پایه‌گذاری بانک اسپرم ماهیان خاویاری جنوب دریای خزر

شهروز برادران نویری[1*]، علیرضا علیپور[1]، محمد پوردهقانی[1]، فریدون چکمه‌دوزقاسمی[1]، محمد پورکاظمی[1]، محمود محسنی[1]، علی حلاجیان[1]

چکیده

در این تحقیق به چگونگی ایجاد بانک اسپرم از ماهیان خاویاری دریای خزر پرداخته شده است. طی این بررسی که در دو فصل تکثیر این ماهیان صورت گرفت، اسپرم ۱۸ مولد از انواع ماهیان خاویاری با کیفیت مناسب و تحرک بالای ۷۰٪ تحت انجماد قرار گرفت. محلول رقیق کننده مورد استفاده شامل ۱۱۸ mM تریس، ۲۳/۴ mM ساکارز، ۱۵ DMSO٪ بود. انتقال نمونه ها بداخل نی‌های انجماد (پایوت‌ها) با دستگاه پر کن خودکارانجام شد. سپس بعد از سرمادهی چند مرحله ای، ۱۲۹۰ میلی لیتر از اسپرم منجمد این ماهیان در ازت مایع نگهداری شد. بررسی نمونه ها نشان داد که مولدین تاسماهی ایرانی صید شده از رودخانه، نسبت به مولدین غیر رودخانه ای از کیفیت و کمیت بالاتری برخوردارند. همچنین اسپرم ماهی ازون برون در مراحل انجماد، نسبت به اسپرم تاسماهی ایرانی از قابلیت تحرک بیشتری پس از انجمادزدائی برخوردار است. لقاح تخمک ماهی ازون برون به کمک اسپرم منجمد ۲ ساله و تخمک تاسماهی ایرانی با اسپرم منجمد ۵ ساله به ترتیب ۱۴/۳ درصد و ۴۳/۷٪ لقاح پس از ۲۴ ساعت را نشان داد.

واژگان کلیدی: اسپرم ماهیان، خاویار، تخمک، لقاح

مقدمه

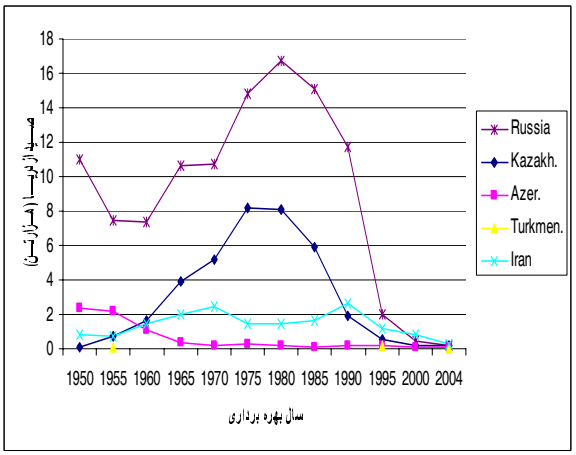
ذخائر با ارزش ماهیان خاویاری در جهان، ازجمله دریای خزر، بشدت در حال کاهش می‌باشد (۲۹ و ۳۸). این امر به دلیل اثر فعالیت‌های مختلف انسانی در چند دهه اخیر شتاب بیشتری گرفته است (٤، ٦، ۱۷ و ۲۱).

آمار صید حاکی از آن است که میزان صید قانونی ماهیان خاویاری در دریای خزر از ۲۸۵۰۰ تن در سال ۱۹۸۵ به ۱۳٤٥ تن در سال ۲۰۰۵ کاهش یافته است (۳۸). چنین کاهش صیدی را می‌توان در آبهای سایر کشورها نیز مشاهده نمود (۲٦). به همین علت، کلیه گونه های ماهیان خاویاری که محل زیست طبیعی آنها در دریای خزر و حوضه آبریز اطراف آن می باشد، در فهرست ماهیان در معرض خطر سازمان IUCN (International Union for Consevation of Nature and Natural Resources) قرار دارند (۲۸). همچنین اسامی این ماهیان از سال ۱۹۹۷ میلادی در ضمائم مختلف کنوانسیون بین المللی نظارت بر تجارت

۱- انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت،
*-نویسنده مسئول Snb170@yahoo.com

گونه‌های در معرض خطر CITES (Convention on International Trading in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) قرار گرفته است (۲۹ و ۳۹).

آمار مقایسه‌ای صید ماهیان خاویاری در حوضه دریای خزر، به تفکیک کشورهای حاشیه این دریا طی سالهای مختلف در نمودار شماره ۱ آمده است.



نمودار شماره ۱–آمار مقایسه ای صید ماهیان خاویاری دریای خزر به تفکیک کشورها (به نقل از پورکاظمی ۱۳۸۵)

این مسئله سبب شده که در فصل تکثیر، از توان تکثیر تعداد مولدین معدودی استفاده شود که خطر کاهش تنوع ژنی این ماهیان را در آینده به دنبال دارد (۱۹). در طول فصل تکثیر، عمدتاً تعداد مولدین نر صید شده بیشتر از تعدادی است که برای پوشش دادن لقاح تخمکهای استحصالی از مولدین ماده صید شده لازم است و در نتیجه پتانسیل اسپرم دهی تعدادی از مولدین نر از دست می‌رود. از طرف دیگر گاهی با وجود مولدین نر مناسب، مولد ماده مناسب در مراکز تکثیر وجود نداشته و بدین ترتیب امکان استفاده از اسپرم مولدین موجود نیز کاهش می‌یابد. در این تحقیق ضمن ایجاد یک مرکز نگهداری طولانی مدت اسپرم ماهیان خاویاری، از اسپرم با کیفیت و مازاد مصرف مولدین بصورت منجمد نگهداری شده تا درمواقع لازم در اختیار مراکز تکثیرقرار گیرد.

مطالعات انجماد و نگهداری طولانی مدت اسپرم ماهیان خاویاری در سالهای اخیر رشد زیادی پیدا کرده است (۳٤). در مطالعه کوپیکا و همکاران، این گروه توانستند از اسپرم منجمد تاسماهی آتلانتیک پس از ۲۲ روز ٦٤٪ لقاح بگیرند. همچنین با انجماد اسپرم تاسماهی سیبری و استرلیاد به ترتیب ۲۳٪ و ٥٤٪ لقاح گرفتند (۳۱). روشهای به کاررفته در مورد محلولهای رقیق کننده، مراحل سرمادهی، نسبت رقت، نتایج بدست آمده و نیز در مورد ٦ گونه از ماهیان خاویاری توسط بیلارد و همکاران (۲۰۰٤) مرور شده است. مطالعاتی در زمینه انجماد اسپرم و نگهداری کوتاه مدت اسپرم ماهیان خاویاری دریای خزر در روسیه نیز توسط چرپانوف و کوپیکا (۱۹۹٦) انجام شد. در این تحقیق ۹۰–٤۰٪ اسپرمهای منجمد شده دارای تحرک بودند (۲۰).

در ایران نیز امکان انجماد و نگهداری اسپرم هر ٥ گونه ماهیان خاویاری جنوب دریای خزر به کمک رقیق کننده اختصاصی این ماهیان قبلاً بررسی شد. در این بررسی ضمن القای تحرک اسپرمها، لقاح ٦۰٪–٤٤٪ در گونه‌های مختلف نیز بدست آمد (٤). طی این بررسی همچنین مشخص گردید اسپرم کلیه تاسماهیان جنوب دریای خزر را می‌توان به کمک رقیق کننده مخصوص این ماهیان در نی‌های انجماد، منجمد کرد و جهت لقاح در شرایط کمبود یا ضعف مولدین بکار گرفت.

در این مقاله، امکان نگهداری اسپرم منجمد مولدین گونه‌های با ارزش ماهیان خاویاری وارد شده به رودخانه‌های جنوب دریای خزر بررسی مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش کار

طی مدت اجرای پروژه که شامل دو فصل تکثیر ماهیان خاویاری در بهار سالهای ۱۳۸٦–۱۳۸٥ می شد، مولدین منتقل شده به مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی رشت، پس از تزریق هورمونی مورد ارزیابی قرار گرفتند. عملیات نمونه برداری و بررسی کمیت و کیفیت اسپرم از ۳٤ مولد نر انواع ماهیان خاویاری شامل ۲٥ عدد تاسماهی ایرانی، ٤

عدد ازون برون، ۲ عدد شیپ و ۳ عدد فیلماهی صورت گرفت. در این بین از میان ۱۸ مولد با کیفیت مناسب و تحرک بیش از ۷۰٪ ، اسپرم گیری بعمل آمد.

استحصال اسپرم از مولدین مورد نظر، پس از تزریق عضلانی mg/kg ۳-۲ عصاره هیپوفیز، با سرکشی مدام و پس از ۱۲-۷ ساعت انجام گرفت (۲۳). اسپرم گیری با کمک فشار شکمی در ظرفهای از قبل آماده و بدون اختلاط با آب، ادرار یا مدفوع صورت گرفت (۱ و ٤٤).

نمونه‌های استحصال شده پس از بررسی‌های کمی و کیفی جهت رقیق سازی در یخچال معمولی (دمای ٤-۳ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند (۳۷). محلول رقیق کننده مورد استفاده شامل ۱۱۸ mM تریس، ۲۳/٤ mM ساکارز، ۱۵٪ DMSO بوده و pH آن بر حسب pH نمونه تنظیم گردید. نمونه اسپرمها به نسبت ۱:۱ با این رقیق کننده مخلوط شدند (۱۷).

انتقال نمونه‌ها بداخل نی‌های انجماد (پایوت‌ها) با دستگاه پر کن خودکار (شرکت IMV فرانسه) انجام شد. سپس سرمادهی چند مرحله‌ای (۳۱) پس از هم دمائی نمونه‌های رقیق شده، با کمک دستگاه فریزر قابل برنامه ریزی بشرح جدول شماره ۱ اجرا شد (٢٤).

جدول شماره ۱- شدت سرمادهی نمونه اسپرم درماهیان خاویاری (برادران نویری ۱۳۸۵)

مرحله سرمادهی	شروع (سانتیگراد)	پایان (سانتیگراد)	شدت (سانتیگراد بر دقیقه)
مرحله یک	۵	-۱۰	۲
مرحله دو	-۱۰	-۷۰	۲۰
مرحله سه	-۷۰	-۹۰	۳۰
مرحله چهار	-۹۰	-۱۹۶	بلافاصله

در مرحله آخر، نمونه های منجمد جمع آوری شده و جهت نگهداری طولانی مدت وارد ازت مایع شدند. این نمونه ها جهت ارزیابی های بعدی و لقاح آزمایشی در حمام آب گرم ٤۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه مورد انجمادزدائی قرار گرفتند. آزمایشات لقاح با نسبت معادل ۱ میلی لیتر اسپرم اولیه برای ۱۰۰ گرم تخم انجام گرفت.

نتایج

با توجه به بررسی‌های مدام از مولدین، موفق به انجماد ۱۲۹۰ میلی لیتر اسپرم چهار گونه از ماهیان خاویاری شدیم که میزان هر یک به تفکیک در جدول آمده است (جدول شماره ۳). هم اکنون اسپرم این ماهیان بصورت منجمد در تانکهای ازت مایع آزمایشگاه انجماد اسپرم (در برودت ۱۹٦- درجه سانتی‌گراد) انستیتو نگهداری می شود.

جدول شماره ۲- حجم اسپرم استحصالی و منجمد شده به تفکیک هر گونه

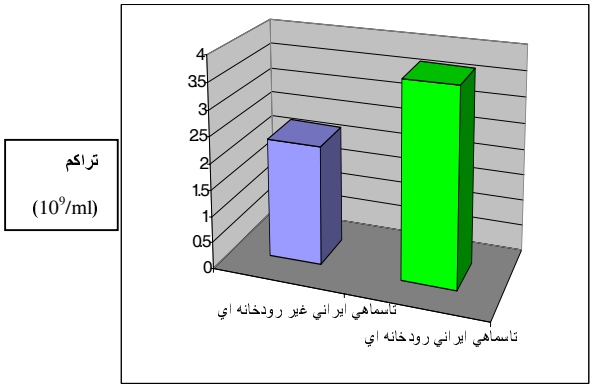
گونه ها	حجم اسپرم منجمد و نگهداری شده (میلی‌لیتر)	تعداد ماهی
فیلماهی	۸۰	۱
تاسماهی ایرانی	۱۰۱۰	۱۲
ازون برون	۹۰	۴
شیپ	۱۱۰	۱
جمع	۱۲۹۰	۱۸

همچنین خصوصیات بیومتریک مولدین، pH و تراکم اسپرم مولدین نیز در جدول شماره ٤ خلاصه شده است.

جدول شماره ۳- میانگین pH ، تراکم اسپرم و خصوصیات بیومتریک مولدین مورد استفاده

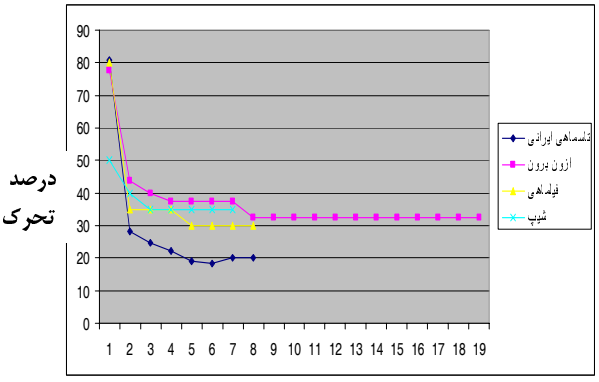
نام گونه	میانگین تراکم اسپرم (۱۰۹بر میلی‌لیتر)	میانگین pH	میانگین حجم استحصالی جهت انجماد (میلی‌لیتر)	میانگین وزن ماهی (کیلوگرم)	میانگین طول ماهی (سانتی‌متر)
فیلماهی	۲/۱۳۱	۸/۵۷	۸۰	۸۳	۲۱۷
تاسماهی ایرانی	± ۱/۶۸ ۲/۷۵	±۰/۵۴ ۸/۴۲	± ۴۴/۱۵ ۸۴/۱۷	± ۱/۴ ۱۷/۱۷	± ۷/۵ ۱۵۰/۵
ازون برون	±۰/۳۲ ۰/۹۵	± ۰/۸۸ ۸/۸۱	± ۹/۵۷ ۲۲/۵	۲/۷۸ ± ۱۰/۷۴	± ۷/۵ ۱۱۲/۸
شیپ	۱/۱۱۶	۹/۱۱	۱۱۰	-	-

بررسی نمونه‌ها نشان داد که مولدین تاسماهی ایرانی صید شده از رودخانه، نسبت به مولدین غیر رودخانه‌ای از کیفیت و کمیت بالاتری برخوردارند. همچنین اسپرم ماهی ازون برون در مراحل انجماد، نسبت به اسپرم تاسماهی ایرانی از قابلیت تحرک بیشتری پس از انجمادزدائی برخودار است (نمودار شماره ۲).

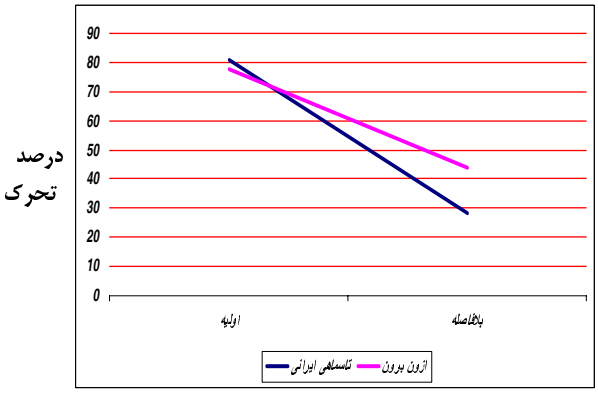


نمودار شماره ۲- مقایسه تراکم اسپرم در نمونه های رودخانه ای و غیر رودخانه ای تاسماهی ایرانی

میزان و چگونگی کاهش درصد تحرک نمونه های اسپرم تازه و نمونه های منجمد شده در نمودار شماره ۲ آمده است. در این نمودار مشخص شده که تحرک اسپرم های انواع ماهیان خاویاری مورد مطالعه، با گذشت زمان و فواصل ۳۰ روزه به چه ترتیب تغییر کرده است.



نمودار شماره ۳ - چگونگی و میزان تغییر درصد تحرک نمونه اسپرم‌های منجمد شده مولدین ماهیان خاویاری
۱ : تحرک اولیه، ۲ : بلافاصله پس از انجماد، ۳ : ۶۰ روزبعد ، ۴ : ۹۰ روز بعد



نمودار شماره ۴- چگونگی میزان کاهش درصد تحرک اسپرم انجمادزدایی شده مولدین تاسماهی ایرانی و ازون برون

طی این مدت لقاح تخمکهای استحصالی از یک مولد ماده ازون برون به کمک اسپرم منجمد ۲ ساله از مولدین وحشی که با همین روش منجمد شده بود، انجام شده و درصد لقاح ۲۷/٤ ٪ (پس از ٤ ساعت) و ۱٤/۳ درصد پس از ۲٤ ساعت بعد از لقاح بدست آمد. همچنین یک مورد لقاح اسپرم منجمد ۵ ساله تاسماهی ایرانی با تخمک تازه استحصال شده نیز انجام گرفت که درصد لقاح بدست آمده معادل ۵۸/۲ ٪ (پس از ٤ ساعت) و ٤۳/۷٪ پس از ۲٤ ساعت بود که تائیدی بر روش به کار رفته در این مطالعه ست (۱۳)

بحث

یافته‌های بدست آمده از مطالعات محققین و اساتید مختلف در رابطه با نگهداری دراز مدت اسپرم تاسماهیان نشان داد این تکنیک، یک روش کاربردی جهت جلوگیری از به هدر رفتن اسپرم مازاد مصرف و حفظ اسپرم مولدین با شناسنامه خاص بوده و امکان استفاده از اسپرم‌های منجمد در زمان عدم دسترسی به مولدین نر مناسب در فصل تکثیر و یا امکان انجام آزمایشهای لقاح خارج از فصل تکثیر را مهیا می‌سازد (۱۷ و ۱۹). همچنین از دیدگاه مدیریت ذخایرمی‌توان به این تکنیک به عنوان یک گزینه عملی در بازسازی ذخایر نگاه کرد

با توجه به نمودار شماره ۳، مشخص می گردد که میانگین درصد تحرک اسپرم کلیه مولدین مورد استفاده ، بلافاصله پس از انجماد کاهش قابل توجهی را نشان می دهد. این میزان کاهش برای تاسماهی ایرانی۵ ± ۵۲/۵٪، برای ازون برون۷ ± ۳۳/۷٪ ، برای فیلماهی ٤٥٪ و برای شیپ ۱۰٪ است. اما مقدار کاهش تحرک پس از وارد شدن به فاز ازت مایع در تمامی نمونه ها پس از ۷ ماه تفاوت معنی داری را با اولین لحظه ورود به ازت مایع نشان نداده است (P <۰/۰۰۵). علیرغم این افت درصد تحرک اولیه ، نتایج لقاح نمونه اسپرمهای منجمد شده با همین مواد و روش کار، پس از انتقال نمونه های منجمد قبلی به بانک اسپرم جدید، حاکی است که کیفیت نمونه‌های منجمد شده مناسب هستند.

بیلارد و همکاران (۲۰۰٤)، لینهارت و همکاران (۲۰۰٦) کوسون (۲۰۰۸)کاهش تحرک و قابلیت لقاح در اسپرم منجمد شده بسیاری از ماهیان را گزارش کرده‌اند. از جمله موارد کاهش نسبی یا شدید درصد لقاح و قدرت باروری نمونه اسپرم های پس از انجماد زدایی، می‌توان به ماهیان خاویاری پاروپوزه میمس و همکاران (۲۰۰۰)، تاسماهی سیبری گلوگوفسکی و همکاران (۲۰۰۲)، تاسماهی آتلانتیک کوپیکا و همکاران (۲۰۰۰)، تاسماهی مکزیک پارک و چاپمن (۲۰۰۵) و تاسماهی آمریکا اینجرمن و همکاران (۲۰۰۲ اشاره نمود. در مورد ماهیان خاویاری دریای خزر نیز قبلاً به این مورد در ماهیان شیپ و ازون برون دزوبا و همکاران (۱۹۹۹)، تاسماهی روسی چرپانوف و کوپیکا (۱۹۹۹)، فیلماهی چرپانوف و کوپیکا (۱۹۹۹)، و استرلیاد جانیچن و همکاران (۱۹۹۹)، تسفتکوفا و همکاران (۱۹۹٦) اشاره شده است. محققین مختلف اعلام داشته اند که این کاهش باروری را می توان با افزایش میزان اسپرم انجمادزدایی شده برای لقاح تخم تازه جبران کرد (۱۲).

اسپرم مولدین رودخانه ای تاسماهی ایرانی از نظر کمیت تفاوت معنی‌داری با سایر مولدین این گونه داشتند (P <۰/۰۵) (نمودار شماره ٤) و این امر نشان می‌دهد که تراکم اسپرم مولدین رودخانه‌ای بیش از مولدین غیر رودخانه‌ای است. این موضوع می‌تواند نشانگر کامل شدن مراحل رسیدگی جنسی در مولدین نر رودخانه‌ای باشد. این مورد که نمونه اسپرم با تحرک اولیه بهتر، پس از انجماد زدایی منجر به افزایش درصد لقاح نسبت به اسپرم اولیه می‌شود، قبلاً در مورد پاروپوزه‌های شمال آمریکا گزارش گردیده است (۳٤).

با پایه‌گذاری یک مرکز انجماد و نگهداری اسپرم و حفظ اسپرم مناسب از مولدین مناسب ماهیان خاویاری، در صورت نیاز مراکز تکثیر و بازسازی ذخائر، می‌توان اقدام به ارائه ا سپرمهای مورد نیاز از هر یک از مولدین به این مراکز نمود تا در مواقع لزوم از هدر رفتن پتانسیل تکثیر این ماهیان با ارزش جلوگیری به عمل آمده و راندمان تکثیر و رهاسازی بچه ماهیان مورد نظر در این مراکز افزایش یابد. این روش یک ابزار مدیریتی جدید را در اختیار مسئولین بازسازی ذخائر شیلاتی قرار می‌دهد تا از پتانسیل تکثیر مولدین بیشتری استفاده شود و همکاران بخش اجرا نیز بتوانند با آموزش های لازم در این خصوص از امکانات فراهم شده بهره ببرند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق، از پروژه های مصوب برنامه محیط زیست دریای خزر (CEP) بوده که از بین ۳۱ پروژه ارائه شده برای سال ۲۰۰٦ مورد تصویب قرار گرفته و با حمایت‌های موسسه تحقیقات شیلات ایران به اجرا در آمده است. لذا بدینوسیله از زحمات عزیزان ذیل که درمراحل مختلف اجرای پروژه ما را همراهی کردند سپاسگزاری می گردد:

دکتر حمیدرضا غفارزاده، ریاست محترم دفتر برنامه محیط زیست دریای خزر؛ دکتر علی محمدی، مشاور محترم دفتر برنامه محیط زیست دریای خزر؛ دکتر عباسعلی مطلبی، ریاست محترم مؤسسه تحقیقات شیلات ایران؛ دکتر مصطفی شریف روحانی، معاونت محترم تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات شیلات ایران؛

مهندس محمد طلوعی، ریاست محترم مرکز تکثیرو پرورش و بازسازی ذخائر شهید بهشتی؛ مهندس علیرضا عباسعلیزاده، معاونت محترم مرکز تکثیرو پرورش و بازسازی ذخائر شهید بهشتی؛ مهندس حسین محمدی پرشکوه، مسئول محترم بخش تکثیرمرکز تکثیرو پرورش و بازسازی ذخائر شهید بهشتی؛ دکتر محمود بهمنی، معاونت پژوهشی انستیتو و مهندس اسماعیل شعبانی، معاونت محترم اداری، مالی انستیتو.

منابع

۱- آذری تاکامی، ق. و کهنه شهری، م. ۱۳۵۳ تکثیر مصنوعی و پرورش ماهیان خاویاری. انتشارات دانشگاه تهران، ۲۹۰ صفحه.

۲- برادران نویری، ش. ۱۳۸۰ پرورش تاسماهیان. انتشارات حق شناس، رشت، ۱۱۵ صفحه.

۳- برادران نویری، ش، علیپور،ع. و پورکاظمی، م. ۱۳۸۲. انجماد اسپرم ۵ گونه از تاسماهیان دریای خزر. ویژه نامه اولین سمپوزیوم ملی ماهیان خاویاری، مجله علمی شیلات ایران، پائیز ۱۳۸۲. ص ص. ۲۸-۲۳.

٤- برادران نویری، ش. ۱۳۸٤. انجماد اسپرم، انتخابی یرای حفظ تنوع زیستی جانوران. دنیای آبزیان، شماره ٦، پائیز ۸٤، ص ص.٤٤-٤۰.

۵- بهمنی، م. ۱۳۷۷ بررسی فیلوژنیک و سیستماتیک تاسماهیان. مجله علمی شیلات ایران، شماره ۲، سال هفتم، ص ص ۳۰-۹.

٦- پور کاظمی، م. ۱۳۷٦ نگرشی بر وضعیت تاسماهیان دریای خزر و چگونگی حفظ ذخائر آن. مجله علمی شیلات ایران، شماره ۳، سال ششم، ص ص ۲۲-۱۳.

۷- تقوی مطلق، ا. ۱۳۷۷ ترکیب سنی و پیش بینی مقدار اپتیمم صید برای چهار گونه ماهیان خاویاری ازون برون، فیلماهی ، قره برون و چالباش. اولین سمپوزیوم ملی ماهیان خاویاری، ۲۵-۲٤ آذر ۱۳۷۷، رشت، خلاصه مقالات، ص ۱.

۸- رضوانی گیل کلائی، س. ۱۳۷۷ بررسی قابلیت های پرورش ماهیان خاویاری، هشتمین همایش ملی شیلات ایران، ۲۸-۲٦ بهمن ۱۳۷۷، دانشگاه تهران، خلاصه مقالات، ص ص ۵۰-٤۹.

۹- عابدی، م. ۱۳۷۵. بررسی امکان انجماد اسپرم در ماهیان خاویاری. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی. واحد لاهیجان. ۹۵ صفحه.

۱۰-علیپور،ع. برادران نویری، ش. نوروز فشخامی، م.ر. و پورکاظمی، م. ۱۳۸۰. انجماد اسپرم ماهیان خاویاری شیپ،فیلماهی، ازون برون و تاسماهی ایرانی در فصل تکثیر. گزارش نهائی پروژه. موسسه تحقیقات شیلات ایران.٤٦ صفحه.

۱۱-مقیم، م. و فضلی، ح. ۱۳۷۷ بررسی وضعیت کنونی ذخائر ماهیان خاویاری در سواحل جنوبی دریای خزر. اولین سمپوزیوم ملی ماهیان خاویاری، ۲۵-۲٤ آذر ۱۳۷۷، رشت، خلاصه مقالات، ص ۲.

12- Alavi,S.M.H.; Linhart,O.; Coward,K. and Rodina,M. 2008 Fish spermatology: Implications for aquaculture management. In: Fish spermatology, (Eds: Alavi, S.M.H.; Cosson, J.; Coward, K. & Rafiee,G.).Alpha Scientific Ltd,Oxford, p:397-460..

13- Baradaran Noveiri,S.; Alipour,A. & Pourkazemi, M. 2007 Fertilization test of Persian sturgeon (Acipenser persicus) spermatozoa after 5 years cryopreservation. In: The 1st International workshop on biology of fish sperm (Ed: Linhart, O .) ,

Vodnany, Czech Rep., pp 68-69.

14- Bauer, A. 1997 Overview: Economic importance and conservation of sturgeons. In: Sturgeon stocks and caviar trade workshop. (Eds: Bristein, .J.;Bauer, A. & Kaiser-Pohlmann,A.) IUCN,Gland,Switzerland, p:1-7.

15- Billard,R.; Cosson,J. Noveiri, S.B. & Pourkazemi,M. 2004 Cryopreservation and short – term storage of sturgeon sperm, A review. Aquaculture, 236: 1-9.

16- Billard, R.; Cosson,J.;Perchec,G. & Linhart,O. 1995 Biology of sperm and artificial reproduction in carp. Aquaculture, 129: 95-112.

17- Billard,R. & Lecointre, G. 2001 Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. Rev.Fish Biol.Fish. 48:1164-1178.

18- Birstein, V. J. 1993 Sturgeon and paddlefishes: Threatened fishes in need to conservation. Cons.Biol.,7(4): 773-787.

19- _ Blesbois, E. & Labbe, C. 2003 Main improvements in semen and embryo cryopreservation for fish and fowl. In: Workshop on cryopreservation of animal genetic resource in Europe (Eds:Planchenault D.), Paris, pp 55-56.

20- Cherpanov,V.V. and Kopeika,E.F.1999. Cryopreservation and low temperature storage of sturgeon sperm. J.Appl.Ichthyol., 15(4-5):310-311

21- Chebanov, M. & Billard, R. 2001 The culture of sturgeons in Russia: production of juveniles for stocking and meat for human consumption. Aquat.Living Resour., 14: 375-381.

22- Cosson, J. 2008 Methods to analyze the movement of fish spermatozoa and their flagella. In: Fish spermatology, (Eds: Alavi, S.M.H.; Cosson, J.; Coward, K. & Rafiee, G.).Alpha Scientific Ltd,Oxford, p:63-102.

23- Dzuba, B.B.; Kopeika, E.F.; Cherepanov, V.V. and Drokin, I. 1999 Sturgeon sperm quality after 6 years of cryopreservation J.Appl. Ichthyol. 15(4-5): 312.

24- Glogowski,J.; Kolman, R.; Szcepkowski, M.; Horvath,A.; Urbanyi,B.; Sieczynski,P.; Rzemieniecki,A.; Domagala, J.; Demianowicz,W.; Kowalski,A. & Ciereszko,A. 2002 Fertilization rate of Siberian sturgeon (Acipenser baeri, Brandt) milt cryopreserved with methanol. Aquaculture, 211: 367-373.

25- Holcik, J. 1989 The freshwater fishes of Europe, Vol.I., Part II. Acipenseriformes, Aula-Verlag, Weisbaden, 470 p.

26- Holcik,J.; Klindova, A.; Masar,J. & Meszaros,J. (2006) Sturgeons in the Slovakian rivers of the Danube river basin: an overview of their current status and proposal for their conservation and restoration. J.Appl. Ichthyol., 22(1): 17-22.

27- Ingerman,R.; Holcomb,M.; Robinson,M. and Cloud, J.(2002) Carbon Dioxide and pH affect sperm motility of white sturgeon (Acipenser transmontanus).J.Exp.Biol. 205:2885-2890

28- IUCN (2007) IUCN Red List of Threatened Species. www.iucnredlist.org. Downloaded on 28 October 2007. Gland, Switzerland,

29- Ivanov, V.P. & Vlasenko, A.D. 2001 The relic fish of the Caspian Sea, The sturgeons. Fish Farm. Fish., 1: 20-21.

30- Jahnichen, H.; Warnecke,W.; Trolsch,E.; Kohlman,K.; Bergler,H. and Pluta,H.(1999) Motility and fertilizing capacity of cryopreserved Acipenser ruthenus . sperm. J.Appl. Ichthyol.15: 204-206.

31- Kopieka, E. F., Williot,P., 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.

32- Lahnsteiner, F.; Berger, B.; Horvath,A. and Urbanyi,B. 2004 Studies on the semen biology and cryopreservation in the starlet,

Acipenser ruthenus L. Aquacul.Res. 35(6): 519-528.

33- Lenhardt, M.; Finn,R.N.; Cakic,P.; Kolarevic,J.; Krpo-Cetkovic,J.; Radovic,I. & Fyhn,H.J. 2004 Analysis of the post-vitellogenic oocytes of the three species of the Danube Acipenseridae: beluga (Huso huso), Russian sturgeon (Acipenser gueldenstaedtii) and starlet (Acipenser ruthenus). Bel.J. Zool., 134(1):77-80.

34- Linhart.O.; Mims,S.; Gomelsky,B.; Cvetkova,L.I.; Cosson,J.; Rodina,M.; Horvath,A. & Urbanyi, B. 2006 Effect of cryoprotectants and male on motility parameters and fertilization rate in paddlefish (Polyodon spathula) frozen-thawed spermatozoa. J.Appl. Ichthyol. ,22(1): 389-394

35- Liu,L.; Wei,Q.; Guo,F.; Zhang,J. & Zhang,T. 2006 Cryopreservation of Chinese sturgeon (Acipenser sinensis) sperm. J Appl. Ichthyol., 22(1): 384-388.

36- Mims,S.D; Tsvetkova,L.I.; Brown,G.G. and Gomelski,B.I. 2000 Cryopreservation of sperm of sturgeon and paddlefish. In: Cryopreservation in aquatic species. Adv.Wold Aquacult. Vol 7 (Eds): Tiersch,T. and Mazil,P.M. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, pp.123-129.

37- Park, C. & Chapman, F.A. 2005 An extender solution for the short- term storage of sturgeon semen. North Am. J. Aquacul., 67:52-57.

38- Pourkazemi, M. 2006 Caspian Sea sturgeon conservation and fisheries: Past, present and future. J. Appl. Ichthyol., 22(1): 12-16.

39- Raymarkers, C. 2002 Conservation and broodstock management. International trade in sturgeon and paddlefish species, The effect of CITES listing. Intern. Rev. Hydrobiol., 87(5-6): 525-537.

40- Sokolov,L.I. & Berdichevskii, L. S. 1989 Acipenseriformes. In: The freshwater fishes of Europe. General introduction to fishes,Acipenseriformes,(Eds: Holcik,J.), AULA-Verlag, Wiesbagen, pp:148-149.

41- Tsvetkova,L.I., Cosson,J., Linhart,O., Billard, R., 1996 Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawed spermatozoa in sturgeons, Acipenser baerii and A. ruthenus. J.Appl. Ichthyol. 12,107-112.

42- Urbanyi,B.; Horvath, A. & Kovacs,B. 2003 Successful hybridization of Acipenser species using cryopreserved sperm. Aquac. Int., 12:47-56.

43- -Williot,p.; Arlati,G.; Chebanov, M.; Gulyas,T.; Kasimov,R.; Kirschbaum, F.; Patriche,N.; Pavlovskaya,L.P.; Poliakova, L.; Pourkazemi,M.; Kim,Y.; Zhaung,P. & Zholdasova,I.M. 2002 Conservation and broodstock management, Status and management of Eurasian sturgeons: An overview. Intern. Rev. Hydrobiol., 87(5-6): 483-506.

44- Williot,P.; Brun, R.; Rouault,T.; Pelard,M.; Mercier,D. & Ludwig.A. 2005 Artificial spawning in cultured starlet sturgeon, Acipenser ruthenus L., with special emphasis on hermaphrodites. Aquaculture, 246: 263-273.