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

علیرضا علیپور جورشری
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی - موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر
رشت- صندوق پستی: ۳۴۶۴ – ۴۱۶۳۵

Alireza_alipour123@yaho.com

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۴

چکیده

ماهی ازون برون *Acipenser stellatus* علاوه برارزش اقتصادی، به‌دلیل شکل ظاهری منحصر به فرد در مرحله انگشت قد، می‌تواند به‌عنوان 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 بررسی۱۰۹×۲/۲۰±۲/۹۳ اسپرم در میلی‌لیتر و میزان درصد اسپرماتوکریت۷/۲۲± ۹/۷۰ 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 ازون‌برون *Acipenser stellatus* یکی از با ارزش‌ترین ماهیان خاویاری دریای‌خزر می باشد که به‌دلیل شکل ظاهری منحصر بفرد در مرحله انگشت‌قد، می‌تواند به‌عنوان یکی از آبزیان 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 آبزیان زینتی در جهان استفاده می‌شود (فشخامی و همکاران). متاسفانه 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 *et al*., 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 می شود.

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 (Cierszko 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 ودرصد تحرک آن است. معمولاً اسپرم‌هایی که در زمان اوج تخمریزی استحصال می‌گردد دارای کیفیت بهتری می‌باشد (Stoss,1983).

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 طیف سنجی، بررسی اسپرماتوکریت و شمارش عددی با لام هماسیتومتر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

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 آزمایش ها 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 اسپرم گیری 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 جمع آوری 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 اسپرماتوروئیدها 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

استفاده شد (هاشمی، ۱۳۷۵). برای این منظور ابتدا لام هموسیتومتر با الکل کاملاً تمیز و سپس خشک گردید. آنگاه ۱۰ میکرولیتر اسپرم با ۲۹۹۰ میکرولیترآب 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 نمونه ها، از لوله‌های موئینه مخصوص استاندارد (با قطر داخلی ۱.۲ – ۱ میلی متر) استفاده شد. سنجش اسپرماتوکریت پس از سانتریفوژ با سرعت ۵۰۰۰ 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 ۰/۷درصد نمک طعام به عنوان شاهد (محلول بلانک) استفاده شد.

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 $۲/۹۳\pm۲/۲۰\times۱۰^{۹}$ گامت نر بوده است. حداقل تراکم اسپرماتوزوئید $۰/۷۷\times۱۰^{۹}$ عدد و حداکثر تراکم اسپرم $۶/۳۸\times۱۰^{۹}$ در هر میلی‌لیتر محاسبه گردید.

تعیین میزان اسپرماتوکریت در اسپرم گونه ازون برون

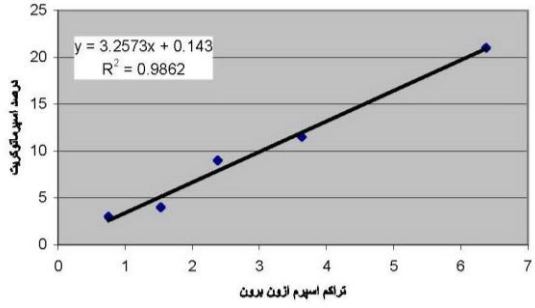
میانگین میزان اسپرماتوکریت به‌دست آمده در ۵ نمونه اسپرم ۷/۲۲± ۹/۷۰ درصد محاسبه شد. حداقل میزان اسپرماتوکریت در نمونه شماره ۱ با ۳ درصد و حداکثر آن در نمونه شماره ۵ با ۲۱ درصد برآورد گردید (جدول ۱).

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

شماره ماهی	وزن ماهی kg	طول ماهی cm	تعداد اسپرم $ml\text{-}1\times۱۰^{۹}$	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

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 ومعادله خط به‌دست آمده به‌صورت رابطه زیر است.

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



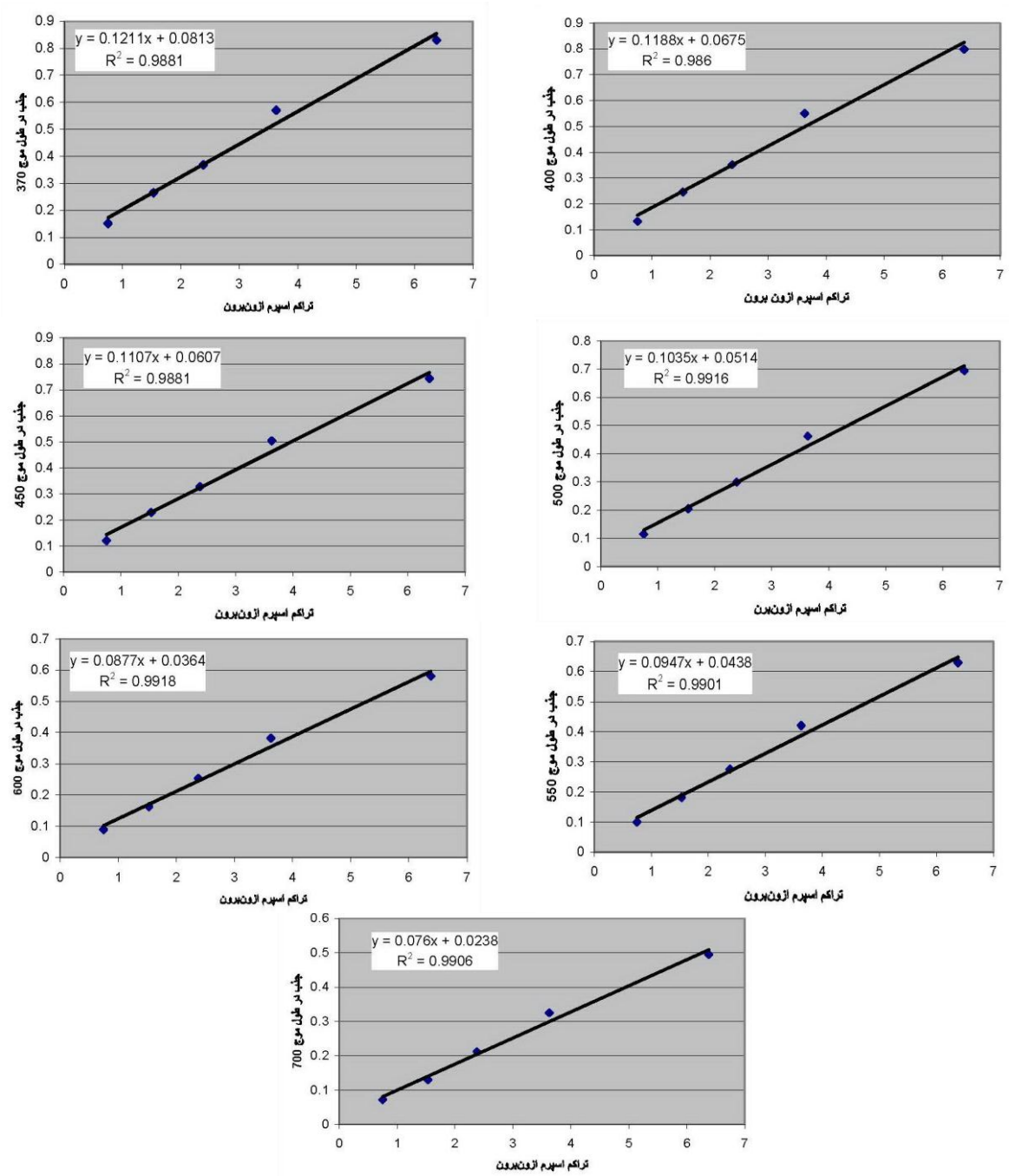
نمودار ۱: ارتباط بین اسپرماتوکریت و تراکم اسپرم در ماهی ازون برون

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 موج‌های۳۷۰، ۴۰۰،۴۵۰، ۵۰۰، ۵۵۰، ۶۰۰ و۷۰۰ 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.

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

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

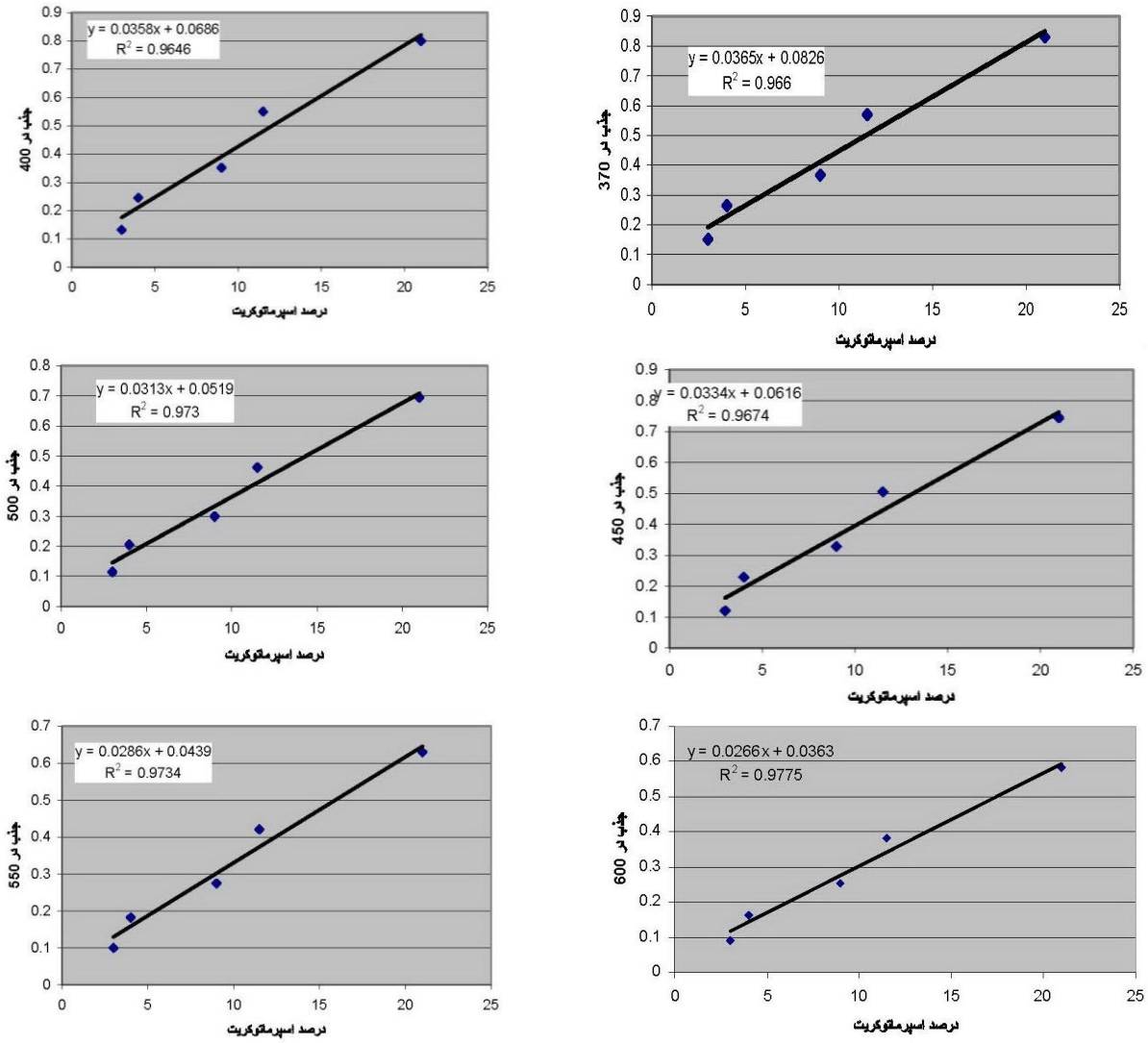


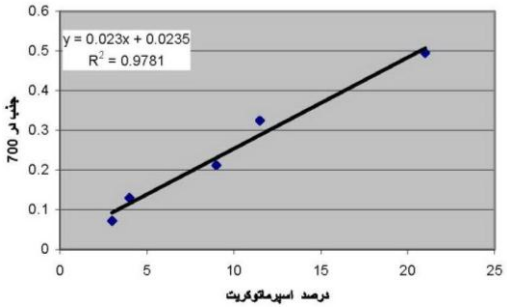
نمودار ۲: روابط رگرسیونی بین تراکم اسپرم و جذب نوری در طول موج های ۳۷۰ الی ۷۰۰

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 جذب کاهش می‌یابد. با وجودی که در تمام طول موج‌ها، با تراکم اسپرم ضریب همبستگی بالای وجود دارد اما بر اساس r و R2 حاصل از آزمون ضریب همبستگی طول موج ۶۰۰ نانومتر، نسبت به سایر طول موج ها از ارتباط بیشتری برخوردار است.

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

ردیف	طول موج	خطوط رگرسیونی	ضریب R2	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 اسپرماتوکریت و جذب نوری در طول موج‌های ۳۷۰ الی ۷۰۰

براساس آزمون ضریب همبستگی پیرسون و معادلات خطوط رگرسیونی بین درصد اسپرماتوکریت و میزان جذب نوری در طول موج‌های مورد بررسی(جدول ۴)، اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نمی‌شود اما با عطف به ضرایب r و R2 طول موج ۷۰۰ نانومتر نسبت به سایر طول موجها دارای برتری است.

جدول ۴: خطوط رگرسیون و ضریب همبستگی بین درصد اسپرماتوکریت و جذب نوری درطول موج‌های ۳۰۰ الی ۷۰۰

ردیف	طول موج	خطوط رگرسیونی	ضریب R2	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 ازون‌برون با ظاهر مورفوفیزیولوییک، پوزه دراز و اشکال استخوانی ستاره شکل، می‌تواند به‌عنوان یکی از آبزیان تزئینی و آکواریومی مطرح باشد. امروزه از ماهیان خاویاری دیگری همچون استرلیاد های کوچک و جوان به عنوان ماهیان تزئینی و در تجارت صنعت آبزیان 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 پاروه‌پوزه‌ها 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 (Linhart *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 گامتوژنز 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

است. بررسی‌های انجام شده برروی 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 به‌دلیل 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، به‌عنوان 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 ۲/۹۳±۲/۲۰ میلیارد سلول در هر میلی‌لیتر اسپرم محاسبه شده است و مقادیر حداقل، حداکثر تعداد گامت نیز در دامنه وسیعی به‌دست 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 ازون‌برون ۷/۲۲±۹/۷۰ درصد برآورد گردید. در نتایج حاصل از مطالعات اسلامبولچی (۱۳۷۸) که آزمون مشابه‌ای را روی درصد اسپرماتوکریت در گونه ازون برون به انجام رساند میانگین درصد اسپرماتوکریت ۶/۵۰± ۱۵/۳۸، اعلام گردید که به‌طور کاملاً مشخصی بیشتر از میانگین به‌دست 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 بالای دارای ارتباط معنی‌دار و همبستگی قوی (r 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 سیبری، ماهی ازون برون، تاس‌ماهی دریاچه‌ای، ماهی پاروه‌پوزه 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 بالای وجود داشته (r بیش از ۰/۹۷) به‌عبارت 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 R2 حاصل از آزمون ضریب همبستگی در ازون برون ۶۰۰ نانومتر نسبت به سایر امواج نوری از ارتباط بیشتری برخودار است.

در مطالعاتی که توسط علوی برای اندازه‌گیری غلظت اسپرم به روش اسپکتروفتومتری در مورد تاس‌ماهی ایرانی انجام گرفت، استفاده از طول موج ۳۵۰ و۳۷۵ نانومتر را پیشنهاد می‌کند. اسلامبولچی نیز طی پژوهشی اعلام داشت که ارتباط بین تراکم اسپرم و میزان جذب در ماهی ازون‌برون درطول 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 پلاسمای منی 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 می نماید.

منابع

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

علوی، س. م. ه. ۱۳۸۱. مطالعه تطبیقی تحرک اسپرماتوزوآی 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 *Acipenser ruthenus* 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 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).:167173

Linhart, O., Mims, A.D., and Shelton,W.L., 1995. Motility of spermatozoa from shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platoryneclus* Rafinesque 1820) and paddlefish (*Polyodon spathulla* Walbaum, 1797). J.Fish Biol.Vo1.97, pp.902-909.

Linhart, O., Mims, A.D., Shelton, W.L., Gomelsky, B., Hiott, A.E., Cosson, J., Rodina, M. and Gela, D., 2000. Spermation of paddlefish (*Polyodon spathulla*) stimulated with injection of LHRH analogue and carp pituitary powder. J.Aquat. Living resour.Vo1.13, 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 l. IX. Reproduction (eds. Hoar, W. S.; Randell, P. J. and Donaldson, E. M). Academic Press. Pp.305-341.

Tsvetkova, L.I., Cosson, J., Linhart, O., and Billard, R1996. Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawed spermatozoa. In: sturgeons *Acipenser baeri* and *Acipenser ruthenus*. J. Appl. Ichthyol. Vo1.12, 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.