لام هموسیتمتر می باشد.

۶ الی ۷ روز پس از لقاح، به منظور تعیین درصد لقاح در تیمارها، در حدود ۸۰ تخمک، پس از شفاف سازی به وسیله محلول شفاف کننده شامل فرمالدهید ۵٪ + اسید استیک ۴٪ (۶) مشاهده شده و نمونه‌های دارای کمر بند عصبی مورد شمارش قرار گرفتند. میزان لقاح تخمک‌ها مطابق رابطه ذیل محاسبه و ثبت گردید (۱۱).

تعداد تخمک‌های لقاح یافته
درصد لقاح = $\frac{\text{تعداد تخمک‌ها}}{\text{تعداد کل تخمک‌ها}} \times 100$

بیهوش شده و سپس طول کل (cm) و وزن مولدین نر (g)، قبل از استحصال اسپرم به ترتیب با تخته بیومتری با دقت ۱ میلی متر و ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه گیری و ثبت شدند. برای اطمینان از سن آنها بر اساس روش کار پرافکنده حقیقی (۱۳۷۹) تعیین سن انجام شد. سپس تخم گیری و اسپرم گیری از مولدین به روش اعمال فشار آرام به ناحیه شکمی و بالای منفذ تناسلی صورت گرفت. مولدین نر دوباره توزین شده و سپس تخمک‌های استحصالی از مولدین ماده به جهت یکسان شدن شرایط تکثیر برای تمام تیمارها مخلوط گشتند. مخلوط تخمک‌های استحصال شده به ۳ قسمت مساوی تقسیم و در تشتک‌های کوچک پلاستیکی ریخته شدند. سپس به میزان ۱/۵ ml از اسپرم‌های استحصال شده از هر رده سنی به صورت جداگانه به منظور آزمایشات تعیین کیفیت اسپرم به آزمایشگاه انتقال و باقی مانده، بر اساس رده سنی مولدین به تشتک‌های حاوی تخمک‌ها اضافه گردید. تخمک‌ها و اسپرم‌های استحصالی به روش خشک لقاح داده شدند. بنابراین ۳ تیمار مختلف از مخلوط تخمک‌های استحصالی و اسپرم مولدین ۴، ۵ و ۶ ساله مورد مطالعه قرار گرفت. پس از آب گیری، تخم‌های لقاح یافته به ترافهای شماره گذاری شده در سالن انکوباسیون انتقال یافتند. به جهت جلوگیری از احتمال بروز اختلال در هر کدام از تیمارها، این تیمارها نیز به سه بخش تقسیم و در سه سینی جداگانه قرار گرفتند و ۹ سینی در ۳ تراف به کار رفت. ۲ روز بعد از لقاح تا بعد از مشاهده اولین تفریخ تخم‌ها، تخم‌ها به وسیله مالاشیت گرین جهت پیشگیری از قارچ زدگی ضد عفونی شدند.

برای محاسبه حجم اسپرم، مقدار اسپرم بدست آمده از هر مولد نر در مرحله اسپرم گیری را در داخل

پس از اینکه لاروها تقریباً دوسوم کیسه زرده خود را جذب کردند (۵۵ تا ۶۰ روز پس از لقاح)، با شمارش لاروهای تلف شده، میزان بازماندگی لارو تا مرحله جذب کیسه زرده محاسبه شد و لاروهای سالم برای تغذیه دستی درون ترف ریخته شدند (۱۰). برای آنالیز داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه (Anova) و آزمون توکی (Tukey) در نرم افزارهای کامپیوتری EXCEL و SPSS استفاده شد و داده‌ها به صورت $M \pm SE$ بیان شد و زمانی که $(P \leq 0/05)$ بود معنی دار تلقی گردید.

نتایج

نتایج حاصل از ارزیابی ۹ عدد مولدین نر در گروه‌های سنی ۴، ۵ و ۶ سال که شامل وزن قبل و بعد از اسپرم‌گیری، طول کل، حجم اسپرم، غلظت اسپرم و اسپرماتوکریت بود در جدول ۱ خلاصه شده است. همچنین نتایج حاصل از لقاح که شامل فاکتورهای درصد لقاح، درصد بازماندگی تا مرحله چشم‌زدگی، درصد ظهور لارو و درصد بازماندگی لارو تا مرحله جذب کیسه زرده بر روی تیمارها، در جدول ۲ آمده است.

حدود ۱۴ روز پس از لقاح، با روش شوک‌دهی، (۸)، تخم‌های چشم زده از تخم‌های تلف شده مشخص گردید. تخم‌ها از فاصله ۲۰ سانتی‌متری در سینی دیگری تخلیه شده که طی این عمل تخم‌های لقاح نیافته یا تلف شده، سفید گشتند. تخم‌های تلف شده با استفاده از پوآر جمع‌آوری شده و مورد شمارش قرار گرفتند. تخم‌های چشم زده به دقت شمارش و میزان بازماندگی تخم‌ها تا مرحله چشم‌زدگی از طریق رابطه ذیل محاسبه گردید.

$$\text{درصد چشم‌زدگی} = \frac{\text{تعداد تخم‌های چشم زده}}{\text{تعداد تخمک‌های لقاح یافته}} \times 100$$

با تفریخ شدن تخم‌ها و ظهور لارو دارای کیسه زرده (۳۰ تا ۳۵ روز پس از لقاح)، تخم‌های تفریخ نشده با استفاده از پوآر جمع‌آوری شده و پس از شمارش آن‌ها درصد تفریخ از طریق رابطه ذیل بدست آمد (۱۰).

$$\text{درصد تفریخ} = \frac{\text{تعداد لارو}}{\text{تعداد تخم‌های چشم زده}} \times 100$$

جدول ۱: اطلاعات مربوط به مولدین نر

پارامتر	سن مولد (سال)		
	۶	۵	۴
وزن قبل از اسپرم گیری (گرم)	۱۷۶۶/۶۷ ± ۱۵۲/۷۵ ^a	۱۱۰۰ ± ۰/۰ ^b	۸۶۶/۶۷ ± ۵۷/۷۴ ^b
وزن بعد از اسپرم گیری (گرم)	۱۷۳۵/۰ ± ۱۵۲/۲۳ ^a	۱۰۵۲/۶۷ ± ۱۱/۶۸ ^b	۸۳۸/۶۷ ± ۵۹/۵ ^b
طول کل (سانتی متر)	۵۶/۳۳ ± ۲/۰۸ ^a	۵۰/۳۳ ± ۰/۵۸ ^b	۴۴/۶۷ ± ۱/۵۳ ^c
حجم اسپرم (میلی لیتر)	۳۱/۸۳ ± ۶/۲۲ ^a	۲۲/۳۱ ± ۲/۸۷ ^{ab}	۱۷/۷۴ ± ۱/۷۱ ^b
غلظت اسپرم (۱۰ ^۹ اسپرم در میلی لیتر)	۱۶/۱۶ ± ۷/۲۷ ^a	۱۴/۸ ± ۶/۱۹ ^a	۱۷/۶ ± ۷/۷۷ ^a
اسپرمتوکریت (درصد)	۳۵/۳۳ ± ۱۷/۰۱ ^a	۲۸/۶۷ ± ۱۰/۱۲ ^a	۳۸/۰ ± ۱۰/۴۴ ^a

جدول ۲: نتایج حاصل از تکثیر مصنوعی در تیمارهای مورد مطالعه

پارامتر	سن مولد (سال)		
	۶	۵	۴
درصد لقاح	۹۸/۵ ± ۰/۵۰ ^a	۹۶/۶۶ ± ۰/۵۰ ^b	۹۸/۵ ± ۰/۵۸ ^a
درصد بازماندگی تا مرحله چشم زدگی	۹۱/۱۶ ± ۱/۸۰ ^a	۸۷/۳۳ ± ۰/۲۹ ^b	۹۱/۱۷ ± ۱/۷۵ ^a
درصد ظهور لارو	۹۱/۶۶ ± ۰/۲۸ ^b	۸۶/۳۳ ± ۰/۷۶ ^c	۹۴/۵ ± ۱/۵۰ ^a
درصد بازماندگی لارو تا مرحله جذب کیسه زرده	۹۵/۸۳ ± ۰/۲۸ ^a	۹۲/۳۲ ± ۱/۵۲ ^c	۹۷/۱۶ ± ۰/۷۷ ^a

بحث

حجم اسپرم یکی از فاکتورهای کمی اسپرم است که میزان آن تابع گونه ماهی، تعداد دفعات اسپرم گیری، سن، وزن، نژاد ماهی، مهارت اسپرم گیر و مقدار اسپرم است (۱۴) و در گونه‌های مختلف ماهی‌ها در هر زمان متغیر می‌باشد (۱۹). نتایج این تحقیق نشان داد که، مولدین نر ۶ ساله دارای حجم اسپرم بیشتری از سایر مولدین بود و این نتیجه مشابه نتایج صورت گرفته بر روی قزل‌آلای رنگین کمان توسط شمس پور (۱۳۸۷) است که مولدین ۵ ساله حجم اسپرم بیشتری در مقایسه با مولدین ۳ ساله داشتند. همچنین Tekin و همکاران (۲۰۰۳) بیان کردند حجم اسپرم با سن، طول و وزن مولدین نسبت مستقیم و با غلظت اسپرم نسبت معکوس

با توجه به آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه فاکتورهای وزن قبل و بعد از اسپرم گیری، طول کل و حجم اسپرم بر اساس سنین ۴، ۵ و ۶ سال نتیجه نشان داد که بین این سنین، از نظر وزن فاکتورهای فوق اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده می‌گردد ($P \leq 0/05$).

نتایج آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که بین تیمارهای مورد بررسی از نظر میانگین فاکتورهای درصد لقاح، درصد بازماندگی تا مرحله چشم‌زدگی، درصد ظهور لارو و درصد بازماندگی لارو تا مرحله جذب کیسه زرده اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده می‌گردد ($P < 0/05$).

بود که ارتباط مثبت و معنی‌دار آماری بین اسپرماتوکریت و غلظت اسپرم وجود دارد. Tekin و همکاران (۲۰۰۳) بیان نمودند که با افزایش سن، غلظت اسپرم یک روند کاهشی را طی می‌نماید. شاید این امر به دلیل افزایش تولید حجم اسپرم در سن‌های بالا باشد زیرا هر چه اندازه مولد بزرگتر باشد، اندازه بیضه‌ها نیز بزرگتر می‌شود و به نسبت آن حجم اسپرم بالاتر می‌رود و از آنجا رابطه حجم اسپرم و غلظت آن به صورت یک رابطه معکوس می‌باشد پس با افزایش سن حجم اسپرم بیشتر شده، اما غلظت آن کاهش می‌یابد.

در تحقیق حاضر مولدین نر ۴ ساله بیشترین میانگین درصد لقاح، درصد بازماندگی تخم تا مرحله چشم‌زدگی، درصد ظهور لارو و درصد بازماندگی لارو تا مرحله جذب کیسه زرده را نشان دادند. در بررسی‌های صورت گرفته توسط شمس پور (۱۳۸۷) بر روی گروه سنی ۳، ۴ و ۵ سال قزل‌آلای رنگین کمان، مولدین نر ۴ ساله مناسب‌ترین نتایج را در روند انکوباسیون تخمک‌ها به دنبال داشتند و همچنین در تحقیق لرستانی (۱۳۸۳)، مولدین نر ۴ ساله قزل‌آلای رنگین کمان در مقایسه با مولدین نر ۲ و ۳ ساله، درصد تفریح بالاتری را نشان دادند.

بر اساس نتایج این تحقیق، سن مولدین اثر مؤثری بر روی مراحل پس از لقاح دارد. این تحقیق با انجام مراحل عملی لقاح بر روی سنین و وزن‌ها و سائزهای مختلف مولدین نر و بررسی روند انکوباسیون تخم‌های حاصل تا مرحله جذب کیسه زرده توسط لاروها و آغاز تغذیه فعال، بهترین سن مولدین نر ماهی آزاد دریای خزر جهت عملیات تکثیر را پیشنهاد کرده تا با تعیین سن این مولدین و کاربرد آن‌ها در تکثیر مصنوعی از نظر کمی و کیفی لاروهای مناسبی را برای پرورش و

دارد. در بررسی حاضر بر روی مولدین ماهی آزاد دریای خزر این پدیده مورد تأیید قرار گرفته است.

اختلاف زیادی بین تراکم اسپرم در گونه‌های مختلف ماهیان وجود دارد. تراکم اسپرم به عنوان یکی از راه‌های تعیین غلظت اسپرم تا حد زیادی به حجم منی در یک‌بار اسپرم‌گیری بستگی دارد (۹).

تعداد اسپرم در ماهیان نر به عنوان شاخص زیستی نیز مطرح می‌باشد و به نوع گونه بستگی دارد. مطابق نظریه Smirnov (۱۹۶۳) نرهای ماهی آزاد کوهو (*Oncathynchus kisutch*) ۱۱۵ بیلیون عدد سلول نر در سانتی‌متر مکعب تولید می‌کنند در صورتی که نرهای ماهی آزاد چام (*Oncathynchus keta*) ۹۳ بیلیون عدد سلول نر در سانتی‌متر مکعب تولید می‌کنند. یکی از روش‌های بررسی غلظت اسپرم تعیین درصد اسپرماتوکریت است که این عمل با سانتریفوژ کردن مقدار مشخصی از اسپرم و جداسازی مایع پلاسما از سلول‌های جنسی و مواد مختلف موجود در منی انجام می‌گیرد. اسپرماتوکریت میزان سلول‌های موجود در یک حجم مشخصی از منی می‌باشد. تغییرات هورمونی در زمان مهاجرت و آلودگی‌های محیطی باعث ایجاد اختلاف در میزان اسپرماتوکریت در یک گونه می‌شود (۱۵).

در این بررسی در مولدین نر ۴ ساله درصد اسپرماتوکریت و غلظت اسپرم بیشتر از مولدین ۵ و ۶ ساله بود. و در بررسی‌های صورت گرفته توسط شمس پور (۱۳۸۷) بر روی قزل‌آلای رنگین کمان، در مولدین نر ۳ ساله، بیشترین درصد اسپرماتوکریت و غلظت اسپرم نسبت به مولدین ۵ ساله مشاهده شد. این نتیجه توسط Rakitin و همکاران (۱۹۹۹) بر روی روغن ماهی اطلس (*Gadus morhua*) گزارش شده

۴. عبدلی، ا. و نادری، م.، ۱۳۸۷. تنوع زیستی ماهیان حوضه جنوبی دریای خزر، انتشارات علمی آبریان. ۲۴۲ ص.

۵. کازانچف، الف.ن.، ۱۹۸۱. ماهیان دریای خزر و حوزه آبریز آن. ترجمه: شریعتی، ا.، ۱۳۸۳. انتشارات نقش مهر. ۲۰۵ ص.

۶. لرستانی، ر.، ۱۳۸۳. اثر سن مولد نر و محلول‌های تقویت کننده بر مدت زمان تحرک اسپرم و میزان باروری ماهی قزل‌آلای رنگین کمان، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور، ۶۷ ص.

۷. یگانه، س.، ۱۳۸۱. اثر تقویت کننده‌ها بر روی مدت تحرک اسپرم و توان لقاح در کفال خاکستری *Mugil cephalus*، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، کرج: دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۱۱۲ ص.

8. Aas, G.H.; Refstie, T. and Gjerde, B., 1991. Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. *Aquaculture*, 95: 125-132.
9. Billard, R.; Cosson, J.; Perchec G. and Linhart, O., 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*, 129: 95-112.
10. Billard, R. and Gillet, C., 1981. Aging of eggs and temperature potentialization of micropollutant effects of the aquatic medium on trout gametes. *Cah. Lab. Hydrobiol. Montreau*, 12: 35-42.
11. Bromage, N.R. and Cumarantunga, R., 1988. Egg production in the rainbow trout, In *Recent advances in Aquaculture*, vol: 3., Muir, J.F, R.J., Robert, Eds, pp: 63-139.
12. Cabrita, E.; Anel, L. and Herraéz., P.M., 2001. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved trout sperm. *Theriogenology*, 56: 623-635.

تکثیر در سال‌های بعد در اختیار داشته باشیم. مولدین نر ۴ ساله با توجه به نتایج این تحقیق می‌توانند مناسب‌ترین گزینه‌ها برای تولید در مراکز تکثیر و پرورش باشند.

سپاسگزاری

بر خود لازم می‌دانیم از جناب آقای دکتر لرستانی، همچنین کلیه کارشناسان و کارکنان محترم مرکز بازسازی ذخایر آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت از جمله جناب آقایان میار، جعفرنژاد و بیکلریان و همکاری ریاست محترم ایستگاه تحقیقات اکولوژی آبریان دریای خزر خیرود، جناب آقای مهندس سالاروند که با لطف و راهنمایی‌های ارزنده آنها تحقیق حاضر انجام گرفت، تشکر و سپاسگزاری نمایم.

منابع

۱. پرافکنده حقیقی، ف.، ۱۳۷۹. روش‌های تعیین سن آبریان، موسسه تحقیقات شیلات ایران. ص: ۱۳-۱۵.
۲. جمalzاده، ح. ر.، ۱۳۸۰. زیست‌شناسی و اکولوژی آزاد ماهی دریای خزر. سمینار کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال. ۶۵ ص.
۳. شمس پور، س.، ۱۳۸۷. بررسی اثر توان باروری مولدین بر روی درصد لقاح، روند انکوباسیون و بازماندگی لارو در قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum (1792). پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده منابع طبیعی - شیلات. ۹۲ ص.

13. Gage, M.J.G.; Stockley, P. and Parker, G.A., 1995. Effects of alternative male mating strategies on characteristics of sperm production in the Atlantic salmon (*Salmo salar*): theoretical and empirical investigations. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 350: 391-399.
14. Ingermann, R.; Holcomb, L.; Robinson, M. and Cloud J.G., 2002. Carbon dioxide and Ph effect sperm motility of white sturgeon 9 (*Acipenser transmontanus*). The Journal of Experimental Biology 205, 2885-2890.
15. Irvin, R.; Schultz, Annskillman, Jean-Marc Nicolas, Daniel, G. Cyr and James, J., 2002. Naglers, Battelle Msl-Pnml Short-Term Exposure to 17a-Ethynylestrodial Decreases the Fertility of Sexually Maturing Male Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). John Wiley & Sons, Inc. 62-17463. U.S.A. 545 P.
16. Kayam, S., 2004. The Effect of Mating Different Age Groups of Broodstocks on the Reproductive Performance, Sex Ratio, Growth and Survival Rate of Rainbow Trout. J. Freshwat. Ecol. Vol. 19, no.4, pp.695-699.
17. Lee, C.S. and Donaldson, E.M., 2001. General discussion on "Reproductive biotechnology in finfish aquaculture. Aquaculture, 197: 303-320.
18. Liley, N.R.; Tamkee, P.; Tsai, R. and Hoysak, D.J., 2002. Fertilization dynamics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effect of male age, social experience, and sperm concentration and motility on ivitro fertilization. Can. J. Fish. Aquat. Sci./J. Can. Sci. Halieut. Aquat. Vol. 59, no. 1, pp. 144-152.
19. Moczarski, M., 1976. Cryobiological factors in grass carp preservation. Proc. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insemin. 8th, 1976. Vol. 4, PP. 1030-1033.
20. Moon, S.H.; Kwon, Y.J.; Lee, K.J. and Chang, J.Y., 2003. Increased plasma 17-hydroxyprogesterone and milt production in response to gonadotropin-releasing hormone agonist in captive male starry flounder, *platichthys stellatus*. Aquaculture, 218: 703-716.
21. Rakitin, A.; Ferguson, M. and Trippel, E., 1999. Spermatocrit and spermatozoa density in Atlantic Cod (*Gadus morhua*): Correlation and variation during the spawning season. Aquaculture 170: 349-358.
22. Smirnov A.Z., 1963. Producirovanie spermy tihookeankimi iososjami roda Oncorhynchus, V.Pr.Icht., 3, 26: 84-98.
23. Stockley, P.; Gage, M.J.G.; Parker, G.A. and Moller, A.P., 1997. Sperm competition in fishes: the evolution of testis size and ejaculate characteristics. Am. Nat. 194: 933-954.
24. Suquet, M.; Omnes, M. H.; Normant, Y and D.K. Fauve. 1992. Assessment of sperm concentration and motility in Turbot, *Scoph thalmus maximus* Aquaculture 101:177-185.
25. Tekin, N.; Seçer, S.; Akçay, E.; Bozkurt, Y. and Kayam, S., 2003. The effect of age on spermatological properties in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W., 1792). Türk. J. Vet. Anim. Sci., 27: 37-44.
26. Tvedt, H.B.; Benfey, T.J.; Martin-Robichaud, D.J. and Power, J., 2001. The relationship between spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. Aquaculture, 191: 191-200.
27. Vladi, T.V.; Afzelius, B.A. and Bronnikov, G.E., 2002. Sperm quality as reflected through morphology in salmon alternative life histories. Biology of Reproduction, 66: 98-105.
28. Yaron, Z., 1995. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. Aquaculture, 129: 49-73.