کشت اولیه سلول های فولیکولی و تخمک، راهکاری جهت ارتقای کیفی تکثیرمصنوعی تاسماهی استرلیاد *Acipenser ruthenus* و سایر ماهیان در آینده

محمدرضا نوروزفشخامی[۱*]، محمد سوداگر[۲]، محمود بهمنی[۱]، نگین سلامات[۳]، محمد مازندرانی[۲]، محمدعلی یزدانی ساداتی[۱]

۱- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، رشت، ایران، کدپستی ٤٣٣٨١٣٣٩٨٦٣

۲- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده شیلات و محیط زیست، گروه تکثیر و پرورش، گرگان، ایران

۳- دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، گروه بیولوژی دریا، خرمشهر، ایران، کدپستی ٤٣١٧٥-٦٤١٩٩

*Nowruzfashkhami@yahoo.com

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹٤ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹٤

چکیده

کشت بافت،کاربردهای آن و استفاده از این روش برای تکثیر سلول‌های فولیکولی تخمک توضیح داده شد. مواد و روش کار مورد نیاز برای جداسازی و کشت سلول‌های فولیکولی تاسماهی استرلیاد در محیط کشت L-15 حاوی سرم گوساله جنینی (FBS) و آنتی‌بیوتیک‌ها، بررسی تکثیر آن‌ها و ترشح هورمون‌های استروییدی بیان گردید. طبق نتایج کسب شده سلول‌های فولیکولی کشت داده شده، تکثیر شدند و هورمون‌های تستوسترون (T)، ۱۷- بتا استرادیول (E_2) و پروژسترون (P_4) در محیط کشت ترشح نمودند. با توجه به نتایج کسب شده در مورد کشت سلول‌های فولیکولی تاسماهی استرلیاد،کپورمعمولی *Cyprinus carpio*، **باس دریایی اروپایی** *Dicentrarchus labra* و کشت اولیه تخمک‌های تعدادی از ماهیان نظیر ماهی قرمز *Carassius auratus*، مداکا *Oryzias latipes*، ماهی گوپی *Poecilia reticulate*، کپور قنات *Pimephales promelas*، تاسماهی استرلیاد، تاسماهی **ایرانی** *Acipenser persicus* و ماهی دو رگه بستر (Bester)، توسعه این چنین سیستم‌های آزمایشگاهی برای سلول‌های فولیکولی و تخمک سایر ماهیان برای انجام مطالعات کاربردی مفید خواهد بود و ابزار خوبی را برای مطالعه تخمک‌ها و سلول‌های فولیکولی فراهم می‌نماید.

کلمات کلیدی: کشت اولیه، سلول‌های فولیکولی، تخمک، تاسماهی استرلیاد.

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1394.2.3.1.7]

مقدمه

جدا نمودن بافت از بدن یک جانور یا گیاه، رشد دادن و تکثیر نمودن آن در خارج از بدن (*In Vitro*)، کشت اولیه[1] نامیده می‌شود (فرشنی[2]، ۲۰۰۵). روکس[3] (۱۸۸۳) برای اولین بار موفق شد سلول‌های جنین جوجه را به مدت چند روز در یک محلول نمکی به صورت زنده نگهداری نماید، لذا اغلب متخصصین کشت سلول وی را به عنوان بنیان‌گذار تکنیک کشت سلول می‌شناسند. بعدها محققین متوجه شدند چنانچه قسمتی از بافت، پس از خارج نمودن از بدن در محیط غنی از عناصر و مواد غذایی مورد نیاز و فاکتورهای رشد قرار گیرد و شرایط مساعد مشابه شرایط طبیعی بدن برای آن‌ها مهیا شود به رشد و تکثیر خود ادامه خواهد داد، بدین‌ترتیب تکنیک کشت بافت در سال‌های ابتدایی قرن بیستم به جهان معرفی شد. از کشت سلول‌های جانوری و رده‌های سلولی[4] می‌توان در زمینه‌های فیزیولوژی، مهندسی ژنتیک، ژنتیک مولکولی، سیتوژنتیک، ایمنولوژی، فارماکولوژی، بهداشت و بیماری‌ها از جمله ویروس‌شناسی، تولید فرآورده‌های بیولوژیک، واکسن‌ها و غیره استفاده نمود. سلول‌های ماهی نیز مانند سلول‌های سایر مهره‌داران در خارج از بدن قابل کشت هستند و روش کار بسیار شبیه روش کار مورد استفاده برای کشت سلول‌های پستانداران و دوزیستان است (ولف و آهنه[5]، ۱۹۸۲). تحقیقات انجام شده در مورد سلول‌های فولیکولی تخمک ماهیان (استوکلوسووا و اپلر[6]، ۱۹۸۵؛ پترینو و همکاران[7]، a۱۹۸۹؛ سلامات[8] و همکاران، ۲۰۱۰) نشان داد این سلول‌ها نیز در محیط کشت تکثیر یافته و به ترشح هورمون‌های استروئیدی ادامه می‌دهند. با کشت سلول‌های فولیکولی حتی می‌توان تغییرات فصلی مقدار هورمون‌های استروئیدی تولید شده توسط این سلول‌ها را بررسی نمود (گالاس[9] و همکاران، ۱۹۹۹).

با توجه به کاهش شدید ذخایر طبیعی تاسماهیان طی سال‌های اخیر، تکثیر مصنوعی و پرورش این ماهیان راه‌کار مناسبی برای حفاظت و بهره‌برداری پایدار از ذخایر ماهیان مذکور می‌باشد. تکثیر مصنوعی تاسماهیان اولین بار در مورد تاسماهی استرلیاد *Acipenser ruthenus* انجام شد (وب و دوروشوو[10]، ۲۰۱۱). این گونه کوچک‌ترین ماهی خانواده آسیپنسریده[11] و دارای بدنی کشیده است (شکل ۱). ماهی استرلیاد ماده در اکوسیستم‌های طبیعی در ۳ تا ۸ سالگی و نرها ۱ تا ۲ سال زودتر از ماده‌ها به سن بلوغ می‌رسند (هولچیک[12]، ۱۹۸۹) و این زمان در محیط پرورشی با فراهم شدن شرایط مساعد می‌تواند کاهش یابد. دمای مناسب برای تخم‌ریزی آن ۱۲ تا ۱۷ درجه سانتی‌گراد است و زمانی که دمای آب به ۲۰ تا ۲۱ درجه سانتی‌گراد برسد، تخم‌ریزی آن متوقف می‌شود. این ماهی احتیاج به مراقبت کمی دارد و تنوع غذایی آن زیاد است (هولچیک، ۱۹۸۹)؛ امروزه از ماهیان استرلیاد بالغ برای آبزی‌پروری و از ماهیان غیربالغ (کوچک، جوان) به عنوان ماهیان زینتی و نگهداری در آکواریوم و تجارت صنعت آبزیان زینتی در جهان استفاده می‌شود. اغلب توصیه می‌شود این ماهی در آکواریوم‌های بزرگ و غیرخانگی و با توجه به این که زیستگاه طبیعی آن مناطق معتدل می‌باشد، لذا در آب خنک و ترجیحاً آب لب شور نگهداری شوند. تخمک این ماهی کمی بیضوی، خاکستری متمایل به سیاه و قطر آن در ماهیان پرورشی ۱/۹۱ تا ۲ میلی‌متر است (چبانوو[13] و گالیچ، ۲۰۱۳) و مانند تخمک سایر ماهیان (اونال[14] و همکاران، ۲۰۰۵) توسط سلول‌های فولیکولی احاطه شده است. با توجه به این که سلول‌های فولیکولی تخمک نقش بسیار مهمی را در ارتباط با تولید استروئیدهای جنسی و رسیدگی نهایی تخمک ایفا می‌نمایند و از طرفی انجام موفقیت‌آمیز تکثیر مصنوعی ماهیان مستلزم انتخاب مولدین ماده‌ای است که پس از تزریق هورمون‌های محرک قادر به تولید گامت‌های رسیده و با کیفیت باشند؛ لذا انجام مطالعات مختلف در مورد تخمک ماهیان از جمله سلول‌های فولیکولی و بررسی عملکرد این سلول‌ها در ارتباط با تولید هورمون‌های استرویید و رسیدگی نهایی تخمک در شرایط آزمایشگاهی (*In Vitro*) می‌تواند انجام بهینه تکثیر مصنوعی ماهیان را به دنبال داشته باشد (گون چاروو[15]، ۲۰۰۲).

[1] Primary culture
[2] Freshney
[3] Roux
[4] Cell line
[5] Wolf and Ahne
[6] Stoklosowa and Epler
[7] Petrino
[8] Salamat
[9] Galas
[10] Webb and Doroshove

[11] Acipenseridae
[12] Holcik
[13] Chebanov and Galich
[14] Unal
[15] Goncharov

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1394.2.3.1.7]

شکل ۱: تاسماهی استرلیاد

مواد و روش کار

برای جداسازی و کشت سلول‌های فولیکولی ماهیان مختلف از جمله تاسماهی استرلیاد می‌توان از روش‌های استفاده شده برای سایر ماهیان از جمله ماهی کپورمعمولی (استوکلوسووا و اپلر، ۱۹۸۵)، البته با کمی تغییرات استفاده نمود. ابتدا لازم است ماهی مورد آزمایش را با استفاده از یک ماده بی‌هوش کننده به عنوان مثال پودر برچه گل میخک (۲۰۰ ppm) بی‌هوش نمود. سپس قسمت شکمی ماهی با اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی گردد و پس از ایجاد برش در بخش شکمی (شکل ۲)، قسمتی از تخمدان حاوی تعدادی تخمک را از بدن خارج نمود. برای جلوگیری از آلودگی باکتریایی و قارچی بهتر است ابتدا تخمک‌های خارج شده از بدن را یک بار با محلول PBS حاوی آنتی‌بیوتیک‌ها و ضدقارچ (شکل ۳) و سه بار با محیط کشت L-15 حاوی آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر استرپتومایسین و پنی‌سیلین پتاسیم G و یک قارچ کش نظیر آمفوتریسین B شستشو داد، سپس تخمک‌ها را از بافت پیوندی در برگیرنده آن‌ها جدا نمود. برای این کار با توجه به قطر تخمک‌ها می‌توان از سرنگ‌هایی با حجم‌های مختلف استفاده نمود و در صورت درشت بودن تخمک بهتر است از دو عدد سوزن ظریف استفاده شود. برای زنده نگهداشتن تخمک‌ها، بهتر است تخمک‌ها در یک ظرف پتری حاوی محیط کشت L-15 ، سرم گوساله جنینی (FBS[1])، آنتی‌بیوتیک‌ها و قارچ‌کش قرار داده شوند. تخمک‌های جدا شده از بافت پیوندی را پس از شستشو با محلول PBS حاوی آنتی‌بیوتیک‌ها، به یک ظرف پتری حاوی تریپسین ۰.۲۵٪ منتقل نموده، پس از گذشت مدت زمان لازم برای جدا شدن سلول‌های فولیکولی از تخمک، محلول تریپسین را خارج نموده و به منظور خنثی نمودن اثر تریپسین و جلوگیری از تخریب تخمک به ظرف حاوی تخمک‌ها سرم گوساله جنینی اضافه شود. پس از شمارش تعداد سلول‌ها با استفاده از لام هماسیتومتر[2] و تعیین درصد تعداد سلول‌های زنده از طریق رنگ‌آمیزی با رنگ تریپان بلو (دویل و گریفیتز[3]، ۱۹۹۸) و لام هماسیتومتر، سلول‌های فولیکولی را با تراکم موردنظر در محیط کشت حاوی سرم گوساله جنینی و آنتی‌بیوتیک‌ها کشت داده و به انکوباتور تنظیم شده در دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد منتقل می‌گردد. پس از کشت سلول‌های فولیکولی، با توجه به این که معمولاً بیست و چهار ساعت پس از کشت، سلول‌های مذکور شروع به تکثیر می‌نمایند، لذا پس از گذشت چهل و هشت ساعت به منظور بررسی عملکرد سلول‌های فولیکولی در ارتباط با ترشح هورمون‌های استرواییدی می‌توان طی چند روز و به فواصل زمانی موردنظر، مقداری از محیط کشت را از ظرف کشت خارج و تا زمان اندازه‌گیری هورمون‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری نمود.

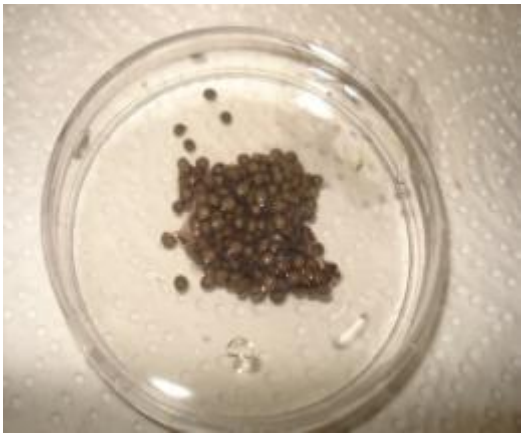
شکل ۲: ایجاد برش در بخش شکمی ماهی مورد آزمایش

[1] Fetal Bovine Serum

[2] Hemocytometer
[3] Doyle & Griffits

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1394.2.3.1.7]

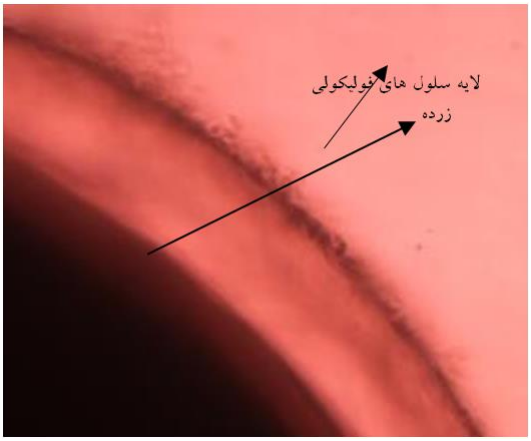


شکل ۳: شستشوی تخمک‌ها با محلول PBS

نتایج و بحث

پس از جدا کردن تخمک‌ها از بافت پیوندی؛ تخمک‌ها به صورت انفرادی (شکل ۴) و سلول‌های فولیکولی در زیر میکروسکوپ اینورت به صورت یک لایه سلولی در اطرف تخمک دیده می‌شوند (شکل ۵).

شکل ۴: تخمک های جدا شده از بافت پیوندی در محلول PBS



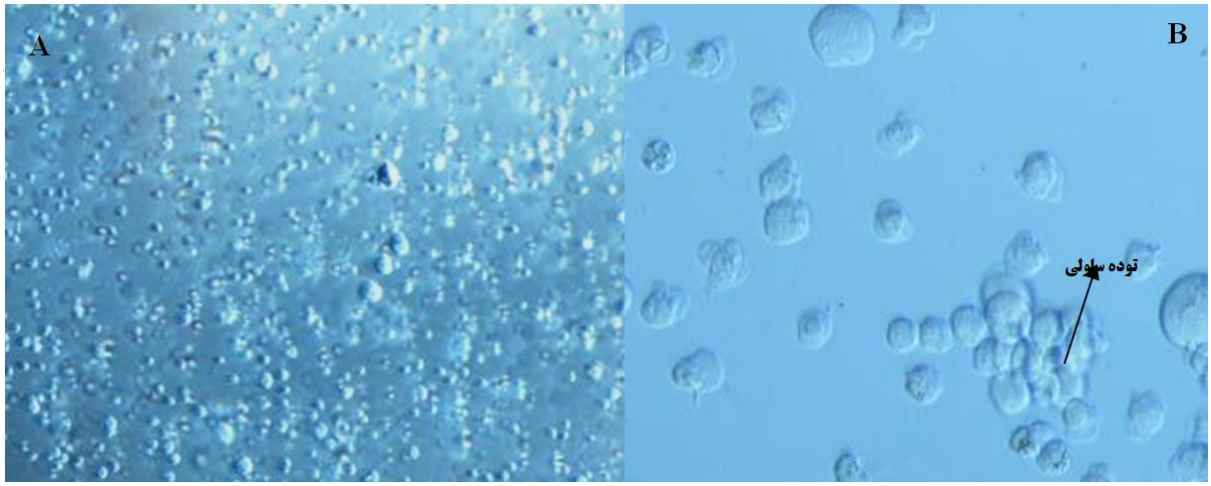
شکل ۵: تخمک ماهی استرلیاد (۶۰۰ ×)

سلول‌های فولیکولی تحت‌تاثیر محلول تریپسین از تخمک جدا می‌شوند و با استفاده از میکروسکوپ اینورت به صورت سلول‌های مجزا دیده می‌شوند (شکل ۶A). البته گاهی چند سلول فولیکولی به صورت چسبیده به هم و به شکل توده سلولی مشاهده می‌گردند (شکل۶B). تعداد سلول‌های فولیکولی جدا شده از تخمک‌ها و درصد سلول‌های فولیکولی زنده می‌تواند متغییر باشد. در مورد تاسماهی استرلیاد تعداد سلول‌های فولیکولی جدا شده $۱/۲۵\times۱۰^{۶}$ تعیین شد که ۹۲ درصد سلول‌ها زنده بودند. معولاً پس از گذشت بیست و چهار ساعت از کشت سلول‌های فولیکولی، این سلول‌ها به کف ظرف کشت می‌چسبند و تقسیم سلولی در آن‌ها آغاز می‌شود و در صورت مساعد بودن شرایط کشت و عدم وجود آلودگی میکروبی و قارچی، پس از گذشت دو هفته سلول‌های فولیکولی تکثیر شده قسمت اعظم کف ظرف کشت را می‌پوشانند و سلول‌های تکثیریافته به صورت سلول‌های شبه فیبروبلاست مشاهده می‌شوند (شکل ۷). در صورت ادامه یافتن شرایط مساعد؛ این سلول‌ها به اعمال طبیعی خود از جمله ترشح هورمون‌های استروئیدی نظیر تستوسترون[۱] (T)، ۱۷- بتا استرادیول[۲] (E_2) و پروژسترون[۳] (P_4) ادامه خواهند داد. با اندازه‌گیری هورمون‌های موجود در محیط کشت که به فواصل زمانی مشخصی نمونه‌برداری شده است می‌توان به کمیت و کیفیت ترشح هورمون‌های مذکور توسط سلول‌های فولیکولی کشت داده شده پی‌برد. مطالعات انجام شده نشان داد سلول‌های فولیکولی تخمک ماهیان تحت‌تاثیر هورمون‌های گنادوتروپین[۴] I و گنادوتروپین II که از غده هیپوفیز ترشح می‌شوند (کوی رات[۵] و همکاران، ۲۰۰۰) اقدام به تولید و ترشح هورموهای استروئیدی می‌نمایند (تایلر[۶] و همکاران، ۱۹۹۱)؛ این هورمون‌ها به نوبه خود باعث زرده‌سازی، رشد و بلوغ نهایی تخمک‌ها می‌گردند (موبرگ[۷] و همکاران، ۱۹۹۵). مقدار هورمون‌ها ترشح شده بستگی دارد به این که تخمک‌های نمونه‌برداری شده متعلق به کدام مرحله از رشد و رسیدگی (پیش و یا پس از مرحله ویتلوژنز[۸]) باشند. چنانچه تخمک‌های نمونه‌برداری شده متعلق به مرحله زرده‌سازی باشد؛ میزان هورمون E_2 بیش از سایر هورمون‌ها خواهد بود (سلامات و همکاران ، ۲۰۱۰) و چنانچه متعلق به مرحله پس از زرده‌سازی و قبل از شروع رسیدگی تخمک باشد مقدار هورمون T بیش از سایر هورمون‌ها خواهد بود.

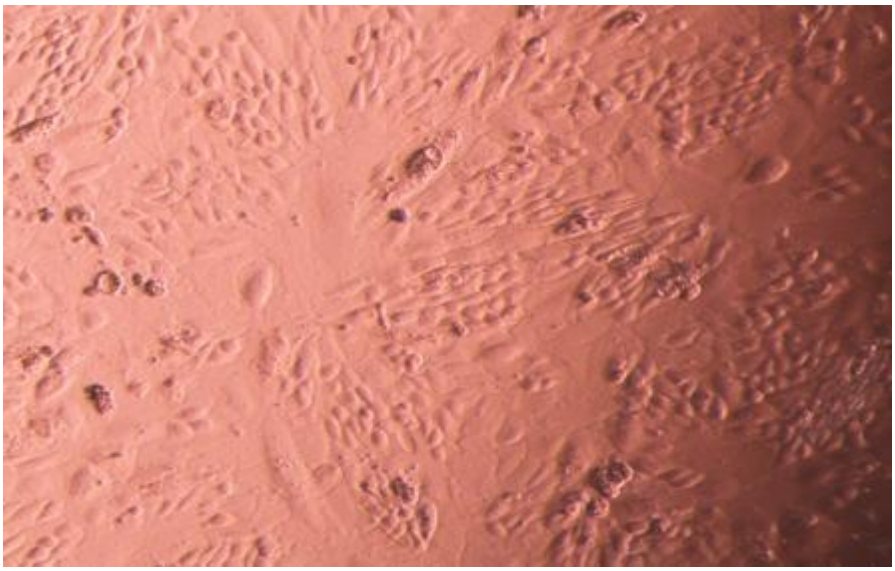
[1] Testosterone
[2] Estradiol
[3] progesterone
[4] GTH I
[5] Quérat
[6] Tyler
[7] Moberg
[8] vitellogenesis

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1394.2.3.1.7]



شکل ۶: سلول های فولیکولی تخمک تاسماهی استرلیاد (B: ×۳۰۰ ; A: ×۱۲۰)



شکل ۷: سلول های شبه فیبروبلاست حاصل از تکثیر سلول‌های فولیکولی تخمک تاسماهی استرلیاد (×۱۲۰)

مطالعات مختلفی توسط محققین در ارتباط با کشت سلول‌های فولیکولی و بررسی تاثیر عوامل مختلف بر تخمک در شرایط in vitro در مورد تعدادی از ماهیان از جمله ماهی قرمز *Carassius auratus* و ماهی کپور قنات *Pimephales promelas* (شکل‌های ۸ و ۹؛ مک ماستر[1] و همکاران، ۱۹۹۵)، مداکا *Oryzias latipes* (شکل ۱۰؛ اگیوارا[2] و همکاران، ۲۰۰۵ و ۲۰۱۰)، ماهی گوپی *Poecilia reticulate* (شکل ۱۱؛ مارتین[3] و همکاران، ۲۰۰۶)؛ کپور معمولی (شکل ۱۲؛ گالاس و همکاران، ۱۹۹۹; سلامات و همکاران، ۲۰۱۰)، ماهی باس دریایی اروپایی *Dicentrarchus labrax* (شکل ۱۳؛ کرسپو[4] و همکاران، ۲۰۱۲)، تیلاپیای نیل *Oreochromis niloticus* (شکل۱۴؛ خمیس[5] و هاشم، ۲۰۱۲)، تاسماهی استرلیاد (سمنکووا[6] و همکاران، ۲۰۰۸; گونچاروو و همکاران، ۲۰۰۹)، ماهی دو ر گه بستر[7] (مجازی امیری[8] و همکاران، ۲۰۰۱; گونچارو و همکاران، ۲۰۰۹; ایشی هارا[9] و همکاران، ۲۰۱۱; آذرین[10] و همکاران، ۲۰۱۳)، تاسماهی سفید *Acipenser transmontanus* (شکل۱۵؛

[1] McMaster
[2] Ogiwara
[3] Martyn

[4] Crespo
[5] Khamis and Hashem
[6] Semenkova
[7] Bester
[8] Mojazi Amiri
[9] Ishihara
[10] Azarin

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1394.2.3.1.7]

وب[1] و همکـاران، ۲۰۰۰)، تاسـماهی سـیبری *Acipenser baerii* (شـکل۱۶؛ گونچـارو و همکـاران، ۱۹۹۹) و تاسـماهی ایرانـی *Acipenser persicus* (شـکل ۱۷؛ تانـه[2] و همکـاران، ۲۰۱۲؛ آذرین و همکاران، ۲۰۱۳) انجام شده است.

شکل ۸: ماهی قرمز

شکل ۹: ماهی کپور قنات

شکل ۱۰: ماهی مداکا

شکل ۱۱: ماهی گوپی

شکل ۱۲: کپور معمولی

شکل ۱۳: ماهی باس دریایی اروپایی

شکل ۱۴: تیلاپیای نیل معمولی

شکل ۱۵: تاسماهی سفید

شکل ۱۶: تاسماهی سیبری

شکل ۱۷: تاسماهی ا یرانی

[1] Webb
[2] Taneh

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1394.2.3.1.7]

نتـایج بـه دسـت آمـده از مطالعـات انجـام شـده حـاکی از موفقیت‌آمیز بودن کشت سلول‌های فولیکولی در محیط کشت، زنده ماندن تخمک و سلول‌های فولیکولی و ادامه ترشح هورمون‌های موثر در رشد و رسیدگی تخمک (P_4 ،E_2 ،T) توسط سلول‌های فولیکولی تخمک در محیط کشت بود. همچنین عملکرد سلول‌های فولیکـولی تخمک در محیط کشت مشـابه عملکـرد ایـن سـلول‌هـا در محـیط طبیعی بدن (*In Vivo*) بود.

با دست‌یابی به روش کار مربوط به کشت سلول‌های فولیکولی ماهی سفید و ماهی قرمـز (نوروزفشـخامی، ۱۳۹۴؛ منتشـر نشـده)، ماهی کپور معمولی و تاسـماهی اسـترلیاد (تحقیـق حاضـر) توسـط محققین کشورمان، همچنین کشت موفقیـت‌آمیـز تخمـک ماهیـان مختلف از جمله تعدادی از ماهیان زینتی که در بالا به آن‌هـا اشـاره شد، لازم است کشت تخمک و سلول‌های فولیکولی تخمک ماهیـان مختلـف از جملـه ماهیـان زینتـی در کشـورمان بـیش از بـیش توسـعه یابـد، زیـرا بـا ایـن کـار انجـام مطالعـات مختلـف از جملـه فیزیولوژی (اندوکرینولوژی[1]) و ژنتیک نظیر بررسـی نقـش ژن‌هـای مختلف بر ترشح هورمون‌های موثر در رشد و رسـیدگی تخمـک در شرایط آزمایشگاهی، در تمام طول سال حتی خارج از فصـل تکثیـر امکان‌پذیر می‌باشد که این موضوع ضرورت محدود شـدن اینچنـین مطالعاتی به مقطع خاصی از سال را منتفی می‌سازد. با کشـت دادن سـلول‌هـای فولیکـولی و تخمـک، از کشـته شـدن تعـداد زیادی ماهی مولد برای انجام مطالعات تحقیقاتی جلـوگیری خواهـد شد و بررسی اثر مستقیم مواد و عوامل مختلف از جمله هورمـون‌هـا بر سلول‌های فولیکولی و تخمک میسر خواهد شد. با توجه بـه ایـن کـه انجـام مطالعـات مختلـف در ارتبـاط بـا تخمـک و سـلول‌هـای فولیکولی تخمک در رفع مشکلات علمی و عملی و همچنین یـافتن پاسخ برخی ابهامات موجود در ارتباط با تکثیر مصـنوعی ماهیـان و انجام بهینه آن در آینده بسیار مفید خواهـد بـود، لـذا روش کشـت سلول‌های فولیکولی تخمک و تخمک کامل ماهیان مختلف می‌تواند یکی از راه‌کارهای ارتقای کیفـی و کمـی تکثیـر مصـنوعی ماهیـان مختلف در آینده باشد. علاوه بر آن، با دست‌یابی به شرایط مطلـوب کشت تخمک ماهیان مختلف از جمله ماهیان زینتی، بستر مناسـبی برای انتقال ژن‌های مختلف به منظور دست‌یابی به صفات مورد نظر فراهم خواهد شد که این موضوع در مورد ماهیان زینتـی مـی‌توانـد درآمد اقتصادی زیادی را برای پرورش‌دهندگان ماهیان مذکور بـه دنبال داشته باشد.

[1] Endocrinology

منابع

Azarin, H., Imanpoor, M.R. and Pourdehghani, M., 2013. Effect of 17α, 20β -Dihydroxy progesterone on *In vitro* oocyte maturation in Persian Sturgeon *Acipenser persicus* and Sterlet *Acipenser ruthenus*. Journal of Aquaculture Research and Development, 4: 1- 4.

Chebanov, M.S. and Galich, E.V., 2013. Sturgeon Hatchery Manual (FAO Fisheries and aquaculture technical paper). 338 pp.

Crespo, B., Zanuy, S. and Go´mez, A., 2012. Development of an *in vitro* System for Functional Studies of Ovarian Follicular Cells in European Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Cytotechnology, 65 (2): 273-286.

Doyle, A. and Griffiths, J. B., 1998. Cell and Tissue culture: Laboratory Procedures in Biotechnology. John Wiley & Sons, Ltd, New York.

Freshney, R. I., 2005. Culture of Animal Cells: A Manual of BasicTechnique. 5th Edition. New York: Wiley- Blackwell.

Galas, J., Epler, P. and Stoklosowa, S., 1999. Seasonal Response of Carp (*Cyprinus carpio*) Ovarian cells to Stimulation by Various Hormones as Measured by Steroid Secretion. Tissue Culture Approach and Endocrine Regulation, 33: 125-132.

Goncharov, B. F., Skoblina, M. N., Trubnikova, O. B. and Chebanov, M. S., 2009. Influence of Temperature on the Sterlet (*Acipenser ruthenus L.*) Ovarian Follicles State. Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons. Fish and Fisheries Series, 29: 205-214.

Goncharov, B. F., Williot, P. and Le Menn, F., 1999. Morphological and physiological characteristics of the ovarian follicles of farmed Siberian sturgeon and their importance for predicting artificial reproduction success. Russian Journal of Developmental Biology, 30: 46–54.

Goncharov, B., 2002. In vitro approach to studying the mechanisms of oocyte maturation in sturgeons: a review of fundamental and applied aspects. Journal of Applied Ichthyology, 18: 368-374.

Holcik, J., 1989. The freshwater fishes of Europe, Vol I/II. General Introduction to fishes Acipenseriformes. Aula-Verlag, Wiesbaden.

Ishihara, M., Abe, T., Kazeto, Y., Ijiri, S. and Adachi, S., 2011. Effects of gonadotropic hormone on the acquisition of ovulatory competence in Japanese eeL *Anguila japonica* and Bester sturgeon (*Huso huso* × *Acipenser ruthenus* Indian Journal of Science and Technology, 4(S 8): 223.

Khamiss, O. and Hashem, M.H., 2012. Developing a cell culture system from Nile Tilapia

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.24234575.1394.2.3.1.7]

Salamat, N., Erfani Majd, N., Hashemitabar, M., Mesbah, M. and Ahangarpoor, A., 2010. Isolation of common carp ovarian follicular cells and evaluation of their endocrine activity in primary cell culture. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 9 (2): 305-314.

Semenkova, T., Bayunova, L., Wuertz, S., Kirschbaum, F. and Barannikova, T., 2008. Effect of C_{21} steroids on germinal vesicle break down (GVBD) in sturgeon follicles in vitro. Cybium, 32 (2): 268-269.

Stoklosowa, S. and Epler, P., 1985. The endocrine activity of isolated follicular cells of the carp ovary in prime culture. General and Comparative Endocrinology, 58: 386-393.

Taneh, B., Abtahi, B. and Nazari, R. M., 2012. *In vitro* assessment of final oocyte maturation index (GVBD) in Persian Sturgeon and broodstock selection. Experimental Animal Biology, 1 (1): 35-46 (in persian).

Tyler, C.R., Sumpter, J.P., Kawauchi, H. and Swanson, P., 1991. Involvement of gonadotropin in the uptake of vitellogenin into vitellogenic oocytes of the Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. General and Comparative Endocrinology, 84: 291-299.

Unal, G., Karak, H. and Elp, H., 2005. Ovarian follicle ultrastructure and changes in levels of ovarian steroids during oogenesis in *Chalcalburnus tarichi*. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 29: 645-653.

Webb, M. A. H. and Doroshov, S. I., 2011. Importance of environmental endocrinology in fisheries management and aquaculture of sturgeons. General and Comparative Endocrinology, 170: 313-321.

Webb, M. A. H., Van Eenennaam, J. P. and Doroshov, S. I., 2000. Effects of steroid hormones on *in vitro* oocyte maturation in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). Fish Physiology and Biochemistry, 23: 317–325.

Wolf, K. and Ahne, W., 1982. Fish Cell culture. In Advances in cell culture Vol. 2 (Ed. Maramorosch K), pp 305-328, New York Academic Press.

(*Oreochromis niliticus*, L.) ovarian tissue in Egypt. IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science, Volume 1(2): 8-12.

Martyn, U., Weigel, D and Dreyer, C., 2006. In Vitro Culture of Embryos of the Guppy, *Poecilia reticulate* Developmental Dynamics, 235:617–622.

McMaster, M.E., Munkittrick, K.R., Jardine, J.J., Robinson, R.D. and Van Der Kraak, G.J., 1995. Protocol for measuring in vitro steroid production by fish gonadal tissue. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences 1961,78p.

Mojazi Amiri, B., Maebayashi, M., Omoto, N., Adachi, S. and Yamauchi, K., 2001. *In Vitro* Oocyte Maturation in a Hybrid Sturgeon, Bester: Changes in the Germinal Vesicle Breakdown and 17, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one Production. Journal of Agricultural Science Technology, 3:199-207.

Ogiwara, K., Ikeda, T. and Takahashi, T., 2010. A New In Vitro Ovulation Model for Medaka Based on Whole Ovary Culture. Zoological Science, 27(9): 762-767.

Ogiwara, K., Takano, N., Shinohara, M., Murakami, M. and Takahashi, T., 2005. Gelatinase A and membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 are responsible for follicle rupture during ovulation in the medaka. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102: 8442–8447.

Petrino, T.R., Lin, Y-W. P., Wallace, R. A., 1989a. Steroidogenesis in *Fundulus heteroclitus*. I. Production of 17α-hydroxy, 20β-dihydroprogesterone, testosterone and 17β-estradiol by prematurational follicles *in vitro*. General and Comparative Endocrinology, 73: 147-156.

Quérat, B., Sellouk, A. and Salmon, C., 2000. Phylogenetic analysis of the vertebrate glycoprotein hormone family including new sequences of sturgeon (*Acipenser baeri*) β subunits of the two gonadotropins and the thyroid-stimulating hormone. Journal of Biology of Reproduction 63: 222-228.

Roux, W., 1883. Beitrage zur Entwicklungsmechaink des Embryo. Zoological BioIogy, 21: 411.

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1394.2.3.1.7]