تأثير محلولهاي فعال كننده بر افزايش ميزان لقاح در ماهي قزل‌آلاي رنگين كمان (*Oncorhynchus mykiss*)

رضا لرستانی[1]*، محمد رضا احمدی[2]، محمد رضا كلباسي[3]

۱- دانش آموخته كارشناسي ارشد شيلات، دانشكده منابع طبيعي و علوم دريايي، دانشگاه تربيت مدرس، تهران
۲- دانشيار دانشكده دامپزشكی، دانشگاه تهران
۳- استاديار گروه شيلات، دانشكده منابع طبيعي و علوم دريايي، دانشگاه تربيت مدرس، نور

چكيده

در اين تحقيق اثر سه محلول فعال كننده اسپرم (محلول فعال كنندههای ۱، ۲ و آب معمولی) بر مدت زمان تحرک اسپرم و ميزان باروری ماهی قزل آلای رنگين كمان بررسی شد. محلولهای فعال كنندۀ اسپرم اختلاف معناداری را در خصوص مدت زمان تحرک اسپرم در مقايسه با هم نشان دادند. بالاترين مدت زمان تحرک اسپرم در فعال كنندۀ ۲ (۲±۹۱/۰۸ ثانيه) و كمترين ميزان در حضور آب (۰/۲۴±۲۶/۰۱ ثانيه) بود.

ميزان باروری حاصل از فعال كنندۀ ۲ علاوه بر بالاتر بودن از فعال كنندۀ آب، اختلاف معناداری را با آن نشان داد. اما اين ميزان در فعال كنندۀ ۱ (۱/۷۳±۸۵/۰۴) اختلاف معناداری را با فعال كننده ۲ و آب نشان نداد بلكه حد واسط آن دو قرار داشت. ميزان باروری با استفاده از فعال كنندۀ ۲ (۱/۴۵±۸۶/۸۵) بيشترين ميزان و با استفاده از آب (۱/۵۸±۸۲/۴۵) كمترين ميزان بود.

كليد واژگان: فعال كننده، تحرک، اسپرم، باروری، قزل آلای رنگين كمان، كلاردشت.

۱- مقدمه

بهبود كيفيت مواد تناسلی مولدان و كنترل توليد مثل، كارايی تكثير در آبزی پروری را افزايش می‌دهد [۱، ۲]. مطالعه زيست‌شناسی اسپرم ماهيان از قرن ۱۹ آغاز شد [۳]. آگاهی از دانش جديد در گرايشهای مختلف زيست شناسی اسپرم [۴] عامل مهمی در كنترل روشهای لقاح مصنوعی در ماهی و گونه‌های در حال انقراض تلقی می‌شود [۵]. در حال حاضر، پژوهشهای بيشتری در آزمايشگاههای مختلف به منظور بهبود فرايند لقاح و كنترل توليد مثل در سطوح آبزی پروری اقتصادی و بازسازی ذخاير در حال اجراست [۵].

خصوصيت قابل توجه در توليد مثل آزاد ماهيان دوره كوتاه زندگی گامتهاست. اسپرم تا زمان قرار نگرفتن در مجاورت آب غير متحرک است؛ پس از آن فقط به مدت ۳۰ ثانيه متحرک باقی می‌ماند [۶]. اگر چه اغلب مطالعات نشان می‌دهد اسپرم آزاد ماهيان به ظاهر در فاصله چند دقيقه پس از فعال سازی با محلولهای فعال كنندۀ نمكی يا مايع حفره شكمی، تحرک و قابليت لقاحی خود را از دست می‌دهد، اما محققان زيادی دوره‌های طولانی‌تری را برای تحرک اسپرم، بين چندين ساعت تا ۷ روز، ثبت كرده‌اند [۷].

آزمايشهای انجام شده در مورد به تاخير انداختن لقاح[1] گامتها بعد

* نويسندۀ مسؤول مقاله: تلفن: ۰۸۳۵۴۲۲۵۸۵۳، E-mail: reza_lorestany@yahoo.com

1. Delayed Insemination of Gamets

Archive of SID
www.SID.ir

از فعال سازی، بوضوح نشان می‌دهد که میزان لقاح بشدت تابع تحرک اسپرم است [۸]. بر اساس تحقیقات جدید روی مواد تناسلی ماهی کپور، بخصوص اسپرم این ماهی، استفاده از محلولهای فعال کننده نمکی به علت حفظ ساختار تاژک اسپرم، زمان حرکت اسپرم را افزایش می‌دهد؛ پس بتدریج با بهبود فنون تلقیح مصنوعی، محققان برای لقاح از محلولهای فعال کنندهٔ نمکی به جای آب استفاده کردند [۹]. هدف از اجرای این تحقیق بررسی اثر محلولهای فعال کننده نمکی بر افزایش مدت زمان تحرک اسپرم و میزان باروری در قزل‌آلای رنگین کمان است.

۲- مواد و روش کار

تحقیق حاضر در آبان ماه سال ۱۳۸۲در مرکز تکثیر و پرورش آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت انجام شد. برای آماده سازی محلولهای فعال کنندهٔ مختلف، ترکیبات مواد شیمیایی مربوط به هر یک، بر حسب g/L بدقت توزین شد (جدول ۱)؛ سپس با ریختن مواد مربوط به هر فعال کننده در بشر جداگانه‌ای، به وسیله دستگاه همزن مغناطیسی مواد در L ۱ از آب مقطر به طور کامل حل و pH محلولها با کمک HCl، NaOH و دستگاه pH متر تنظیم شد.

۳- عملیات تکثیر

به منظور اجرای عملیات تکثیر از ۸ ماهی ماده و ۱۵ ماهی نر استفاده شد. در ابتدا ماهیان ماده به وسیله ماده MS ۲۲۲ بیهوش و تخمکهای مورد نیاز برای لقاح تهیه شدند. برای یکسان شدن شرایط تکثیر برای تمام تیمارها تخمکهای استحصال شده از ماهیان ماده مخلوط شدند [۱۱]. به دلیل احتمال عقیم بودن یا کیفیت نامناسب اسپرم در بعضی از مولدان یا کیفیت بالای اسپرم در بعضی دیگر، اسپرمهای مولدان نر با هم مخلوط گردیدند. در مجموع ۳ تیمار (آب، تقویت کننده ۱ و ۲) و ۲۷ تکرار انجام شد.

برای اجری لقاح در هر تیمار، ۹ دسته تخمک ۵۰mL با پیمانه از تخمکهای مخلوط شده مولدان ماده جدا و برای جلوگیری از خطا با استفاده از تنظیف، مایع حفره شکمی از تخمکها جدا شد زیرا مایع حفره شکمی خود یک فعال کننده اسپرم است [۷].

سپس با قرار دادن هر دسته تخمک به طور جداگانه در ظروف پلاستیکی متوسط، برای هر ظرف، ۰/۵mL اسپرم با استفاده از میکروپیپت برداشت و با تخمکهای موجود در آن به طور کامل مخلوط شد. به منظور فعال‌سازی اسپرم و انجام عمل لقاح ۵mL آب در تیمار گروه شاهد، ۵mL فعال کننده ۱ به عنوان تیمار اول و ۵mL فعال کننده ۲ به عنوان تیمار دوم به هر ظرف اضافه شد؛ پس از آن به مدت ۲ دقیقه برای تکمیل لقاح به طور کامل هم زده شد. سپس برای حذف اسپرمهای اضافه و پوسته‌ها، تخمهای موجود در هر ظرف، بدقت شستشو شدند. در مرحله بعد یک تراف آبگیری و جریان ملایمی از آب در آن ایجاد شد. تخمکهای لقاح یافته موجود در ظروف پلاستیکی بعد از شستشو، با قرار گرفتن در آبکشهای از پیش شماره‌گذاری شده برای جذب آب به مدت ۳۰ دقیقه در تراف قرار گرفتند (شرایط معمول کارگاه).

جدول۱ ترکیبات ۲ محلول انتخاب شده برای انجام آزمایشها بر حسب g/L [۱۰]

مواد / محلولها	NACL	$CACL_2.2H_2O$	TRIS	GLYCIN	PH
محلول فعال کننده ۱	۵/۵۴	–	۲/۴۲۲	۳/۵۷	۸/۴
محلول فعال کننده ۲	۷/۳۰۵	۰/۷۳۵	–	–	۷/۷

Archive of SID
www.SID.ir

۴- سنجش مدت زمان تحرک اسپرم

به منظور سنجش مدت زمان تحرک مخلوط اسپرمهای مولدان و سنجش تأثیر گروه شاهد بر مدت زمان تحرک اسپرم، پس از قرار گرفتن یک قطره آب روی لام در زیر میکروسکوپ، یک قطره اسپرم با آن مخلوط شد. مدت زمان تحرک اسپرم بلافاصله با استفاده از کرنومتر ثبت گردید. مدت زمان تحرک اسپرم تا زمانی که تحرک سلولها به میزان ۹۵-۹۹٪ متوقف شوند، در نظر گرفته شد [۷، ۸، ۱۲]. این آزمایش برای فعال کنندههای ۱، ۲ و گروه شاهد (آب)، حداقل ۳ بار به عنوان ۳ تکرار صورت پذیرفت.

۵- انکوباسیون تخمها

برای انجام انکوباسیون تخمهای لقاح یافته، ۳ تراف و ۹ سینی به کار رفت و در هر تراف ۳ سینی قرار داده شد. هر سینی به وسیلهٔ نئوپلاست به ۳ قسمت مساوی تقسیم و تمام قسمتهای تقسیم بندی شده سینیها به طور تصادفی شماره‌گذاری شدند. تخمکهای لقاح یافته، پس از جذب آب، بدون شناسایی قبلی در سینیها قرار گرفتند. ۲ روز پس از لقاح تا بعد از مشاهده اولین تفریخ، تخمها به وسیله مالاشیت گرین برای پیشگیری از قارچ زدگی ضد عفونی شدند. میزان مالاشیت گرین مورد استفاده برای هر تراف ۱g/L بود. تخمها یک روز در میان به مدت ۴۵-۶۰ دقیقه در معرض این ماده قرار گرفتند (شرایط معمول کارگاه).

۶- محاسبه میزان لقاح

۶- ۷ روز پس از لقاح در حدود ۹۰ تخم پس از شفاف سازی به وسیله محلول شفاف کننده[1]، مشاهده شد و نمونه‌های دارای کمربند عصبی شمارش شدند. درصد لقاح مطابق رابطه ذیل محاسبه و ثبت شد [۴، ۱۳].

۱۰۰× (تعداد کل تخمکها/تعداد تخمکهای لقاح یافته)= میزان لقاح

۷- تجزیه و تحلیل آماري

اطلاعات جمع آوری شده از بررسیها، مطالعات میدانی و آزمایشگاهی با استفاده از نرم افزار spss و به شرح زیر تجزیه و تحلیل شدند. ابتدا تأیید نرمال بودن داده‌ها به وسیلهٔ آزمون کولموگراف- اسمیرنف[2] صورت گرفت. داده‌هایی که نرمال نبودند با روشهای معمول، نرمال شدند. برای سنجش محلولهای متفاوت فعال کننده بر میزان لقاح و مدت زمان تحرک اسپرم، از آنالیز واریانس یک طرفه و برای مقایسه میانگینها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۹۵٪ استفاده شد.

۸- نتایج

اثر فعال‌کننده‌هاي متفاوت اسپرم (آب، فعال‌کنندة ۱ و فعال‌کنندة ۲) بر مدت زمان تحرک اسپرم

نتایج تجزیه واریانس یک طرفه نشان داد، بین مدت زمان تحرک در استفاده از محلولهای متفاوت فعال کننده اسپرم اختلاف معناداری وجود دارد (f=۲۹۵۸/۲۹۹, df=۲, P≤۰/۰۱). براساس نتایج به دست آمده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن، بین فعال‌کنندههای متفاوت اسپرم اختلاف معناداری بود (P≤۰/۰۵)؛ یعنی فعال کنندهٔ ۲ بیشترین (۲±۹۱/۰۸ ثانیه) و آب کمترین (۰/۲۴±۲۶/۰۱ ثانیه) مدت زمان تحرک را باعث شد. فعال کننده ۱ (۳/۸۸±۸۴/۴۲ ثانیه) نیز اختلاف معناداری را با فعال کننده ۲ و آب نشان داد (P≤۰/۰۵) (نمودار۱).

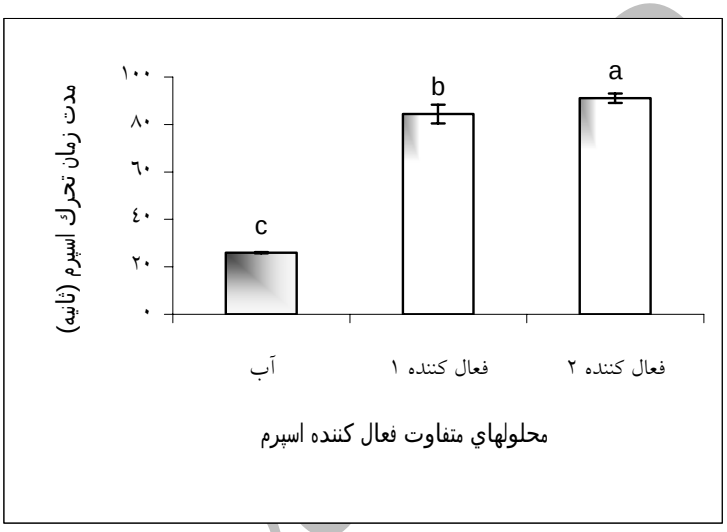
1- Clearing solution (Stockard's solution): Formaldehyde 5%+ Acetic acid 4%

2. Kolmogorov-Smirnov

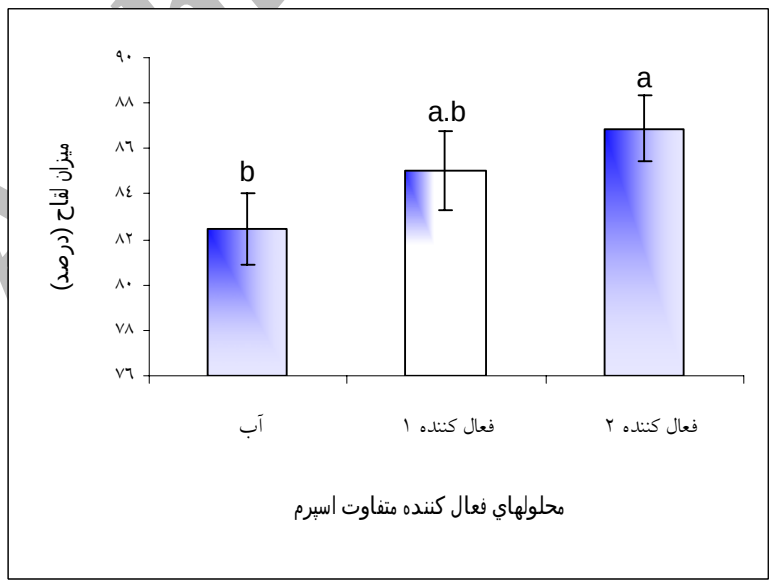
Archive of SID
www.SID.ir

۹- اثـر محلـولهاي فعال‌كننـدة اسپـرم (آب، فعال‌كنندة ۱ و ۲) بر ميزان لقاح

ميزان لقاح حاصل از استفاده فعال كننده‌هاى متفاوت اسپرم اختلاف معناداری را با يكديگر نشان مى‌دهند (f=۳/۹۰۸ df= ۲, P≤۰/۰۵). نتايج آزمون دانكن نشان داد، فعال كنندۀ ۲ با گروه شاهد اختلاف معناداری دارد (P≤۰/۰۵)؛ اين در حالى است كه فعال كنندۀ ۱ اختلاف معناداری را با فعال كنندۀ ۲ و آب نشان نداد (P≥۰/۰۵). ميزان لقاح با استفاده از فعال كنندۀ ۲ بيشترين ميزان (۱/۴۵±۸۶/۸۵) و با استفاده از آب كمترين ميزان بود (۱/۵۸±۸۲/۴۵). اين ميزان در فعال كنندۀ ۱ (۱/۷۳±۸۵/۰۴) اختلاف معناداری را نسبت به دو فعال كننده ديگر نشان نداد (نمودار ۲).



نمودار۱ تأثير فعال كننده‌هاى متفاوت بر مدت زمان تحرك اسپرم



نمودار۲ اثر محلولهاى متفاوت فعال كنندۀ بر ميزان لقاح

www.SID.ir

۱۰- بحث

با مقایسه ترکیبات فعال کنندههای ۱ و ۲ (جدول ۱) دیده می‌شود یون کلسیم که یون ضروری برای آغاز تحرک اسپرماتوزوآ در اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان است [۳]، در ترکیب فعال کننده ۲ وجود دارد. یون کلسیم مهمترین عامل برای القا و تمدید مدت زمان تحرک اسپرم می‌باشد [۱۰]. از آنجا که با اضافه کردن ۱mm کلسیم به محلولهای فعال کنندهٔ اسپرم، مدت زمان تحرک اسپرم فراتر از ۳۰ ثانیه به طول می‌انجامد[۱۴] و از طرفی وجود یونهای کلسیم و سدیم نیز اثر تقویت کنندگی بر مدت زمان تحرک اسپرم دارند [۱۵]، پس عملکرد مناسبتر فعال کننده ۲ بر مدت زمان تحرک اسپرم نسبت به فعال کننده ۱ و اثر این دو فعال کننده بر افزایش مدت زمان تحرک اسپرم در مقایسه با گروه شاهد قابل توجیه است.

pH محیط لقاح تأثیر زیادی در میزان موفقیت لقاح دارد [۱۶]. شرایط قلیایی مشابه یا بالاتر از pH مایع منی یا مایع حفره شکمی باعث تحرک و لقاح بیشتر در اسپرماتوزوای آزاد ماهیان می شود [۱۷]. pH مایع منی نیز معمولاً بالاتر از ۷/۵ [۳] و pH مایع حفره شکمی نیز ۸/۲۵ – ۸/۶۵ است [۱۸، ۱۹]. با مقایسه pH محلولهای فعال کننده ۱ و ۲ با pH مایع منی و مایع حفره شکمی، مشاهده می‌شود که pH فعال کنندهٔ ۲ در حدود pH مایع منی و pH فعال کنندهٔ ۱ نیز برابر با pH مایع حفره شکمی است. عملکرد مناسب این دو محلول در مقایسه با گروه شاهد در تحرک اسپرم دور از انتظار نیست زیرا این دو محلول علاوه بر داشتن pH مناسب، حاوی یون کلسیم و یون سدیم‌اند. یونهای سدیم و کلسیم می‌توانند عمل جلوگیری کننده پتاسیم را در مایع منی بر تحرک اسپرم کاهش دهند [۲۰، ۲۱]. در این میان اثر پیشگفته برای یونهای دوظرفیتی مانند کلیسم شدیدتر و به دلیل وجود یون کلسیم در ترکیب فعال کنندهٔ ۲، عملکرد آن در مقایسه با فعال کننده ۱ بهتر بود. کلسیم در رفتار اسپرم بعد از آغاز تحرک، نقش تنظیمی دارد به طوری که با افزایش غلظت خارج سلولی یون کلسیم، مدت زمان تحرک اسپرم افزایش می یابد [۳]. نزدیک بودن pH فعال کنندهٔ ۲ به pH مایع منی مزیت دیگری را نیز داراست و آن وارد نشدن شوک اختلاف pH فعال کننده و مایع منی به سلولهای اسپرم است.

در نمودار ۱ دیده می‌شود که فعال سازی اسپرم به وسیله آب کمترین مدت زمان تحرک را در مقایسه با فعال کنندههای ۱ و۲ نشان می‌دهد. اسپرماتوزوآ بعد از قرار گرفتن در معرض آب تغییرات ساختاری سریعی در جهت نابودی نشان می دهد و به این دلیل عمر گامتها در آب بسیار کوتاه است [۲۲]. با استفاده از فعال کننده‌ها مانند محلول نمکی در اسپرم ماهی کپور نشان داده شد که محلولهای فعال کنندهٔ نمکی باعث حفظ ساختار تاژک اسپرم می‌شوند و در نتیجه مدت زمان تحرک در مقایسه با آب بالاتر می‌رود [۹].

نتایج این تحقیق نیز تأیید کننده نتایج بیلارد[1] در سال ۱۹۹۲ و احمدیان در سال ۱۳۸۱ است، زیرا مدت زمان تحرک اسپرم در فعال کننده‌ها در مقایسه با آب علاوه بر بیشتر بودن، تفاوت معناداری را نیز با آن نشان داد. رورانگوا[2] و همکاران نیز در سال ۲۰۰۴ و لایلی[3] و همکاران در سال ۲۰۰۲ دامنه مدت زمان تحرک اسپرم در ماهی قزل آلای رنگین کمان را کمتر از ۳۰ ثانیه گزارش کردند[۸، ۲۳]. نمودار ۲ نشاندهندهٔ اختلاف معنادار فعال کنندهٔ ۲ بر میزان لقاح نسبت به گروه شاهد است؛ یعنی فعال کنندهٔ ۲ میزان بالاتر لقاح را باعث شده است.

افزایش میزان لقاح با استفاده از فعال کنندهٔ ۲ در مقایسه با گروه شاهد را می‌توان به دلایل متعددی توجیه کرد. واضح است افزایش مدت زمان تحرک اسپرم، شانس رسیدن اسپرمها به میکروپیل و انجام عمل لقاح را افزایش می‌دهد؛ بنابراین نتیجه آن افزایش میزان لقاح تخمکهاست. از آنجا که نقطه منحصر به فردی برای نفوذ اسپرماتوزوآ (میکروپیل) وجود دارد و طول مسیر حرکت یک اسپرماتوزوآ (۳mm) کوتاهتر از قطر تخمک (۴–۶mm) است، بنابراین یک

1. Billard
2. Rurangwa
3. Liley

Archive of SID
www.SID.ir

اسپرماتوزوآ، در نزدیکی تخمک شانس رسیدن بـه میکروپیـل را ندارد[۲۲]. پس واضح است افـزایش مـدت زمـان تحـرک اسپرماتوزوآ شانس رسیدن آنها را به میکروپیل زیادتر می‌کند. زمانی که از آب برای فعال‌سازی اسپرم استفاده شود، هم اسپرماتوزوآ و هم تخمک صدمه می‌بینند. در تخمک سوراخ میکروپیل بسرعت به وسیله تولیدات حاصل از واکنش لایه بیرونی که بسرعت بعد از غوطه‌وری در آب ایجاد می‌شود، بسته می‌شود. اما در استفاده از فعال کننده‌های نمکی این مشکلات وجود ندارد. احتمال ترکیدن تخمکهای مولدان ماده جوان به دلیل پوستهٔ نازک تخمک در آنها هنگام تخم‌کشی زیاد است. با عنایت به این مطلب که هرگاه بیشتر از ۱٪ از تخمکها بترکند، لقاح دیگر میسر نیست؛ همچنین با توجه به این امر که مهمترین مزیت فعال کننده‌های نمکی، امکان کسب میزان لقاح بالا هنگام آلوده شدن تخمکها به وسیله زرده حاصل از شکستن تخمکهاست، پس بالا بودن میزان لقاح در فعال کنندهٔ ۲ در مقایسه با گروه شاهد به خوبی قابل توجیه است[۲۲]. استفاده از فعال کننده‌های نمکی حتی می‌تواند به عنوان یک عامل ضدعفونی کننده در مراحل اولیه لقاح باشد و انتقال بیماری را هنگام لقاح کاهش دهد[۲۲]. براساس نتایج مشهود، فعال کنندهٔ ۲ (۱/۴۵±۸۶/۸۵) در مقایسه با گروه شاهد (۱/۵۸±۸۲/۴۵) اختلاف معناداری را نشان می‌دهد و باعث افزایش حدود۴/۴۰٪ در میزان لقاح تخمکها در مقایسه با گروه شاهد می شود؛ با در نظر گرفتن کل تخمکهای قابل لقاح در مراکز تکثیر قزل آلای رنگین کمان، رقم قابل توجهی به میزان تولید لارو در کشور افزوده خواهد شد.

۱۱- منابع

[1] Yaron Z.; «Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp»; *Aquaculture*; 1995; 129: 49-73.

[2] Billard R., Cosson J., Perchec G., Linhart. O.; «Biology of sperm and artificial reproduction in carp»; *Aquaculture*; 1995; 124: 95-112.

[3] Billard R., Cosson. M. P.; «Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish»; *J. of Exp. Zool*.; 1992; 261: 122-131.

[4] Billard R., Cosson J., Crim L.W., Suquet M.; Sperm physiology and quality. In: Bromage, N. R. and Roberts, R. J. (Eds), Brood stock Management and Egg and Larval Quality. Blackwell, Oxford; 1995; 25-52.

[۵] علوی س. م. ه.؛ «بررسی مقایسه‌ای تحرک اسپرم تاس ماهی ایرانی و قابلیت لقاحی آن در آب شیرین و محلولهای نمکی»؛ *پایان نامه کارشناسی ارشد*؛ دانشکده منابع طبیعی کرج؛ ۱۳۸۱؛ ص. ۱۰۵.

[6] Hoysak D. J., Liley N. R.; «Fertilization dynamics in sockeye salmon and a comparison of sperm from alternative male phenotypes»; *J. Fish Biol*.; 2001; 58:1286-1300.

[7] Billard R.; «Effects of coelomic and seminal fluids and various saline diluents on the rainbow trout, *Salmo gairdneri*»; *J. Reprod. Ferttil.*; 1983; 68: 77-84.

[8] Liley N. R., Tamkee P., Tsai R., Hoysak D.J.; 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*.; 2002; 59: 144-152.

[۹] احمدیان ن.، مجازی امیری ب.، ابطحی ب.، نظری ر. م.؛ «استفاده از تقویت کننده‌های اسپرم در لقاح تخمک تاس ماهی ایرانی ***Acipenser persicus***»؛ *دومین همایش ملی منطقه‌ای ماهیان خاویاری*؛ رشت؛ ۴-۶ آبان؛ ۱۳۸۱؛ صص. ۱۱۱- ۱۱۵.

[۱۰] لرستانی ر.؛ «اثر محلولهای متفاوت تقویت کننده اسپرم و میزان اسپرماتوکریت بر روند تکثیر ماهی قزل آلای رنگین کمان»؛ *سمینار کارشناسی ارشد*؛ دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور؛ دانشگاه تربیت مدرس؛ ۱۳۸۳؛ ص. ۴۲.

Archive of SID
www.SID.ir

[11] Moccia R.D., Munkittrick K.R.; «Relationship between the fertilization of rainbow trout *(Salmo gairdeneri)* eggs and the motility of spermatozoa»; *Theriogenology*; 1982; 27 (4): 679-688.

[12] Aas G. H., Refstie T., Gjerde B.; «Evaluation of milt quality of Atlantic salmon»; *Aquaculture*; 1991; 95: 125-132.

[13] Bromage N. R., Cumaranataunga P. C. R.; «Egg production in the rainbow trout»; In Recent advances in Aquacultur; Muir, J.F, R.J., Roberts, R.J. and Muir, J.F. (Eds);1988; 39: 63-139.

[14] Billard R., Cosson M.P.; «Measurement of sperm motility in trout and carp. Aquaculture, a biotechnology in progress. N. Depaun, E. Jaspers, Ackefors H. and Wilkins, N. (Eds)»; European Aquaculture Society, Bredene, Belgium; 1989; 499-503.

[۱۵] یگانه س.؛ «اثر تقویت کننده‌ها بر مدت تحرک اسپرم و توان لقاح در کفال خاکستری ***Mugil cephalus***»؛ *پایان نامه کارشناسی ارشد*؛ دانشگاه تهران؛ دانشکده منابع طبیعی کرج؛ ۱۳۸۱؛ ص. ۱۱۲.

[16] Billard R., Petit J., Jalabert B., Szoilosi D.; Artificial insemination in trout using a sperm diluents. Pages 715-723 in J. H. S. Blaxter, editor. Early life history of fish. Springer-Verlag, Berlin; 1974.

[17] Cosson J., Billard R., Cibert C., Dreanno C., Suquet M.; Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In the male gamete. From basic Science to clinical application, C. Gagnon, (Ed). Cache River Press; 1999; 161-186.

[18] Nomura M.; «Studies on reproduction of rainbow trout *Salmo gairdnerii* with special reference to egg taking- VI. The activities of spermatozoa in different diluents and preservation of semen»; *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*; 1964; 30: 723-733.

[19]Baynes S. W., Scott A.P., Dawson A. P.; «Rainbow trout, *Salmo gairdnerii* Richardson, Spermatozoa: Effect of cation and pH on motility»; *J. Fish Biol.*; 1981; 19: 259-267.

[20] Linhart O., Slechta V., Slavik T.; «Fish sperm composition and biochemistry»; *Bull. Inst. Zool. Acad. Sinica. Monograph*; 1991; 16: 285-311.

[21] Stoss J.; Fish gamete preservation and spermatozoa physiology. In: W.S. Hoar, D.J. Randall and E.M. Donaldson (Eds), Fish Physiology, Vol. IXB., Academic press, London; 1983; 305-350.

[22] Billard R.; «Reproduction in rainbow trout: Sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes»; *Aquaculture*; 1992; 100: 263-298.

[23] Rurangwa E., Kime D. E., Ollevier F., Nash J. P.; «The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish»; *Aquaculture*; 2004; 234:1-28.

Archive of SID

www.SID.ir