

(Oncorhynchus mykiss)

*

در این تحقیق اثر سه محلول فعال کننده اسپرم (محلول فعال کننده‌های ۱، ۲ و آب معمولی) بر مدت زمان تحرک اسپرم و میزان باروری ماهی قزل آلی رنگین کمان بررسی شد. محلولهای فعال کننده اسپرم اختلاف معناداری را در خصوص مدت زمان تحرک اسپرم در مقایسه با هم نشان دادند. بالاترین مدت زمان تحرک اسپرم در فعال کننده ۲ ($91/08 \pm 2$) ثانیه) و کمترین میزان در حضور آب ($26/01 \pm 24$) ثانیه) بود. میزان باروری حاصل از فعال کننده ۲ علاوه بر بالاتر بودن از فعال کننده آب، اختلاف معناداری را با آن نشان داد. اما این میزان در فعال کننده ۱ ($85/04 \pm 1/73$) اختلاف معناداری را با فعال کننده ۲ و آب نشان نداد بلکه حد واسط آن دو قرار داشت. میزان باروری با استفاده از فعال کننده ۲ ($86/85 \pm 1/45$) بیشترین میزان و با استفاده از آب ($82/45 \pm 1/58$) کمترین میزان بود.

فعال کننده، تحرک، اسپرم، باروری، قزل آلی رنگین کمان، کلاردشت.

خصوصیت قابل توجه در تولید مثل آزاد ماهیان دوره کوتاه زندگی گامتهاست. اسپرم تا زمان قرار نگرفتن در مجاورت آب غیر متحرک است؛ پس از آن فقط به مدت ۳۰ ثانیه متحرک باقی می ماند [۶]. اگر چه اغلب مطالعات نشان می دهد اسپرم آزاد ماهیان به ظاهر در فاصله چند دقیقه پس از فعال سازی با محلولهای فعال کننده نمکی یا مایع حفره شکمی، تحرک و قابلیت لقاحی خود را از دست می دهد، اما محققان زیادی دوره های طولانی تری را برای تحرک اسپرم، بین چندین ساعت تا ۷ روز، ثبت کرده اند [۷]. آزمایشهای انجام شده در مورد به تاخیر انداختن لقاح گامتها بعد

بهبود کیفیت مواد تناسلی مولدان و کنترل تولید مثل، کارایی تکثیر در آبی پروری را افزایش می دهد [۱، ۲]. مطالعه زیست شناسی اسپرم ماهیان از قرن ۱۹ آغاز شد [۳]. آگاهی از دانش جدید در گرایشهای مختلف زیست شناسی اسپرم [۴] عامل مهمی در کنترل روشهای لقاح مصنوعی در ماهی و گونه های در حال انقراض تلقی می شود [۵]. در حال حاضر، پژوهشهای بیشتری در آزمایشگاههای مختلف به منظور بهبود فرایند لقاح و کنترل تولید مثل در سطوح آبی پروری اقتصادی و بازسازی ذخایر در حال اجراست [۵].

* نویسنده مسؤول مقاله: تلفن: ۰۸۳۵۴۲۲۵۸۵۳، E-mail: reza_lorestany@yahoo.com

یکسان شدن شرایط تکثیر برای تمام تیمارها تخمکهای استحصال شده از ماهیان ماده مخلوط شدند [۱۱]. به دلیل احتمال عقیم بودن یا کیفیت نامناسب اسپرم در بعضی از مولدان یا کیفیت بالای اسپرم در بعضی دیگر، اسپرمهای مولدان نر با هم مخلوط گردیدند. در مجموع ۳ تیمار (آب، تقویت کننده ۱ و ۲) و ۲۷ تکرار انجام شد.

برای اجرای لقاح در هر تیمار، ۹ دسته تخمک ۵۰mL با پیمانیه از تخمکهای مخلوط شده مولدان ماده جدا و برای جلوگیری از خطا با استفاده از نظیف، مایع حفره شکمی از تخمکها جدا شد زیرا مایع حفره شکمی خود یک فعال کننده اسپرم است [۷].

سپس با قرار دادن هر دسته تخمک به طور جداگانه در ظروف پلاستیکی متوسط، برای هر ظرف، ۵mL اسپرم با استفاده از میکروپیپت برداشت و با تخمکهای موجود در آن به طور کامل مخلوط شد. به منظور فعالسازی اسپرم و انجام عمل لقاح ۵mL آب در تیمار گروه شاهد، ۵mL فعال کننده ۱ به عنوان تیمار اول و ۵mL فعال کننده ۲ به عنوان تیمار دوم به هر ظرف اضافه شد؛ پس از آن به مدت ۲ دقیقه برای تکمیل لقاح به طور کامل هم زده شد. سپس برای حذف اسپرمهای اضافه و پوسته‌ها، تخمهای موجود در هر ظرف، بدقت شستشو شدند. در مرحله بعد یک تراف آگیری و جریان ملایمی از آب در آن ایجاد شد. تخمکهای لقاح یافته موجود در ظروف پلاستیکی بعد از شستشو، با قرار گرفتن در آبکشیهای از پیش شماره گذاری شده برای جذب آب به مدت ۳۰ دقیقه در تراف قرار گرفتند (شرایط معمول کارگاه).

از فعال سازی، بوضوح نشان می‌دهد که میزان لقاح بشدت تابع تحرک اسپرم است [۸]. بر اساس تحقیقات جدید روی مواد تناسلی ماهی کپور، بخصوص اسپرم این ماهی، استفاده از محلولهای فعال کننده نمکی به علت حفظ ساختار تاژک اسپرم، زمان حرکت اسپرم را افزایش می‌دهد؛ پس بتدریج با بهبود فنون تلقیح مصنوعی، محققان برای لقاح از محلولهای فعال کننده نمکی به جای آب استفاده کردند [۹]. هدف از اجرای این تحقیق بررسی اثر محلولهای فعال کننده نمکی بر افزایش مدت زمان تحرک اسپرم و میزان باروری در قزل‌آلای رنگین کمان است.

تحقیق حاضر در آبان ماه سال ۱۳۸۲ در مرکز تکثیر و پرورش آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت انجام شد. برای آماده سازی محلولهای فعال کننده مختلف، ترکیبات مواد شیمیایی مربوط به هر یک، بر حسب g/L بدقت توزین شد (جدول ۱)؛ سپس با ریختن مواد مربوط به هر فعال کننده در بشر جداگانه‌ای، به وسیله دستگاه همزن مغناطیسی مواد در ۱ L از آب مقطر به طور کامل حل و pH محلولها با کمک HCl، NaOH و دستگاه pH متر تنظیم شد.

به منظور اجرای عملیات تکثیر از ۸ ماهی ماده و ۱۵ ماهی نر استفاده شد. در ابتدا ماهیان ماده به وسیله ماده MS ۲۲۲ بیهوش و تخمکهای مورد نیاز برای لقاح تهیه شدند. برای

ترکیبات ۲ محلول انتخاب شده برای آزمایشها بر حسب g/L [۱۰]

PH	GLYCIN	TRIS	CaCl ₂ .2H ₂ O	NaCl	
۸/۴	۳/۵۷	۲/۴۲۲	-	۵/۵۴	
۷/۷	-	-	۰/۷۳۵	۷/۳۰۵	

کمر بند عصبی شمارش شدند. درصد لقاح مطابق رابطه ذیل محاسبه و ثبت شد [۴، ۱۳].

$100 \times (\text{تعداد کل تخمکها} / \text{تعداد تخمکهای لقاح یافته}) = \text{میزان لقاح}$

اطلاعات جمع آوری شده از بررسیها، مطالعات میدانی و آزمایشگاهی با استفاده از نرم افزار spss و به شرح زیر تجزیه و تحلیل شدند. ابتدا تأیید نرمال بودن داده‌ها به وسیله آزمون کولموگراف-اسمیرنف^۲ صورت گرفت. داده‌هایی که نرمال نبودند با روشهای معمول، نرمال شدند. برای سنجش محلولهای متفاوت فعال کننده بر میزان لقاح و مدت زمان تحرک اسپرم، از آنالیز واریانس یک طرفه و برای مقایسه میانگینها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۹۵٪ استفاده شد.

()

نتایج تجزیه واریانس یک طرفه نشان داد، بین مدت زمان تحرک در استفاده از محلولهای متفاوت فعال کننده اسپرم اختلاف معناداری وجود دارد ($f=2958/299, df=2, P \leq 0/01$). براساس نتایج به دست آمده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن، بین فعال کنندههای متفاوت اسپرم اختلاف معناداری بود ($P \leq 0/05$)؛ یعنی فعال کننده ۲ بیشترین ($91/08 \pm 2$ ثانیه) و آب کمترین ($26/01 \pm 24$) مدت زمان تحرک را باعث شد. فعال کننده ۱ ($84/42 \pm 3/88$) نیز اختلاف معناداری را با فعال کننده ۲ و آب نشان داد ($P \leq 0/05$) (نمودار ۱).

به منظور سنجش مدت زمان تحرک مخلوط اسپرمهای مولدان و سنجش تأثیر گروه شاهد بر مدت زمان تحرک اسپرم، پس از قرار گرفتن یک قطره آب روی لام در زیر میکروسکوپ، یک قطره اسپرم با آن مخلوط شد. مدت زمان تحرک اسپرم بلافاصله با استفاده از کرنومتر ثبت گردید. مدت زمان تحرک اسپرم تا زمانی که تحرک سلولها به میزان ۹۵-۹۹٪ متوقف شوند، در نظر گرفته شد [۷، ۸، ۱۲]. این آزمایش برای فعال کنندههای ۱، ۲ و گروه شاهد (آب)، حداقل ۳ بار به عنوان ۳ تکرار صورت پذیرفت.

برای انجام انکوباسیون تخمهای لقاح یافته، ۳ تراف و ۹ سینی به کار رفت و در هر تراف ۳ سینی قرار داده شد. هر سینی به وسیله نئوپلاست به ۳ قسمت مساوی تقسیم و تمام قسمتهای تقسیم بندی شده سینیها به طور تصادفی شماره گذاری شدند. تخمکهای لقاح یافته، پس از جذب آب، بدون شناسایی قبلی در سینیها قرار گرفتند. ۲ روز پس از لقاح تا بعد از مشاهده اولین تفریح، تخمها به وسیله مالاشیت گرین برای پیشگیری از قارچ زدگی ضد عفونی شدند. میزان مالاشیت گرین مورد استفاده برای هر تراف ۱g/L بود. تخمها یک روز در میان به مدت ۴۵-۶۰ دقیقه در معرض این ماده قرار گرفتند (شرایط معمول کارگاه).

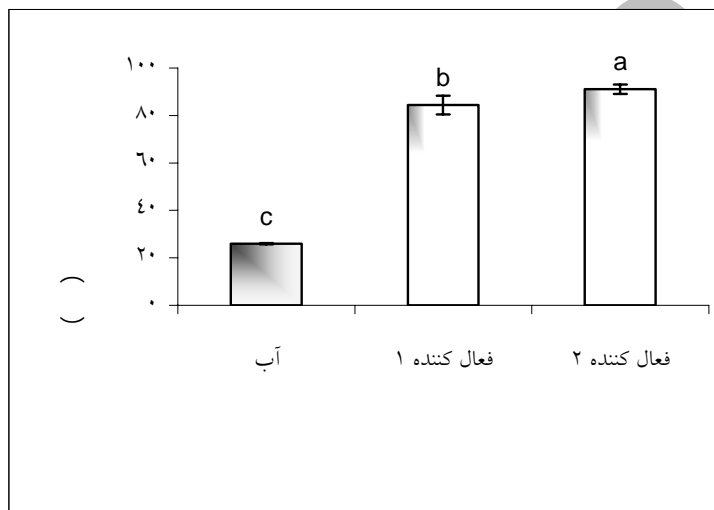
۶- ۷ روز پس از لقاح در حدود ۹۰ تخم پس از شفاف سازی به وسیله محلول شفاف کننده^۱، مشاهده شد و نمونه‌های دارای

1- Clearing solution (Stockard's solution): Formaldehyde 5%+ Acetic acid 4%

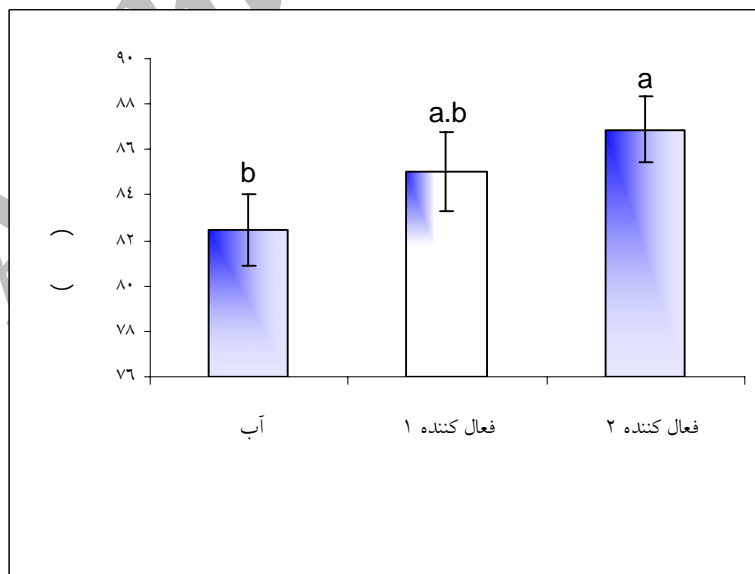
2. Kolmogorov-Smirnov

این در حالی است که فعال کننده ۱ اختلاف معناداری را با فعال کننده ۲ و آب نشان نداد ($P \geq 0.05$). میزان لقاح با استفاده از فعال کننده ۲ بیشترین میزان ($86/85 \pm 1/45$) و با استفاده از آب کمترین میزان بود ($82/45 \pm 1/58$). این میزان در فعال کننده ۱ ($85/04 \pm 1/73$) اختلاف معناداری را نسبت به دو فعال کننده دیگر نشان نداد (نمودار ۲).

()
میزان لقاح حاصل از استفاده فعال کننده های متفاوت اسپرم اختلاف معناداری را با یکدیگر نشان می دهند (نتایج آزمون دانکن نشان داد، $f=3/908$ $df=2$, $P \leq 0.05$)؛ فعال کننده ۲ با گروه شاهد اختلاف معناداری دارد ($P \leq 0.05$)؛



تأثیر فعال کننده های متفاوت بر مدت زمان تحرک اسپرم



اثر محلول های متفاوت فعال کننده بر میزان لقاح

pH فعال کننده ۲ به pH مایع منی مزیت دیگری را نیز داراست و آن وارد نشدن شوک اختلاف pH فعال کننده و مایع منی به سلولهای اسپرم است.

در نمودار ۱ دیده می‌شود که فعال سازی اسپرم به وسیله آب کمترین مدت زمان تحرک را در مقایسه با فعال کننده‌های ۱ و ۲ نشان می‌دهد. اسپرماتوزوآ بعد از قرار گرفتن در معرض آب تغییرات ساختاری سریعی در جهت نابودی نشان می‌دهد و به این دلیل عمر گامت‌ها در آب بسیار کوتاه است [۲۲]. با استفاده از فعال کننده‌ها مانند محلول نمکی در اسپرم ماهی کپور نشان داده شد که محلولهای فعال کننده نمکی باعث حفظ ساختار تاژک اسپرم می‌شوند و در نتیجه مدت زمان تحرک در مقایسه با آب بالاتر می‌رود [۹].

نتایج این تحقیق نیز تأیید کننده نتایج بیلارد^۱ در سال ۱۹۹۲ و احمدیان در سال ۱۳۸۱ است، زیرا مدت زمان تحرک اسپرم در فعال کننده‌ها در مقایسه با آب علاوه بر بیشتر بودن، تفاوت معناداری را نیز با آن نشان داد. رورانگوا^۲ و همکاران نیز در سال ۲۰۰۴ و لایلی^۳ و همکاران در سال ۲۰۰۲ دامنه مدت زمان تحرک اسپرم در ماهی قزل آلی رنگین کمان را کمتر از ۳۰ ثانیه گزارش کردند [۸، ۲۳]. نمودار ۲ نشاندهنده اختلاف معنادار فعال کننده ۲ بر میزان لقاح نسبت به گروه شاهد است؛ یعنی فعال کننده ۲ میزان بالاتر لقاح را باعث شده است.

افزایش میزان لقاح با استفاده از فعال کننده ۲ در مقایسه با گروه شاهد را می‌توان به دلایل متعددی توجیه کرد. واضح است افزایش مدت زمان تحرک اسپرم، شانس رسیدن اسپرم‌ها به میکروپیل و انجام عمل لقاح را افزایش می‌دهد؛ بنابراین نتیجه آن افزایش میزان لقاح تخمک‌هاست. از آنجا که نقطه منحصراً به فردی برای نفوذ اسپرماتوزوآ (میکروپیل) وجود دارد و طول مسیر حرکت یک اسپرماتوزوآ (۳mm) کوتاهتر از قطر تخمک (۴-۶mm) است، بنابراین یک

با مقایسه ترکیبات فعال کننده‌های ۱ و ۲ (جدول ۱) دیده می‌شود یون کلسیم که یون ضروری برای آغاز تحرک اسپرماتوزوآ در اسپرم ماهی قزل آلی رنگین کمان است [۳]، در ترکیب فعال کننده ۲ وجود دارد. یون کلسیم مهمترین عامل برای القا و تمديد مدت زمان تحرک اسپرم می‌باشد [۱۰]. از آنجا که با اضافه کردن ۱mm کلسیم به محلولهای فعال کننده اسپرم، مدت زمان تحرک اسپرم فراتر از ۳۰ ثانیه به طول می‌انجامد [۱۴] و از طرفی وجود یونهای کلسیم و سدیم نیز اثر تقویت کنندگی بر مدت زمان تحرک اسپرم دارند [۱۵]، پس عملکرد مناسبتر فعال کننده ۲ بر مدت زمان تحرک اسپرم نسبت به فعال کننده ۱ و اثر این دو فعال کننده بر افزایش مدت زمان تحرک اسپرم در مقایسه با گروه شاهد قابل توجیه است.

pH محیط لقاح تأثیر زیادی در میزان موفقیت لقاح دارد [۱۶]. شرایط قلیایی مشابه یا بالاتر از pH مایع منی یا مایع حفره شکمی باعث تحرک و لقاح بیشتر در اسپرماتوزوای آزاد ماهیان می‌شود [۱۷]. pH مایع منی نیز معمولاً بالاتر از ۷/۵ [۳] و pH مایع حفره شکمی نیز ۸/۲۵ - ۸/۶۵ است [۱۸، ۱۹]. با مقایسه pH محلولهای فعال کننده ۱ و ۲ با pH مایع منی و مایع حفره شکمی، مشاهده می‌شود که pH فعال کننده ۲ در حدود pH مایع منی و pH فعال کننده ۱ نیز برابر با pH مایع حفره شکمی است. عملکرد مناسب این دو محلول در مقایسه با گروه شاهد در تحرک اسپرم دور از انتظار نیست زیرا این دو محلول علاوه بر داشتن pH مناسب، حاوی یون کلسیم و یون سدیم‌اند. یونهای سدیم و کلسیم می‌توانند عمل جلوگیری کننده پتاسیم را در مایع منی بر تحرک اسپرم کاهش دهند [۲۰، ۲۱]. در این میان اثر پیشگفته برای یونهای دوظرفیتی مانند کلسیم شدیدتر و به دلیل وجود یون کلسیم در ترکیب فعال کننده ۲، عملکرد آن در مقایسه با فعال کننده ۱ بهتر بود. کلسیم در رفتار اسپرم بعد از آغاز تحرک، نقش تنظیمی دارد به طوری که با افزایش غلظت خارج سلولی یون کلسیم، مدت زمان تحرک اسپرم افزایش می‌یابد [۳]. نزدیک بودن

1. Billard
2. Rurangwa
3. Liley

میزان لقاح بالا هنگام آلوده شدن تخمکها به وسیله زرده حاصل از شکستن تخمکهاست، پس بالا بودن میزان لقاح در فعال کننده ۲ در مقایسه با گروه شاهد به خوبی قابل توجیه است [۲۲]. استفاده از فعال کننده‌های نمکی حتی می‌تواند به عنوان یک عامل ضد عفونی کننده در مراحل اولیه لقاح باشد و انتقال بیماری را هنگام لقاح کاهش دهد [۲۲]. براساس نتایج مشهود، فعال کننده ۲ ($82/45 \pm 1/58$) اختلاف معناداری را نشان می‌دهد و باعث افزایش حدود ۴۰٪ در میزان لقاح تخمکها در مقایسه با گروه شاهد می‌شود؛ با در نظر گرفتن کل تخمکهای قابل لقاح در مراکز تکثیر قزل آالی رنگین کمان، رقم قابل توجهی به میزان تولید لارو در کشور افزوده خواهد شد.

اسپرماتوزوآ، در نزدیکی تخمک شانس رسیدن به میکروپیل را ندارد [۲۲]. پس واضح است افزایش مدت زمان تحرک اسپرماتوزوآ شانس رسیدن آنها را به میکروپیل زیادتر می‌کند. زمانی که از آب برای فعال سازی اسپرم استفاده شود، هم اسپرماتوزوآ و هم تخمک صدمه می‌بینند. در تخمک سوراخ میکروپیل سرعت به وسیله تولیدات حاصل از واکنش لایه بیرونی که بسرعت بعد از غوطه‌وری در آب ایجاد می‌شود، بسته می‌شود. اما در استفاده از فعال کننده‌های نمکی این مشکلات وجود ندارد. احتمال ترکیدن تخمکهای مولدان ماده جوان به دلیل پوسته نازک تخمک در آنها هنگام تخم‌کشی زیاد است. با عنایت به این مطلب که هرگاه بیشتر از ۱٪ از تخمکها بترکند، لقاح دیگر میسر نیست؛ همچنین با توجه به این امر که مهمترین مزیت فعال کننده‌های نمکی، امکان کسب

- [1] Yaron Z.; «Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp»; *Aquaculture*; 1995; 129: 49-73.
- [2] Billard R., Cosson J., Perchec G., Linhart. O.; «Biology of sperm and artificial reproduction in carp»; *Aquaculture*; 1995; 124: 95-112.
- [3] Billard R., Cosson. M. P.; «Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish»; *J. of Exp. Zool.*; 1992; 261: 122-131.
- [4] Billard R., Cosson J., Crim L.W., Suquet M.; Sperm physiology and quality. In: Bromage, N. R. and Roberts, R. J. (Eds), Brood stock Management and Egg and Larval Quality. Blackwell, Oxford; 1995; 25-52.
- [5] علوی س. م. ه. «بررسی مقایسه‌ای تحرک اسپرم تاس ماهی ایرانی و قابلیت لقاحی آن در آب شیرین و محلولهای نمکی»؛ پایان نامه کارشناسی ارشد؛ دانشگاه تهران؛ دانشکده منابع طبیعی کرج؛ ۱۳۸۱؛ ص. ۱۰۵.
- [6] Hoysak D. J., Liley N. R.; «Fertilization dynamics in sockeye salmon and a comparison of sperm from alternative male phenotypes»; *J. Fish Biol.*; 2001; 58:1286-1300.
- [7] Billard R.; «Effects of coelomic and seminal fluids and various saline diluents on the rainbow trout, *Salmo gairdneri*»; *J. Reprod. Fertil.*; 1983; 68: 77-84.
- [8] 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.
- [۹] احمدیان ن.، مجازی امیری ب.، ابطحی ب.، نظری ر. م.؛ «استفاده از تقویت کننده‌های اسپرم در لقاح تخمک تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)»؛ دومین همایش ملی منطقه‌ای ماهیان خاویاربی؛ رشت؛ ۴-۶ آبان؛ ۱۳۸۱؛ صص. ۱۱۱-۱۱۵.
- [۱۰] لریستانی ر.؛ «اثر محلولهای متفاوت تقویت کننده اسپرم و میزان اسپرماتوکریت بر روند تکثیر ماهی قزل آالی رنگین کمان»؛ سمینار کارشناسی ارشد؛ دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور؛ دانشگاه تربیت مدرس؛ ۱۳۸۳؛ ص. ۴۲.

- [11] Moccia R.D., Munkittrick K.R.; «Relationship between the fertilization of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) eggs and the motility of spermatozoa»; *Theriogenology*; 1982; 27 (4): 679-688.
- [12] Aas G. H., Refstie T., Gjerde B.; «Evaluation of milt quality of Atlantic salmon»; *Aquaculture*; 1991; 95: 125-132.
- [13] Bromage N. R., Cumaranataunga P. C. R.; «Egg production in the rainbow trout»; In Recent advances in Aquaculture; Muir, J.F, R.J., Roberts, R.J. and Muir, J.F. (Eds); 1988; 39: 63-139.
- [14] Billard R., Cosson M.P.; «Measurement of sperm motility in trout and carp. Aquaculture, a biotechnology in progress. N. Depaun, E. Jaspers, Ackefors H. and Wilkins, N. (Eds)»; European Aquaculture Society, Bredene, Belgium; 1989; 499-503.
- [15] یگانه س.؛ «اثر تقویت کننده‌ها بر مدت تحرک اسپرم و توان لقاح در کفال خاکستری *Mugil cephalus*»؛ پایان نامه کارشناسی ارشد؛ دانشگاه تهران؛ دانشکده منابع طبیعی کرج؛ ۱۳۸۱؛ ص. ۱۱۲.
- [16] Billard R., Petit J., Jalabert B., Szollosi D.; Artificial insemination in trout using a sperm diluents. Pages 715-723 in J. H. S. Blaxter, editor. Early life history of fish. Springer-Verlag, Berlin; 1974.
- [17] Cosson J., Billard R., Cibert C., Dreanno C., Suquet M.; Tonic factors regulating the motility of fish sperm. In the male gamete. From basic Science to clinical application, C. Gagnon, (Ed). Cache River Press; 1999; 161-186.
- [18] Nomura M.; «Studies on reproduction of rainbow trout *Salmo gairdnerii* with special reference to egg taking- VI. The activities of spermatozoa in different diluents and preservation of semen»; *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*; 1964; 30: 723-733.
- [19] Baynes S. W., Scott A.P., Dawson A. P.; «Rainbow trout, *Salmo gairdnerii* Richardson, Spermatozoa: Effect of cation and pH on motility»; *J. Fish Biol.*; 1981; 19: 259-267.
- [20] Linhart O., Slechta V., Slavik T.; «Fish sperm composition and biochemistry»; *Bull. Inst. Zool. Acad. Sinica. Monograph*; 1991; 16: 285-311.
- [21] Stoss J.; Fish gamete preservation and spermatozoa physiology. In: W.S. Hoar, D.J. Randall and E.M. Donaldson (Eds), Fish Physiology, Vol. IXB., Academic press, London; 1983; 305-350.
- [22] Billard R.; «Reproduction in rainbow trout: Sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes»; *Aquaculture*; 1992; 100: 263-298.
- [23] Rurangwa E., Kime D. E., Ollevier F., Nash J. P.; «The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish»; *Aquaculture*; 2004; 234:1-28.