تاثیر اسپرم‌گیری مجدد بر برخی از شاخص‌های کیفی اسپرم ماهی سفیدک سیستان (Schizothorax zarudnyi Nikolskii, 1897)

- **سمیه عرب‌نژاد***: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، صندوق‌پستی: ۵۳۸-۹۸۶۱۵
- **علیرضا افشاری**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندرعباس، صندوق‌پستی: ۱۳۱۱- ۷۹۱۵۸
- **حسینعلی شیبک**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، صندوق‌پستی: ۵۳۸-۹۸۶۱۵
- **عباس علیزاده‌سرگزی**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، صندوق‌پستی: ۵۳۸-۹۸۶۱۵
- **تقی نجفی**: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، صندوق‌پستی: ۵۳۸-۹۸۶۱۵

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۳

کلمات کلیدی: سفیدک سیستان (*Schizothorax zarudnyi*)، اسپرم‌گیری مجدد، شاخص‌های کیفی

اسپرم واجد کیفیت بالا برای صنعت شیلات و مراکز تکثیر و بازسازی ذخایر شیلاتی حائز اهمیت می‌باشد (Dietrich و همکاران، ۲۰۰۵) از این‌رو ارزیابی مناسب کیفیت اسپرم جزء عوامل کلیدی در تولید موفق ماهی محسوب می‌گردد (Alavi و همکاران، ۲۰۰۶) و نیازی روزافزون در زمینه بهبود فرایندهای تولیدمثلی از طریق به‌کارگیری گامت‌های با درجه بالای استاندارد احساس می‌شود. اسپرم با کیفیت مناسب بر روی سلامت لاروهای حاصله موثر است (Rurangwa و همکاران، ۲۰۰۴). کیفیت اسپرم معیاری جهت اندازه‌گیری توانایی اسپرم در موفقیت لقاح می‌باشد بنابراین پارامترهای اسپرم‌شناختی که در لقاح تاثیرگذار می‌باشند جزو پارامترهای کیفی اسپرم محسوب می‌شوند. مهم‌ترین پارامترهایی که برای ارزیابی کیفیت اسپرم در ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرند شامل: اسپرماتوکریت، تراکم اسپرم، حجم منی، pH، اسمولاریته، طول دوره تحرک اسپرم، درصد تحرک اسپرم ترکیبات پلاسمای سمینال است (Billard و همکاران، ۱۹۹۵).

تراکم اسپرم به‌عنوان یکی از راه‌های تعیین غلظت اسپرم تا حد زیادی به حجم منی در یک‌بار اسپرم‌گیری بستگی دارد و اختلاف زیادی بین تراکم اسپرم در گونه‌های مختلف و حتی در یک گونه بسته به زمان اسپرم‌گیری، تعداد دفعات اسپرم‌گیری، سن، وزن، نژاد ماهی، شرایط محیطی، محل مهاجرت برای تخم‌ریزی، مهارت اسپرم‌گیری و مقدار اسپرم متغییر است (تکه و همکاران، ۱۳۸۸).

تاثیر اسپرم‌گیری مجدد بر نرخ تفریخ و برخی پارامترهای اسپرم‌شناختی تاس‌ماهی ایرانی انجام گرفته که نتایج نشان داده

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: s.arabnejad@yahoo.com

پارامترهای کیفی اسپرم و نرخ تفریخ در اسپرم‌گیری اول بهتر از اسپرم‌گیری دوم بوده است (دادرس و همکاران، ۱۳۸۸).

هم‌چنین برای ارزیابی اثر تکرار اسپرم‌گیری با فاصله ۱۲ ساعت شاخص‌های پلاسمای سمینال (اسمولالیته و ترکیبات یونی)، غلظت اسپرماتوزوا و تحرک اسپرم در تاس‌ماهی *Acipenser persicus* مطالعه شده است، نتایج نشان داد غلظت اسپرماتوزوآ و اسمولالیته با تکرار اسپرم‌گیری کاهش می‌یابد (Alavi و همکاران، ۲۰۰۷). هم‌چنین تاثیر اسپرم‌گیری مجدد بر روی برخی از پارامترهای اسپرم‌شناختی، درصد لقاح و روند انکوباسیون در ماهی آزاد وحشی بررسی شده است که نتایج نشان داده که بیش‌ترین حجم اسپرم، تراکم، اسپرماتوکریت، درصد لقاح، چشم‌زدگی و تحرک در مرحله اول اسپرم‌گیری مشاهده شده که حجم، درصد لقاح، چشم‌زدگی و تحرک اسپرم اختلاف معنی‌دار داشته اما تراکم و اسپرماتوکریت اختلاف معنی‌داری با مرحله دوم نداشته است (خارا و همکاران، ۱۳۹۱).

خشکسالی‌های متوالی سال‌های اخیر در منطقه سیستان و شرایط شدیداً ناپایدار تالاب هامون، از بین رفتن زیستگاه و زمینه تکثیر طبیعی ماهی *شیزوتراکس زارودنی* در کنار ورود و حضور گونه‌های غیربومی، احتمال خطر انقراض نسل این گونه ارزشمند بومی را به‌وجود آورده است لذا برای حفظ تکثیر مصنوعی این گونه دسترسی به اسپرم با کیفیت مناسب، به‌مقدار کافی در زمان لازم (Billard و همکاران، ۱۹۹۵) و مدیریت سلول‌های جنسی لازم است که میزان موفقیت فرایند تکثیر مصنوعی را تعیین کند و بر روی سلامتی لاروهای تولید شده تاثیر گذارد. طی فعالیت‌های تکثیر مصنوعی از ماهیان نر بالغ، در صورت نیاز بیش از یک‌بار اسپرم‌گیری می‌شود که این امر به‌دلیل کمبود تعداد مولدین نر و یا بلوغ دیررس آن‌ها است (Piros و همکاران، ۲۰۰۲).

براساس مطالعات قبلی، بین اسپرم‌های استحصالی از نرهای مختلف یا حتی اسپرم استحصالی از یک مولد خاص طی دفعات مختلف اسپرم‌گیری، تفاوت‌های زیادی می‌تواند وجود داشته باشد (Rana، ۱۹۹۵). به‌همین منظور تاثیر اسپرم‌گیری مجدد بر برخی فاکتورهای کیفی اسپرم ماهی *شیزوتراکس زارودنی* مورد بررسی قرار گرفت.

این تحقیق در اسفند ماه ۱۳۹۲ در مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهی بومی زهک صورت گرفت. بدین منظور تعداد ۱۱ قطعه مولد نر ماهی سفیدک سیستان (*S. zarudnyi*) (با میانگین طولی ۳/۹۱±۴۲/۸ سانتی متر و میانگین وزنی ۸۸/۳۵± ۷۳۱/۵ گرم) تهیه شدند.

جهت القای رسیدگی جنسی این ماهیان از هورمون اواپریم به‌میزان ۰/۳ میلی‌لیتر به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن (Gharaei و همکاران، ۲۰۱۱) استفاده شد و پس از گذشت ۲۴ ساعت، نمونه‌های منی بعد از خشک کردن منفذ تناسلی با رعایت عدم آلودگی با آب، ادرار و یا خون تهیه شدند. نمونه‌های اسپرم پس از اطمینان از فعال بودن، در سرنگ‌های استریل جمع‌آوری شده و به‌وسیله فلاسک محتوی یخ در مجاورت هوا، در طی کم‌تر از ۶ ساعت به آزمایشگاه مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهی بومی زهک جهت اندازه‌گیری پارامترهای مورد نظر (اسپرماتوکریت، تراکم اسپرم، طول دوره تحرک اسپرم، درصد تحرک اسپرم و pH) منتقل شدند (Secer و همکاران، ۲۰۰۴).

درصد تحرک و مدت زمان تحرک اسپرم با میکروسکوپ فازکنتراست (Leica-DFC ۲۹۵) مجهز به دوربین پاناسونیک با بزرگ‌نمایی ۴۰۰× ارزیابی گردید. در این بررسی درصد تحرک اسپرم به‌روش تخمین چشمی مورد ارزیابی قرار گرفت (Kopieka و همکاران، ۲۰۰۰) در بررسی مایع منی، زمان تحرک اسپرم‌ها بلافاصله پس از مخلوط کردن و از لحظه تماس با آب تا زمانی که ۱۰۰ درصد از اسپرماتوزواها از تحرک ایستادند با استفاده از کرنومتر دیجیتال محاسبه شد (Alavi و همکاران، ۲۰۰۶).

حجم اسپرم‌دهی با استفاده از سرنگ انسولین و بر حسب میلی‌لیتر محاسبه شد. سپس برای اندازه‌گیری اسپرماتوکریت، لوله‌های موئینه حاوی منی که یک طرف آن توسط خمیر مخصوص لوله‌های هپارینه مسدود شده بود به دستگاه سانتریفووژ منتقل و با سرعت ۳۰۰۰ دور به‌مدت ۸ دقیقه سانتریفووژ شدند. سپس با استفاده از هماتوکریت خوان درصد اسپرم به پلاسمای مایع منی اندازه‌گیری شد. بدین منظور میانگین نمونه‌های اسپرم در سه تکرار به‌عنوان درصد اسپرماتوکریت ثبت شد (Fitzpatrick و همکاران، ۲۰۰۵). تراکم اسپرم با روش استاندارد هموسایتومتری با رقیق کردن اسپرم به نسبت ۱:۱۰۰۰ و با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگ‌نمایی ۱۰ اندازه‌گیری و با واحد 10^9× در هر میلی‌لیتر مایع منی محاسبه شد.

به‌منظور اندازه‌گیری pH، نمونه‌های اسپرم به ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شدند سپس ابتدا نمونه‌ها به‌مدت ۲ دقیقه در ۵۰۰ دور در دقیقه و بعداً به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفووژ شدند (Linhart و همکاران، ۱۹۹۱). بعد از سانتریفووژ، پلاسمای منی که در قسمت بالای ویال قرار گرفته بود به‌درون ویال‌های جدید منتقل گردید و میزان اسیدیته توسط pH متر اندازه‌گیری شد.

برای تجزیه و تحلیل آماری از بسته نرم‌افزاری SPSS (ویرایش ۱۶) و برای تشخیص وجود اختلاف بین تیمارها از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One way-ANOVA) استفاده گردید. در صورت وجود اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ از آزمون دانکن (Duncan test) استفاده شد.

نتایج اندازه‌گیری پارامترهای اسپرم‌شناختی (اسپرماتوکریت، تراکم اسپرم، طول دوره تحرک اسپرم، درصد تحرک اسپرماتوزوا، حجم اسپرم‌دهی، pH) ماهی *شیزوتوراکس زارودنی* در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: میانگین پارامترهای اسپرم‌شناختی در دو اسپرم‌گیری

پارامتر	اسپرم‌گیری اول	اسپرم‌گیری دوم
طول تحرک اسپرم (ثانیه)	۴۵/۰۹±۷/۷۳^{a}	۵۲/۸۴±۵/۲۰^{a}
درصد تحرک اسپرم	۵۷/۱۸±۱۱/۲۹^{a}	۷۲/۴±۹/۷۳^{a}
اسپرماتوکریت(درصد)	۳۳/۵۵±۲/۹۱^{b}	۳۵ ±۷/۱۶^{a}
حجم (میلی‌لیتر)	۴/۳۵±۴/۷^{a}	۳/۹۸±۳/۲^{a}
تراکم اسپرم^{9}×۱۰	۰/۷۰±۰/۸۴^{a}	۸±۰/۱۰^{a}
pH	۷/۷۸±۰/۲۷^{a}	۸/۰۳ ±۰/۱۲^{a}

حروف انگلیسی مختلف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ است.

همان‌گونه که در جدول مشاهده می‌شود میانگین و انحراف معیار طول دوره حرکت اسپرم در اسپرم‌گیری اول ۴۵/۰۹±۷/۷۳ و در اسپرم‌گیری دوم ۵۲/۸۴±۵/۲۰ بود که براساس آنالیز آماری اختلاف معنی‌داری نداشت (p>۰/۰۵). در مورد پارامتر درصد تحرک اسپرماتوزوا بین تکرار اسپرم‌گیری‌ها نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (p>۰/۰۵).

مقایسه بین میزان حجم اسپرم‌دهی در بین دو اسپرم‌گیری نشان داد که حجم اسپرم در اسپرم‌گیری اول بالاتر از اسپرم‌گیری دوم بوده است. میانگین و انحراف معیار تراکم اسپرم در اسپرم گیری اول برابر با ۰/۷۰±۰/۸۴×۱۰^{9} سلول در میلی‌لیتر به‌دست آمد و میانگین و انحراف معیار تراکم اسپرم در اسپرم‌گیری دوم برابر با ۰/۸±۰/۱۰×۱۰^{9} سلول در میلی‌لیتر بود که اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند (p>۰/۰۵). از طرفی مقایسه میانگین pH در بین تکرار اسپرم‌گیری اول و دوم نشان داد که حداکثر میزان pH در اسپرم‌گیری دوم بود که اختلاف معنی‌داری با مرحله اول اسپرم‌گیری نداشت (p>۰/۰۵).

بین میانگین و انحراف معیار اسپرماتوکریت در اسپرم‌گیری اول و دوم اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (p<۰/۰۵) و در اسپرم گیری اول برابر با ۲/۹۱ ±۳۳/۵۵ درصد به‌دست آمد و میانگین و انحراف معیار اسپرماتوکریت در اسپرم‌گیری دوم برابر با ۷/۱۶±۳۵ درصد بود.

معمولاً در فرایندهای تولیدمثلی، از ماهیان نر بالغ، بیش از یک‌بار اسپرم‌گیری می‌شود که این امر به‌دلیل کمبود تعداد مولدین نر با کیفیت لازم می‌باشد، این عمل می‌تواند تا حدی مشکلات فرا رو را برطرف نماید (Piros و همکاران، ۲۰۰۲؛ Dettlaff و همکاران، ۱۹۹۳). نتایج حاصل از تحقیق انجام شده نشان داد که درصد تحرک اسپرم در اسپرم‌گیری دوم (پس از تزریق دوم) افزایش یافت. مطالعات نشان داده که یک تزریق هورمون برای رسیدن به بلوغ جنسی و اسپرم‌ریزی کافی است اما ادامه فرایند القای هورمونی برای حفظ تولید و کیفیت اسپرم ضروری است (Asturiano و همکاران، ۲۰۰۵).

هم‌چنین Alavi و همکاران (۲۰۰۶) اعلام نمودند افزایش زمان سپری شده در اسپرم‌کشی بعدی (چند ساعت پس از اسپرم‌کشی اول بدون انجام تزریق دوم) بعد از القای تحرک در آب‌شیرین بر روی درصد تحرک و طول دوره تحرک اسپرماتوزوآی تاس‌ماهی ایرانی (*A. persicus*) اثر منفی می‌گذارد و شاید بتوان دلیل آن‌را تغییر در فعالیت‌های آنزیمی پلاسمای سمینال طی اسپرم‌کشی‌های متوالی و تأثیر گذاری بر تحرک اسپرم دانست. در کل الگوی خاص از تولید اسپرم در طول اسپرم‌کشی‌های متعدد ممکن است در نتیجه اثرات فیزیولوژیکی و تغییرات محیطی بر روی فرایند اسپرم‌ریزی در طول فصل تکثیر باشد (Hajirezaee و همکاران، ۲۰۰۹).

در مطالعه حاضر عمل جمع‌آوری اسپرم پس از هر بار تزریق و القاء رسیدگی مجدد با فاصله چندروزه (متغیر) صورت پذیرفت و به ماهی فرصت طی کردن دوباره مراحل اسپرم‌سازی (Spermatogensis، Spermiogensis و Spermation) داده شد که براساس نتایج حاصله می‌توان گفت اسپرم‌کشی‌های مکرر پس از هر بار تزریق و القاء رسیدگی جنسی بر روی میزان درصد تحرک و طول دوره تحرک تأثیر منفی نداشت. هم‌چنین تفاوت مشاهده شده بین این مطالعه و مطالعات دیگران می‌تواند مربوط به حصول ظرفیت تحرک اسپرم در مجرای بیضه در پاسخ به تولید پروژسترون باشد (Nagahama، ۱۹۹۴).

به‌دلیل این‌که اسپرماتوژنز و اسپرمیوژنز از خصوصیات ویژه هر گونه است که ممکن است به شرایط آب و هوایی از قبیل درجه حرارت و دوره نوری بستگی داشته باشد (Zohar و Mylonas، ۲۰۰۱). Suquet و همکاران (۱۹۹۲) نیز با بررسی فواصل اسپرم‌گیری در ماهی turbut (*Scophthalmus maximus*) گزارش کردند که تکرار اسپرم‌کشی‌ها با فواصل ماهیانه تأثیری

بر میانگین تحرک اسپرم و حجم کلی آن نداشت اما در مواقعی که فواصل اسپرم‌گیری‌ها به هر ۱۴ روز یا هفته‌ای یک‌بار کاهش یافت تحرک اسپرم افزایش پیدا کرد و می‌توان گفت که نتایج حاصل از مطالعه مذکور در راستای تأیید یافته‌های تحقیق حاضر می‌باشد.

هم‌چنین Buyukhatipoglu و Holtz (۱۹۸۴) بیان کردند که از مولدینی که در میانه فصل تکثیر، اسپرم‌گیری انجام می‌شود نسبت به مولدینی که در پایان فصل تکثیر اسپرم‌گیری می‌شوند کیفیت اسپرم بهتری دارند و در مولدینی که هفته‌ای یک‌بار اسپرم‌گیری تکرار می‌شوند نسبت به مولدینی که هر دو هفته یا ۴ هفته اسپرم‌گیری شده‌اند اسپرم تولید شده بیش‌تر بوده است. غلظت اسپرم در ماهیان نر مختلف، متفاوت می‌باشد و این تفاوت حتی در اسپرم‌گیری‌های متوالی در طول یک یا چند هفته نیز متغییر است (احمدیان و همکاران، ۱۳۸۱). فواصل بین اسپرم‌گیری‌ها و سن مولدین نر نیز می‌تواند بر فاکتورهای کیفی اسپرم تاثیرگذار باشند که آن‌ها نیز در کارایی تکثیر دخیل می‌باشند (لرستانی، ۱۳۸۳).

در تحقیق حاضر میانگین و انحراف معیار تراکم اسپرم در اسپرم‌گیری اول برابر با $۱۰^{۹}\times۰/۸۴\pm۰/۷۰$ سلول در هر میلی‌لیتر و در اسپرم‌گیری دوم برابر با $۱۰^{۹}\times۰/۱۰\pm۰/۸$ سلول در هر میلی‌لیتر بود که براساس نتایج میزان تراکم اسپرم در اسپرم‌گیری دوم افزایش داشته است هر چند که اختلاف معنی‌داری مشاهده نشده است ($P>۰/۰۵$).

Piros و همکاران (۲۰۰۲) مشاهده کردند که تراکم اسپرم تاس‌ماهی سیبری در طول دومین اسپرم‌گیری (چند ساعت بعد از اسپرم‌گیری اول) در مقایسه با اولین‌بار افزایش یافت هرچند مقدار افزایش مشاهده شده چندان زیاد نبود ($P>۰/۰۵$). علت این اختلاف مشخص نیست و ممکن است ریشه در تفاوت شیوه‌های تحریک هورمونی، شرایط محیطی، مشخصات بیولوژیکی مولدین مثل سن و یا سایر دلایل داشته باشد (Linhart و همکاران، ۲۰۰۰).

در مطالعه حاضر حجم اسپرم در اسپرم‌گیری اول بیش‌تر از اسپرم‌گیری دوم بود مطالعات نشان داده که در گونه‌هایی که حجم اسپرم آن‌ها پایین می‌باشد، معمولاً جهت جبران حجم کم اسپرم، دارای اسپرمی با تراکم بالا می‌باشند (Alavi و همکاران، ۲۰۰۷) که با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. حجم اسپرم دریافتی و اختلاف بین غلظت اسپرم در گونه‌های مختلف و حتی در یک گونه بسته تعداد دفعات اسپرم‌گیری، سن، وزن، نژاد ماهی، شرایط محیطی، مهاجرت تولیدمثلی، مهارت اسپرم گیری و مقدار اسپرم متغییر است (تکه و همکاران، ۱۳۸۸).

در تحقیق انجام شده میانگین و انحراف معیار pH اسپرم در اسپرم‌گیری اول برابر با ۷/۷۸±۰/۲۷ و میانگین و انحراف معیار pH اسپرم در اسپرم‌گیری دوم برابر با ۸/۰۳±۰/۱۲ به‌دست آمد. در این تحقیق میانگین و انحراف معیار اسپرماتوکریت در اسپرم گیری اول برابر با ۳۳/۵۵±۲/۹۱ و میانگین و انحراف معیار اسپرماتوکریت در اسپرم‌گیری دوم برابر با ۳۵±۷/۱۶ به دست آمد.

Rideout و همکاران (۲۰۰۴) در مورد ماهی هادداک گزارش نمودند میزان اسپرماتوکریت در طول فصل تکثیر به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد و بین اسپرماتوکریت و سلول‌های متحرک اسپرم زمانی‌که اسپرماتوکریت برابر و یا کم‌تر از ۷۰ درصد باشد ارتباط معنی‌داری وجود ندارد و در صورتی‌که بالاتر از ۷۰ درصد باشد کاهش تحرک اسپرم دیده می‌شود.

Hatef و همکاران (۲۰۰۷) نیز میانگین تراکم اسپرم قزل‌آلای قهوه‌ای دریای خزر را $۳/۳\times۱۰^{۹}$ اسپرماتوزوآ در هر میلی‌لیتر و دامنه مقدار اسپرماتوکریت را بین ۲۵٪ تا ۵۲٪ اعلام نمودند و بیان داشتند که رابطه خطی معنی‌دار قوی بین تراکم اسپرم و اسپرماتوکریت وجود دارد.

با توجه به بررسی‌های صورت گرفته و درنظر گرفتن این‌که در مرحله اول پارامترهای اسپرم‌شناختی اندازه‌گیری شده با مرحله دوم اختلاف معنی‌داری نداشت و حتی در مرحله دوم بالاتر از مرحله اول بود، به‌نظر می‌رسد ادامه فرایند القای هورمونی و کاهش استرس مولدین به شرایط نگه‌داری و تنظیم فاصله مناسب جهت اسپرم‌گیری مکرر می‌تواند راهکار مناسبی جهت افزایش کارایی تکثیر در این گونه باشد.

هم‌چنین پیشنهاد می‌شود اثر عوامل مختلف مانند سن، وزن مولدین و دیگر عوامل در اسپرم‌گیری‌های مکرر بررسی گردد.

منابع

۱. **احمدیان، ن.؛ مجازی‌امیری، ب.؛ ابطحی، ب. و محمد نظری، ر.، ۱۳۸۱.** استفاده از تقویت کننده‌های اسپرم در لقاح تخمک تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*). دومین همایش ملی- منطقه‌ای ماهیان خاویاری رشت. صفحات ۱۱۱ تا ۱۱۵.

۲. **تکه، ش.؛ ایمانپور، م.ر.؛ سوداگر، م. و شعبانی، ع.، ۱۳۸۸.** مقایسه برخی پارامترهای اسپرم‌شناختی و بیوشیمیایی سمن ماهی سفید مولد (*Rutilus frisii kutum*) در زمان‌های مختلف مهاجرت تولیدمثلی. مجله علوم کشاورزی و منابع

طبیعی. جلد ۱۶، شماره ۲، صفحات ۵۳ تا ۶۲.

۳. **خارا، ح.؛ شمس‌پور، س.؛ رضوانی، م.؛ احمدنژاد، م.؛ رهبر، م. و موسوی، س.، ۱۳۹۱.** تاثیر اسپرم‌گیری مجدد بر روی برخی از پارامترهای اسپرم‌شناختی، درصد لقاح و روند انکوباسیون در ماهی آزاد وحشی (*Salmo trutta caspius*). مجله علمی و پژوهشی زیست‌شناسی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز. جلد ۴، شماره ۴، صفحات ۱۱ تا ۲۲.

۴. **دادرس، ح.؛ نظامی، ش.؛ خارا، ح. و برادران‌نویری، ش.، ۱۳۸۸.** تأثیر اسپرم‌گیری مجدد بر نرخ تفریخ و اندازه لارو تاس ماهی ایرانی(*Acipenser persicus* Borodin, 1897). مجله علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان. سال ۳، شماره ۳، صفحات ۳۳ تا ۳۷ .

۵. **لرستانی، ر.، ۱۳۸۳.** اثر سن مولد نر و محلول‌های تقویت کننده اسپرم در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تربیت مدرس. ۶۴ صفحه.

6. **Alavi, S.M.H.; Cosson, J. and Kazemi, R., 2006.** Semen characteristics in *Acipencer persicus* in relation to sequential stripping. Journal of Applied Ichthyology. Vol. 22, No. 1, pp: 400-405.

7. **Alavi, S.M.H.; Linhart, O.; Coward, K. and Rodina, M., 2007.** Fish spermatology: implications for aquaculture management. In: S.M.H. Alavi, J.J. Cosson, K. Coward and G. Rafiee, (Eds.), Fish Spermatology. Alpha Science Ltd, Oxford. pp: 397-460.

8. **Asturiano, J.F.; Pérez, L.; Garzón, D.L.; Peñaranda, D.S.; Marco-Jiménez, F.; Martínez-Llorens, S.; Tomás, A. and Jover, M., 2005**. Effect of different methods for the induction of spermiation on semen quality in European eel. Aquaculture Research. Vol. 36, No. 15, pp: 1480-1487.

9. **Billard, R.; Cosson, J.; Perchec, G. and Linhart, O., 1995**. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. Aquaculture. Vol. 124, No. 1-4, pp: 95-112.

10. **Buyukhatipoglu, S. and Holtz, H., 1984**. Sperm output in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females, Aquaculture. Vol. 37, pp: 63-71.

11. **Cosson, J.; Billard, R.; Dreanno, C.; Suquet, M. and Cibert, C. 1999.** Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors. In the Mail Gamete from Basic Knowledege to Clinical Applications. Vienna, U.S.A. pp: 161-186.

12. **Dettlaff, T.A.; Ginsburg, A.S. and Schmalchausen, O.I., 1993**. Sturgeon fishes. In: Developmental Biology and Aquaculture. Springer-Verlag, Berlin. pp: 67-71.

13. **Dietrich, G.J.; Kowalski, R.; Wojtczak, M.; Dobosz, S.; Goryczkoand, K. and Ciereszko, A., 2005.** Motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa in relation to sequential collection of milt, time of post-mortem storage and anesthesia. Fish Physio and Biochem. Vol. 31, pp: 1-9.

14. **Drokin, S.I. and Kopeika, E.F., 1997.** Cryopreservation and phospholipid content of spermatozoa of some sturgeon sppecies. Journal of Applied Ichthyology. Vol. 15, 311 p.

15. **Fitzpatrick, J.L.; Henry, J.C.; Leily, N.R. and Devlin, R.H., 2005**. Sperm characteristics and fertilization success of masculinized Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Aquaculture. Vol. 249, No. 1-4, pp: 459-468.

16. **Gharaei, A.; Rahdari, A. and Ghaffari, M., 2011**. Induced Spawning of *Schizothorax zarudnyi* (Cyprinidae) By Using Synthetic Hormones (Ovaprim and HCG). J of Fish and Mari Scie. Vol. 3, No. 6, pp: 518-522.

17. **Hajirezaee, S.; Mojazi Amiri, B. and Mirvaghefi, A.R., 2009**. Effect of stripping frequency on semen quality of endangered Caspian brown trout *Salmo trutta caspius*. Ame. J of anim and vete sci. Vol. 4, No. 3, pp: 65-71.

18. **Hatef, A.; Niksirat, H.; Mojazi Amiri, B.; Alavi, S.M.H. and Karami, M., 2007**. Sperm density, seminal plasma composition and their physiological relationship in the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). Aquaculture Research. Vol. 38, No. 11, pp: 1175-1181.

19. **Kopieka, E.F.; Williot, P. and Goncharov, B.F., 2000.** Cryopreservation of Atlantic sturgeons *Acipenser sturio* L., 1758 sperm: First results and associated problems. Boletín Instituto Español de Oceanografía. Vol. 16, No. 1-4, pp: 167-173.

20. **Linhart, O.; Barth, T. and Kouril, J., 1991**. Stimulation of spermiation in tench *Tinca tinca* L. by analogues of GnRH and carp hypophysis. In: Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E., Rolfe, M.S. (Eds), Proceedings of the Fourth International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, University of East Anglia, Norwich, UK. 282 P.

21. **Linhart, O.; Mims, S.D.; Gomelsky, B.; Hiott, A.E.; Shelton, W.L.; Cosson, J.; Rodina, M. and Gela, D., 2000.** Spermiation of paddlefish (*Polyodon spathula*) stimulated with injection of LHRH analogue and carp pituitary extract. Aquatic Living Resources.Vol. 13, No. 6, pp: 1-6.

22. **Nagahama, Y., 1994.** Endocrine regulation of gametogenesis in fish. The International Journal of Developmental Biology. Vol. 38, No. 3, pp: 217-229.

23. **Piros, B.; Glogowski, J.; Kolman, R.; Rzemieniecki, A.; Domagala, J.; Horvath, A.; Urbanyi, B. and Ciereszko, A., 2002.** Biochemical characterization of Siberian sturgeon, *Acipenser baeri*, and starlet, *Acipenser ruthenus*, milt plasma and spermatozoa. Fish Physiol Biochem.Vol. 26, pp: 289-295

24. **Rana, K.J., 1995**. Preservation of gametes. Cambridge: Cambridge University Press. Brood Stock Management and Egg and Larvae Quality. pp: 53-76

25. **Rideout, R.M.; Trippel, E.A. and Litvak, M.K., 2004**. Relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and spawning date in wild and cultured haddock. J of Fish Biolo. Vol. 65, pp: 319-332.

26. **Rurangwa, E.; Kime, D.E.; Ollevier, F. and Nash, J.P., 2004**. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquacul. Vol. 234, pp: 1-28.

27. **Secer, S.; Tekin, N. and Bozkurt, Y., 2004.** Correlation between biochemical and spermatological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus my*kiss). Bamidgeh, Aqua. Vol. 56, pp: 274-280.

28. **Suquet, M.; Omnes, M.H.; Normant, Y. and Fauvel, C., 1992**. Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scprthalmus maximus*), Aqua. Vol. 101, pp: 177-185.

29. **Zohar, Y. and Mylonas, C.C., 2001.** Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. Aquaculture. Vol. 197, No. 1-4, pp: 99-136.