✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۵۵، تابستان ۱۳۸۱

اثر مراحل انجماد بر چگونگی تحرک اسپرم ماهی کپور (*Cyprinus carpio*)

● **شهروز برادران نویری**، ● **محمد پورکاظمی**، انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری رشت، بخش ژنتیک
● **پریتا کوچینین** و ● **وحید یاوری**، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی

تاریخ دریافت: دیماه ۱۳۸۰ تاریخ پذیرش: خرداد ماه ۱۳۸۱

چکیده

در این مطالعه، به ارزیابی نوع حرکت و مدت زمان تحرک اسپرم‌های ماهی کپور پس از انجمادزدائی و مقایسه آن با اسپرم تازه پرداخته شد. عملیات انجماد شامل رقیق کردن اسپرم‌ها در محلول‌های مختلف، استفاده از پایوت ۰/۵ میلی‌لیتر و سرنگ ۱میلی لیتر جهت نگهداری اسپرم‌ها و سرمادهی چهارمرحله‌ای می‌شد. سپس تحرک اسپرم‌های شاهد و اسپرم‌های انجمادزدائی شده با استفاده از مقیاس تحرک سه مرحله‌ای (حرکت مستقیم، دورانی و زنشی) مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. طی تحقیق حاضر مشخص گردید که با میانگین تعداد اسپرم ماهی کپور معادل $۲۷/۰۸۳\times۱۰^{۹}$ سلول در هر میلی‌لیتر و تحرک اسپرم‌های اولیه بالای ۸۰٪، مدت زمان حرکات مستقیم و دورانی در اسپرم‌های انجمادزدائی شده از اسپرم‌های تازه کمتر بوده ولی زمان حرکت زنشی در این اسپرم‌ها، بیشتر می‌باشد. این موضوع بیانگر آن است که انجام مراحل انجماد به طریق ذکر شده از قدرت حرکات مستقیم و دورانی اسپرم‌های ماهی کپور که در امر لقاح بسیار حائز اهمیت است، می‌کاهد.

کلمات کلیدی: کپور، تحرک اسپرم، انجماد اسپرم، رقیق کننده، درصد لقاح

✓ **Pajouhesh & Sazandegi, No 55 PP: 6-10**

The effects of cryopreservation on movement patterns of carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa

By: Baradaran Noveiri., S. International Sturgeon Research Institute, P.O.Box 41635-3464, Rasht. Iran. Pourkazemi, M. International Sturgeon Research Institute, P.O.Box 41635-3464, Rasht. Iran.; Kouchinian, P. and Yavari, V. Faculty of Marine Sciences, Shahid Chamran University, Ahwaz, Iran.

The present study involved the duration of motility due to different patterns of movement and the fertility of intact and cryopreserved carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. Cryopreserved sperms were prepared in different extenders and volumes by a four - step freezing rate. Movement of intact and thawed samples were considered according to three-pattern scale (progressive, rotatory and oscillatory). With a mean carp sperm density of $27.083x10^{9}$ cell/ml and motility rate of above 80%, the duration of progressive and rotatory patterns were lower in cryopreserved sperm as compared with those in intact samples, however the duration of oscillatory movement was greater in the cryopreserved samples. Thus it is evident that this protocol lowered the progressive and rotatory movements of cryopreserved sperms which are important to produce high fertilization rates.

Keywords: Carp, Sperm motility, Cryopreservation, Extenders, Fertilization rate.

مقدمه

حفاظت، نگهداری و طولانی ساختن عمر اسپرم‌ها وابسته به تقلیل تحرک و فعالیت این سلول‌ها است که از طریق نگهداری در دماهای بسیار پایین امکان‌پذیر می‌باشد. چندین سال است که از این تکنیک برای نگهداری اسپرم نژادهای مختلف جانوران از جمله گاو، اسب، گاومیش، گوسفند، بز، خوک (۵)، قوچ (۴)، غاز (۱۴)، خروس (۱۹) و انسان (۱۹) استفاده می‌شود و این کار امروزه به صورت یک فعالیت روزمره در آمده است (۱۸).

چنانچه تکنیک‌های انجماد اسپرم در آبزیان نیز به طور مناسب به اجرا در آیند، از این روش می‌توان به عنوان یک ابزار مدیریتی قوی برای نیل به اهداف زیر استفاده نمود(۶):

کمک به جلوگیری از انقراض نسل انواع گونه‌های در معرض خطر، در اختیار بودن اسپرم برای تمام طول سال، امکان هیبریدگیری در سطوح رده‌بندی (Taxa) مختلف، کاهش تعداد مولدین نر نگهداری شده در کارگاه‌ها و مزارع پرورش ماهی، کاهش اثرات استرس حمل و نقل بر مولدین نر، پوشش دادن عدم کفایت اسپرم دهی مولدین بعضی از گونه‌ها در شرائط نگهداری در کارگاه، تهیه بانک اسپرم به عنوان پایه‌ای برای ایجاد بانک ژنی، کنترل و بهبود خزانه ژنی مولدین کارگاهی موجود و کاربردهای خاص تحقیقاتی. در طول مراحل انجماد، سلول‌ها با چند استرس مواجه هستند که از جمله آن‌ها می‌توان به کاهش درجه حرارت، اثرات فیزیکی و مکانیکی یخ تشکیل شده خارج سلولی و افزایش غلظت مواد محلول بیرون سلولی طی مراحل مختلف اشاره کرد(۳۱).

تحرک اسپرم معیار بسیار مناسبی جهت ارزیابی اثرات انجماد بر اسپرم است (۲۷). طرح تحرک اسپرم ماهی کپور، مثل سایر ماهیان با لقاح خارجی است. به چند روش می‌توان تحرک اسپرم را ارزیابی کرد که معمولی‌ترین روش، تعیین درصد تحرک سلول‌ها و زمان تحرک آن‌ها است. درصد تحرک اسپرم‌های متحرک، به فشار اسمزی و طبیعت یون‌های موجود در محلول بستگی دارد. میزان تحرک اسپرم در مولدین مختلف و فصول مختلف سال، بسیار متفاوت است(۹).

در این تحقیق اثرات مراحل انجماد بر نوع و مدت زمان تحرک اسپرم‌های ماهی کپور مورد بررسی و مقایسه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

تعداد سی و یک قطعه از مولدین کپور نر در این تحقیق از کارگاه تکثیر و پرورش ماهی شهید انصاری، رشت و همچنین کارگاه تکثیر و پرورش گلباف رشت تهیه شدند. آزمایشات بررسی تحرک اسپرم ماهی کپور و انجماد آن، از تاریخ ۷۷/۲/۲ در انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری آغاز گردید. آخرین آزمایشات در مورد لقاح در تاریخ ۷۷/۴/۱ صورت گرفت.

مولدین ۲۴ ساعت قبل از اسپرم‌گیری و تخم‌کشی در آب ۲۰ درجه سانتی‌گراد تحت تزریق عصاره هیپوفیز ماهی کپور، به میزان ۲/۵ mg/Kg وزن بدن برای ماده‌ها و ۱ mg/Kg وزن بدن برای نرها قرار گرفتند (۷، ۳۰). اسپرم‌گیری از مولدین نر با استفاده از ماده بیهوش کننده MS-۲۲۲ با غلظت ۱۰۰ mg/L انجام گرفت (۱۰، ۱۵). نمونه‌های خونی یا نمونه‌های حاوی ادرار یا مدفوع جهت انجماد مورد استفاده قرار نگرفتند (۸، ۲۶).

جهت بررسی تحرک اسپرم‌های استحصال شده، ابتدا یک لام تمیز را در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰۰ X (Nikon, Labophot 2, Japan) که فاصله عدسی شیئی آن از قبل تنظیم شده بود، قرار داده (۷) و یک قطره آب بر روی آن گذاشته می‌شد. سپس یک قطره کوچک اسپرم را در وسط قطره آب، روی لام قرار داده (۳۴) و بلافاصله با یک لامل، مخلوط حاصله را هم زده و لامل بر روی آن قرار داده می‌شد. تحرک اسپرم‌ها با استفاده از روش سه مرحله‌ای بررسی و تعیین شد (۲۰، ۲۱، ۳۰). زمان‌سنجی تحرک اسپرم‌ها با استفاده از کرونومتر دستی با دقت ۰/۰۱ ± ثانیه (ALBA W 921-402B, Japan) و از لحظه تماس اسپرم با آب، محاسبه شد. برای شمارش اسپرم‌ها و تعیین تراکم آنها از لام هموسیتومتر (Thoma heamocytometer, W.Germany) با دقت ۰/۰۰۲۵ ± میلی متر مربع استفاده شد.

چهار محلول رقیق کننده مورد استفاده در این تحقیق شامل محلول‌های Alsever (۲۹)، محلول Kurokura (۲۳)، محلول Linhart (۲۸) و محلول Sucrose (۷) بوده و ترکیب شیمیایی آنها به شرح جدول ۱ می‌باشد. به هر یک از محلول‌ها ۱۵ درصد DMSO نیز افزوده شد (۹).

جهت مخلوط کردن اسپرم‌ها با محلول‌های رقیق کننده، ابتدا اسپرم و محلول‌های رقیق کننده به طور جداگانه در مخلوط آب و یخ (۱-۰ درجه سانتیگراد) به مدت ۵ دقیقه هم دما شده و سپس مخلوط می‌شدند (۷).

پس از تهیه مخلوط اسپرم و رقیق کننده و پر کردن محفظه‌ها، مرحله سرمادهی به روش زیر انجام گرفت: نگهداری در ۱۰ سانتی‌متری بالای سطح ازت مایع به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳ سانتی‌متری بالای سطح ازت مایع به مدت ۳ دقیقه دیگر، پس از آن مماس با سطح ازت مایع به مدت ۲ دقیقه و سرانجام فرو بردن در ازت مایع (۲۰، ۲۹) (تصویر شماره ۱).

کیفیت نمونه‌ها ۲۴ ساعت بعد، پس از انجمادزدایی بررسی می‌شد. انجماد زدایی در آب ۴۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ثانیه برای پایوت‌ها (۲۸، ۳۰)، ۴۵ ثانیه برای سرنگ انسولین (۱۳) انجام شد.

پس از انجمادزدایی محفظه‌های حاوی نمونه اسپرم، آزمایش لقاح اسپرم‌های منجمد با نسبت ۰/۵ میلی لیتر اسپرم خالص با ۵۰ میلی‌لیتر تخم تازه مولدین ماده (۱۷، ۲۰) در تشتک‌های پلاستیکی انجام گرفت. برای رفع چسبندگی تخم‌ها از محلول لقاح وایناروویچ استفاده گردید (۹). طریقه لقاح اسپرم شاهد نیز در روز اسپرم‌گیری به روش مشابه بود.

بررسی‌های آماری به کمک بسته نرم‌افزاری Statgraph ver. 5 و آزمون t (t test) انجام گرفت.

محلول / نوع ترکیب	Al.	Ku.	Li.	Su.
NaCl	۰/۴	۰/۴۴	۰/۷۵	
$CaCl_2$		۰/۰۲۲		
KCl		۰/۶۲	۰/۰۳۸	
NaH_2PO_4, H_2O				
$MgSO_4$, $7H_2O$				
$NaHCO_3$		۰/۰۲	۰/۲	
Glucose	۲/۰۵		۰/۱	
$C_6H_5O_7Na_3$, $2H_2O$	۰/۸			
Sucrose				۲۰/۵۳۸
$MgCl_2$		۰/۰۰۸		

جدول ۱: ترکیب شیمیائی محلول‌های رقیق‌کننده (بر حسب گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر)

نتایج

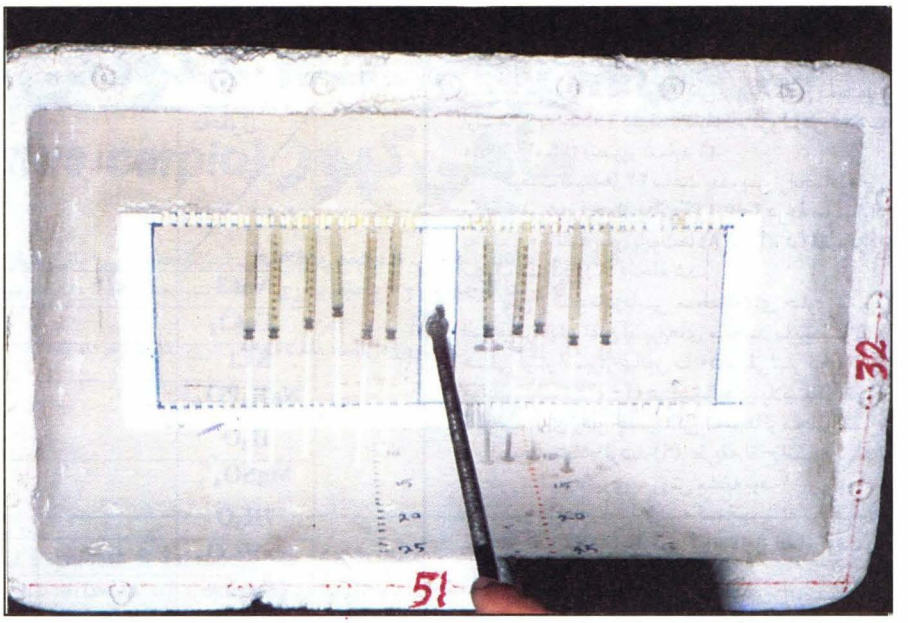
با بررسی‌های میکروسکوپی مشخص شد که بهترین رقت برای شمارش اسپرم‌های کپور، رقت ۱:۴۰۰ است. زیرا با توجه به تراکم بالای اسپرم ماهی کپور، تفکیک اسپرم‌ها در این رقت، در زیر میکروسکوپ به خوبی انجام شده و هر اسپرم از اسپرم‌های مجاور، به خوبی قابل تشخیص است (تصویر شماره ۲).

حداقل تراکم اسپرم نمونه‌ها و حداکثر میزان آن در این تحقیق، به ترتیب $۱۹/۲۱۲\times۱۰^{۹}$ و $۳۶/۶۰۹\times۱۰^{۹}$ اسپرم در هر میلی‌لیتر و میانگین آن برابر $۲۷/۰۸۳\times۱۰^{۹}$ اسپرم در هر میلی‌لیتر بوده است. مدت زمان تحرک اسپرم‌های مورد بررسی بر حسب نوع حرکت (Progressive, Rotatory, Oscillatory) در جدول ۲ آمده است. همچنین درصدهای لقاح، تخم‌های چشم زده و لاروهای بدست آمده از اسپرم‌های منجمد در محلول‌های رقیق کننده مختلف در جداول ۳ و ۴ آمده است (۳).

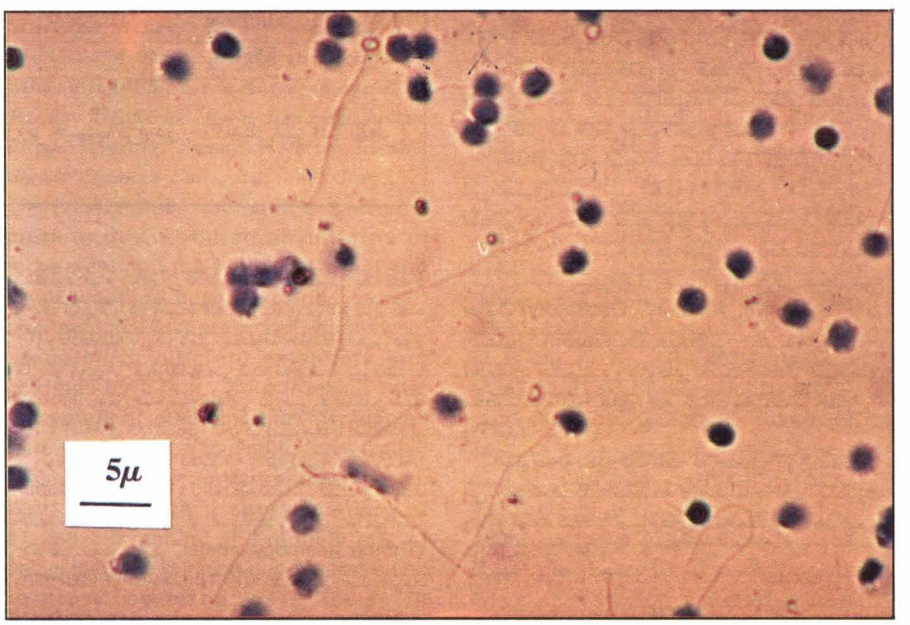
با توجه به نتایج ارائه شده در جداول ۳ و ۴، مشخص می‌گردد که در کلیه تیمارها، درصد لقاح، تخم چشم زده و لارو تولید شده از اسپرم‌های منجمد، از شاهد کمتر می‌باشد.

بحث

تحرک اسپرم ماهی کپور و مدت زمان این تحرک همراه با بررسی نحوه حرکت آن، با توجه به سه نوع حرکت رو به جلو، دوار و زنشی (Progressive Rotatory, Oscillatory) یکی از عملی‌ترین راه‌های ارزیابی بقای اسپرم (۹) و قابلیت لقاح آن پس از انجمادزدایی می‌باشد (۳۵). قابلیت حرکت اسپرم، نوع و سرعت حرکت آن بلافاصله پس از القاء تحرک طی زمان کوتاهی تغییر می‌کند (۹). دسته بندی سه مرحله‌ای حرکت اسپرم توسط Ravinder و همکاران (۳۲) برای اسپرم ماهی کپور، توسط Moczarski و Koldras (۲۲) برای اسپرم ماهی *E. lucius* و توسط



عکس شماره ۱- سرمادهی تدریجی اسپرم‌ها



عکس شماره ۲- نمونه اسپرم‌های انجمادزدائی شده ماهی کپور با تاژک مشخص

Koldras و Moczarski (۳۲) بـرای اسـپرم مـاهی *T. tinca* نیز در نظر گرفته شده است. بعضی از محققین به جهت مشکلات موجود در این زمینه فقط درصد تـحرک اسپرم را بدون هیچگونه دسته‌بندی حرکتی مورد توجه قرار داده‌اند، در حالی که مدت زمان تحرک یکی از عوامل بسیار موثر در ارزیابی کیفیت اسپرم می‌باشد (۱۲).

با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش، مشخص می‌گردد که میانگین مدت زمان حرکت رو به جلو (a = ۰/۰۱) و دورانی (a= ۰/۱) در اسپرم ماهی کپور در حد معنی‌داری (۲) پس از انجمادزدائی کاهش می‌یابد (به ترتیب از ۳۳/۵۳ ثانیه به ۱۹/۸۶ ثانیه در حرکت مستقیم و از ۲۴ ثانیه به ۱۵/۱۴ ثانیه در حرکت دورانی). اما نوع حرکت زنشی از ۳۱/۰۷ ثانیه در اسپرم تازه به ۵۱/۸۸ ثانیه در اسپرم پس از انجمادزدایی افزایش می‌یابد (a= ۰/۰۱). در ضمن حدود تغییرات (Range) این محدوده زمانی در هر سه نوع حرکت اسپرم پس از انجمادزدایی بسیار وسیع‌تر از اسپرم‌های تازه در ماهی کپور می‌باشد. در تحقیق Bieniarz و Koldras (۲۰) مشخص شده است که درصد اسپرم‌های با حرکت رو به جلو پس از انجمادزدایی کم می‌شود. این محققین همچنین کاهش درصد تحرک اسپرم‌های با حرکات دوار و زنشی را نیز گزارش کرده‌اند. طی نتایج حاصله از این مطالعه مشخص شده است که میانگین مدت زمان حرکت رو به جلوی اسپرم‌ها پس از انجمادزدائی صفر بوده و حرکات دوار و زنشی هر یک به ترتیب معادل ۳۰ و ۱۰۶ ثانیه بوده است (۲۰). در مطالعه مشابهی سرعت حرکت اسپرم‌ها در حرکت رو به جلو در اسپرم ماهی کپور بیش از چهار برابر سرعت حرکت آن در حرکت دوار گزارش شده (۳۲) و تاکید گردیده است که سرعت حرکات اختصاصی اسپرم کپور از جمله سرعت خطی رو به جلو و سرعت طی منحنی در حرکت دوار به سرعت با گذشت زمان کاهش می‌یابد. Bayrle و Stein نیز در تحقیق خود، حرکت رو به جلو را در اسپرم انجمادزدایی شده قزل آلای قهوه‌ای *(S. trutta)* مشاهده کرده در حالی که در مورد اسپرم ماهی کپور، پس از انجماد زدایی فقط حرکت دورانی مشاهده نمودند (۳۳). نتیجه مشابهی در رابطه با کاهش طول کل مدت تحرک اسپرم و همزمان با آن افزایش مدت زمان حرکت زنشی در مورد اسپرم اردک ماهی نیز گزارش شده است (۲۲).

تحرک اسپرم، عامل مهمی برای ارزیابی قدرت بقای آن است (۳۵). اما تحرک، لزوماً شاخص مناسبی برای ارزیابی قابلیت لقاح نیست (۶). در مورد اسپرم بسیاری از گونه‌ها، این نظریه که تنها بررسی تحرک کافی نبوده و باید قابلیت باروری با لقاح نیز مورد بررسی قرار گیرد، توسط بسیاری از محققین مورد اشاره قرار گرفته است (۲۰).

این مطالعه نشان می‌دهد که اثرات انجماد بر اسپرم‌های ماهی کپور تا چه اندازه می‌تواند بر نوع حرکت آن‌ها تأثیرگذار بوده و در نتیجه از قدرت لقاح مربوطه بکاهد و به احتمال زیاد این مسئله ناشی از تأثیر مراحل انجماد بر کاهش مدت زمان حرکت مستقیم اسپرم‌ها است. تغییر نوع حرکت اسپرم‌ها می‌تواند برآیندی از تاثیر یون‌های محیط، محتوای انرژی باقی مانده سلولی (۲۴)، میزان تخریب غشای سیتوپلاسمی یا نارسائی‌های به وجود آمده درون تاژک باشد (۳۲). این کاهش سرعت حرکت و تغییر نوع حرکت در انواع Salmonidae (۲۴) و Siganidae (۲۵) نیز گزارش شده است. به همین دلیل در مورد بسیاری از ماهیان گفته شده که با افزایش نسبت مصرفی اسپرم به تخم می‌توان به درصد لقاح بیشتری دست یافت. اما این رابطه یک رابطه مستقیم خطی نیست. مثلاً Koldras، Mejza (۲۱) پی بردند که با ۲۰۰ برابر کردن این نسبت در لقاح ماهی کپور می‌توان موفقیت لقاح را حداکثر تا ۶ برابر افزایش داد. این محققین بهترین نسبت اسپرم مصرفی در لقاح ماهی کپور را ۱:۵۰ تا حداکثر ۱:۱۰۰ (نسبت حجمی اسپرم به تخم) می‌دانند. نتیجه مشابهی در مورد کپور در آزمایش Kurokura و همکاران (۲۳) و در مورد *T. tinca* نیز در آزمایش Bieniarz و Koldras (۲۰) ارائه شده است. این موضوع در مورد ماهیان سایر خانواده‌ها از جمله *Oncorhynchus mykiss* (۱۱)، *O. masou* (۳۶) *Micropogonias undulatus* (۱۵) و ماهیان خاویاری (۱) نیز به اثبات رسیده است.

نوع حرکت / زمان (ثانیه)	نوع حرکت اسپرم تازه (n= ۲۵)			نوع حرکت اسپرم پس از انجمادزدایی (n= ۲۵)		
	P	P+R	P+R+O	P	P+R	P+R+O
حداقل	۲۵	۳۵	۶۳	۰	۶	۲۶
حداکثر	۴۹	۷۷	۱۰۲	۴۰	۱۱۰	۲۳۰
میانگین ± SD	۳۳/۵۳±۸/۷	۵۷/۵۳±۱۱/۱	۸۸/۶±۱۱/۴	۱۹/۸۶±۱۴	۳۵±۲۵/۳	۸۶/۸۸±۴۲/۶

جدول ۲ : میانگین مدت زمان تحرک اسپرم‌های مورد بررسی بر حسب نوع حرکت
(P = حرکت رو به جلو، R = حرکت دوار، O = حرکت زنشی)

نام محلول	مدت زمان نگهداری در ازت مایع (روز)	نسبت اسپرم به تخم	درصد لقاح نمونه نسبت به شاهد
AL.	۷	$۳۱۷/۱۲\times۱۰^{۳}$	۴۵
K.	۷	$۳۱۷/۱۲\times۱۰^{۳}$	۲۰/۵
Li.	۷	$۳۱۷/۱۲\times۱۰^{۳}$	۲۳/۳۲
Su.	۷	$۳۱۷/۱۲\times۱۰^{۳}$	<۲/۵

جدول ۳ : درصد لقاح به دست آمده از اسپرم‌های منجمد شده ماهی کپور در رقیق‌کننده‌های مختلف

نام محلول	درصد تخم چشم زده نمونه نسبت به شاهد	تعداد تخمهای معرفی شده در ویس ها	تعداد لاروهای شمارش شده پس از ۶ روز انکوباسیون	درصد تبدیل تخم به لارو
Al.	۴۷/۸۱	۱۲۵۹۰	۲۸۵۰	۲۲/۶۳
K.	۱۸/۴۵	۱۳۳۸۰	۹۸۵	۷/۳۶
Li.	۱۹/۱۱	۱۲۲۰۰	۳۸۰	۳/۱۱
Su.	۶/۳۶	۱۱۸۰۰	۲۶۰	۲/۲۰

جدول ۴ : مقایسه درصد تخم چشم‌زده و لارو به دست آمده از اسپرم منجمد ماهی کپور در رقیق‌کننده‌های مختلف

سپاسگزاری

بدین وسیله نگارنده مراتب سپاس خود را از راهنمائی‌های ارزنده جناب آقای دکتر محمد پورکاظمی، سرکار خانم دکتر پریتا کوچینین و جناب آقای دکتر وحید یاوری اعلام می‌دارد.
همچنین از همکاری صمیمانه جناب آقای مهندس محمد طلوعی، سرپرست محترم مرکز تکثیر و پرورش ماهیان گرمابی شهید انصاری رشت و همکاران محترمشان و جناب آقای دکتر سعید رحمت سمیعی، مدیریت محترم مزرعه پرورش ماهیان گرمابی گلباف رشت و همکاران محترمشان در بخش تکثیر سپاسگزاری می‌نمایم.

منابع مورد استفاده

۱- آذری تاکامی، قباد و کهنه شهری، مجید. ۱۳۵۳. تکثیر مصنوعی و پرورش ماهیان خاویاری، انتشارات دانشگاه تهران، ص ص ۷۲-۶۵.
۲- اهدائی، بهمن. ۱۳۷۳. آمار تجربی عمومی. انتشارات دانشگاه شهید چمران، دانشکده کشاورزی. بخش ۸، ص ص ۳۱۱-۲۵۵.
۳- برادران نویری، شهروز. ۱۳۷۷. انجماد اسپرم ماهی کپور. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم دریائی، ۱۰۴ صفحه.
۴- جعفری آهنگری، یوسف، آکسفورد، راجرز و آپ دوی، یوآن. ۱۳۷۳. انجماد اسپرم قوچ در محلول هیپرتونیک حاوی رافینوز. پژوهش و سازندگی، شماره ۲۵، زمستان ۷۳، ص ص ۹۷-۹۱.
۵- عدل، فیروز و قدوسی، جواد. ۱۳۵۴. تلقیح مصنوعی دام و طیور. وزارت کشاورزی و منابع طبیعی، انتشارات سازمان دامپزشکی کل کشور. ۲۸۱ صفحه.
6- Babiak, I., J. Glogowski, M.J. Luczynski, D. Kucharczyk & M. Luczynski. 1995. Cryoprotection of the milt of the northern Pike. J. Fish Biol. 46: 819-828.
7- Babiak, I., J. Glogowski, E. Brzuska, J. Suemiec and J. Adamek. 1997. Cryoprotection of sperm of common carp, *Cyprinus carpio* L. Aquacul. Res., 28: 567-571.
8- Baynes, S. M. and A. P. Scott. 1987. Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: The influence of sperm quality, egg quality and extender composition on post-thaw fertility. Aquaculture. 66: 53-67.
9- Billard, R., J. Cosson, G. Perchec and O.Linhart. 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. Aquaculture, 129: 95-112.
10- Christ, S.A., G.P.Toth, H. W. McCarthy, J. A. Torsella and M.K, Smith. 1996. Monthly variation in sperm motility in common carp assessed using computer-assisted sperm anaylsis (CASA). J. Fish Biol., 48: 1210-1222.
11- Cloud, J.G., W. H. Miller and M.J.Levanduski. 1990. Cryopreservation of sperm hatchery populations. Prog. Fish. Cult., 52:51-53.
12- Cosson., J. and O. Linhart. 1996. Paddlefish (*Polyodon spathula*) spermatozoa: Effects of potassium and pH on motility. Folia Zoologica, 45(4): 361-370.
13- Drokin, S.I., and E.F.Kopeika. 1997. Cryopreservation and phospholipid content of spermatozoa of some sturgeon species. In: Abstract Bull. of 3rd Int. Symp. Sturgeon, Piacenza, Italy, July 8-11, 1997.
14- Gee, G. and T.J. Sexton. 1990. Cryogenic peresvation of semen from the Aleutian Canada goose (*Branta canadensis leucopareia*). Zool Biol., 9(5): 361-371.
15- Gwo, J. C., K. Strawn., M.T. Longnecker and C.R. Arnold. 1991. Cryopreservation of Atlanaic croaker spermatozoa. Aquaculture, 94: 355-375.
16- Hammerstedt, T.R.H. and J.K.Graham 1992. Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glaycerol. Cryobiology, 29(1): 26-38.
17- Huet, M. 1997. Textbook of fish culture, Breeding and cultivation of fish (2nd ed.) Fishing News Books. pp. 113-124.
18- Kerby J.H. 1983. Cryogenic preservation of sperm from striped bass. Trans. Am.Fish. Soc., 112(1): 86-94.
19- Khalifa, E., S. Oehninger, A.A.Acosta., M.Morshedi, L.Veeck, R.G.Bryzyski and S.J. Muasher. 1992. Successful fertilization and pregnancy outcome in vitro fertilization using cryopreserved/thawed spermatozoa from patients with malignant diseases. human Reporoduction. 7(1): 105-108.
20- Koldras, M. and k. Bieniarz. 1987. Cryopresercation of carp sperm. Pol. Arch. Hydrobiol., 34(10): 125-134.
21- Koldras, M. and T.Mejza. 1983. Effects of quantity and quality of carp sperm on egg fertilization success. Acta Ichthyologica et Piscatoria., 13(2): 83-92.
22- Koldras M and M. Moczarsk. 1983. Properties of pike, *Esox lucius* L. Milt and its cryopreservation. Pol. Arch. Hydrobiol, 30 (1): 69-78.
23- Kurokura, H., R. Hirano, M. Tomita and M. Iwahashi. 1984. Cryopreservation of carp sperm. Auqaculture, 37: 207-273.
24- Lahnsteiner, F.; B. Berger, ; T. Weismann and R.Patzner. 1995. Fine structure and motility of spermatozoa and composition of the seminal plasma in the perch. J. Fish Biol. 47, 492-508.
25- Lahnsteiner, F. and R.A.Patzner. 1999. Characterization of spermatozoa and eggs of the rabbitfish. J. Fish Biol. 55, 820-835.
26- Lahnsteiner, F.; T.Weismann and R.A. Patzner. 1997. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. Aquacul. Res., 28:471-479.
27- Linhart, O., R. Billard and J.P. Proteau. 1993. Cryopreservation of European catfish (*Silurus glanis* L.) spermatozoa. Aquaculture, 115: 347-359.
28- Linhart, O., Liehman, P. and P. Rab. 1983. The first results in cryopreservation of carp sperm. Buletin VURH Vodnany, 2:3-13.
29- Moczarski, M. 1977. Deep freezing of carp, *Cyprinus carpio* L. sperm. Bull. Lacad. Polo. Scie., 25(3): 187-190.
30 - Mocazrski, M. and M. Koldras. 1982. Properties of tench - *Tinca tinca* L -sperm and experiments with freezing it at -196°C. Acta Ichthyol. Piscatoria., 12(2): 41-49.
31- Muir, J.F. and R. J. Rolberts. 1993. Recent advances in aquaculture, vol. IV, Blackwell Scientific Publications., Pp. 295-336.
32- Ravinder, K.; K.Nasaruddin; K.C. Majumar and S.Shivaji. 1997. Computerized analysis of motility, motility patterns and motility parameters of spermatozoa of carp following short - term storage of semen. J. Fish Biol. 50, 1309-1328.
33- Stein H. and H. Bayrle. 1978. Cryopreservation of sperm of some freshwater teleosts. Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys., 18(4): 1073-1076.
34- Steyn, G.J. 1993. The effect of freezing rate on the survival of cryopreserved African sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) spermatozoa. Cryobiology, 30: 581-5690.
35- Stoss, J. 1983. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In Fish physiology, Vol Ix. Reprodluction, part B. Behaviour and fertility control. WS.Hoar, P.J. Randall & E.M. Donaldson. (eds) Academic Press, pp. 305-341.
36- Yamano, K., N.Kasahara, E. Yamaha and F. Yamazaki. 1990. Cryopreservation of masu salmon sperm by the pellet method. Bull. Fac. Fish., Hokkaido Unive., 41(4): 149-154.