کشت بافت تخمدان ماهی طلایی (*Carassius auratus*)

محمدرضا نوروزفشخامی[1*]، محمود بهمنی[1]

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

* Nowruzfashkhami@yahoo.com

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۶

چکیده

در این تحقیق کشت اولیه وکشت های مجدد اول و دوم (ساب کالچر اول و ساب کالچر دوم) بافت تخمدان ماهی طلایی *Carassius auratus* به منظور ایجاد یک مدل آزمایشگاهی از سلول های تخمدان این گونه انجام شد. یک عدد ماهی قرمز به وزن ۴۲ گرم و طول ۷ سانتیمتر با پودر گل میخک (۰/۲ g/lit) بی هوش شد و تخمدان آن از بدن خارج و در یک ظرف پتری حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت L-15، استرپتومایسین سولفات (۲۰۰ µg/ml)، پنی سیلین پتاسیم جی (۲۰۰ µg/ml) و آمفوتریسین B (۵ µg/ml) منتقل شد. تخمک ها که در مرحله پیشرفته رسیدگی (مرحله IV) بودند از تخمدان جدا شدند و تخمدان به وسیله یک سرنگ ۵ میلی لیتری به تکه های کوچک تر تبدیل شد. تکه های کوچک بافت تخمدان در ۵ میلی لیتر محیط کشت L-15، ۱۵٪ سرم گوساله جنینی (FBS)، استرپتومایسین سولفات (۱۰۰ µg/ml)، پنی سیلین پتاسیم جی (۱۰۰ µg/ml) و آمفوتریسین B (۲/۵ µg/ml) تحت دمای ۲۵ درجه سانتیگراد کشت داده شدند. بعد از گذشت دو هفته و تشکیل مقدار کافی لایه سلولی بر روی کف فلاسک کشت، سلول‌ها با محلول PBS حاوی آنتی‌بیوتیک‌ها شستشو شدند، از کف فلاسک کشت سلول از طریق تیمار با Trypsin-EDTA (۰/۲۵ درصد) جدا و مجدداً در ۵ میلی لیتر محیط کشت L-15 ، ۱۵٪ سرم گوساله جنینی (FBS)، استرپتومایسین سولفات (۱۰۰ µg/ml)، پنی سیلین پتاسیم جی (۱۰۰µg/ml) و آمفوتریسین B (۲/۵ µg/ml) تحت دمای ۲۵ درجه سانتیگراد کشت داده شدند. پس از تشکیل مقدار کافی لایه سلولی بر روی کف فلاسک کشت، در روز پانزدهم همین مراحل برای انجام ساب کالچردوم نیز تکرار شد. سلول‌های حاصل از کشت اولیه و ساب کالچرهای اول و دوم بافت تخمدان ماهی قرمز همگی سلول های شبه فیبروبلاست (Fibroblast-like) بودند.

کلمات کلیدی: کشت تخمدان، ماهی طلایی، *Carassius auratus*

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1397.5.1.3.6]

مقدمه

بسیاری از ماهیان در شرایط پرورش تکثیر خوبی را از خود نشان نمی دهند (Kouril *et al*., 2008) زیرا در شرایط پرورش بسیاری از محرک‌های رسیدگی تخمک‌ها و تخمریزی نظیر تغذیه طبیعی، کیفیت و جریان خوب آب، عمق مناسب، بستر مناسب برای تخمریزی و غیره وجود ندارد. در کپورماهیان نیز علت تکثیرمصنوعی نامناسب، عدم رسیدگی نهایی تخمک‌ها (Mananos *et al*., 2009) به دلیل وجود شرایط نامساعد تکثیر گزارش شده است (Sudova *et al*., 2007). بررسی عملکرد تخمدان و تاثیر عوامل مختلف بر رسیدگی تخمک ها، بدون شک در فراهم نمودن شرایط مساعد برای رسیدگی تخمک‌ها و انجام تکثیرمصنوعی مناسب ماهیان می توان بسیار مفید باشد. با توجه به اینکه در بسیاری موارد بررسی مستقیم (*in vivo*) عملکرد تخمدان و تاثیر عوامل گوناگون بر رسیدگی تخمک‌ها میسر نیست و یا از محدودیت فصلی برخوردار است لذا کشت بافت تخمدان و تخمک ماهیان مختلف از جمله ماهیان زینتی می تواند گام بسیار موثری برای پی بردن به نقش عوامل مختلف در رسیدگی تخمک‌ها و انجام تکثیر مصنوعی خوب ماهیان باشد (نوروزفشخامی و همکاران، ۱۳۹۵). ماهی قرمز به دلیل مقاوم بودن در برابر شرایط نامساعد محیطی و آسان بودن حمل و نقل و پرورش می‌تواند مدل آزمایشگاهی خوبی برای انجام بررسی‌های ذکر شده باشد.

ماهی طلایی یا قرمز حوض (*Carassius auratus*) به دلیل زیستن در آب شیرین، تنوع رنگ و شکل ظاهری بسیار مورد توجه علاقمندان به ماهیان زینتی است و در بسیاری از کشورها وجود دارد. این ماهی متعلق به خانواده کپورماهیان و بومی شرق آسیا است (Lelek, 1987). در اواخر دهه ۱۶۰۰ به اروپا (Lever, 1977)، آسیای صغیر (Izci, 2004)، کانادا (Munkittrick and Leatherland, 1984) و استرالیا (Baumgartner *et al*., 2008) معرفی شد. معمولاً به طول ۲۰ سانتیمتر و وزن ۱۰۰ تا ۳۰۰ گرم می‌رسد. ممکن است به طول کل ۴۵ سانتیمتر و وزن ۳ کیلوگرم نیز برسد (Muus and Dahlström, 1967). طول عمر آن ۶ تا ۷ سال است. در موارد نادر بیش از ۳۰ سال عمر می‌کند (Menasse,1974). ماهی قرمز نسبت به آلودگی آب مقاوم است. همه چیزخوار است و جیره غذایی آن سخت پوستان پلانکتونی، فیتوپلانکتون‌ها، لارو حشرات، تخم و نوزاد ماهیان، گیاهان کفزی و دیتریت‌ها را شامل می‌شود (Nico and Schofield, 2006). به سرعت تکثیر می‌یابند و از طریق ماده‌زایی (ژاینوژنزیز[1]) نیز قادر به تکثیر می باشد (Kuznetsov, 2004). نسبت به شرایط محیطی از جمله استرس (Abramenko *et al*., 1997)، کدورت بالای آب، افزایش pH و دما مقاوم است (Spotila *et al*., 1979). pH بین ۴/۵ تا ۱۰/۵ را تحمل می کند ولی ۴/۵ تا ۷ را ترجیح می‌دهد (Szczerbowski, 2001). در آب دارای شوری ppt ۱۷ نیز صید شده است. در رودخانه با دمای آب ۰ تا ۴۱ درجه سانتیگراد می‌تواند دوام یابد (Nico and Schofield, 2006). چون نسبت به آلودگی آب خیلی مقاوم است (Abramenko *et al*., 1997)، می‌تواند با مقدار کم اکسیژن آب تطبیق یابد و حتی در آب آلوده بدون اکسیژن دارای دمای ۲ درجه سانتیگراد به مدت چند ماه نیز قادر به ادامه حیات است (Van den Thillart *et al*., 1983). ویژگی‌های ذکر شده این ماهی را قادر می‌سازد در زیستگاه‌های مختلف از جمله حوضچه‌ها (Holopainen *et al*., 1991) و آکورایوم زندگی کند. برای نگهداری آن نیاز به آزمایشگاه های بزرگ و دستگاه‌های گرانقیمت و پیچیده نیست. تعداد زیادی ماهی قرمز را می‌توان در یک آکواریوم معمولی مجهز به پمپ هوا برای مدتی طولانی نگهداری نمود. ماهی قرمز علاوه بر علاقمندان به ماهیان زینتی، مورد توجه محققین علوم زیستی نیز است و اغلب به عنوان مدل آزمایشگاهی برای انجام تحقیقات زیست‌شناسی استفاده می شود. با توجه به اینکه این ماهی اغلب در دو سالگی به رسیدگی جنسی می‌رسد لذا بررسی بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیک از جمله تولیدمثل در آن‌ها به راحتی انجام پذیر است. با توجه به مزایای ذکر شده برای کشت بافت تخمدان و تخمک و بررسی آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی(*in vitro*)، همچنین ویژگی‌های بیان شده برای ماهی قرمز، در این تحقیق کشت تخمدان ماهی قرمز به منظور ایجاد یک مدل آزمایشگاهی برای انجام تحقیقات متنوع مرتبط با عملکرد تخمدان و رسیدگی تخمک ماهیان مختلف در آینده، انجام شد.

مواد و روش کار

برای انجام این تحقیق تعداد ۲۵ عدد ماهی قرمز دو ساله به طول ۵ تا ۸ سانتیمتر و به وزن ۲۰ تا ۴۰ گرم تهیه شد و به یک آکواریوم به ابعاد۴۰×۲۸×۶۰ سانتیمتر حاوی ۲۵ لیتر آب چاه منتقل شدند. آب آکواریوم طی مدت نگهداری ماهیان به

[1] Gynogenesis

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1397.5.1.3.6]

وسیله پمپ آکواریوم بخوبی هوادهی شد و دمای آن بین ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتیگراد بود. ماهیان مورد آزمایش نیز در طول مدت نگهداری با گاماروس‌های تازه و خشک شده تغذیه شدند. آزمایش پس از گذشت ۸ روز از انتقال ماهیان به آکواریم، آغاز شد.

جداسازی بافت تخمدان: برای جداسازی و کشت بافت تخمدان از روش Stoklosowa و Epler (1985) با کمی تغییرات استفاده شد. پس از بی‌هوش کردن یک عدد ماهی قرمز ماده به وزن ۴۲ گرم و طول ۷ سانتیمتر با استفاده از پودر گل میخک (۰/۲ ppt)، بخش شکمی ماهی مورد آزمایش با دستمال کاغذی خشک و با الکل ۷۰٪ ضدعفونی گردید. پس از ایجاد برش در بخش شکمی ماهی مورد آزمایش، تخمدان حاوی تخمک ها را از بدن خارج نموده، به یک ظرف پتری حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت L-15، استرپتومایسین سولفات (۲۰۰ µg/ml)، پنی سیلین پتاسیم جی (۲۰۰ µg/ml) و آمفوتریسین B (۵ µg/ml) منتقل گردید و به وسیله اسکالپل به تکه‌های کوچکتر بریده شد. به منظور جداسازی تخمک‌ها از بافت تخمدان، تخمدان حاوی تخمک‌ها را به داخل یک سرنگ ۵ میلی‌لیتری کشیده، دوباره در ظرف پتری خالی گردید. این عمل سه بار نیز تکرار شد تا تخمک‌ها و بافت تخمدان تا حد امکان از هم جدا شوند. سپس محیط کشت را خارج نموده، ۵ میلی‌لیتر محیط کشت جدید با همان ترکیب قبلی به ظرف پتری اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه محیط کشت را خارج نموده، ۵ میلی‌لیتر محیط کشت جدید اضافه شد. این مرحله برای بار سوم نیز تکرار شد. محیط کشت حاوی بافت تخمدان به یک لوله سانتریفوژ استریل منتقل و سانتریفوژ شد. پس از اتمام سانتریفوژ، ۴ میلی‌لیتر محلول رویی را دور ریخته، رسوب باقیمانده را به وسیله یک پیپت پاستور در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت باقیمانده به هم زده، در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. پس از گذشت ۵ دقیقه نمونه را به آرامی به هم زده، بعد از گذشت تقریباً ۳۰ ثانیه محلول رویی را که حاوی بافت تخمدان بود با پیپت پاستور به یک لوله سانتریفوژ جدید حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت با ترکیب قبلی افزوده، در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. بعد از گذشت ۵ دقیقه، نمونه‌ها را به آرامی به هم زده، به وسیله پیپیت پاستور از محلول رویی برداشته، به لوله سانتریفوژ حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت جدید اضافه شد. این کار دوبار نیز تکرار شد. سر انجام نمونه را سانتریفوژ نموده، محلول رویی دور ریخته شد و مقدار ۱ میلی‌لیتر محیط کشت L-15 حاوی آنتی‌بیوتیک‌ها با همان غلظت قبلی به لوله سانتریفوژ اضافه گردید و نمونه به هم زده شد تا بافت تخمدان به تکه‌های ریز تبدیل شوند.

کشت اولیه بافت تخمدان: تکه‌های بافت تخمدان به همراه ۱ میلی‌لیتر محیط کشت به یک فلاسک کشت (۲۵ سانتی‌مترمربع) استریل حاوی ۴ میلی‌لیتر محیط کشت L-15، ۱ میلی‌لیتر سرم گوساله جنینی (FBS)، استرپتومایسین سولفات (۱۰۰µl/ml)، پنی سیلین پتاسیم جی (۱۰۰µg/ml) و آمفوتریسین B (۲/۵µg/ml) منتقل شد. پس از ته‌نشین شدن تکه‌های بافت تخمدان، تمامی محیط کشت به وسیله پیپت پاستور از فلاسک خارج شد و فلاسک به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا تکه های بافت تخمدان به کف فلاسک کشت بچسبند. سپس به فلاسک مقدار ۵ میلی‌لیتر محیط کشت با همان ترکیب ذکر شده اضافه شد و فلاسک به دستگاه انکوباتور تنظیم شده در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد منتقل شد.

کشت مجدد (ساب کالچر[۲]) اول: بعد از گذشت ۱۴روز (روز پانزدهم) زمانی که سلول‌های بافت تخمدان به اندازه کافی تکثیر شدند و بخش وسیعی از کف فلاسک کشت را پوشاندند، به منظور شستشوی سلول‌ها، به وسیله پیپت پاستور محیط کشت از فلاسک خارج شد و مقدار ۴ میلی لیتر محلول PBS استریل، استرپتومایسین سولفات (۲۰۰µg/ml)، پنی‌سیلین پتاسیم جی (۲۰۰µg/ml) و آمفوتریسین B (۵µg/ml) به فلاسک اضافه شد. سپس محلول PBS از فلاسک خارج و مقدار ۴ میلی لیتر محلول Trypsin-EDTA (۰/۲۵ درصد تریپسین و ۰/۰۲ درصد EDTA، حل شده در محلول PBS عاری از یون های کلسیم و منیزیم) اضافه شد. بعد از ۳ دقیقه فلاسک به آرامی تکان داده شد تا سلول‌های چسبیده به کف فلاسک از آن جدا شدند. سپس سلول‌ها به همراه تریپسین به یک لوله سانتریفوژ استریل منتقل و سانتریفوژ شدند. محلول رویی را از لوله سانتریفوژ خارج نموده، به منظور خنثی نمودن اثر تریپسین، ۴ میلی لیتر FBS به لوله سانتریفوژ افزوده شد. بعد از گذشت ۱۰ دقیقه نمونه سانتریفوژ شد و پس از دور ریختن محلول رویی، مقدار ۱ میلی‌لیتر محیط کشت L-15 حاوی FBS و آنتی بیوتیک‌ها به لوله سانتریفوژ اضافه شد و نمونه به هم زده شد. پس از شمارش سلول‌ها و بررسی درصد تعداد سلول های زنده، سوسپانسیون سلولی حاصل را به یک فلاسک کشت

[2] Subculture

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1397.5.1.3.6]

حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت با همان ترکیب قبلی افزوده (5×10^5)، به انکوباتور ۲۵ درجه سانتیگراد منتقل شد.

ساب کالچر دوم: بعد از گذشت ۱۴ روز از ساب کالچر اول، محیط کشت را از فلاسک خارج نموده، مراحلی که در ساب کالچر اول انجام شده بود برای این مرحله نیز انجام شد و فلاسک حاوی سلول‌ها در انکوباتور ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سانتریفوژ نمودن محلول‌ها در تمامی مراحل این تحقیق با سرعت ۱۶۰۰ دور در دقیقه به مدت ۷ دقیقه انجام شد.

نتایج و بحث

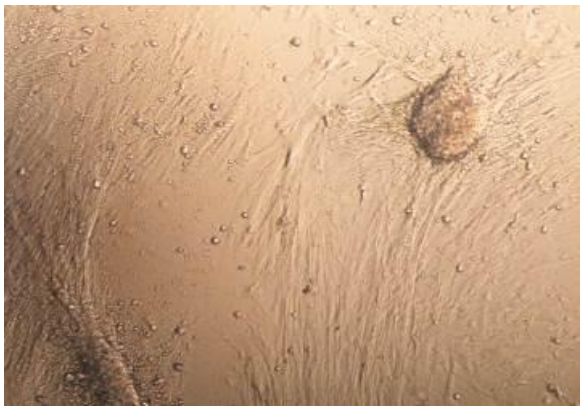
بررسی نمونه کشت داده شده پس از گذشت تقریباً ۳۶ ساعت، نشان داد تقریباً ۹۰ درصد تکه های بافتی (explants) کشت داده شده تخمدان ماهی قرمز به کف فلاسک کشت چسبیدند (شکل ۱). بررسی نمونه کشت داده شده به وسیله میکروسکوپ اینورت نشان داد بعد از گذشت ۱۴روز اغلب تکه‌های بافتی تخمدان بخوبی به کف فلاسک چسبیده بودند (شکل۲) و سلول‌های آن‌ها تکثیر یافته، به سمت خارج از بافت یعنی به طرف محیط کشت مهاجرت نمودند (شکل ۳).

شکل ۱: تکه‌های کشت شده بافت تخمدان پس از ۴۸ ساعت

شکل ۲: تکه‌های کشت شده بافت تخمدان در روز چهاردهم

تکثیر بافت کشت داده شد تخمدان و مهاجرت سلول‌های تکثیر یافته ادامه یافت و با گذشت زمان بیشتر شد. بررسی نمونه‌ها در روز دهم نشان داد سلول‌ها به‌خوبی تکثیر شدند و به نزدیک تکه‌های بافتی مجاور رسیدند (شکل ۴).

شکل ۳: تکثیر بافت تخمدان و مهاجرت سلول‌های جدید به سمت خارج از بافت (۱۲۰×)

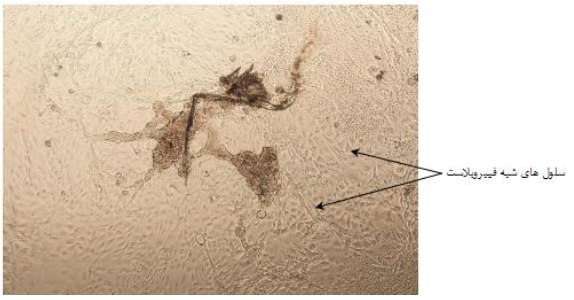


شکل ۴: تکثیر بافت تخمدان و مهاجرت سلول‌های جدید به سمت تکه بافتی مجاور (۳۰۰×)

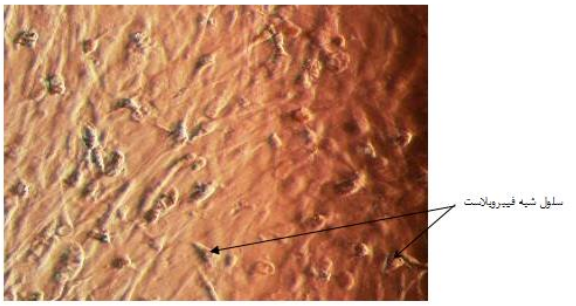
در روز چهاردهم بیش از ۸۰ درصد کف فلاسک کشت توسط سلول های جدید که شبیه سلول های فیبروبلاست بودند (Fibroblast -like) اشغال شد (شکل ۵). ۸۵ درصد سلول‌ها زنده بودند. تمامی سلول‌های حاصل از ساب‌کالچر اول و دوم نیز سلول‌ها شبه فیبروبلاست بودند (شکل‌های ۶ و ۷). سلول‌های زنده به ترتیب ۷۴ و ۶۸ درصد سلول‌های حاصل از ساب کالچر اول و دوم را شامل می‌شدند.

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1397.5.1.3.6]



شکل ۵: تکثیر بافت تخمدان و مهاجرت سلول‌های جدید به سمت خارج از بافت (۱۲۰×)



شکل ۶: سلول های حاصل از ساب کالچر اول بافت تخمدان ماهی قرمز (۶۰۰×)

کشت بافت تخمدان قبلاً در مورد اردک ماهی *Esox lucius* (Ahne, 1979)، گربه ماهی آبراهه *Ictalurus punctatus* (Bowser and Plumb, 1980)، ماهی کپور معمولی *Cyprinus carpio* (Stoklosowa and Epler, 1985; Epler *et al*., 1997) ماهی مداکا *Oryzias latipes* (Ogiwara *et al*., 2010) گربه ماهی آفریقایی *Clarias gariepinus* (Kumar *et al*., 2001)، ماهی تیلاپیا *Oreochromis niliticus* (Chen *et al*., 1983; Khamiss and Hashem, 2012)، و ماهی باس دریایی اروپایی *Dicentrarchus labrax* (Crespo *et al*., 2012) با موفقیت انجام شد. نتایج کسب شده توسط این افراد حاکی از قابل اعتماد بودن و کاربردی بودن این روش برای تکمیل رسیدگی تخمک در شرایط آزمایشگاهی و درک مکانیزم‌های دخیل در فرآیندهای تولید و رسیدگی تخمک است.

با انجام موفقیت آمیز کشت بافت تخمدان ماهی قرمز و دستیابی به مواد و روش کار در این تحقیق، زمینه برای انجام این روش در مورد سایر ماهیان از جمله تاسماهیان فراهم شد. به طوری که بعد از انجام این تحقیق، در بهار سال ۱۳۹۶ کشت بافت تخمدان و تخمک ماهی استرلیاد با موفقیت انجام شد (منتشر نشده). به کارگیری این روش برای سایر ماهیان بخصوص ماهیانی که تکثیر مصنوعی آن‌ها با چالش جدی مواجه است می‌تواند کمک بسزایی در رفع معضلات مرتبط با ناموفق بودن تکثیر مصنوعی برخی از گونه‌ها از جمله ماهیان خاویاری که خود ناشی از عدم رسیدگی تخمک می‌باشد، نماید.

منابع

نوروزفشخامی، م.ر.، سوداگر، م.، بهمنی، م.، سلامات، ن.، مازندرانی. و یزدانی، م.ع.، ۱۳۸۱. کشت اولیه سلول‌های فولیکولی و تخمک، راهکاری جهت ارتقای کیفی تکثیر مصنوعی تاسماهی استرلیاد *Acipenser ruthenus* و سایر ماهیان در آینده، مجله آبزیان زینتی، شماره ۳، صفحات ۸-۱.

Abramenko, M.I., Kravchenko, O.V. and Velikoivanenko, A.E., 1997. Population genetic structure of the goldfish *Carassius auratus gibelio* diploid-triploid complex from the Don River Basin. Journal of Ichthyology, 37, 56–65.

Ahne, W., 1979. Fish cell culture: A fibroblastic line (PG) from ovaries of juvenile Pike *Esox lucius*. In vitro, 15(11), 839-840.

Baumgartner, L.J., Stuart, I.G. and Zampatti, B.P., 2008. Determining diel variation in fish assemblages downstream of three weirs in a regulated lowland river. Journal of Fish Biology, 72, 218–232.

Bowser, P.R. and Plumb, J.A., 1980. Fish cell lines: Establishment of a line from ovaries of Channel catfish. In vitro, 16(5), 365-368.

Chen, S.N., Chi, S.C. and Kou, G.H., 1983. A cell line derived from Tilapia ovary. Fish Pathology, 18(1), 13–18.

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.

Epler, P., Galas, J. and Stoklosowa, S., 1997. Steroidogenic activity of carp ovarian

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-01]
[DOR: 20.1001.1.24234575.1397.5.1.3.6]

follicular and interstitial cells at the pre-spawning and resting time: a tissue culture approach. Comparative Biochemistry and Physiology, 116(2), 167–170.

Holopainen, I.J., Tonn, W.M. and Paszkowski, C.A., 1991. Ecological responses of crucian carp populations to predation by perch in a manipulated pond. Verhandlungen der Internationale Vereinigung Limnologie, 14, 2412–2417.

Izci, L., 2004. Some population parameters of *Carassius auratus* (L., 1758) in Lake Eğirdir. Turkish Journal of Veterinary Animal Science, 28, 23–27.

Khamiss, O. and Hashem, M.H., 2012. Developing a cell culture system from Nile Tilapia (*Oreochromis niliticus*, L.) ovarian tissue in Egypt. IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science, 1(2), 8-12.

Kouril, J., Mraz, J., Hamackova, J. and Barth, T., 2008. Hormonal induction of Tench (*Tinca tinca* L.) with the same treatments at two sequential reproductive seasons. Cybium, 32, 61.

Kumar, G.S., Singh, I.S.B. and Rosamma, P., 2001. Development of a cell culture system from the ovarian tissue of African catfish *Clarias gariepinus*. Aquaculture, 194, 51–62.

Kuznetsov, V.A., 2004. Changes in the population structure and biological indices of the goldfish *Carassius auratus gibelio* in the Volga Stretch of the Kuibyshev Reservoir under conditions of intense anthropogenic load on the ecosystem. Journal of Ichthyology 44, 167–174.

Lelek, A., 1987. The freshwater fishes of Europe. Threatened fishes of Europe. Aula-Verlag, Wiesbaden, Germany.

Lever, C., 1977. The Naturalized Animals of the British Isles, London: Hutchinson & Co Limited. 600 P.

Mananos, E., Duncan, N. and Mylonas, C., 2009. Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish. 3−80. In: Cabrita E., Robles V., Herraez P. (eds.): Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species. CRC Press, Florida. 549 P.

Menasse`, V., 1974. Pesci rossi o carassi. Edagricole, Bologna, Italy.

Munkittrick, K.R. and Leatherland, J.F., 1984. Seasonal changes in the pituitary-gonad axis of feral goldfish, *Carassius auratus* L., from Ontario, Canada. Journal of Fish Biology, 24, 75–90.

Muus, B.J. and Dahlström, P., 1967. Guide des poissons d'eau douce et Peˆche. Delachaux & Niestle`, Neuchatel, Switzerland.

Nico, L. and Schofield, P.J., 2006. *Carassius auratus*. USGS Non-indigenous Aquatic Species Database, Gainesville, FL.

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.

Omaima, K. and Hashem, M.H., 2012. Developing a cell culture system from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.) ovarian tissue in Egypt. IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science, 1(2), 8-12.

Schofield, P.J., Brown, M.E. and Fuller, P.F., 2006. Salinity tolerance of goldfish, *Carassius auratus*, a non-native fish in the United States. Florida Scientist, 69(4), 258-268.

Spotila, J.R., Terpin, K.M., Koons, R.R. and Bonati, R.L., 1979. Temperature requirements of fishes from eastern Lake Erie

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1397.5.1.3.6]

and upper Niagara River. Environmental Biology of Fishes, 4, 281–307.

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

Sudova, E., Machova, J., Svobodova, Z. and Vesely, T., 2007. Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish: a review. Veterinarni Medicina, 52, 527-539.

Szczerbowski, J.A., 2001. *Carassius auratus* (Linneaus, 1758). Pp: 5–41 in P. M. Banarescu and H. J. Paepke, editors. The Freshwater Fishes of Europe, vol. 5/III; Cyprinidae 2/III and Gasterosteidae. AULA-Verlag, Wiebelsheim, Germany.

Van den Thillart, G., Van Berge Henegounen, M. and Kesbete, F., 1983. Anaerobic metabolism of goldfish, *Carassius auratus*: ethanol and CO_2 excretion rates and anoxic tolerance at 20, 10, and 5 ºC. Comparative Biochemistry and Physiology, 76, 295–300.

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1397.5.1.3.6]