رابطه سن مولدین نر با کارایی تکثیر مصنوعی در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

***معصومه علی نیای رودسری[۱]، شعبانعلی نظامی بلوچی[۲]، حسین خارا[۳]، شهروز برادران نویری[۴] و حدیثه دادرس[۵]**

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد شیلات دانشگاه آزاداسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران، [۲و۳]دانشگاه آزاداسلامی واحد لاهیجان، دانشکده منابع‌طبیعی، لاهیجان، ایران، [۴]انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت، ایران، [۵]باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاداسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۰/۹/٤؛ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱/۱٦

چکیده

در مطالعه حاضر، به بررسی تأثیر سن مولدین نر بر کارایی تکثیر مصنوعی ماهی‌کپور در طول فصل تکثیر مصنوعی ۱۳۹۰پرداخته شد. به این منظور، ۸ مولد ماهی‌کپور معمولی نر ۲ و ۳ ساله با ٤ مولد ماده ۳ ساله به‌صورت جداگانه لقاح داده شد. در تیمار ۳ نیز ترکیب اسپرم‌های استحصالی از مولدین ۲ و ۳ ساله استفاده شد. نتایج نشان داد، مولدین نر ۳ ساله دارای بیشترین درصد تحرک و تراکم اسپرم بودند ($p<۰/۰۵$). تخم‌های حاصل از لقاح ترکیب اسپرم‌های مولدین ۳ ساله با تخمک‌های مولدین ماده بیشترین میانگین درصد لقاح و بازماندگی لارو را داشتند. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان گفت لقاح حاصل از مولدین نر ۲ ساله دارای بیشترین موفقیت در کارایی تکثیر ماهی کپور بوده است.

واژه‌های کلیدی: تکثیر مصنوعی، سن، کپور معمولی، مولدین نر

مقدمه

کپور ماهیان (Cyprinidae) از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی ماهیان در سراسر دنیا می‌باشند و پرورش آنها قرن‌هادر جوامع مختلف در حال انجام است.در میان این خانواده، ماهی کپور معمولی از اهمیت و ارزشاقتصادی زیادی از لحاظ کیفیت گوشت برخوردار می‌باشد.برای افزایش میزان بازدهی و بهبود شرایط تکثیر مصنوعی این ماهی و جهت تحقیقات بر روی سلول‌های جنسی، ذخیره و انجماد گامت‌ها و انجامبرنامه‌های اصلاح نژاد و مولدسازی این ماهی، دانستن زیست‌شناسی سلول‌های جنسیامری ضروری به نظر می‌رسد.کارآیی مولد نر می‌تواند به زمان و شرایط رهاسازی اسپرم، توان باروری اسپرم و به تعداد اسپرم رهاسازی شده وابسته باشد. برخی از تحقیقات، گوناگونی در تعداد و کیفیت گامت‌های تولید شده توسط نرها را وابسته به روش‌های تولید مثلی می‌دانند (Gage و همکاران، ۱۹۹۵). آزمایشاتی که در مورد به تأخیر افتادن لقاح گامت‌ها بعد از فعال‌سازی صورت گرفته است، به‌وضوح نشان می‌دهد که میزان لقاح تابع تحرک اسپرم می‌باشد (Liley و همکاران، ۲۰۰۲). کیفیت اسپرم از فاکتورهایی است که می‌تواند میزان لقاح را تحت تأثیر قرار داده و عامل مؤثر در باروری تخمک‌ها محسوب گردد (Gage و همکاران، ۱۹۹۵؛ Stockley و همکاران، ۱۹۹۷)، رابطه نوع اسپرم استفاده شده با موفقیت لقاح و بقاء لارو غیر قابل اغماض می‌باشد (Bozkurt و همکاران، ۲۰۰٦). تحرک اسپرماتوزوا، میزان اسپرم و تراکم اسپرماتوزوا شاخص‌های خوبی

*مسئول مکاتبه: m.aliniya626@gmail.com

برای کیفیت اسپرم هستند (Cabrita و همکاران، ۲۰۰۱، Tekin و همکاران، ۲۰۰۳). pH اسپرم یکی از پارامترهای مهم فعال‌کننده اسپرم در گونه‌های مختلف ماهیان است که برروی قابلیت لقاح اسپرم تأثیر می‌گذارد. همچنین بررسی‌ها نشان داده است که یک تغییر وابسته به زمان در pH داخلی اسپرم کپورماهیان بعد از شوک هیپواسمتیکی که باعث تغییر pH به‌سمت قلیایی می‌شود باعث تحرک اسپرم کپورماهیان می‌گردد (Alavi و Cosson، ۲۰۰۶). در کنار کلیه عوامل مذکور، سن مولدین نر را می‌توان از جمله فاکتورهای کلیدی در فرآیند تکثیر دانست تا جایی‌که برخی مطالعات به بررسی لقاح حاصل از گروه‌های سنی مختلف در قزل‌آلای رنگین‌کمان پرداختند و به این نتیجه دست یافتند که نتایج لقاح مولدین جوان‌تر دارای موفقیت بیشتری بوده است (Kayam، ۲۰۰٤). با توجه به تأثیرگذاری فاکتورهای کیفی اسپرم مانندتحرک اسپرم و شاخص‌های تولیدمثلی آن در بهبود فرآیند تکثیر مصنوعی (Alavi و همکاران، ۲۰۰۸) و اهمیت رابطه سن مولدین با کارایی تکثیر (Tekin و همکاران، ۲۰۰۳؛ Alp و همکاران، ۲۰۰۳) به‌منظور افزایش لقاح و بهبود کیفیت وسلامت لاروهای حاصل شده در ماهی کپور،کیفیت مولدین نر این گونهبا تکیه بر عامل سن و بررسی توان باروری آنها در مطالعه حاضر مورد ارزیابی واقع گردید.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در فصل تکثیر ۱۳۹۰ در مزرعه تکثیروپرورش ماهیان گرمابی تعاونی شماره ۱۲ (رشت) انجام شد.در مطالعه حاضر، از ۸ عدد مولد کپور نر ۲ و ۳ ساله و ٤ عدد مولد ماده ۳ ساله استفاده گردید. بطوری‌که هر یک از گروه‌های سنی مولدین نر به‌صورت جداگانه لقاح داده شدند. در تیمار ۳ نیز ترکیب اسپرم‌های استحصالی از مولدین ۲ و ۳ ساله با تخمک لقاح داده شد. جهت یکسان شدن شرایط تکثیر برای مولدین مختلف، تخمک و اسپرم استحصالی از کلیه مولدین در یک گروه سنی با هم مخلوط گشتند. مولدین ماده با استفاده از ترکیب ۳/٦ میلی‌گرم هیپوفیز و ۰/۳ سی‌سی سرم فیزیولوژیک به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن طی دو مرحله و مولیدن نر با استفاده از یک میلی‌گرم هیپوفیز به‌همراه ۰/۲۵ سی‌سی سرم فیزیولوژیک به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن همزمان با تزریق دوم (حدود ٦ ساعت بعد از تزریق اول) مولدین ماده مورد تزریق قرار گرفتند. حدود ۱۰ ساعت بعد از تریق دوم عمل تخم‌کشی و اسپرم‌گیری مولدین به‌روش مالشی انجام شد. تخمک-های استحصالی از هر مولد ابتدا توزین شده و سپس در ظروف جداگانه به‌میزان ۲۵۰ گرم (با ۳ تکرار) ریخته شد. نمونه اسپرم‌ها به‌مقدار ۲/۵ سی‌سی به ظروف حاوی تخم افزوده گردید و عمل لقاح به‌روش خشک صورت پذیرفت. مقدار ml ۱/۵ از اسپرم‌های استحصال شده از هر رده سنی به‌صورت جداگانه جهت آزمایشات تعیین کیفیت اسپرم به آزمایشگاه منتقل شدند. وزن بدن، طول کل و طول چنگالی مولدین نر قبل از استحصال اسپرم به ترتیب با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ گرم و تخته بیومتری با دقت ۱ میلی‌متر به دقت مورد ارزیابی قرار گرفت. محاسبه میزان درصد لقاح با استفاده از فرمول زیر انجام شد (Bromage و Cumalantunga، ۱۹۸۸):

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

پس از تفریخ لاروها، نرخ تفریخ بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید (Hanjavanit و همکاران، ۲۰۰۸)

۱۰۰× (تعداد تخم‌های لقاح یافته/تعداد لارو) = نرخ تفریخ

میزان بازماندگی لارو نیز در مرحله جذب کیسه زرده با کمک فرمول زیر مورد ارزیابی قرار گرفت:

۱۰۰ × (تعداد کل لاروها/تعداد لاروهای زنده مانده) = درصد بازماندگی لارو

در مطالعه حاضر، بررسی درصد اسپرم‌های متحرک به‌صورت چشمی انجام شد. برای این منظور، از میکروسکوپ نوری با عدسی ٤٠ استفاده گردید. بطوری‌که ٤٠ میکرولیتر از اسپرم استحصالی پس از رقیق‌سازی با آب مقطر با نسبت ۱:۱۰۰ بر روی لام قرار داده شد و در زیر میکروسکوپ مورد ارزیابی قرار گرفت. طول دوره تحرک اسپرم نیز به‌صورت چشمی و با استفاده از زمان‌سنج تا لحظه‌ای که تمام اسپرماتوزوآها (۱۰۰٪) فاقد تحرک شوند، اندازه‌گیری شد. میزان تراکم اسپرم با استفاده از روش هماتوسیتومتری با رقیق‌سازی اسپرم به نسبت ۱:۳۰۰ و با بکارگیری میکروسکوپ نوری معمولی با عدسی ٤٠ ارزیابی گردید. جهت بررسی اسپرماتوکریت به‌وسیله لوله میکروهماتوکریت از اسپرم مولدین، نمونه‌برداری صورت پذیرفت.سپس لوله‌های میکرو حاوی نمونه اسپرم با سرعت ۱٤۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه با استفاده از دستگاه سانتریفوژ مدل eppendrof-5415 D ساخت کشور آلمان سانتریفیوژ شدند و در خاتمه با کمک میکروهماتوکریت خوان میزان اسپرماتوکریت هر نمونه مشخص گردید. pH مایع منی نیز به وسیله دستگاه pH متر قلمی مدل PHS30 ساخت کشور چین اندازه‌گیری شد. آزمایشات در ۳ تکرار انجام شد و میزان دمای آب در حین انجام تحقیق ۲۷ درجه سانتی‌گراد بود. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS14 و برای رسم نمودارها از برنامه Excel2007 استفاده گردید. مقایسه جفتی هر یک از فاکتورهای اندازه‌گیری شده بین ماهیان نر ۲ و ۳ ساله در صورت نرمال بودن داده‌ها با کمک آزمون t در سطح اطمینان ۵٪ و زمانی که توزیع داده‌ها نرمال نبودند با استفاده از آزمون ناپارامتریک من- ویتنی صورت پذیرفت. آنالیز نتایج حاصل از لقاح در صورت نرمال بودن توزیع داده‌ها با کمک آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح اطمینان ۵٪ انجام شد و در غیر این صورت آزمون کروسکال- والیس مورد استفاده واقع گردید.

نتایج

مطابق جدول ۱، مولدین نر ۳ ساله دارای میانگین وزن بدن، طول کل و چنگالی بیشتری بودند. اما با توجه به آزمون t، بین دو گروه سنی مورد بررسی از نظر پارامترهای مذکور اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$).

جدول ۱- میانگین وزن بدن، طول کل و چنگالی کپور معمولی نر در سنین ۲ و ۳ ساله

سن (سال)	پارامترها		
	میانگین وزن بدن (گرم)	میانگین طول کل (سانتی‌متر)	میانگین طول چنگالی (سانتی‌متر)
۲	٤٨٣٠±١٠٤٠	٦٨/٧٥ ± ٥/٩١	٦٤/٧٥ ± ٧/١٨
۳	٥٣٨٠±٤٨٠	٧٤/٥ ± ١/٢٩	٦٩/٢٥ ± ١/٢٦

مطابق جدول ۲، مولدین ۳ ساله دارای مقادیر بیشتر میانگین طول دوره تحرک، تراکم و pH اسپرم بوده‌اند و در بین دو گروه سنی ۲ و ۳ ساله، تنها از نظر درصد تحرک و تراکم اسپرم تفاوت معنی‌دار آماری مشاهده گردید ($p<۰/۰۵$).

جدول ۲- میانگین پارامترهای اسپرم‌شناختی کپور معمولی در سنین ۲ و ۳ ساله

سن (سال)	درصد تحرک اسپرم (درصد)	طول دوره تحرک اسپرم (ثانیه)	تراکم اسپرم (سلول در میلی لیتر)	اسپرماتوکریت (درصد)	pH اسپرم
۲	۷۵±۵/۷۷ [a]	٤۲/۲۵±۷/۲۷ [a]	۱۷/٦۹ ×۱۰^{۹}±۰/۵×۱۰^{۹} [b]	۹۷/۲۵±۱/۲٦ [a]	۷/۷±۰/۲٦ [a]
۳	٦۰ ±۵/۱ [b]	٤٤ ± ۱/۱٦ [a]	۲٤/٦۳×۱۰^{۹} ±۰/٦٤×۱۰^{۹} [a]	۹٦/۲۵ ± ۰/۵ [a]	۸ ±۰/۲٦ [a]

براساس نتایج تحقیق حاضر، تیمارهای مورد بررسی از نظر درصد لقاح و بازماندگی لارو دارای اختلاف معنی‌داری بودند ($p<۰/۰۵$). اما از نظر نرخ تفریخ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$). میزان میانگین پارامترهای مذکور در ۳ تیمار مورد بررسی در جدول ۳ قابل مشاهده است.

جدول ۳- میانگین شاخص‌های کارایی تکثیر کپور معمولی در تیمارهای مورد مطالعه

سن (سال)	درصد لقاح (٪)	نرخ تفریخ (٪)	درصد بازماندگی لارو (٪)
نر ۲ ساله و ماده ۳ ساله	۹۰ ± ۵ [a]	٤۰± ۵ [a]	۹۰/۵ ± ۰/۵ [a]
نر ۳ ساله و ماده ۳ ساله	۷۰ ± ۵ [b]	۳۰ ±۰ [a]	۸۲/٤۱ ± ۰/۳٦ [b]
نر ۲ و ۳ ساله و ماده ۳ ساله	۹۱/۳۳ ± ۱/۱٦ [a]	۳۵ ± ۵ [a]	۸۰/۷۵ ± ۰/٦٦ [c]

بحث

با توجه به نتایج بدست آمده میانگین تراکم اسپرم در مولدین نر ۳ ساله بیشتر از ۲ ساله دیده شد. همچنین در دوگروه سنی مورد مطالعه از نظر تراکم اسپرم اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید. شاید بتوان علت این افزایش را در رسیدگی کامل اسپرم‌ها، اندازه، وزن، سن مولدین و همچنین مدت زمانی که مولد بیشترین انرژی خود را صرف تولید گامت کرده و کمتر صرف سوخت و ساز می‌کند، جستجو نمود. در حالی‌که برخی مطالعات بیان می‌دارند که با افزایش سن بر مقدار اسپرم افزوده شده اما تراکم آن کاهش می‌یابد(Tekin و همکاران، ۲۰۰۳). مطالعات مختلف نشان داده است که اسپرم‌های با میزان تراکم بالا، لزوماً دارای بیشترین میزان تحرک و درصد لقاح نمی‌باشند (Geffen و Evans، ۲۰۰۰؛ Williot و همکاران، ۲۰۰۰). در این پژوهش بررسی میانگین اسپرماتوکریت در ماهیان ۲ و ۳ ساله نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت چشمگیر در سنین مختلف بود. حال آنکه برخی محققان اثبات کردند که با افزایش میزان سن مولدین، اسپرماتوکریت کاهش می‌یابد (Tekin و همکاران، ۲۰۰۳؛ Liley و همکاران، ۲۰۰۲). بررسی‌های صورت گرفته توسط شمس‌پور و همکاران (۱۳۸۷) بر روی قزل‌آلای رنگین‌کمان، بیانگر این بود که مولدین نر ۳ ساله دارای بیشترین میزان اسپرماتوکریت و تراکم اسپرم نسبت به مولدین ۵ ساله بودند. تحقیقی بر روی Sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) و Atlantic salmon (*Salmo salar*) نشان داد که میزان اسپرماتوکریت در ۳ ساله‌ها بیشتر از سایرین بود (Daye و Glebe، ۱۹۸٤؛ Hoysak و Liley، ۲۰۰۱). همچنین مقایسه‌ای بین سنین ۱ تا ۱۲ ساله Striped bass (*Morone saxatilis*) مشخص نمود که ماهیان ۳ ساله دارای بیشترین تعداد اسپرماتوزوآ، تراکم اسپرم و اسپرماتوکریت بودند (Vuthiphandchai و Zohar، ۱۹۹۹). وجود یک ارتباط مثبت و معنی‌دار بین اسپرماتوکریت و تراکم

اسپرم در روغن ماهی اطلس (*Gadus morhua*) نیز توسط Rakitin و همکاران (۱۹۹۹) گزارش شده است. همچنین لرستانی و همکاران (۱۳۸٦) همبستگی بین اسپرماتوکریت و لقاح را در ماهی قزل‌آلا مثبت و معنی‌دار بیان کردند. در حالی‌که رابطه تراکم اسپرم با درصد لقاح و نرخ تفریخ در تاس‌ماهی ایرانی معکوس گزارش شد (دادرس و همکاران،۲۰۱۱). شمس پور و همکاران (۱۳۸۷) در مطالعه‌ای که بر روی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) انجام دادند، مشاهده نمودند که مولدین نر ۳ و ٤ ساله از نظر درصد اسپرماتوکریت مناسب‌تر از مولدین ۵ ساله بوده‌اند، همچنین مولدین ٤ ساله بیشترین میزان در صد لقاح، چشم‌زدگی و درصد بازماندگی لاروهای تولید شده را داشتند. در مطالعه حاضر نیز لقاح حاصل از اسپرم‌های ترکیبی ماهیان ۲ و ۳ ساله دارای بیشترین میزان درصد لقاح بود.اما مقادیر نرخ تفریخ و بازماندگی لارو در تیمارهای شامل اسپرم نر ۲ ساله بیشتر بدست آمد، بطوری‌که در مورد درصد لقاح و نرخ تفریخ تفاوت معنی‌دار مشاهده شد. در اغلب مطالعات، رابطه بین تراکم اسپرم و اسپرماتوکریت تایید شده است تا جایی‌که براساس برخی مطالعات، همبستگی مثبتی بین اسپرماتوکریت و تراکم اسپرم در مورد گونه‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان (Bouck و Jacobson، ۱۹۷٦؛ Baynes و Scott، ۱۹۸۵؛ Moccia وUnkittrick، ۱۹۸۷؛Cierrezko و Dabowski، ۱۹۹۳)، ماهی آزاد کوهو (*Oncorhyncvhus kisutch* Bouck و Jacobson، ۱۹۷٦)، ماهی آزاد اقیانوس اطلس (Piironen، ۱۹۸۵)، ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*)، سوف زرد (*Perca flavescens* Cierreszkon و Dabrowski، ۱۹۹۳)، کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و ازون‌برون (*Acipenser stellatus*) (اسلامبولچی، ۱۳۷۸) بیان شده است. با بررسی مولدین نر ماهی آزاد دریای‌خزر (*Salmotrutta caspious*) مشخص گردید که مولدین نر ٤ ساله دارای میزان اسپرماتوکریت و تراکم اسپرم بیشتر از مولدین ۵ و ٦ ساله بودند و همچنین بیشترین میزان درصد لقاح، بازماندگی تخم تا مرحله چشم‌زدگی، درصد ظهور لارو و بازماندگی لارو تا مرحله جذب کیسه زرده متعلق به گروه سنی ٤ ساله بود (رهبر و همکاران، ۱۳۸۸). مدت زمان تحرک اسپرم در مورد ماهیان استخوانی با لقاح خارجی، ۳۰ ثانیه تا ۱ دقیقه گزارش شده است (Billard و همکاران، ۱۹۹۹). برطبق برخی تحقیقات، درصد تحرک و طول دوره آن بر روی درصد لقاح تاثیر بسزایی دارد (Aas و همکاران، ۱۹۹۱؛ Pool و Dillanea، ۱۹۹۸) و از این رو تعیین آن در مطالعه درصد لقاح حائز اهمیت می‌باشد. همچنینWojtczak و همکاران (۲۰۰۷) با انجام تحقیقی بر روی قزل‌آلای رنگین‌کمان به این نتیجه رسیدند که درصد تحرک اسپرم اولین عامل تضمین کننده موفقیت لقاح است. در پژوهش حاضر، طول دوره تحرک اسپرم در ماهی نر ۳ ساله و درصد تحرک اسپرم در ماهی نر ۲ ساله بیشتر بود اما تنها درصد تحرک اسپرم ماهیان بین رده‌های مختلف سنی دارای تفاوت معنی‌دار بود. در مطالعه لرستانی (۱۳۸۳) میزان تحرک اسپرم در مولدین ۲ ساله قزل‌آلا بیشتر از ۳ و ٤ ساله ها گزارش شد. در تحقیق حاضر، بررسی میانگین pH اسپرم در ماهیان ۲ و ۳ ساله حاکی از این بود که مولدین ۳ ساله دارای pH اسپرم بیشتری بوده‌اند اما بین دو گروه سنی مذکور اختلاف معنی‌دار وجود نداشت. بر اساس برخی مطالعات می‌توان گفت که کاهش pH اسپرم بر روی میزان تحرک آن تاثیر می‌گذارد (Kopeika و Kopeika، ۲۰۰۸). در این راستا تأثیر مثبت pH

اسپرم بر درصد لقاح و نرخ تفریخ در تاس ماهی ایران تأئید گردیده است (دادرس و همکاران، ۲۰۱۱). با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و مقایسه آن با نتایج سایر مطالعات می‌توان بیان نمود که اختلاف زیادی از لحاظ کمیت وکیفیت پلاسمای منی در بین ماهیان مختلف مشاهده می‌شود. از طرفی، هر یک از پارامترهای مورد بررسی می‌توانند اثرات متفاوتی در کارایی تکثیر مصنوعی گونه‌های مختلف داشته باشند و به نظر می‌رسد از یک قانون کلی تبعیت نمی‌کنند. در مجموع، می‌توان بیان نمود که درصد تحرک اسپرم و اسپرماتوکریت از عامل بهبوددهنده کارایی تکثیر مصنوعی ماهی کپور معمولی بوده است و توجه به عامل سن مولدین می‌تواند در حصول یک لقاح موفق بسیار موثر باشد.

سپاسگزاری

از مدیریت و پرسنل پرتلاش کارگاه تکثیر تعاونی شماره ۱۲ و انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان شهرستان رشت نهایت تشکر را داریم.

منابع

۱. اسلامبولچی، ش. ۱۳۷۸. تخمین تراکم اسپرم ماهی کپور، آمور و ازون‌برون با استفاده از روش اسپکتروفتومتری. پروژه کارشناسی شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ٤٩ صفحه.

۲. رهبر، م.، نظامی، ش.، خارا، ح.، رضوانی،م.، شمس پور، س.، کامکار، م. و موحد، ر. ۱۳۸۸. تعیین رابطه سن مولدین نر با عوامل کارایی تکثیر مصنوعی در ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspious*, Kessler, 1877). مجله علوم زیستی واحد لاهیجان. سال سوم، شماره ۱. صفحات ۲۱-۲۸.

۳. شمس‌پور، س.، نظامی، ش.، خارا، ح. و گل‌شاهی، ح. ۱۳۸۷. تاثیر توان باروری سنین مختلف مولدین نر قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1972) بر روی درصد لقاح، درصد چشم‌زدگی، درصد تفریخ و درصد بازماندگی لاروتا مرحله تغذیه فعال. مجله شیلات دانشگاه آزاد آزادشهر. شماره ۳. صفحات ۵۷-٦٦.

٤. لرستانی، ر. ۱۳۸۳. اثر سن مولد نر و محلول‌های تقویت کننده بر مدت زمان تحرک اسپرم و میزان باروری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور، ٦٧صفحه.

۵. لرستانی، ر.، احمدی، م.ر. و کلباسی، م.ر. ۱۳۸٦. همبستگی خصوصیات کیفی اسپرم مولدین نر در روند تکثیر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. مجله منابع طبیعی ایران، دانشکده منابع طبیعی تهران. دوره ٦۰، شماره ۱. صفحات ۱٤۱-۱٦۸.

6. Aas,G.H., Refstie, T., and Gjerde, B. 1991. Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. Aquaculture. 95:125- 132.
7. Alavi, S.M.H., and Cosson, J. 2006. Sperm motility in fishes. Effects of ions and osmolality. Cell Biol.Int.30:1-14.
8. Alavi, S.M.H., Psenicka, M., Rodina, M., Policar, T., and Linhart, O. 2008. Changes of sperm morphology, volume, density and motility and seminal plasma composition in *Barbus barbus* (Teleostei: Cyprinidae) during the reproductive season. Aquat. Living Resour. 21:75-80.
9. Alp, A., Kara, C., and Bueyuekcapar, H.M., 2003. Reproductive biology of brown trout (*Salmo trutta macrostigma*) in a tributary of the Ceyhan River Which flows into the eastern Mediterranean Sea. Appl. Ichthyol. 19(6): 346-351.
10. Baynes, S.M., and Scott, A.P. 1985. Seasonal variation in parameters of milt production and plasma concentration of sex steroid in male rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Gen. Comp. Endocrinol. 57: 150-160.

11. Billard, R., Cosson, J., Fierville, F., Brun, R., Rouault, T., and Williot, P. 1999. Motility analysis and energetic of the Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*, spermatozoa. Appl Ichthyol. 15: 199-203.
12. Bouck, G.R., and Jacobson, J. 1976. Estimation of salmonid sperm concentration by microhematocrit technique. Trans. Am. Fish. Soc.105: 534-535.
13. Bozkurt, Y., Secer, S., and Bejcan, S. 2006. Relationship between spermatozoa motility, egg size, fecundity and fertilization success in *Salmo truttaabanticus* . Tarim. BilIm. Derg. 12 (4): 345-348.
14. Bromage, N.R., and Cumaranataunga, R.C. 1988. Egg production in the rainbow trout in recent advances in aquaculture, Vol. 39 Muir, J.F, R.J., Robert. (Eds), pp. 63-139.
15. Cabrita, E., Anel, L., and Herraéz, P.M. 2001. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved trout sperm. Theriogenology. 56: 623-635.
16. Cierreszko, A., and Dabrowski,K. 1993. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, withfish and yellow perch using a spectrophotometric technique. Aquaculture. 109: 367-373.
17. Dadras, H., Khara, H., Baradaran Noveiri, S., and Shahkar, E. 2011. Relationship between sperm density, sperm pH, fertilization and hatching rates in Persian sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1897). International Conference on chemical, Environmental and Biological sciences, October 7-8, Pattaya, Thailand, pp 358-361
18. Daye, P.G., and Glebe, B.D. 1984. Fertilization success and sperm motility of Atlantic salmon *(Salmo salar* L.*)* in acidified water. Aquaculture. 43: 307-31.
19. 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. Biol. Sci. 350: 391-399.
20. Geffen, A.J., and Evans, J.P. 2000. Sperm traits and fertilization success of male and sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. 182:61-72.
21. Hanjavanit, C., Kitancharoen, N., and Rakmanee, C. 2008. Experimental infection of aquatic fungi on eggs of African catfish (*Clarias gariepinus* Burch). KKU Science. 36:36-43.
22. Hoysak, D.J., and Liley, N.R. 2001.Fertilization dynamics in sockeye salmon and a comparison of sperm from alternative male phenotypes. Fish. Biol.58:1286-1300.
23. 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. Freshwat. Ecol. 19 (4): 695-699.
24. Kopeika, E., and Kopeika, J. 2008. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish. In: Alavi, S.M.H., Cosson, J., Coward, K., Rafiee, G. (Eds), Fish Spermatology. Alpha Science International Ltd, pp: 347-465.
25. 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 invitro fertilization. Fish. Aquat. Sci. 59:144-152.
26. Moccia, R.D., and Munkittrick, K.R. 1987. Relationship between the fertilization of rainbow trout eggs and the motility of spermatozoa. Theriogenology. 27 (4): 679-688.
27. Piironen, J.1985. Variation in the properties of milt from the Finnish landlocked salmon (*Salmo salar* Sebago Girard) during a spawning season. Aquaculture. 48:337-350.
28. Pool, W.R., and Dillanea, M.G. 1998. Estimation of sperm concentration of wild and reconditioned brown trout, *Salmo trutta* L. Aquacult. Res. 29: 439-445.
29. Rakitin, A., Ferguson, M., and Tripple, E.A. 1999. Spermatocrit and spermatozoa density in Atlantic Cod (*Gadus morhua*): Correlation and variation during the spawning season. Aquaculture. 170: 349-358.
30. 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.

31. Tekin, N., Secer, S., Akcay, E., Bozkurt, Y., and Kayam, S. 2003. The effect of age on spermatological properties in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.1722). Turk. J. Vet. Anim. Sci. 27: 37-44.
32. Vuthiphandchai, V., and Zohar, Y. 1999. Age-related sperm quality of captive striped bass *Morone saxatilis*. World Aquacult. Soc. 30:65-72.
33. Williot, P., Kopeika, E.F., and Goncharov, B.F. 2000. Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). Aquaculture. 189: 53–61.
34. Wojtczak, M., Dietrich, G., Slowinska, M., Dobosz, S., Kuzminski, H., and Ciereszko, A. 2007. Ovarian fluid pH enhances motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. Aquaculture. 270: 259-264.