

الگوی کاربرد روش‌های شمارش عددی، اسپرماتوکریت و طیف سنجی تراکم اسپرم در ماهیان با تاکید بر ماهی ازون برون *Acipenser stellatus*

علیرضا علیپور جورشری

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی - موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر

رشت - صندوق پستی: ۳۴۶۴ - ۴۱۶۳۵

Alireza_alipour123@yahoo.com

تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۴

چکیده

ماهی ازون برون *Acipenser stellatus* علاوه بر ارزش اقتصادی، به دلیل شکل ظاهری منحصر به فرد در مرحله انگشت قد، می‌تواند به عنوان یکی از آبزیان تزئینی و آکواریومی مطرح باشد. یکی از عوامل موثر در بهبود کیفیت تکثیر ماهیان، کیفیت و کمیت گامت‌های نر می‌باشد. این مطالعه به منظور بررسی کمی اسپرماتوزوئید در ماهی ازون برون از طریق شمارش عددی با لام هماسیتومتر، درصد اسپرماتوکریت و طیف سنجی در طول موج‌های ۳۷۰، ۴۰۰، ۴۵۰، ۵۰۰، ۵۵۰، ۶۰۰ و ۷۰۰ نانومتر انجام گرفت. میانگین تراکم اسپرم در این بررسی $2/93 \pm 2/20 \times 10^9$ اسپرم در میلی‌لیتر و میزان درصد اسپرماتوکریت $9/70 \pm 7/22$ درصد اندازه‌گیری شد. در روش طیف سنجی، نتایج نشان داد که با افزایش طول موج میزان جذب کاهش می‌یابد. در تمام طول موج‌های مورد بررسی، بین تراکم اسپرم و میزان جذب، همبستگی بالایی مشاهده شد. همچنین بین درصد اسپرماتوکریت و میزان جذب در طول موج‌های مختلف اختلاف معناداری مشاهده نشد. این یافته نشان داد که بین عوامل اسپرماتوکریت، تراکم و جذب نوری در اسپرم ماهی ازون برون همبستگی معنی‌داری دیده شده و هر یک از این روش‌ها می‌تواند به عنوان روش کاربردی در بررسی تراکم اسپرم در ماهیان مختلف مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: ازون برون، اسپرم، تراکم، اسپرماتوکریت، طیف‌سنجی.

مقدمه

ماهی ازون برون *Acipenser stellatus* یکی از با ارزش‌ترین ماهیان خاویاری دریای خزر می باشد که به دلیل شکل ظاهری منحصر بفرد در مرحله انگشت‌قد، می‌تواند به عنوان یکی از آبریان تزئینی و آکواریومی مطرح باشد. امروزه از ماهیان خاویاری دیگری همچون استرلیاد های کوچک و جوان به عنوان ماهیان زینتی و نگهداری در آکواریوم و تجارت صنعت آبریان زینتی در جهان استفاده می‌شود (فشخامی و همکاران). متأسفانه به دلیل شرایط نامساعد اکولوژیک، نسل این ماهیان با خطر انقراض روبرو شده است (Cherepanov, et al. 1993).

تحقیق و مطالعه هرچه بیشتر در مورد مواد تناسلی باعث افزایش دانش ما از ویژگی‌های کمی و کیفی سلول‌های جنسی و ویژگی نژادی، تکثیر گونه‌ها می‌شود (اسلامبولچی، ۱۳۷۸). دستیابی به اسپرم با کیفیت خوب و مقدار کافی در زمان مورد نظر و همچنین مدیریت بر آن، شاخص تعیین کننده‌ای در موفقیت تکثیر مصنوعی می‌باشد.

غلظت اسپرم در ماهیان با روش‌های مختلفی مانند، استفاده از لام هماسیتومتر (نعمت‌اللهی، ۱۳۷۲، اسلامبولچی، ۱۳۷۸، Suquet, 1992, Ciereszko and Dabrowski, 1993)، بکارگیری روش طیف‌سنجی (اسپکتروفتومتری) (اسلامبولچی، ۱۳۷۸، علوی، ۱۳۸۱، Ciereszko and Dabrowski 1993) و اندازه‌گیری اسپرماتوکریت (Suquet et al., 1992) تعیین می‌شود.

تعداد یاخته‌های اسپرم به همراه ویژگی‌های دیگری نظیر میزان تحرک و شکل ظاهری مناسب، از مهمترین عوامل در تعیین کیفیت مواد تناسلی مولدین نر و در نتیجه پیش‌بینی نتیجه حاصل از لقاحی است که اسپرماتوزوئیدهای ماهی در آن شرکت داشته‌اند. همچنین تخمین تراکم اسپرم، برای ذخیره‌سازی آن نیز حائز اهمیت است (Ciereszko and Dabrowski, 1993).

اسپرم بسیاری از ماهیان در دستگاه تناسلی بی‌حرکت است. اسپرماتوزوئیدها تنها بعد از رهاسازی در محیط خارجی فعال می‌شوند و دوره تحرک آنها کوتاه است. اسپرم ماهیان خاویاری در پلاسما، بدون تحرک بوده و تنها تعداد کمی از گامت‌ها متحرک هستند. اما بعد از رقیق شدن در آب دارای حرکت می‌شوند (Linhart, 1995). بارزترین ویژگی اسپرم تحرک آن می‌باشد این صفت، اسپرم را برای مطالعات فیزیولوژیک مطلوب ساخته و روش ساده‌ای برای ارزیابی کیفیت مواد تناسلی فراهم می‌آورد.

ساده‌ترین و قابل قبول‌ترین روش برای پی بردن به کیفیت مناسب اسپرم قدرت و درصد تحرک آن است. معمولاً اسپرم‌هایی که در زمان اوج تخم‌ریزی استحصال می‌گردد دارای کیفیت بهتری می‌باشد (Stoss, 1983).

مواد و روش کار

با توجه به اینکه کمیت مناسب گامت جنس نر، یکی از عوامل موثر در افزایش کارایی لقاح است، در این تحقیق خصوصیات کمی اسپرم گونه نر ازون برون از طریق طیف‌سنجی، بررسی اسپرماتوکریت و شمارش عددی با لام هماسیتومتر مورد بررسی قرار گرفت.

در این تحقیق، اسپرم ماهیان خاویاری از مولدین مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید بهشتی در فصل تکثیر تامین گردید. کلیه عملیات آزمایشگاهی و مراحل اندازه‌گیری در آزمایشگاه انجماد اسپرم بخش ژنتیک و آزمایشگاه فیزیولوژی انستیتو تحقیقات ماهیان خاویاری انجام شد.

بررسی بر روی ۷ عدد مولد نر ازون برون انجام گرفت که پس از بررسی اولیه اسپرم ۵ مولد برای انجام آزمایش‌ها مناسب بود. به منظور القای رسیدگی جنسی، مولدین نر صید شده به میزان ۳-۲ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن مورد تزریق هیپوفیز قرار گرفته (Dettlaff and Schmalhausen; 1993) و پس از ۲۴-۱۵ ساعت با توجه به میزان درجه حرارت آب، از آنها اسپرم استحصال گردید.

برای اسپرم‌گیری از مولدین، ابتدا محوطه مجرای تناسلی و شکمی، با پارچه کاملاً خشک شده و با فشار در ناحیه کمر ماهی، اسپرم از منفذ تناسلی با فشار در ظرف آلومینیومی جمع‌آوری شد. اسپرم‌های آلوده شده به مواد دفعی و ادرار یا خون مورد آزمایش قرار نگرفتند (Linhart, 1995). اسپرم استحصالی درون ظروف درب دار خنک ریخته شده و بلافاصله به یخچال آزمایشگاه انجماد اسپرم در دمای ۵+ درجه سانتی‌گراد منتقل گردید.

کیفیت اسپرم استحصال شده، از روی چگونگی حرکت اسپرماتوزوئیدها تعیین می‌گردد. جهت انتخاب اسپرم مناسب، میزان تحرک اسپرم‌ها به عنوان شاخص در نظر گرفته شد. در تخمین چشمی، تعداد سلول‌های متحرک اسپرماتوزوئید، سرعت آنها و نوع حرکت آنها بررسی گردید (Kopeika, 1997).

پس از رقیق شدن اسپرم با آب معمولی با رقت ۵۰ برابر، درصد و کیفیت تحرک اسپرم‌ها با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی (۲۰۰×) در زمینه تاریک تخمین زده شد (Linhart, 1996).

هر یک از نمونه اسپرم‌های جمع‌آوری شده به سه روش زیر مورد بررسی قرار گرفت

شمارش اسپرم با استفاده از لام هماسیتومتر: جهت تعیین تراکم اسپرماتوزوئید تعداد اسپرم در حجم مشخص از لام هماسیتومتر

داده‌های به‌دست آمده به کمک نرم‌افزار SPSS و Excel 2007 مورد تفسیر و تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

تراکم اسپرم در گونه ازون برون

میانگین تراکم اسپرم ازون‌برون در ۵ نمونه جمع‌آوری‌شده با استفاده از لام هماسیتومتر و بررسی میکروسکوپی با بزرگنمایی (×۴۰۰)، دارای $2/93 \pm 2/20 \times 10^9$ گامت نر بوده است. حداقل تراکم اسپرماتوزوئید $0/77 \times 10^9$ عدد و حداکثر تراکم اسپرم $6/38 \times 10^9$ در هر میلی‌لیتر محاسبه گردید.

تعیین میزان اسپرماتوکریت در اسپرم گونه ازون برون

میانگین میزان اسپرماتوکریت به‌دست آمده در ۵ نمونه اسپرم $9/70 \pm 7/22$ درصد محاسبه شد. حداقل میزان اسپرماتوکریت در نمونه شماره ۱ با ۳ درصد و حداکثر آن در نمونه شماره ۵ با ۲۱ درصد برآورد گردید (جدول ۱).

استفاده شد (هاشمی، ۱۳۷۵). برای این منظور ابتدا لام هموسیتومتر با الکل کاملاً تمیز و سپس خشک گردید. آنگاه ۱۰ میکرولیتر اسپرم با ۲۹۹۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط شده و خوب هم زده شد تا اسپرم‌ها به‌طور یکنواخت پخش گردند. پس از گذشت ۱۵ دقیقه که تحرک اسپرم‌ها کاملاً متوقف شد، یک قطره از اسپرم رقیق شده، با بزرگنمایی ۲۰۰، در زیر میکروسکوپ شمارش شد.

تعیین میزان اسپرماتوکریت: برای بررسی اسپرماتوکریت هریک از نمونه‌ها، از لوله‌های موئینه مخصوص استاندارد (با قطر داخلی ۱.۲ - ۱ میلی متر) استفاده شد. سنجش اسپرماتوکریت پس از سانتریفوژ با سرعت ۵۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه (Williot et al., 2000) و برای هر نمونه با سه تکرار انجام گرفت.

تعیین تراکم اسپرم به روش طیف سنجی: در این بررسی‌ها اندازه‌گیری غلظت اسپرم از روش طیف سنجی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل CE2040 انجام گردید. نمونه اسپرم‌ها پس از رقیق سازی به نسبت ۱:۳۰۰ در محفظه‌های استوانه‌ای مخصوص ریخته شدند. دامنه طول موج اندازه‌گیری شده در این بررسی برای تعیین بهترین طول موج نوری، طول موج‌های ۳۷۰، ۴۰۰، ۴۵۰، ۵۰۰، ۵۵۰، ۶۰۰ و ۷۰۰ نانومتر انتخاب گردید (Linhart et al., 2000). همچنین از یک محلول ۰/۷ درصد نمک طعام به عنوان شاهد (محلول بلانک) استفاده شد.

جدول ۱: کیفیت، تراکم اسپرم و میزان اسپرماتوکریت در تاسماهی ازون برون

شماره ماهی	وزن ماهی kg	طول ماهی cm	تعداد اسپرم $ml^{-1} \times 10^9$	کیفیت اسپرم (تخمین چشمی با میکروسکوپ)	درصد اسپرماتوکریت
۱	۹.۲	۱۱۶	۰/۷۵	خوب	۳
۲	۱۰.۸	۱۳۲	۱/۵۳	متوسط	۴
۳	۹.۵	۱۳۱	۲/۳۸	متوسط	۹
۴	۱۰.۵	۱۳۵	۳/۶۳	متوسط	۱۱/۵
۵	۱۲.۱	۱۴۰	۶/۳۸	خوب	۲۱

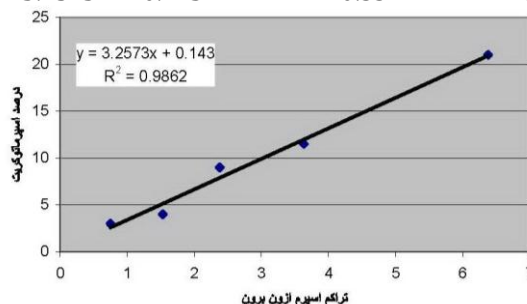
نمودار ۱: ارتباط بین اسپرماتوکریت و تراکم اسپرم در ماهی ازون برون

تعیین تراکم اسپرم به روش اسپکتروفتومتری

میزان تراکم اسپرم در ازون‌برون با نسبت رقت ۳۰۰: ۱ به روش طیف‌سنجی (اسپکتروفتومتری) و براساس شدت جذب نور در طول موج‌های ۳۷۰، ۴۰۰، ۴۵۰، ۵۰۰، ۵۵۰، ۶۰۰ و ۷۰۰ نانومتر مطابق جدول ۲ برآورد گردید. همچنین در نمودار ۲، روابط رگرسیونی بین تراکم اسپرم و جذب نوری در طول موج های ۳۷۰ الی ۷۰۰ مشاهده می شود.

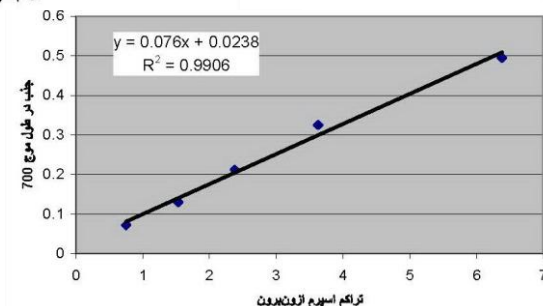
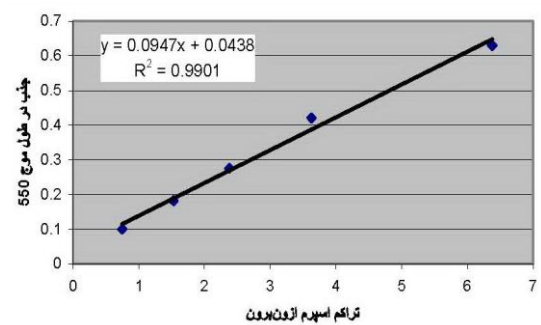
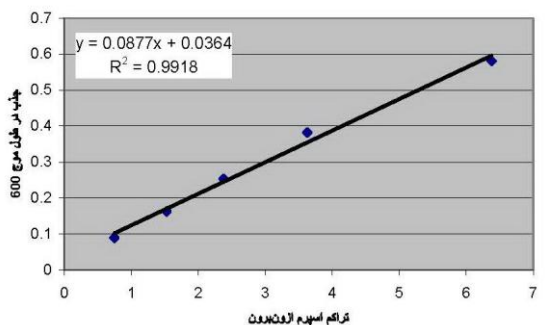
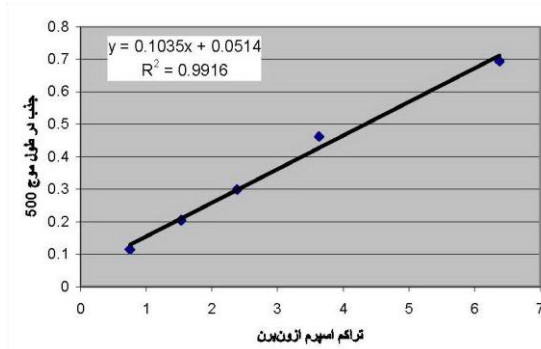
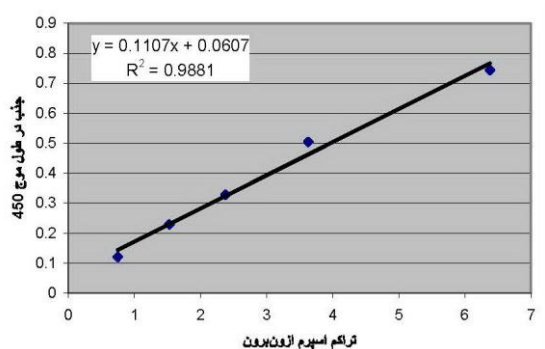
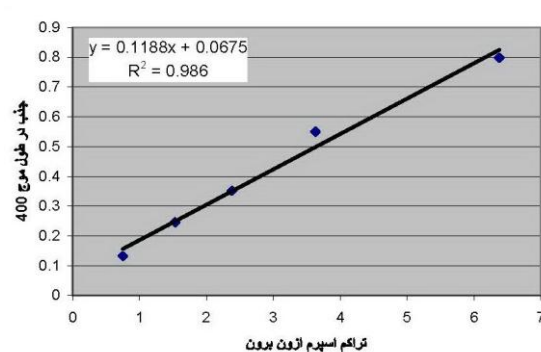
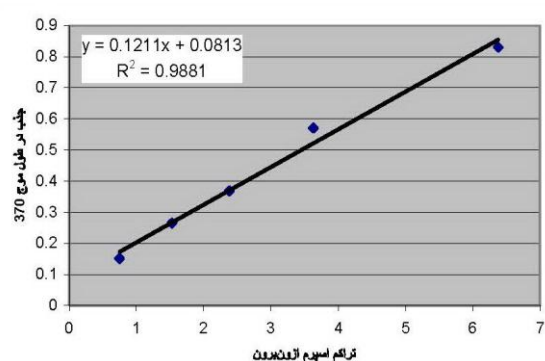
در نمودار ۱ ارتباط بین تراکم اسپرم در ماهی ازون‌برون و درصد اسپرماتوکریت منی بر اساس آزمون ضریب همبستگی پیرسون دارای نسبت مستقیم و همبستگی زیاد مشاهده می‌شود و معادله خط به‌دست آمده به‌صورت رابطه زیر است.

$$Y = 3.2573X + 0.143 \quad r = 0.99 \quad R^2 = 0.98$$



جدول ۲: طول موج و میزان جذب در روش طیف سنجی با نسبت ۳۰۰ : ۱ در آزون برون

طول موج شماره ماهی ↓	۳۷۰	۴۰۰	۴۵۰	۵۰۰	۵۵۰	۶۰۰	۷۰۰
۱	۰/۱۵۱	۰/۱۳۳	۰/۱۲۱	۰/۱۱۵	۰/۱۰۰	۰/۰۹۰	۰/۰۷۲
۲	۰/۲۶۵	۰/۲۴۶	۰/۲۲۹	۰/۲۰۵	۰/۱۸۲	۰/۱۶۳	۰/۱۳۰
۳	۰/۳۶۸	۰/۳۵۲	۰/۳۲۸	۰/۲۹۹	۰/۲۷۵	۰/۲۵۳	۰/۲۱۲
۴	۰/۵۷۰	۰/۵۵۰	۰/۵۰۵	۰/۴۶۲	۰/۴۲۱	۰/۳۸۲	۰/۳۲۵
۵	۰/۸۳۰	۰/۷۹۹	۰/۷۴۴	۰/۶۹۴	۰/۶۳۰	۰/۵۸۱	۰/۴۹۵



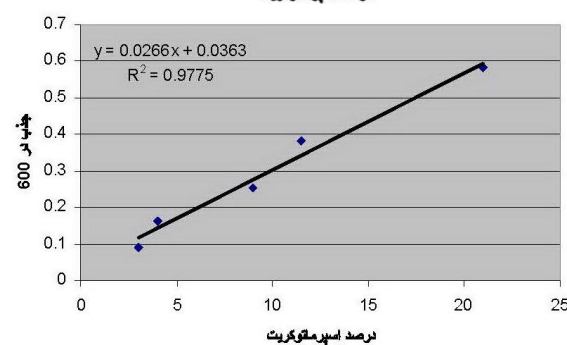
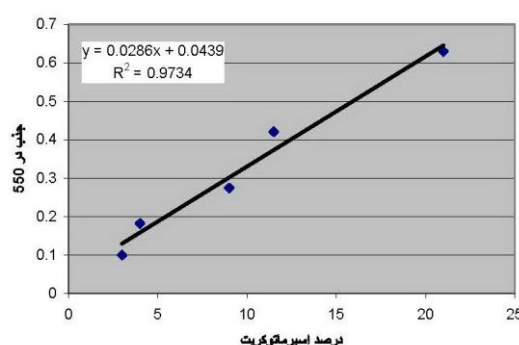
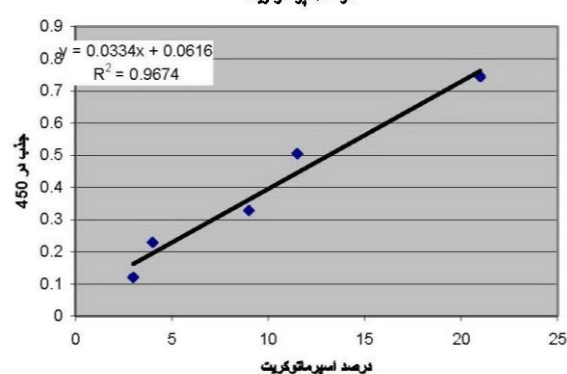
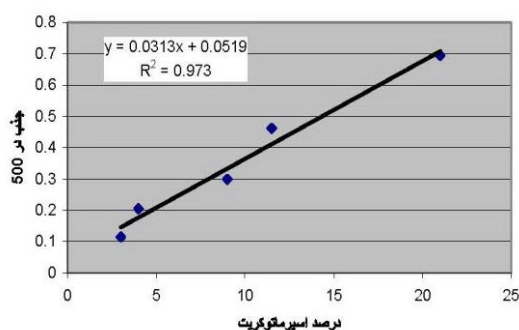
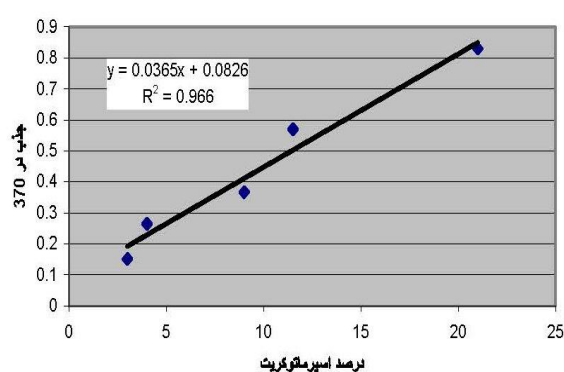
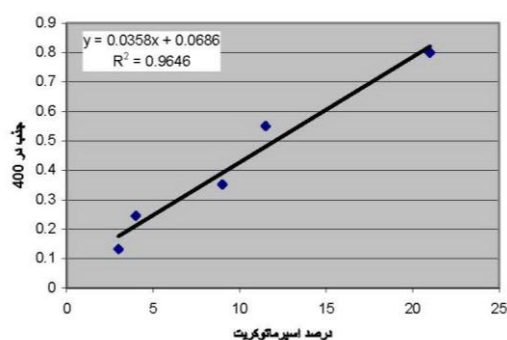
نمودار ۲: روابط رگرسیونی بین تراکم اسپرم و جذب نوری در طول موج های ۳۷۰ الی ۷۰۰

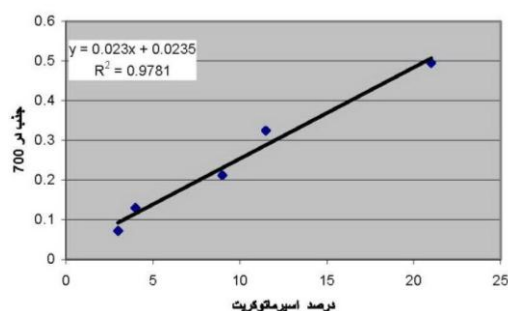
جذب کاهش می‌یابد. با وجودی که در تمام طول موج‌ها، با تراکم اسپرم ضریب همبستگی بالایی وجود دارد اما بر اساس R^2 و r حاصل از آزمون ضریب همبستگی طول موج ۶۰۰ نانومتر، نسبت به سایر طول موج‌ها از ارتباط بیشتری برخوردار است.

بر اساس خطوط رگرسیونی به‌دست آمده از نمودارها بین تراکم اسپرم ازون‌برون و میزان جذب نوری در طول موج‌های مورد آزمون (۳۷۰ الی ۷۰۰ نانومتر) اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد. نتایج به‌دست آمده در جدول ۳ و نمودار ۳ نشان می‌دهند که بیشترین جذب در طول موج ۳۷۰ نانومتر بوده و با افزایش طول موج، مقدار

جدول ۳: معادله خطوط رگرسیون و ضریب همبستگی بین تراکم اسپرم و جذب نوری در طول موج‌های ۳۰۰ الی ۷۰۰

ردیف	طول موج	خطوط رگرسیونی	ضریب R^2	r $P < 0.01$
۱	۳۷۰	$Y = 0.121x + 0.0813$	0.9881	0.9940
۲	۴۰۰	$Y = 0.1188x + 0.0675$	0.986	0.9929
۳	۴۵۰	$Y = 0.1107x + 0.0607$	0.9981	0.9940
۴	۵۰۰	$Y = 0.1035x + 0.0514$	0.9916	0.9958
۵	۵۵۰	$Y = 0.0947x + 0.0438$	0.9901	0.9950
۶	۶۰۰	$Y = 0.0877x + 0.0364$	0.9918	0.9959
۷	۷۰۰	$Y = 0.076x + 0.0238$	0.9906	0.9953





نمودار ۳: روابط رگرسیونی بین درصد اسپرمانوکریت و جذب نوری در طول موج‌های ۳۷۰ الی ۷۰۰

نمی‌شود اما با عطف به ضرایب r و R^2 طول موج ۷۰۰ نانومتر نسبت به سایر طول موج‌ها دارای برتری است.

براساس آزمون ضریب همبستگی پیرسون و معادلات خطوط رگرسیونی بین درصد اسپرمانوکریت و میزان جذب نوری در طول موج‌های مورد بررسی (جدول ۴)، اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده

جدول ۴: خطوط رگرسیون و ضریب همبستگی بین درصد اسپرمانوکریت و جذب نوری در طول موج‌های ۳۰۰ الی ۷۰۰

ردیف	طول موج	خطوط رگرسیونی	ضریب R^2	r	$P < 0.01$
۱	۳۷۰	$Y = 0.0365X + 0.0826$	0.966	0.9828	
۲	۴۰۰	$Y = 0.0358x + 0.0686$	0.9646	0.9821	
۳	۴۵۰	$Y = 0.0334x + 0.0616$	0.9674	0.9835	
۴	۵۰۰	$Y = 0.0313x + 0.0519$	0.973	0.9863	
۵	۵۵۰	$Y = 0.0286x + 0.0439$	0.9734	0.9866	
۶	۶۰۰	$Y = 0.0266x + 0.0363$	0.9775	0.9886	
۷	۷۰۰	$Y = 0.023x + 0.0235$	0.9781	0.9890	

بحث

بچه ماهی ازون برون با ظاهر مورفوفیزیولوژیک، پوزه دراز و اشکال استخوانی ستاره شکل، می‌تواند به عنوان یکی از آبیان تزئینی و آکواریومی مطرح باشد. امروزه از ماهیان خاویاری دیگری همچون استرلیاد های کوچک و جوان به عنوان ماهیان تزئینی و در تجارت صنعت آبیان زینتی در جهان استفاده می‌شود.

با توجه به خطر انقراض نسل و دسترسی محدود به مواد تناسلی و اهمیت مطالعات در زمینه گامت‌های جنسی جهت استفاده و کاربرد این دانش امری ضروری است.

مطالعاتی که در گذشته بر روی تحرک اسپرم تاس‌ماهیان و پاره‌پوزه‌ها انجام گرفت، نشان داد که اساساً گامت جنسی نر در پلاسمای منی بی‌حرکت است و موقعی که به محیط رقیق انتقال یابد، فعال شده و بلافاصله حرکات سریع رو به جلو دارند، که از نظر رفتاری، شبیه رفتار اسپرم ماهیان استخوانی است (Cosson et al., 1996).

بر اساس بررسی بعمل آمده در این مطالعه، مشخص گردید نمونه اسپرم‌های استحصال شده در گونه ازون برون (A. stellatus) با مشاهده در زمینه روشن میکروسکوپ، در پلاسمای

منی بی‌حرکت است و تنها بعد از رقیق شدن در آب یا محلول‌های نمکی فعال می‌گردد. چنین وضعیتی در مورد اسپرم بسیاری از دیگر گونه‌های تاس‌ماهیان نیز گزارش شده است (Linhardt et al., 1995).

نتایج حاصل از بررسی‌های کیفی در این مطالعه، نشان دادند که بیشترین درصد تحرک اسپرم، که عامل مهمی در رسیدن گامت نر به تخمک و انجام فرایند لقاح است در حدود ۳ تا ۵ دقیقه است. در بررسی انجام شده بر روی گونه goldfish (Carassius auratus) مدت زمان تحرک اسپرم ۲ دقیقه گزارش شده است که این نتایج نشان دهنده مدت زمان تحرک اسپرم ماهی ازون برون بیشتر از گونه ماهی قرمز است.

کیفیت اسپرم تولید شده در مولدین به فاکتورهای مختلفی بستگی دارد. از جمله فاکتورهای خارجی و شرایط زیست محیطی ماهیان نر از قبیل دما و کیفیت غذا که در طی مرحله گامتوژن بر ترکیب و ساختار غشاء اسپرم تاثیر خواهد گذاشت و همچنین فاکتورهای فیزیولوژیک مانند درجه تکامل گناد و زمان رسیدگی جنسی که از عوامل موثر در ایجاد گامت‌هایی با کیفیت مناسب

ماهی پاره‌پوزه و برخی از ماهیان استخوانی پیشنهاد شده است (علوی، ۱۳۸۱).

بر اساس نتایج حاصل از بررسی تراکم اسپرم در روش طیف‌سنجی بیشترین جذب نوری در طول موج ۳۷۰ نانومتر مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد که با افزایش طول موج مقدار جذب کاهش می‌یابد. بر پایه آزمون‌های آماری به نظر می‌رسد که بین تراکم اسپرم و میزان جذب، همچنین بین درصد اسپرماتوکریت و میزان جذب در تمام طول موج‌های مورد بررسی ارتباط و همبستگی بالایی وجود داشته (۲ بیش از ۰/۹۷) به عبارت دیگر در روش طیف‌سنجی از تمام طول موج‌ها می‌توان برای تخمین تراکم اسپرم در تاس‌ماهیان استفاده نمود. با وجودی که در تمام طول موج‌های مورد بررسی، بین تراکم اسپرم و میزان جذب ضریب همبستگی بالایی برقرار است و اختلاف معناداری مشاهده نمی‌شود، اما بر اساس r و R^2 حاصل از آزمون ضریب همبستگی در آزمون برون ۶۰۰ نانومتر نسبت به سایر امواج نوری از ارتباط بیشتری برخوردار است.

در مطالعاتی که توسط علوی برای اندازه‌گیری غلظت اسپرم به روش اسپکتروفتومتری در مورد تاس‌ماهی ایرانی انجام گرفت، استفاده از طول موج ۳۵۰ و ۳۷۵ نانومتر را پیشنهاد می‌کند. اسلامبولچی نیز طی پژوهشی اعلام داشت که ارتباط بین تراکم اسپرم و میزان جذب در ماهی ازون برون در طول موج ۴۰۰ نانومتر، بهترین طول موج برای اندازه‌گیری غلظت اسپرم می‌باشد. به نظر می‌رسد، عدم تعریف یک طول موج مشخص برای اندازه‌گیری تراکم اسپرم در ماهیان خاویاری به دلیل وجود ترکیبات آلی موجود در پلاسما می‌تواند این ماهیان باشد (Suquet et al., 1992).

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، در آزمایشگاه انجماد اسپرم موسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر به انجام رسید. همچنین از همکاری کارشناسان و کارکنان محترم مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید بهشتی به جهت تامین مولدین مورد نیاز و مساعدت مستمر و موثر آنان تشکر می‌نماید.

منابع

اسلامبولچی، ش.، ۱۳۷۸. تخمین تراکم اسپرم ماهی کپور، امور و ازون برون با استفاده از روش اسپکتروفتومتری. پایان نامه کارشناسی، دانشکده شیلات دانشگاه منابع طبیعی گرگان. ص ۴۹.

است. بررسی‌های انجام شده بر روی تغذیه ماهی گلدفیش توسط تیزکار و همکاران چنین نتیجه‌ای را تایید می‌نماید.

تراکم اسپرم یک فاکتور مهم قابل اندازه‌گیری در فرآیند لقاح و نگهداری سلول‌های جنسی است. معمولاً بررسی کمی اسپرم به دلیل اتلاف وقت انجام نشده، بلکه بیشتر کیفیت تحرک اسپرم بررسی می‌گردد. با توجه به اینکه در فرآیند لقاح تنها یک سلول اسپرم با نفوذ در سوراخ میکروپیل تخمک باعث ایجاد تخم شده، بنابر این محاسبه دقیق غلظت اسپرم می‌تواند با جلوگیری از ایجاد تخم‌های پلی‌اسپرمی یا تخم‌های لقاح نیافته، به عنوان یک راهکار عملی موجب بهبود و افزایش راندمان تکثیر و تولید گردد.

در این مطالعه سعی شده با استفاده از روش‌های مختلف، غلظت و تراکم سلول‌های جنسی در مواد تناسلی بررسی شده و روابط و میزان همبستگی آنها ارزیابی گردد.

بر اساس نتایج این مطالعه، میانگین تراکم اسپرم، ازون برون $2/93 \pm 2/20$ میلیارد سلول در هر میلی‌لیتر اسپرم محاسبه شده است و مقادیر حداقل، حداکثر تعداد گامت نیز در دامنه وسیعی به دست آمده است. این تفاوت زیاد دامنه تغییرات تراکم اسپرم در مطالعات دیگر محققان نیز گزارش شده است.

همچنین نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که میانگین غلظت اسپرم در ماهیان خاویاری مورد بررسی کمتر از ماهیان استخوانی مانند کپور (Billard et al., 1995) و ماهی قرمز *Carassius auratus* است (تیزکار و همکاران).

یکی از روش‌های بررسی غلظت اسپرم تعیین درصد اسپرماتوکریت آن است. در پژوهش حاضر میانگین درصد اسپرماتوکریت محاسبه شده در ازون برون $9/70 \pm 7/22$ درصد برآورد گردید. در نتایج حاصل از مطالعات اسلامبولچی (۱۳۷۸) که آزمون مشابهی را روی درصد اسپرماتوکریت در گونه ازون برون به انجام رساند میانگین درصد اسپرماتوکریت $15/38 \pm 6/50$ ، اعلام گردید که به طور کاملاً مشخصی بیشتر از میانگین به دست آمده در این تحقیق است. در مطالعات انجام شده بر روی گونه گلدفیش *Carassius auratus* درصد اسپرماتوکریت ۲۹ درصد گزارش گردید که بسیار بیشتر از درصد اسپرماتوکریت در گونه ازون برون است (تیزکار و همکاران).

در مطالعه حاضر بر اساس روابط ریاضی و آماری ضرایب همبستگی و ضریب همبستگی پیرسون نشان داد که ارتباط بین درصد اسپرماتوکریت و تراکم عددی اسپرم در حد بالایی دارای ارتباط معنی‌دار و همبستگی قوی (۲ بیش از ۰/۹۷) است.

روش طیف سنجی می‌تواند، روش سریع برای ارزیابی غلظت اسپرم در تاس‌ماهیان استفاده شود. این روش برای مطالعه تراکم اسپرم در تاس‌ماهی سبیری، ماهی ازون برون، تاس‌ماهی دریاچه‌ای،

- biology and aquaculture. Springer-verlag. Berlin.p.300P
- Kopeika, E.F., Williot, P., and Goncharov, B.F., 2000.** Cryopreservation of Atlantic sturgeon *Acipenser sturio* L., 1758 sperm: First results and associated problems. Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 16(1-4):167-173
- Linhart, O., Mims, A.D., and Shelton, W.L., 1995.** Motility of spermatozoa from shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platyrhynchus* Rafinesque 1820) and paddlefish (*Polyodon spathula* Walbaum, 1797). J. Fish Biol. Vol. 1. 97, pp. 902-909.
- Linhart, O., Mims, A.D., Shelton, W.L., Gomelsky, B., Hiott, A.E., Cosson, J., Rodina, M. and Gela, D., 2000.** Spermatogenesis of paddlefish (*Polyodon spathula*) stimulated with injection of LHRH analogue and carp pituitary powder. J. Aquat. Living resour. Vol. 1. 13, pp. 1-6.
- Suquet, M., Omnes, M. H., Normant, Y., and Fauve, D. K., 1992.** Assessment of sperm concentration and motility in Turbot, *Scophthalmus maximus*. Aquaculture 101:177-185
- Stoss, J., 1983.** Fish gamete preservation and spermatozoa physiology. In: Fish physiology. Vol 1. IX. Reproduction (eds. Hoar, W. S.; Randall, P. J. and Donaldson, E. M). Academic Press. Pp. 305-341.
- Tsvetkova, L.I., Cosson, J., Linhart, O., and Billard, R., 1996.** Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawed spermatozoa. In: sturgeons *Acipenser baeri* and *Acipenser ruthenus*. J. Appl. Ichthyol. Vol. 1. 12, pp. 107-112.
- Tizkar B., Kazemi, R., Alipour, A., Seidavi, A., Naseralavi, G., Ponce-Palafox, J.T., 2015.** Effects of dietary supplementation with astaxanthin and b-carotene on the semen quality of goldfish (*Carassius auratus*)
- 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 baeri* Bradt). Aquaculture 189 53-61.
- علوی، س. م. ه. ۱۳۸۱. مطالعه تطبیقی تحرک اسپرمانوزوای تاسماهی ایرانی و قابلیت لقاحی آن بین آب شیرین و محلول‌های نمکی. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده منابع طبیعی کرج. ۹۵ ص.
- نوروز فشخامی، م.، سوداگر، م.، بهمنی، م.، سلامات، ن.، مازندرانی، م.، یزدانی ساداتی، م.، ۱۳۹۴. کشت اولیه سلول‌های فولیکولی و تخمک تاسماهی استرلیاد *ruthenus* *Acipenser* روشی مناسب برای انجام مطالعات کاربردی. مجله آبزیان زینتی. سال دوم. شماره سوم. صص ۱-۷.
- نعمت‌الهی، م.، ۱۳۷۲. بررسی مقایسه‌ای مایع اسپرمی آزاد ماهیان پرورشی موجود در ایران. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده منابع طبیعی کرج. ۱۱۵ ص.
- هاشمی، م.، ۱۳۷۵. تلقیح مصنوعی در گاو (فیزیولوژی تولید مثل و تلقیح مصنوعی) انتشارات فرهنگ جامع. چاپ دوم، ۳۰۲ ص.
- Billard, R., Cosson, J., Perche, G. and Linhart, O., 1995.** Biology of sperm and artificial reproduction in carp. Aquaculture, Vol. 124, pp. 95-112.
- Cherepanov, V.V., Drokin, S.I., Ochkur, S.I., Dzuba B.B., Chikhachoc, A.S., and Kopeika E.F., 1993.** Freezing of sperm of the Azov-Black Sea *Acipenserids*: 1th Inter. Sympo. on sturgeons. Sep 6-11, Moscow, Russia, pp. 63-64.
- Cosson, J., Billard, R., Cibert, C., Dreanno, C., Linhart O., Suquet, M., 1997.** Movement of fish sperm flagella studied by high Speed videomicroscopy coupled to computer assisted image analysis. Polskie Archivum Hydrobiology 44, 103-113
- Ciereszko, A., and Dabrowski, K., 1993.** Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. Aquaculture, 109: 367-373
- Dettlaff, T.A., Ginsburg, A.S., and Schmalhausen, O.I., 1993.** Sturgeon fishes: Developmental