ارزيابی غلظت اسپرم، اثر فعال کننده‌ها و ميزان pH آنها بر تحرک اسپرم کپور معمولي *(Cyprinus carpio)*

محمد رضا احمدي[۱]، محمد رضا کلباسي[۲]، شهربانو حسيني[۳]، رضا لرستاني[٤]*

۱- استاد گروه بهداشت و بيماريهاي آبزيان، دانشکده دامپزشکي دانشگاه تهران

۲- دانشيار گروه شيلات، دانشکده منابع طبيعي و علوم دريايی، دانشگاه تربيت مدرس, نور

۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد شيلات, دانشگاه آزاد اسلامي واحد لاهيجان

٤- عضو باشگاه پژوهشگران جوان, کارشناسي ارشد شيلات، دانشکده منابع طبيعي و علوم دريايی, دانشگاه تربيت مدرس, نور

چکيده

اثر دو فعال فعال کننده با ترکيب NaCl ۴۵ mM, KCl ۵ mM, Tris ۲/۵ mM ,Glycin ۱۹mM و NaCl ۵۰ mM در مقايسه با آب مقطر و همچنين اثر pH آنها بر مدت زمان تحرک اسپرم کپور معمولی بررسی شد. طول کل مدت زمان تحرک اسپرم با فعال کننده‌های نمکی در مقايسه با آب مقطر اختلاف معناداری را در سطح ۹۵٪ نشان داد. مدت زمان تحرک کل اسپرم در فعال کننده‌های ۱، ۲ و آب مقطر به ترتيب برابر با ۳/۲±۱۲۹/۱، ۲/۴±۱۲۴ و ۱/۵±۹۰/۱ ثانيه بود. دوره تحرک رو به جلو اسپرم در فعال کننده‌های ۱، ۲ و آب مقطر به ترتيب برابر ۲/۱±۶۵/۱، ۲/۶±۶۳/۲ و ۱/۲±۵۰/۲ ثانيه بود. اين دوره در هر دو فعال کننده نمکی اختلاف معناداری را با هم نشان ندادند ولی فعال کننده‌ها نمکی اختلاف معناداری را با گروه شاهد نشان دادند. فعال کننده با pH ۸/۵ بالاترين مدت زمان تحرک اسپرم و در حدود ۸/.±۹۴ ثانيه و فعال کننده با pH ۷ کمترين طول دوره تحرک اسپرم و در حدود ۱/۶±۹۲/۲ ثانيه را داشت. غلظت اسپرم برابر با $۱/۵±۰/۱\times۱۰^{۹}$ سلول در هر ميلی ليتر ارزيابی شد. همبستگی بين مدت زمان تحرک اسپرم با غلظت اسپرم منفی و معنادار بود (r=-۰/۶۰۹). همچنين ارتباط بين وزن بدن با مدت زمان تحرک اسپرم مثبت و معنادار بود (r=-۰/۵۴۵).

کليد واژگان: تحرک، اسپرم، فعال کنند، کپور معمولی.

۱- مقدمه

در لقاح سنتی ماهيان از آب معمولی برای فعال‌سازی اسپرم استفاده می‌شد، اما در حال حاضر برای حصول بازده بيشتر نسل از ماهيان و افزايش توان لقاح از محلولهای متفاوت نمکی فعال‌کننده اسپرم برای فعال‌سازی اسپرمها استفاده می‌شود [۱-۳]. از عوامل مؤثر در تعيين کيفيت اسپرم، غلظت يا تراکم آن می‌باشد که به تعداد اسپرم در واحد حجم تعريف می‌شود. غلظت اسپرم در ماهيان نر مختلف، متفاوت بوده و حتی در اسپرم‌گيريهای مختلف در طول يک يا چند هفته متغيير است [۲]. غلظت بالای يون پتاسيم در آزاد ماهيان و فشار اسمزی بالا در کپور ماهيان از تحرک اسپرم در مايع منی جلوگيری می‌کند [۴]. از طرف ديگر شاخصهای متفاوتی از قبيل طول کل مدت زمان تحرک، حرکت رو به جلو، ميان اسپرماتوکريت و غلظت سلولهای اسپرم، محتوی ATP، ميزان يونهای موجود در پلاسمای منی و همچنين فعال‌کننده‌ها، ترکيبات پلاسمای منی و غيره همه از عواملی‌اند که می‌توانند کيفيت اسپرم را تحت تأثير

* نويسنده مسؤول مقاله: تلفن: ۰۸۳۵۴۲۲۵۸۵۳, Email: reza_lorestany@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

قرار دهند [۲، ۳، ۵]. کیفیت منی از عواملی است که می‌تواند میزان لقاح را تحت تأثیر قرار دهد و می‌توان از آن به عنوان عامل مؤثر باروری تخمکها نام برد[۵]. کیفیت اسپرم معمولاً در ارتباط با شدت تحرک و بر پایه میزان سلولهای متحرک و مدت زمان تحرک رو به جلو در اسپرم است [۲]. با ایجاد تغییرات در عواملی نظیر: pH، فشار اسمزی، تغییر غلظت هر یک از کاتیونها به تنهایی یا به حالت ترکیبی و افزایشATP می‌توان سبب افزایش تحرک اسپرم شد. مدت زمان حرکت اسپرم در محیط طبیعی در میان گونه‌های مختلف ماهیان متفاوت بوده و بر مدت زمان لقاح اسپرماتوزوآ منطبق است [۶]. همچنین خصوصیات شیمیایی محلولهای فعال‌کننده بر مدت زمان تحرک اسپرماتوزوآ تأثیرگذار است [۷].

هدف از انجام این تحقیق بررسی میزان غلظت اسپرم با استفاده از لام نئوبار، سنجش دوره تحرک اسپرم در حضور فعال‌کننده‌های نمکی در مقایسه با گروه شاهد است، تا با یافتن فعال‌کننده نمکی مناسب، برای فعال‌سازی مناسب اسپرم، توان لقاح مصنوعی این ماهی در کشور افزایش یابد.

۲- مواد و روش‌کار

تحقیق حاضر در فروردین ۱۳۸۵ انجام شد. برای انجام تحقیق حاضر در آبان سال ۱۳۸٤ پس از صید ماهیان پرواری با استفاده از تور پره، تعداد ۲۰ قطعه ماهی نر ۲ ساله به طور تصادفی صید شد و به استخر جداگانه‌ای با ابعاد $۱۰۰m^۲$ منتقل شدند. جهت آماده‌سازی محلولهای تقویت‌کننده مختلف، ترکیبات مواد آزمایشگاهی مربوط به فعال‌کننده نمکی۱ با ترکیب ۵ mM, Tris ۲/۵ mM, Glycin۱۹ mM NaCl ۴۵ mM, KCl و فعال‌کننده ۲ با ترکیب NaCl ۵۰ mM، برحسب گرم در لیتر با استفاده از ترازوی دیجیتال توزین شد. سپس مواد مربوط به هر تقویت‌کننده در بشر جداگانه‌ای ریخته شد و مواد هر فعال‌کننده نمکی در یک لیتر آب مقطر [۸] کاملاً حل شد. تنظیم pH به وسیله HCl و NaOH و با استفاده از دستگاه pH متر در pH برابر ۹ اقدام شد [۹]. در فروردین سال ۱۳۸۵، مولدان صید شدند و پس از صید به مخزنی با ابعاد ۲ در $۲m^۲$ و با تراکم ۵ قطعه در متر مربع منتقل شدند. از تمام مولدان پس از بیهوشی با MS۲۲۲ (۱۲۰۰۰-۱ رقیق‌سازی) اسپرم‌گیری به عمل آمد و پس از انجام اسپرم‌گیری از هر مولد (۳mL)، نمونه اسپرم برای جلوگیری از اُفت کیفیت در کنار یخ نگهداری شد و سنجش طول کل مدت زمان تحرک اسپرم و طول مدت زمان تحرک رو به جلو اسپرم و سنجش غلظت اسپرم با استفاده از لام نئوبار، روی نمونه به صورت زیر انجام شد؛ به منظور سنجش طول کل مدت زمان تحرک اسپرم، مولدان به طور انفرادی اسپرم‌گیری شدند و در هر نمونه برای سنجش تأثیر گروه شاهد بر مدت زمان تحرک اسپرم، یک قطره اسپرم روی لام در زیر میکروسکوپ قرار داده شد و یک قطره آب مقطر [۸] با آن مخلوط گردید و مدت زمان تحرک اسپرم بلافاصله با استفاده از کرنومتر ثبت گردید. مدت زمان تحرک اسپرم تا زمانی که تحرک ۹۵-۹۹٪ میزان سلولها متوقف شوند درنظر گرفته شد. براس سنجش تحرک رو به جلو اسپرم، زمان تا مدت پایان یافتن حرکت موجی و رو به جلو اسپرمها در نظر گرفته شد [۱، ۵، ۶، ۱۰-۱۳]. سنجش طول مدت زمان حرکت اسپرم و رو به جلو آن در تیمارها (فعال‌کننده‌های نمکی) همانند گروه شاهد بود با این تفاوت که برای فعال‌سازی اسپرمها در گروه شاهد از آب مقطر [۸] استفاده شد اما در تیمارها از محلولهای فعال‌کننده نمکی به عنوان جانشین آب مقطر استفاده گردید. در گروه شاهد به این دلیل از آب مقطر استفاده شد که اثر نبود یونها بر تحرک اسپرم در مقایسه با اضافه کردن نمکها به محلولهای رقیق کننده، نمایان شود. در فعال‌کننده‌های نمکی ۱ و ۲ و گروه شاهد (آب مقطر)، در هر مولد حداقل ۳ بار به عنوان ۳ تکرار صورت پذیرفت. برای سنجش غلظت اسپرم از لام نئوبار یا لام هماسیتومتر[۱] استفاده شد[۵، ۱۴]. اطلاعات جمع‌آوری شده از بررسیها و مطالعات

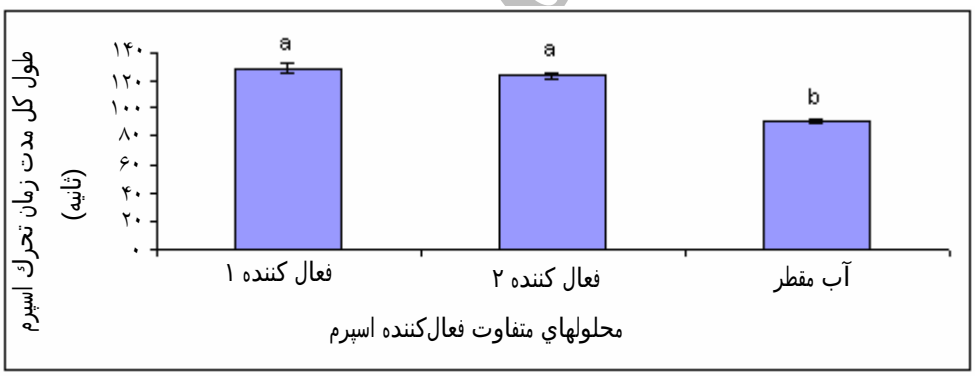
Archive of SID
www.SID.ir

میدانی و آزمایشگاهی با استفاده از نرم‌افزار SPSS از طریق تأیید نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون کولموگراف اسمیرنف صورت گرفت. پس از این مرحله آنالیز آماری داده‌ها صورت پذیرفت. در این خصوص برای سنجش تأثیر محلولهای متفاوت فعال‌کننده و همچنین برای سنجش اثر pHهای متفاوت فعال‌کننده‌ها بر مدت زمان تحرک اسپرم، از آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد. در صورت مشاهده اختلاف بین داده‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای معنادار بودن یا نبودن اختلاف موجود در سطح ۹۵٪ استفاده گردید. برای بررسی همبستگی بین میزان غلظت اسپرم و مدت زمان تحرک اسپرم از ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد.

۳- نتایج

طول کل مدت زمان تحرک اسپرم در رقیق‌سازی با محلولهای فعال‌کننده نمکی در مقایسه با آب مقطر اختلاف معناداری را در سطح ۹۵٪ نشان داد و در فعال‌کننده نمکی۱ معادل ۱۲۹/۱±۳/۲ ثانیه بالاترین میزان مدت زمان تحرک و در فعال‌کننده نمکی ۲ معادل ۱۲۴±۲/۴ ثانیه و در آب مقطر با میزان ۹۰/۱±۱/۵ ثانیه کمترین دوره تحرک اسپرم ثبت گردید.

دوره تحرک رو به جلو اسپرم در محلول نمکی ۱ معادل ۶۵/۱±۲/۱ ثانیه و در محلول نمکی ۲ معادل ۶۳/۲±۲/۶ ثانیه و در آب مقطر برابر ۵۰/۲±۱/۲ ثانیه بود و این دوره در هر دو محلول فعال‌کننده نمکی در سطح ۹۵٪ اختلاف معناداری را با هم نشان ندادند اما هر دو تیمار اختلاف معناداری را با گروه شاهد نشان دادند.

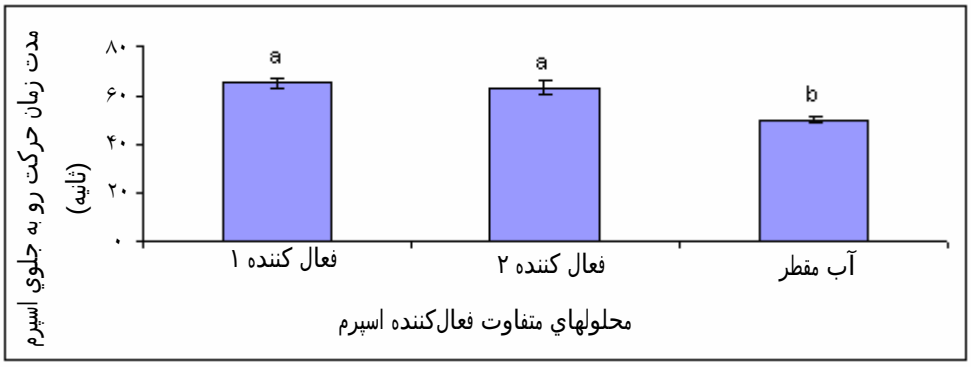


نمودار۱ اثر محلولهای متفاوت فعال‌کننده بر طول کل مدت زمان تحرک اسپرم

*حروف همنام بالای نمودارها به معنی نبود اختلاف معنادار و حروف غیرهمنام به معنی اختلاف معنادار است.

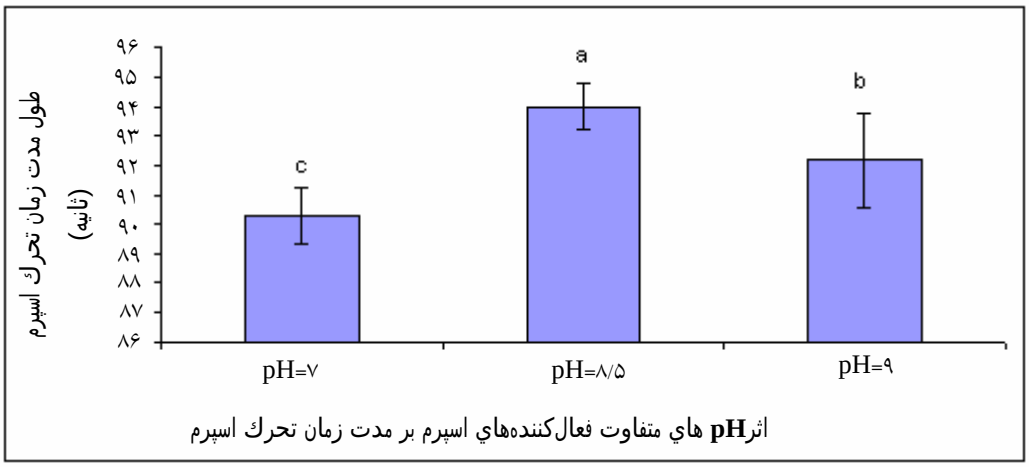
1. Haemocytometer

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار۲ اثر محلولهای متفاوت فعال‌کننده بر مدت زمان تحرک رو به جلوی اسپرم

*حروف همنام بالای نمودارها به معنی نبود اختلاف معنادار و حروف غیرهمنام به معنی اختلاف معنادار است.



نمودار۳ اثر pHهای متفاوت محلولهای فعال‌کننده بر طول کل مدت زمان تحرک اسپرم

*حروف همنام بالای نمودارها به معنی نبود اختلاف معنادار و حروف غیرهمنام به معنی اختلاف معنادار است.

محلول با pH= ۸/۵ بالاترین مدت زمان تحرک اسپرم و با میزان (ثانیه ۰/۸±۹۴) و محلول با pH= ۷ کمترین طول دوره تحرک اسپرم را با میزان ثانیه۱±۹۰/۳ نشان داد. مدت زمان تحرک اسپرم حاصل از محلول با pH= ۸/۵ و pH= ۹ اختلاف معناداری را در سطح ۹۵٪ با هم نشان دادند و به ترتیب معادل ثانیه ۰/۸±۹۴ و ثانیه۱/۶±۹۲/۲ بودند.

غلظت اسپرم ماهیان در این تحقیق $۱/۵±۰/۱\times۱۰^{۹}$ سلول در هر میلی‌لیتر ارزیابی شد. نتایج همبستگی بین مدت زمان تحرک اسپرم با غلظت اسپرم نشان داد که رابطه بین این دو شاخص منفی و معنادار است (r=-۰/۶۰۹). همچنین ارتباط بین وزن بدن با مدت زمان تحرک اسپرم مثبت و معنادار بود (r=۰/۵۴۵).

۴- بحث

همچنان که در نمودارهای ۱ و۲ مشخص است، فعال‌کننده‌های نمکی تأثیر مناسبتری را در تداوم مدت زمان فعالیت اسپرمها نسبت به گروه شاهد (آب مقطر) داشت. اسپرماتوزوآ بعد از قرارگرفتن در معرض آب تغییرات ساختاری وخیم و سریعی

www.SID.ir

را نشان می‌دهد و به این دلیل عمر گامتها در آب بسیار کوتاه است [۱]. با استفاده از تقویت‌کننده‌ها مانند محلول نمکی در اسپرم ماهی کپور نشان داده شده که محلولهای فعال‌کننده نمکی باعث حفظ ساختار تاژک اسپرم می‌شود و در نتیجه مدت زمان تحرک در مقایسه با آب بالاتر می‌رود [۱۲]. نتایج این تحقیق نیز تأییدکننده نتایج بیلارد[1] در سال ۱۹۹۲ و احمدیان در سال ۱۳۸۱ است, زیرا مدت زمان تحرک اسپرم در تقویت کننده‌ها در مقایسه با آب بیشتر بوده و تفاوت معناداری را با آن نشان می‌دهد. افزایش مدت زمان تحرک اسپرم، شانس رسیدن اسپرمها به میکروپیل و انجام عمل لقاح را افزایش می‌دهد که نتیجه آن افزایش میزان لقاح تخمکهاست. از آنجا که نقطه منحصر به فردی جهت نفوذ اسپرماتوزوآ (میکروپیل) وجود دارد و روند حرکت اسپرماتوزوآ (۳mm) کوتاهتر ار قطر تخمک (٤-۶mm) است، بنابراین یک اسپرماتوزوآ در نزدیکی تخمک شانس رسیدن به میکروپیل را ندارد, پس واضح است افزایش مدت زمان تحرک اسپرماتوزوآ شانس رسیدن آنها را به میکروپیل زیادتر می‌کند. زمانی که برای فعال‌سازی اسپرم از آب استفاده شود، هم اسپرماتوزوآ و هم تخمک صدمه می‌بینند. اسپرماتوزوآ بعد از قرارگرفتن در معرض آب تغییرات ساختاری وخیم و سریعی را نشان می‌دهد. در تخمک سوراخ میکروپیل سریعاً به وسیله تولیدات حاصل از واکنش لایه بیرونی که به سرعت بعد از غوطه‌وری در آب ایجاد می‌شود، بسته می‌شود و به این دلیل عمر گامتها در آب خیلی کوتاه است. در حالی که در استفاده از تقویت‌کننده‌ها این مشکلات وجود ندارد. همانند اغلب ماهیان دیگر، اسپرم در مجرای تناسلی کپور معمولی بی‌تحرک است و وقتی که اسپرم در محیط آب شیرین قرار می‌گیرد، شروع به فعالیت می‌کند. شروع فعالیت به دلیل کاهش فشار اسمزی است. ساختار تاژک اسپرم وقتی که در محیط آب شیرین قرار می‌گیرد، سریعاً به هم می‌ریزد و شکل طبیعی خود را از دست می‌دهد و حرکت اسپرم بعد از ۳۰ ثانیه متوقف می‌شود. وقتی که رقیق‌سازی در محلول ۵۰ mM NaCl رخ می‌دهد، فشار اسمزی به اندازه‌ای تغییر می‌کند که برای آغاز فعالیت اسپرم مناسب است و تاژک اسپرم نیز ساختار طبیعی خود را حفظ می‌کند و حرکت سلولهای اسپرم به مدت چند دقیقه ادامه پیدا می‌کند. طول دوره تحرک اساساً به ذخایرATP نیز وابسته است و سلولهای اسپرم زمانی که ۵۰ تا ۸۰٪ از ذخایر ATP آنها به وسیله هیدرولیز مصرف شوند، از تحرک باز می‌ایستند[۱۵]. اسپرماتوزوآ وقتی که در آب شیرین قرار می‌گیرد، تغییرات ساختاری شدیدی پیدا می‌کند اما این حالت زمانی که در محلولهای نمکی رقیق‌سازی صورت می‌گیرد، دیده نمی‌شود.

در بعضی از گونه‌ها کیفیت ضعیف اسپرم می‌تواند به عنوان یک عامل محدودکننده در کشت آنها بروز کند. همچنانکه نتایج تحقیقهای مذکور نشان می‌دهد، طول دوره تحرک اسپرم و تداوم آن در فعال‌کننده‌های نمکی به دلیل حفظ ساختار تاژک اسپرم، عدم تورم سلولها به دلیل عدم شوک فشار اسمزی به سلولهای اسپرم و غیره, افزایش می‌یابد. نتایج این تحقیق نیز تأیید کننده نتایج تحقیقهای مذکور در فعال‌سازی اسپرم توسط این فعال‌کننده‌هاست (نمودارهای ۱ و۲). با مطالعه و بررسی نمودار ۳، این نکته به دست می‌آید که pH محلولهای فعال‌ساز اسپرم نیز می‌تواند در تداوم طول دوره تحرک اسپرم نقش داشته باشد. همچنانکه نتایج این تحقیق نشان می‌دهد، طول دوره تحرک اسپرم در pH=۸/۵ بیشترین میزان است. ویزیانو[2] و همکاران در سال ۱۹۹۵ اثر کاتیونها، pH و اسمولایتی را بر تحرک اسپرم *Micropogonias furnieri* بررسی کردند[۱۶]. نتایج نشان داد که سطوح بالای NaCl (۲۵۰ mM) متناسب با pH برابر۸/۶ باعث بهترین تحرک اسپرم شده است. این تحقیق نشان می‌دهد، ارتباط افزایش غلظت اسپرم با مدت زمان تحرک آن یک رابطه منفی و معنادار ارزیابی شده است. محققان مختلف دیگر، چنین ارزیابی را در گونه‌های تفاوت آبزیان به دست آورده‌اند. با کاهش میزان اسپرماتوکریت تعداد اسپرماتوزوآ در واحد حجم

1. Billard

2. Vizziano

Archive of SID
www.SID.ir

کاهش می‌یابد، پس ممکن است با کمتر شدن این تعداد، میزان ATP اختصاص یافته به هر سلول اسپرماتوزوآ در مقایسه با حالتی که تعداد اسپرماتوزوآها در واحد حجم بالا باشد، بیشتر شود و مدت زمان تحرک اسپرمهای رقیق افزایش یابد[۱۷]. نتایج همبستگی متوسط اسپرماتوکریت در مخلوط اسپرمهای مولدان نر همسن با مدت زمان تحرک اسپرم نشان داد که این همبستگی معنادار و به صورت منفی است یعنی با افزایش میزان اسپرماتوکریت، مدت زمان تحرک اسپرم نیز کاهش می‌یابد. نتایج نشان داد که بین اسپرماتوکریت و نسبت سلولهای متحرک اسپرم زمانی که اسپرماتوکریت برابر یا کمتر از ۷۰٪ باشد، ارتباط معناداری وجود ندارد. با افزایش اسپرماتوکریت به میزان بیشتر از۷۰٪، کاهش تحرک اسپرم دیده می‌شود. همچنین سرعت شنای اسپرماتوزوآ ارتباط معناداری را با اسپرماتوکریت نشان نداد.

۵- منابع

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

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

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

[4] Perchec G., Cosson J., Andre F., Billard R.; «Spermatozoa motility of trout (Oncorhynchus mykiss) and carp (Cyprinus carpio)»; *J. Appl Ichthyol -Z.-Angew. Ichthyol*; 1993; 9 (3-4): 129-149.

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

[۶] علوی ه.؛ «بررسی مقایسه‌ای تحرک اسپرم تاس ماهی ایرانی و قابلیت لقاحی آن در آب شیرین و محلولهای نمکی»؛ *پایان‌نامه کارشناسی ارشد*؛ کرج، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران؛ ۱۳۸۱؛ ۱۰۵ص.

[۷] علوی س. م. ه.؛ «مطالعه تطبیقی مدت زمان تحرک اسپرم تاس‌ماهی ایرانی *Acipenser persicus* در آب سالن انکوباسیون و محلولهای تقویت‌کننده»؛ *پروژه کارشناسی*؛ کرج، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران؛ ۱۳۷۹؛ ۵۰ ص.

[۸] لرستانی ر.، احمدی م. ر.، کلباسی م. ر.؛ «تأثیر محلولهای فعال‌کننده بر افزایش میزان لقاح در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان»؛ *مجله علوم دریایی ایران*؛ دانشگاه تربیت مدرس؛ ۱۳۸۲؛ صص ۶۷-۷۳.

[۹] لرستانی ر.؛ «اثر محلولهای متفاوت تقویت‌کننده اسپرم و میزان اسپرماتوکریت بر روند تکثیر ماهی قزل‌آلای رنگین کمان»؛ *سمینار کارشناسی ارشد*؛ دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور، دانشگاه تربیت مدرس؛ ۱۳۸۳.

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

[11] 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.

[۱۲] احمدیان ن.، مجازی امیری ب.، ابطحی ب.، نظری ر. م.؛ «استفاده از تقویت‌کننده‌های اسپرم در لقاح تخمک تاس‌ماهی ایرانی *Acipenser persicus*»؛ *دومین همایش ملی منطقه‌ای ماهیان خاویاری*؛ ۱۳۸۱؛ صص ۱۱۱- ۱۱۵.

Archive of SID
www.SID.ir

[۱۳] یگانه س.؛ «اثر تقویت‌کننده‌ها بر روی مدت تحرک اسپرم و توان لقاح در کفال خاکستری ***Mugil cephalus***»؛ *پایان‌نامه کارشناسی ارشد*؛ کرج، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران؛ ۱۳۸۱؛ ۱۱۲ص.

[14] Rakitin A., Ferguson M., Trippel E.; Spermatocrit and spermatozoa density in Atlantic Cod (*Gadus morhua*): Correlation and variation during the spawning season; Aquiculture 1999; 170: 349-358.

[15] Billard R., Cosson J., Perchec G., Linhart O.; «Biology of sperm and artificial reproduction in carp»; The Carp Proceedings of The Second "Aquaculture" Sponsored Symposium Held In Budapest, Hungary, 6-9 September 1993; Billard R., Gall G.A.E., eds.; 1995; 129 (1-4): 95-112.

[16] Vizziano D., Garcia-Alonso J. R., Carnevia D.; Effect of cations, pH and osmolality on sperm motility of male white croaker, Micropogonias furnieri; Proceedings of The Fifth International Symposium on The Reproductive Physiology of Fish; The University of Texas At Austin, 2-8 July 1995; Goetz F.W., Thomas P., Eds.; Austin Tx-Usa Fish Symposium 95; 1995; p.148.

[۱۷] لرستانی ر، احمدی م. ر، کلباسی م. ر.؛ «اثر سن مولد نر و محلولهای تقویت‌کننده اسپرم در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان»؛ *پایان نامه کارشناسی ارشد*؛ دانشگاه تربیت مدرس؛ ۱۳۸۳؛ ۶۴ ص.

Archive of SID

www.SID.ir