View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور – پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور

عنوان :

بررسی مقدماتی امکان القای تریپلوئیدی با استفاده از شوک های گرمابی در ماهی بنی

مجری :
الهام جرفی

شماره ثبت
٤٧٨٠٠

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور

عنوان پروژه : بررسی مقدماتی امکان القای تریپلوئیدی با استفاده از شوک های گرمابی در ماهی بنی
شماره مصوب پروژه : ۸۷۰۱۱ – ۱۲ – ۷٤ – ۲
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : الهام جرفی
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) :
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : الهام جرفی
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : سیدعبدالصاحب مرتضوی زاده، محمد سنجری، فرخ امیری، محمد یونس زاده فشالمی، منصور نیک پی، غلامرضا اسکندری، فرود بساک کاهکش
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : فرهاد امینی
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -
محل اجرا : استان خوزستان
تاریخ شروع : ۸۷/۷/۱
مدت اجرا : ۲ سال و ٦ ماه
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال۱۳۹۵
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

پروژه : بررسی مقدماتی امکان القای تریپلوئیدی با استفاده از شوک های گرمایی در ماهی بنی

کد مصوب : ۸۷۰۱۱ – ۱۲ – ۷۴ – ۲

شماره ثبت (فروست) : ۴۷۸۰۰ تاریخ : ۹۴/۷/۸

با مسئولیت اجرایی سرکار خانم الهام جرفی دارای مدرک تحصیلی کارشناسی ارشد در رشته مهندسی شیلات می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش اصلاح نژاد و تکثیر و پرورش آبزیان در تاریخ ۹۱/۱۰/۶ مورد ارزیابی و رتبه متوسط تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه

با سمت عضو هیئت علمی در پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه

چکیده ۱
۱- مقدمه ۲
۱-۱-آبزی پروری در جهان و تاثیر روش های ژنتیکی بر رشد این صنعت: پیشرفت ها و پتانسیل ها ۲
۱-۲-دستکاری کروموزومی آبزیان؛ القای تری پلوییدی ۴
۱-۳-مکانیسم القای تری‌پلوییدی ۵
۱-۴-عوامل موثر بر مکانیسم القای پلی پلوییدی ۷
۱-۵-روش های القای تریپلوییدی ۹
۱-۶-تشخیص تری پلوییدی در ماهی ۱۱
۱-۷-ویژگی های ماهیان تری پلویید ۱۳
۱-۸-تاریخچه القای تری پلوییدی ۱۵
۱-۹-ویژگی های زیستی ماهی بنی ۱۷
۱-۱۰-اهمیت ماهی بنی ۱۸
۲- مواد و روش ها ۲۰
۲-۱-تهیه مولدین، تکثیر ماهی بنی و القای شوک های دمایی بر روی تخم های استحصالی ۲۰
۲-۲-پرورش لارو و بچه‌ماهیان بنی ۲۵
۲-۳-انتقال بچه ماهیان به کارگاه در پایان فصل پرورش ۲۸
۲-۴-تهیه گسترش خونی از ماهیان ۲۸
۲-۵-ثبت اطلاعات مربوط به گویچه های قرمز ۲۹
۲-۶-آنالیز آماری و تحلیل داده‌ها ۲۹
۳-نتایج ۳۱
۳-۱-تکثیر و القای تری پلوییدی در ماهی بنی ۳۱
۳-۲-ماندگاری تخم ها و لاروها ۳۱
۳-۳-پرورش در استخر ۳۳
۳-۴-وضعیت رشد بچه ماهیان در دوره پرورش ۳۴

عنوان	«فهرست مندرجات »	صفحه

۵-۳-نتایج بررسی سلول های خونی ۳۶
۴- بحث و نتیجه گیری ۴۱
پیشنهادها ۴۴
منابع ۴۶
پیوست ۴۹
چکیده انگلیسی ۶۵

چکیده

ماهی بنی از گونه های بومی آب های شیرین کشور می‌باشد که در برنامه های سال های اخیر سازمان شیلات ایران جزء گونه های مطرح جهت معرفی به ترکیب پلی کالچر ماهیان گرم آبی پرورشی در استخرها بوده است. با توجه به بازارپسندی آن در منطقه جنوب هدف این پروژه در مرحله اول بررسی امکان القای تری پلوییدی در این ماهی و بازبینی پتانسیل های این گونه در پاسخ به شوک های القایی و کارایی نتاج از لحاظ میزان رشد و بازماندگی بود. عملیات القای تری پلوییدی بر روی ماهی بنی در دو گروه شوک های سرما و گرما (۲و ۴ درجه‌سانتیگراد برای سرما و ۳۴، ۳۶ و ۳۸ درجه‌سانتیگراد برای گرما) اجرا گردید. زمان شروع شوک دهی شامل ۲ و ۵ دقیقه بعد از لحظه لقاح و طول دوره شوک دهی ۳ و ۵ دقیقه بوده که مجموعاً ۴ حالت را برای هر دما ایجاد می‌نمود و با احتساب ۵ دمای بررسی شده کلاً ۲۰ تیمار و سه تکرار برای هر تیمار در این مطالعه بررسی شد. برای هر تیمار یک گروه شاهد بدون دریافت شوک روند متداول تکثیر مصنوعی را طی نمودند. تعیین وضعیت پلوییدی ماهیان با روش اندازه‌گیری ابعاد گویچه های قرمز خون (قطر کوچک و بزرگ هسته و سلول) و آنالیز آماری داده‌ها با کمک نرم افزار SPSS 16 و با استفاده از آزمون های T-test وANOVA انجام گردید. نتایج نشان داد که بیشترین بازده تری پلوییدی در ماهی بنی مربوط به تیمارهای ۳۴ درجه‌سانتیگراد، دو تا پنج دقیقه بعد از لقاح به مدت پنج دقیقه شوک دهی بود. از سویی بیشترین درصد افراد تری پلویید شده در گروه تیمار ۳۸ درجه‌سانتیگراد، ۲ دقیقه بعد از لقاح و به مدت ۳ دقیقه بوده اما به دلیل شرایط نامناسب میزان تلفات لاروها در این گروه موجب پایین‌آمدن بازده تری پلوییدی شده‌است. در افراد تری پلویید ابعاد هسته اریتروسیت ها به طور قابل توجهی افزایش یافت و مؤید این موضوع است که استفاده از روش بررسی گویچه های قرمز خونی می‌تواند به‌عنوان روش تشخیصی برای تعیین وضعیت پلی پلوییدی مورد استفاده قرار گیرد. نتایج این مطالعه حاکی از آن است که امکان القای تری پلوییدی در ماهی بنی با استفاده از شوک های دمایی وجود دارد.

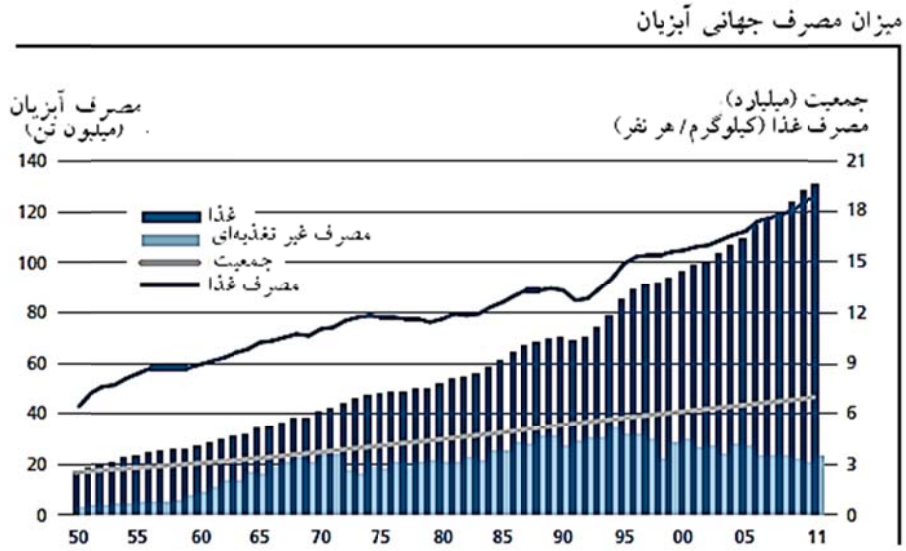
۱- مقدمه

۱-۱-آبزی پروری در جهان و تاثیر روش های ژنتیکی بر رشد این صنعت: پیشرفت ها و پتانسیل ها

آبزی‌پروری قدیمی‌ترین شکل کشاورزی می‌باشد که قدمت آن به ۲۰۰۰ سال قبل یا بیشتر در چین و امپراطوری روم برمی‌گردد. با این حال در دهه‌های اخیر این صنعت به صورت گسترده در سطح جهان به فعالیتی با تولید فراوان تبدیل شده است. تولیدات آبزی پروری از اوایل دهه ۸۰ به شکلی چشمگیر افزایش یافته و همراه با بالارفتن نیاز به تولیدات شیلاتی، کاهش منابع شیلاتی در آب های طبیعی و رشد روزافزون جمعیت انسانی همچنان بر اهمیت آن افزوده خواهد شد. زی‌توده آبزیانی که در واحد سطح قابل پرورش می‌باشند در مقایسه با جانوران خشکی‌زی بسیار بیشتر است بنابراین آبزی‌پروری می‌تواند به‌عنوان صنعتی کلیدی در جهت امنیت غذایی جهان مطرح باشد (دانهم، ۲۰۰۴).

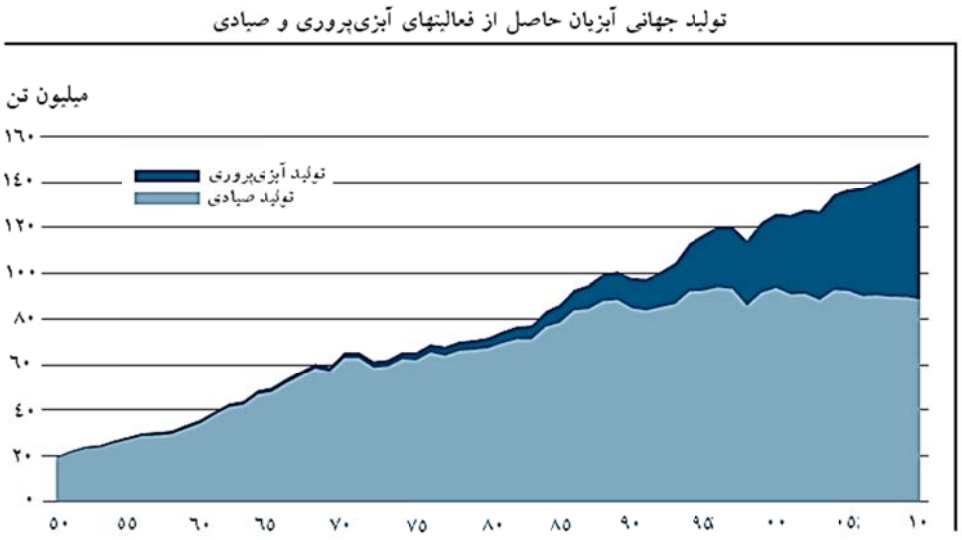
در حال حاضر سهم پروتئین جانوری استحصالی از کل فعالیت های شیلاتی در جهان، به‌صورت برداشت از منابع طبیعی همچون دریاها و آب های آزاد در بالاترین حد خود قرار دارد. براساس آخرین آمار سازمان خوار و بار جهانی (فائو)، کل محصول به دست آمده از فعالیت های شیلاتی شامل بخش های صیادی و آبزی‌پروری برابر با ۱۵۴ میلیون تن بوده که از این مقدار، بخش صیادی (شامل آب های دریای و داخلی) معادل ۹۰/۴ میلیون تن و فعالیت های آبزی‌پروری نیز ۶۳/۶ میلیون تن را به خود اختصاص داده‌است. بسیاری از ذخایر ماهیان مطرح و عمده در جهان به لحاظ برداشت های بی رویه، کاهش شدیدی را نشان می دهند و با توجه به وضعیت فعلی نمی توان افزایش بیشتری را انتظار داشت. هاردی (۱۹۹۹) پیش‌بینی نموده است که در سال ۲۰۲۵ در نتیجه کاهش صید ذخایر طبیعی و افزایش نیاز انسانی کمبود تولیدات دریایی ۵۵ میلیون تن خواهد بود. با فرارسیدن سال ۲۰۲۵ به منظور پوشش کمبود پیش بینی شده صنعت آبزی پروری ناگزیر از یک افزایش ۳۵۰٪ خواهد بود.

تولید جهانی حاصل از آبزی‌پروری در طول چهار دهه گذشته به سرعت رشد کرده که سهم عمده ای را در مصرف جهانی آبزیان برای انسان تامین نموده است (شکل ۱-۱). در حال حاضر آبزی پروری نزدیک به نیمی (۴۴/۳درصد) از تولیدات آبزیان را در سطح جهان فراهم می نماید. با رشد سریعی که این صنعت هم اکنون دارا می باشد انتظار می رود که آبزی پروری در آینده‌ای نزدیک سهم بیشتری را نسبت به بخش صید برای انسان به همراه داشته باشد (سوباسینگ و سوتو، ۲۰۱۰).



شکل ۱-۱- وضعیت مصرف جهانی آبزیان (فائو، ۲۰۱۲)

آبزی‌پروری هنوز هم در مقایسه با سایر تولیدات غذایی سریع ترین بخش از لحاظ رشد و توسعه می باشد (شکل ۱-۲). یکی از دلایل این موضوع وجود تنوع گونه ای در بین گونه های پرورشی (بیش از ۲۳۰ گونه) و تنوع ژنتیکی قابل بهره‌برداری از خلال برنامه‌های تکثیر در اسارت و اهلی‌سازی می‌باشد که این امکان را فراهم می‌سازد تا روش های پرورشی بهبودیافته برای طیف متنوعی از گونه‌ها قابل‌اجرا باشد و در نتیجه آبزی‌پروری تجاری رشد و توسعه لازم را بیابد.



شکل ۲-۱- تولید جهانی آبزیان حاصل از کل فعالیت های شیلاتی شامل آبزی‌پروری و صیادی (فائو، ۲۰۱۲)

افزایش نیاز به محصولات شیلاتی به معنای افزایش فشار به سیستم های تولیدی و بالارفتن سطح کارایی آنها می‌باشد. هرآنچه تاکنون در جهت بهینه سازی صنایع آبزی پروری انجام شده است در قالب زمینه های مدیریتی، تغذیه، تشخیص و درمان بیماری ها، حفظ کیفیت آب و بهسازی ژنتیکی صفات آبزیان پرورشی بوده است حال آن که ژنتیک به‌عنوان یک زمینه مشترک در میان همه این موارد به صورت فعال یا غیرفعال در چالش های مربوط به آنها مشارکت دارد.

کاربرد ژنتیک در آبزی پروری همراه با ظهور این صنعت در چین حدود ۲۰۰۰ سال پیش و تقریباً همزمان با رومیها و از زمانی که نگهداری ماهیان را در استخرها شروع نمودند و چگونگی تکثیر آنها را آموختند، آغاز شد. اولین پرورش دهندگان ماهی که توانستند گونه هایی همچون کپور معمولی یا *Cyprinus carpio* را پرورش دهند، بدون آن که بدانند تغییر فراوانی های ژنی و کارایی ماهیان پرورشی را آغاز نمودند. زمانی که پرورش دهندگان متوجه جهش و تنوع ظاهری در رنگ و ساختار بدن ماهیان گردیدند و افراد دارای صفات موردنظر را به‌عنوان مولد انتخاب نمودند، عملاً بهگزینی ژنتیکی شروع شد. با این حال طراحی و اجرای یک برنامه هدف دار اولین بار با کار ژاپنی ها بر روی ماهی کوی در سال های ۱۸۰۰ میلادی و همچنین فعالیت چینی ها بر روی گلدفیش تزئینی صورت گرفت (دانهم، ۲۰۰۴). با پیشرفت علم اصلاح نژاد و وراثت در سال های ۱۹۰۰ (اصول مندلی) برنامه های ژنتیکی درباره آبزیان رواج بیشتری یافت. برنامه های اصلاح نژادی در دهه ۱۹۶۰ آغاز گردید. با ظهور علم ژنتیک مولکولی در دهه ۱۹۸۰ و ادامه آن تا کنون، پیشرفت های فراوانی در ژنتیک آبزیان حاصل گردیده است. امروزه عمده تلاش ها در جهت بهگزینی نژادهای تجاری، بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی آبزیان پایه ریزی شده است و با هدف اهلی سازی آبزیان و افزایش کارایی پرورش به سرعت در حال پیشرفت و توسعه می باشد (دانهم، ۲۰۰۴).

۲-۱-دستکاری کروموزومی آبزیان؛ القای تری‌پلوییدی

تولیدمثل به روش جنسی تقریباً روشی معمول در میان همه گونه های آبزیان می باشد. این روش تولیدمثلی از نقطه نظر تکاملی دارای مزیت هایی می‌باشد که بخش عمده آن راحتی ایجاد ژنوتیپ های جدید و انتقال آنها از نسلی به نسل دیگر به ویژه از خلال روند تقسیم میوزی می‌باشد. اغلب جانوران معمولاً دارای دو سری کروموزوم در هر سلول خود می‌باشند که به صورت 2N یا دیپلوییدخوانده می‌شوند. این افراد سلول های جنسی هاپلوییدی تولید می‌کنند که حاوی 1N(یا یک سری از رشته های کروموزومی) می‌باشند. در این صورت به هنگام آمیزش سلول های جنسی برای تشکیل یک فرد جدید، تعداد کروموزوم های نتاج حاصله همانند والدین، 2N خواهد بود. لذا در حین تشکیل تخم و اسپرم لازم است که رشته های کروموزوم به صورت کاملاً مساوی تقسیم شوند تا نتیجه آمیزش آنها تشکیل فردی 2N (دارای دو سری رشته کروموزوم) باشد. با این وجود این روند تقسیم و ترکیب جفت کروموزوم ها قابلیت تخریب یا متوقف‌شدن را دارد بدین صورت که جانور تعداد

رشته های کروموزومی‌اش فرد باشد (مثلاً 3N) بنابراین نمی‌تواند به دو سری تقسیم گردد. علاوه بر این در صورتی که جانوری تولید شود که دارای چند سری از کروموزومهای 2N باشد، به طور مثال 4N، گامت های این فرد می‌تواند در تولید نتاج جدید ویژگی های جالب توجهی داشته‌باشد. تولید موجوداتی که تعداد کروموزوم هایشان بیشتر از تعداد عادی سری های کروموزومی باشد را اصطلاحاً القای پلی پلوییدی می‌نامند. هدف نهایی ایجاد گله‌های تری پلویید تولید موجوداتی است که از لحاظ زیستی تمام کارکردهای طبیعی به جز تشکیل گامت ها و پروسه‌های فیزیولوژیکی و رفتاری مرتبط با آن را دارند. در صنعت آبزی‌پروری به‌ویژه در رابطه با گونه‌های تجاری چنین جمعیت عقیمی می‌تواند از نظر بهبود میزان رشد، ضرایب تبدیل غذایی و یا حتی کاهش خطرات اکولوژیک در رابطه با گونه‌های خارجی، دورگه‌ها یا ذخایر تغییریافته ژنتیکی ارزشمند باشد.

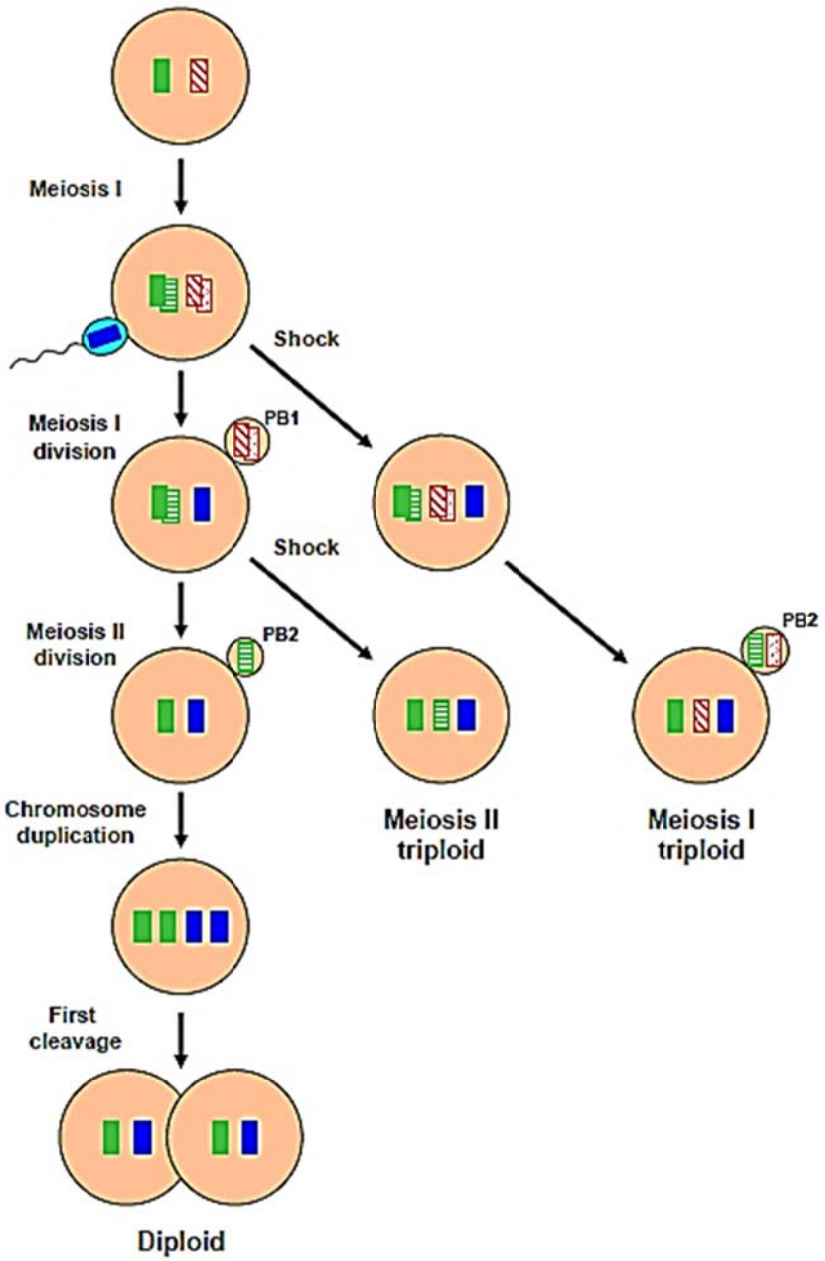
مزایای بالقوه تری پلوییدی شامل ضریب تبدیل غذای بهتر، بقای بیشتر و بازدهی بالاتر در سیستم های تولید می‌باشد. از آنجایی که این هدف در مهره‌داران عالی‌تر به لحاظ ناهنجاری‌های حاصله قابل دستیابی نیست، گامت های بسیاری از ماهیان و صدف داران قابلیت دستکاری جهت تولید نتاج تری پلویید ماندگار را دارند. اگرچه روش هایی که معمولاً برای القای تری پلوییدی به‌کار می‌روند، می‌توانند تاثیرات عمیقی بر عملکرد نتاج حاصل داشته باشد که غالباً محصول به دست آمده از این فرایند را تحت تاثیر قرار می‌دهد. علاوه بر آن روش های القایی مورد استفاده، توانایی تولید یک جمعیت کاملاً تری پلویید را ندارند. سایر انواع پلی‌پلویید همچون تتراپلوییدها نیز در کنار تریپلوییدها تولید می‌شوند با این حال هدف نهایی در وهله اول تولید موجودات 3N در سطح وسیع می‌باشد (لوتز، ۲۰۰۱).

۳-۱-مکانیسم القای تری‌پلوییدی

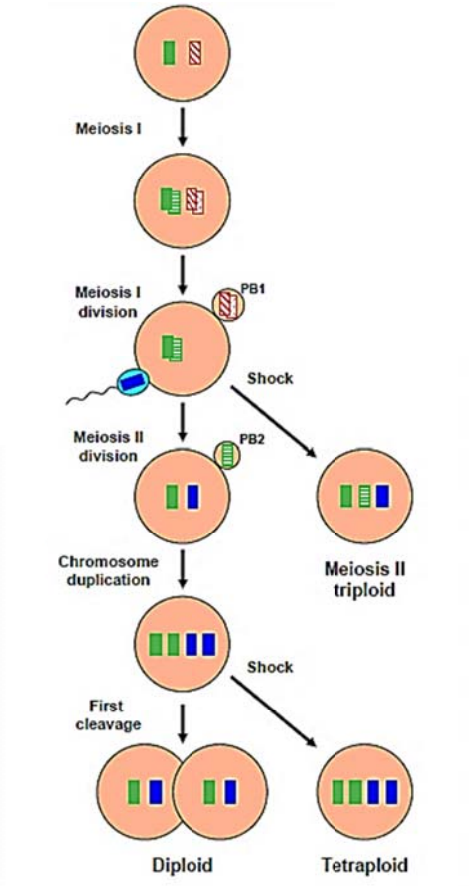
زمانی که سلول اسپرم با تخمک ترکیب می‌شود تخم فعال می‌گردد و روندی در تخم آغاز می‌شود که نتیجه آن رهاشدن گویچه قطبی دوم می‌باشد. بهتر است که گویچه قطبی دوم را این گونه تعریف نماییم که شامل دسته یا مجموعه مواد ژنتیکی است که در جایگاه یکی از چهار رشته کروموزوم مربوط به تشکیل اولیه تخم قرار می‌گیرد.

القای تری پلوییدی میوزی شامل استفاده از شوک های دمایی، فشار یا شیمیایی (می‌تواند با جریان الکتریسته نیز همراه باشد) بر روی تخم های تازه لقاح‌یافته است که در نتیجه این فرایند از خروج گویچه قطبی دوم به بیرون از تخم پیشگیری می شود لذا در سلول تخم باقی می‌ماند (دانهم، ۲۰۰۴) (شکل ۳-۱). این یک روش کلی و بسیار معمول در ارتباط با القای تری پلوییدی در گونه‌های آبزیان می‌باشد. الزاماً وراثت مواد ژنتیکی در حالت تری پلویید به شکل برابر نیست. همچنین می‌توان تری پلوییدها را از طریق تلاقی افراد 4N با افراد طبیعی 2N به دست آورد. تتراپلوییدها که گامت های 2N تولید می‌کنند در بسیاری از موجودات آبزی تولید شده‌اند (آلدریج و همکاران، ۱۹۹۰، مالیسون و همکاران، ۱۹۹۳). برای تولید تتراپلویید تخم ها و اسپرم های طبیعی با هم ترکیب

می‌شوند و یک تخم طبیعی 2N ایجاد می‌نمایند. کروموزوم های 2N برای آمادگی جهت اولین تقسیم سلولی مضاعف می‌شوند اما شوک های فیزیولوژیک دقیقاً در لحظه مناسب برای پیشگیری از این تقسیم اعمال گردیده و یک مجموعه 4N کروموزومی در یک سلول به‌جا می‌گذارد. بنابراین مضاعف‌سازی کروموزوم ها و تقسیم سلولی به طور طبیعی پیش می‌رود اما هر سلول حاوی یک سری 4N از کروموزوم ها می‌باشد (شکل۴-۱).



شکل ۳-۱- طرح شماتیک از نحوه القای تری پلوییدی در سلول تخم (برگرفته از پیفرر و همکاران، ۲۰۰۹)



شکل۴-۱- طرح شماتیک از نحوه القای تتراپلوییدی در سلول تخم (برگرفته از پیفرر و همکاران، ۲۰۰۹)

۴-۱-عوامل موثر بر مکانیسم القای پلی پلوییدی

میزان موفقیت در تیمارهای القای تری پلوییدی به زمان القای شوک، شدت آن و طول مدت زمان شوک دهی بستگی دارد. بهترین زمان برای القای شوک در میان گونه‌های مختلف بسیار متنوع می‌باشد اما به‌طور کلی به سرعت رشد و به‌طور اختصاصی برای تری پلوییدی به زمان تقسیم دوم میوزی و برای حالت تتراپلوییدی به زمان تقسیم اول میتوزی بستگی دارد.

یوئدا و همکاران (۱۹۸۸) توانستند با قراردادن تخمک و اسپرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در معرض pH و کلسیم بالا تری پلوییدی ایجاد نمایند. در بعضی موارد این موضوع می‌تواند به پیوستگی یا ترکیب غیرمعمول اسپرم ها و دی‌اسپرمی منجر گردیده و ظاهراً هم مانع خروج گویچه قطبی دوم می‌شود (دانهم، ۲۰۰۴). لو و پوردام (۱۹۸۴) دریافتند که استفاده از اتر برای القای تری پلوییدی موفقیت آمیز نیست. اتر به‌تنهایی یا همراه با شوک فشار هیدروستاتیک موجب القای تری پلویید در ماهی قزل‌آلا نگردید. همچنین جانستون و همکاران (۱۹۸۹) با استفاده از گاز اکسید نیتروژن در ماهی آزاد اقیانوس اطلس، *Salmo salar*، ۸۰٪ تری پلوییدی به دست

آوردند. کاسانی و کیتون (۱۹۸۶) و بوری (۱۹۸۹) چنین بیان داشته اند که در مقایسه با شوک های دمایی و سایر انواع شوک، شوک فشار هیدروستاتیک نتایج پایاتر، ماندگاری بهتر در تخم های تیماردیده و درصد بالاتر القای تری پلوییدی را به همراه دارد (دانهم، ۲۰۰۴).

در تحقیق دیگری که بر روی ماهی لوچ، *Misgurnus fossilis*، انجام شد، پیش از القای شوک، جسم قطبی مرحله خروج را آغاز نمود ولی دوباره با سیتوپلاسم تخم ترکیب گردیده که حاصل آن تخریب دوک میوزی و ایجاد دو پیش‌هسته مادینه بود (برتینا و همکاران، ۱۹۸۵). سپس پیش‌هسته سلول نر با پیش‌هسته سلول ماده ترکیب شده و تخم تریپلوییید را به‌وجود آورد. پیش‌هسته اندازه‌ای کوچک دارد و در مقایسه با تخم های غیرالقایی در مکانی نزدیک تر به سطح تخم قرار می‌گیرند. در هنگام اولین تقسیم سلولی (آنافاز، تشکیل شیار) بلاستودیسک در سلول های غیرالقایی (شاهد) نسبت به تخم های تری پلوییید قطورتر هستند و دگردیسی‌های ریختی در تخم های تری پلوییید سریعتر انجام می‌گیرد.

غالباً میزان تفریخ جنین‌هایی که برای ایجاد تری پلوییدی در معرض شوک قرار گرفته اند، پایین‌تر از افراد شاهد می‌باشد. در ماهی توربوت، *Scophthalmus maximus* و ماهی باس دریایی، *Dicentrarchus labrax*، مشخص شده که مقدار پایین تفریخ به دلیل دستکاری و تیماردهی تخم ها بوده و به خاطر تری پلوییید بودن نیست (پیفرر و همکاران، ۲۰۰۰).

همچنین کیفیت گامت ها می‌تواند کارایی پلی‌پلوییدی را تحت تاثیر قرار دهد. آلدریج و همکاران (۲۰۰۰) بیان داشتند که در ماهی کپور سرگنده، *Hypophthalmichthys nobilis*، در حالتی که میزان بازماندگی تخم ها بالای ۵۹٪ بود، مقادیر بیشتری از تری پلوییید ایجاد شد در حالی که با بازماندگی کمتر از ۴۰ ٪ هیچ ماهی تری پلوییدی تولید نشد (دانهم، ۲۰۰۴).

تنوع نژادی یا خانوادگی می‌تواند کارایی القای تری پلوییدی را متاثر سازد. آندرس (۱۹۹۰) نشان داد که نژاد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ممکن است در برابر شوک های دمایی مختلف، پاسخ های متفاوتی را برای القای تری پلوییدی به دست دهد. این موضوع تعجب‌آور نیست چرا که تفاوت های ژنتیکی دخیل در سرعت رشد جنینی می‌توانند عوامل مناسب برای دستکاری پلوییدی را تحت تاثیر قرار دهند (دانهم، ۲۰۰۴). علاوه بر این بلانک و همکاران (۱۹۸۸) شواهدی را از تاثیرات ژنتیکی بر کیفیت القای تری پلوییدی و تتراپلوییدی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان یافتند. شوک گرمایی ۳۰ درجه سانتیگراد برای القای ۱۰۰٪ تری پلوییدی در نژاد اهلی‌شده قزل‌آلای رنگین‌کمان لازم بود در حالی که برای به‌دست آوردن همین نتیجه در نژاد وحشی این ماهی، دمای ۲۸ درجه سانتیگراد مورد نیاز بود.

تری پلوییدی می‌تواند به صورت طبیعی در ماهیانی که شوک ندیده اند، روی دهد و این مورد در ماهی آزاد صورتی، *Oncorhynchus gorbuscha* ، مشاهده شده است. در طبیعت گونه‌هایی وجود دارند که بیشتر از دیپلوییید می‌توان آنها را تری پلوییید یا تتراپلوییید دانست. پلی‌پلوییدی فرایند گونه‌زایی است. بر اساس مطالعات آلندورف

و تورگارد (۱۹۸۴) و فیلیپس و رب (۲۰۰۱) دیدگاه فعلی درباره خانواده آزادماهیان اعتقاد بر تتراپلوییدبودن آنها است و گاهی هنوز نشانه‌هایی از وراثت تتراسومیک همچون الگوهای وراثتی آنزیمها در آنها مشاهده می‌شود (گرگوری، ۲۰۰۵). بعضی از ماهیان به صورت ماده‌زایی‌شده و تری پلوییدتولیدمثل نموده و در طبیعت وجود دارند. به طور مثال ماهی مولی ،*Poecilia formosa*، غالباً یک ماهی دیپلوییدتک‌جنس است اما فرم تریپلوییدآن به صورت موردی در مطالعات آزمایشگاهی و به شکل نسبتاً متعدد در طبیعت یافت شده است. اسکلاپ و همکاران (۱۹۹۸) مشاهده نمودند که ماهیان مولی تری پلوییدآزمایشگاهی عقیم بوده اما انواع تری پلوییدموجود در طبیعت بارور بوده و نتاج تری پلوییدتولید می‌نمایند (گرگوری، ۲۰۰۵).

۵-۱-روش های القای تریپلوییدی

روش های مورد استفاده برای تغییر تعداد کروموزوم ها را می‌توان به دو دسته شوک های فیزیکی یا شیمیایی دسته‌بندی نمود. شوک های فیزیکی شامل تغییر در فشار یا دما می باشد که شوک های دمایی خود به دو گروه سرما و گرما تقسیم می‌شوند. در شوک های شیمیایی از موادی همچون سیتوکالازین‌بی، ۶-دی‌متیل‌آمینوپورین و کافئین استفاده می‌شود که در عملکرد میکروتوبول ها در حین تقسیم سلولی اختلال ایجاد می‌کند و حاصل آن ممانعت از خروج جسم قطبی می‌باشد (پیفرر و همکاران، ۲۰۰۹). زمان بندی دقیق و طول مدت شوک‌دهی نسبت به میوز (خروج دومین گویچه قطبی) و میتوز (اولین تقسیم جنینی هنگامی که تخم به یک رویان دو سلولی تقسیم

می شود) و نیز دما یا فشار دقیق نه تنها میزان موفقیت را رقم می زنند بلکه نوع دستکاری کروموزومی را نیز مشخص می کنند (تیو، ۱۳۸۸).

به منظور اعمال شوک فشار از محفظه‌های فشار استفاده می‌شود که به طور مکانیکی کار می‌کنند و مقادیر فشار به‌کاررفته معمولاً بین ۷۰۰۰psi-۱۰۰۰۰ می‌باشند. محدودیت های خاص در اعمال شوک فشار از جمله مخاطرات ایمنی و محدودیت در میزان تخم استفاده شده در هر بار اعمال شوک سبب شده که مراکز تکثیر تمایل بیشتری به استفاده از شوک های دمایی (گرما و سرما) داشته باشند که به صورت گسترده برای القای تری پلوییدی بر روی تخم های لقاح‌یافته به‌کار رفته است. روش های القای شوک های دمایی ارزان بوده و می‌توان آنها را به‌راحتی در حجم وسیع به‌کار برد. اگرچه به طور معمول شوک های گرمایی و سرمایی را به‌ترتیب برای ماهیان سردآبی و گرم آبی به‌کار می‌برند اما در برخی موارد مثل مطالعه ای که توسط وارادارج و پاندین (۱۹۸۸) انجام شد استفاده از شوک های گرمایی در رابطه با ماهیان گرم آبی ماهی تیلاپیا، *Oreochromis mossambicus*، موفقیت‌آمیز (با موفقیت ۱۰۰٪) ارزیابی شده است (تیواری، ۲۰۰۴). حتی در برخی موارد استفاده از شوک های سرما برای تولید افراد تری پلوییدر رابطه با گونه های گرم آبی همچون کپور هندی روهو، *Labeo rohita*، موفقیت آمیز نبوده است (ردی و همکاران، ۱۹۹۰).

استفاده از شوک های فشار هیدروستاتیک نیز به منظور ممانعت از رهاشدن دومین گویچه قطبی در گونه های مختلفی گزارش شده است از جمله توسط لو و پوردوم (۱۹۸۴) در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*)، استریسینگر و همکاران (۱۹۸۱) در گورخرماهی (*Danio rerio*)، لینهارت و همکاران (۱۹۹۱) در کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، حسین وهمکاران (۱۹۹۱) در تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*)، مالیسون و همکاران (۱۹۹۳) در سوف زرد (*Perca flavescens*)، پیفرر و همکاران (۱۹۹۴) در سالمون کوهو (*Onchorhynchus kisutch*) ، گودای و همکاران (۱۹۹۵) در دورگه گربه‌ماهی کانالی (*Ichtalurus punctatus*) و گربه‌ماهی آبی (*Ichtalurus furcatus*) با موفقیت استفاده شده‌اند (تیواری، ۲۰۰۴).

از مواد شیمیایی نیز برای جلوگیری از رهاشدن دومین گویچه قطبی در تخم های لقاح یافته ماهیان بهره برده شده‌است. رفستی و همکاران (۱۹۷۷) تولید موزاییک پلی‌پلوییـد- دیپلوییـد ماهی سالمون اقیانوس اطلس را پس از قرارگرفتن تخم ها در معرض سیتوکالازین بی گزارش نموده‌اند. اسمیت و لموئین (۱۹۷۹) وضعیت مشابهی را درباره ماهی قزل‌آلای جویباری، *Salvelinus fontinalis*، پس از قرارگرفتن در معرض کلشی‌سین گزارش نمودند. یوئدا و همکاران (۱۹۸۸) اعلام نمودند در صورتی که اسپرم یا تخم تازه لقاح‌یافته قزل‌آلای رنگین کمان در معرض pH بالای و کلسیم قرار بگیرد، درصد بالایی از تری پلوییدی ایجاد می‌گردد (تیواری، ۲۰۰۴). در جدول ۱-۱ مقادیر معمول برای القای انواع شوک در میان ماهیان و صدف داران، زمان القا و شدت آن آورده شده است.

جدول ۱-۱- نمونه‌ای از شرایط شوک‌های استفاده‌شده در القای تری پلوییدی در ماهیان و صدف داران (پیفرر و همکاران، ۲۰۰۹)

	نوع شوک	زمان القای شوک (بعد از لقاح)	شدت شوک القایی	طول مدت شوک‌دهی
ماهی	فشار	۲-۷ دقیقه در گونه‌های گرم آبی	۶۲ میلی پاسکال (محدوده: ۵۸-۸۵ میلی پاسکال)	۲-۶ دقیقه
		۱۵-۲۰ دقیقه در گونه‌های سردآبی		
	سرما	۲- ۷ دقیقه در گونه‌های گرم آبی	۱- تا ۴ درجه سانتیگراد در گونه‌های گرم آبی و معتدل	۲-۲۰ دقیقه
		۱۵-۲۰ دقیقه در گونه‌های سردآبی		۳۵ دقیقه تا ۳ساعت در گونه‌های سردآبی
	گرما	۲- ۷ دقیقه در گونه‌های گرم آبی	۲۴-۳۲ درجه‌سانتیگراد در گونه‌های سردآبی	۱۰-۲۵دقیقه در گونه‌های سردآبی
		۱۵-۲۰ دقیقه در گونه‌های سردآبی	۳۴-۴۱ درجه سانتیگراد در گونه‌های گرم آبی	۴/۵ ثانیه تا ۳/۵ دقیقه در گونه‌های معتدله و گرم آبی

صدف داران	شیمیایی	به دما وابسته می‌باشد. دقیقاً قبل از خروج اولین (معمول‌ترین حالت) یا دومین جسم قطبی.	سیتوکالازین‌بی: ۰/۱-۱ میلی‌گرم در لیتر آب‌دریا	۱۵-۲۰ دقیقه
			۶-دی‌متیل‌آمین‌پورین: ۲۰-۶۰ میلی‌گرم در لیتر آب‌دریا با غلظت نهایی ۳۰۰میکرومولار	
	فشار	همانند آنچه در بالا ذکر شد	حدود ۶۰ میلی‌پاسکال	۱۰-۱۵ دقیقه
	سرما	همانند آنچه در بالا ذکر شد	۰-۵ درجه‌سانتیگراد	۱۵-۲۰ دقیقه
	گرما	همانند آنچه در بالا ذکر شد	۲۵-۳۸ درجه‌سانتیگراد	۱۵-۲۰ دقیقه

۶-۱-تشخیص تری پلوییدی در ماهی

افراد تریپلوییدی دارای یک سری اضافه از کروموزم ها و در نتیجه هسته بزرگتر می‌باشند. نسبت سیتوپلاسم به هسته ثابت می‌باشد بنابراین وجود هسته بزرگتر در افراد پلی‌پلوییدی سبب افزایش حجم سیتوپلاسم و کل سلول می‌گردد. از لحاظ تئوری تری پلوییدها به دلیل اندازه بزرگتر سلول باید سایز بزرگتری نسبت به افراد دیپلوییدی داشته باشند. با این وجود در مطالعه‌ای در رابطه با ماهی سه‌خاره، *Gasterosteus aculeatus*، و آیو، *Plecoglossus altivelis*، مشاهده گردید که ماهی در مقابل این افزایش صورت‌گرفته در سایز سلول ها، تعداد سلول های خود را کاهش می‌دهد و افراد تری پلوییدی ماهی سه‌خاره هم‌اندازه افراد دیپلوییدی می‌باشند. افزایش حجم سلول در همه بافت های بدن ماهی پلی‌پلوییدی رخ می‌دهد. این افزایش در سلول هایی همچون گویچه های قرمز، لوکوسیت ها، سلول های مغزی و سلول های شبکیه در تری پلوییدهای ماهی آزاد اقیانوس آرام (کوهو) *Oncorhynchus kisutch* و آزاد اقیانوس اطلس *Salmo salar* مشاهده شده‌است (دانهم، ۲۰۰۴).

تعیین سطح پلوییدی درماهیان القاشده می تواند به صورت مستقیم مانند تعیین کاریوتایپ، اندازه گیری میزان DNA، تعیین ژنوتیپ نشانگرهای مایکروستلایت، آنالیز NORها یا به شکل غیرمستقیم اندازه گیری ابعاد هسته و سلول (مساحت/حجم) انجام گیرد(پیفرر و همکاران، ۲۰۰۹). از آنجایی که افراد تری پلوییدی در مقایسه با افراد دیپلوییدی یک سری کروموزوم اضافه تر دارند (ایهسن و همکاران، ۱۹۹۰) یک روش ساده، مرسوم و ارزان برای ارزیابی ماهیان روش غیرمستقیم اندازه گیری قطر بزرگ گویچه های قرمز می باشد که در مطالعات متعدد مورد استفاده قرار گرفته است (گزارش شده توسط ولترز و همکاران، ۱۹۸۲، بنفی و ساترلین، ۱۹۸۴، بنفی، ۱۹۹۹، پوردام، ۱۹۹۳). دقت و اطمینان این روش جهت شناسایی تری پلوییدها در میان گونه های مختلف متفاوت گزارش شده است به طوری که این میزان بر اساس گزارش بنفی و همکاران (۱۹۸۴) در رابطه با ماهی آزاد اطلس *Salmo salar*، ۹۵-۱۰۰٪، ولترز و همکاران (۱۹۸۲) در گربه ماهی کانالی *Ictalurus punctatus*، ۸۰-۹۴٪،

تمبتس و همکاران (۱۹۹۱) در قزل‌آلای‌رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss*، ۷۰/۸٪ اعلام شده است (گارسیا-آبیادو و همکاران، ۱۹۹۹). همچنین واتندورف (۱۹۸۶) گزارش نمود که اندازه‌گیری حجم گویچه قرمز با استفاده از یک کولترکانتر روشی کاملاً دقیق و سریع برای تعیین سطح پلوییدی در ماهی آمور (*Ctenopharyngodon idella*) می‌باشد. در جدول ۲-۱ خلاصه ای از روش های استفاده شده جهت شناسایی وضعیت پلوییدی آورده شده است.

جدول۲-۱- روش های استفاده‌شده برای شناسایی وضعیت پلوییدی در ماهیان (گارسیا-آبیادو، ۲۰۰۹)

روش	گونه آزمایش‌شده	منبع
شمارش کروموزومی	*Misgurnus angullicaudaus*	آرای و همکاران (۱۹۹۱)
	Onchorhynchus mykiss	فلاج شنس و همکاران (۱۹۹۲)
فلوسایتومتری	*Ctenopharngodon idella*	برنز و همکاران (۱۹۸۶)
	Onchorhynchus mykiss	تورگارد و همکاران (۱۹۸۲)
	Perca flavescens	مالیسون و همکاران (۱۹۹۳)
	Stizostedion vitreum	مالیسون و گارسیا-آبیادو (۱۹۹۶)
محاسبه ابعاد گویچه قرمز		
کولترکانتر	*Ctenopharngodon idella*	واتندورف (۱۹۸۶)
	Ameiurus nebulosus	کورمیر و همکاران (۱۹۹۳)
Image analysis	*Silurus glanis*	فلاج شنس (۱۹۹۷)
میکروسکوپ فلوئورسنت	*Clarias macrocephalus*	تیتیتانانوکیجی و همکارن (۱۹۹۶)
میکروسکوپ نوری	*Salmo trutta*	کروزیر و موفت (۱۹۸۹)
	Misgurnus anguillicaudatus	آرای و همکاران (۱۹۹۱)
	Pagrus major	کیتامورا و همکاران (۱۹۹۱)
	Cyprinus carpio	چرفاش و همکاران (۱۹۹۴)
NOR	*Onchorhynchus mykiss*	فلاج شنس و همکاران (۱۹۹۲)
	Piaractus mesopotamicus	فارست و همکاران (۱۹۹۴)
ریخت‌شناسی خارجی	*Ctenopharngodon idella*	بونار و همکاران (۱۹۸۸)
شاخص‌های بافتی	*Plecoglossus altivelis*	آلیاه و همکاران (۱۹۹۰)

رنگ آمیزی فلوئورسانت هسته با استفاده از اتیدیوم بروماید برای تشخیص تری پلوییدی در گربه‌ماهی آسیایی،*Clarias macrocephalus*، به کار رفته است (تیواری و همکاران، ۲۰۰۴). ماهیان تری پلویید برخلاف انواع دیپلوییدر در هسته خود به جای دو هستک، دارای سه هستک می‌باشند. شمارش هستک ها برای تشخیص تری پلوییدی در دورگه کپور طلایی، *Carassius carassius*، و کپور معمولی، گربه ماهی اروپایی تری پلویید، *Silurus glanis*، و قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده شده است (تیواری و همکاران، ۲۰۰۴).

الکتروفورز پروتئینها نیز به واسطه اختلاف موجود در دوز نسبی آللهای موجود در افراد دیپلویید و تری پلویید برای شناسایی تری پلوییدها قابل استفاده است. لیو و همکاران (۱۹۷۸) با استفاده از الگوهای پروتئینی میوژن ماهیچه و کریتین کیناز تشخیص بین تری لویید و دیپلویید را در ماهی ginbuna (*Carassius auratus langsdorfi*) انجام دادند. نشانگرهای آلوزایمی در سه لوکوس (ADH, EST و 6PGD) برای اثبات تری پلوییدی در ماهی سیم دریایی قرمز، *Pagrus major*، به کار گرفته شدند (تیواری و همکاران ، ۲۰۰۴).

بر اساس گزارش تورگارد (۱۹۸۳) شمارش کروموزوم ها یکی از روش های مستقیم و بسیار دقیق جهت شناسایی حالت تری پلوییدی در ماهیان می‌باشد که البته روشی خسته کننده و وقت‌گیر می‌باشد و عموما مستلزم از بین بردن ماهیان مورد مطالعه است اگرچه در رابطه با ماهیان جوان می‌توان کروموزوم ها را از باله‌های در حال ترمیم و کشت سلول های لمفوسیت بدون نیاز به کشتن موجود زنده نیز به‌دست آورد (تیواری و همکاران، ۲۰۰۴). در ضمن در روش کاریوتایپ به دلیل سختی در نمونه‌برداری از تعداد زیادی سلول، امکان تشخیص انواع حالتهای پلوییدی در یک فرد فراهم نمی‌شود (دانهم، ۲۰۰۴).

اندازه‌گیری میزان DNA در سلول های افراد با استفاده از روش فلوسایتومتری نیز یکی دیگر از روش های دقیق و سریع و در عین حال بسیار گران‌قیمت برای تعیین تری پلوییدی می‌باشد. از این روش برای تعیین تری پلوییدی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، دورگه آمور و کپور سرگنده، ماهی Walleye (*Sander viterus*)، کپور نقره‌ای و ماهی مولی آمازون (*Poecilia formosa*) استفاده شده است (تیواری و همکاران، ۲۰۰۴).

۷-۱-ویژگی های ماهیان تری پلویید

میزان رشد عامل مهمی برای بهبود ژنتیکی ماهیان پرورشی تجاری می‌باشد. انتظار می‌رود تری پلوییدها به دلیل عقیم‌بودن و کندشدن رشد گنادی توانایی رشد بالاتری نسبت به دیپلوییدها داشته باشند. این پتانسیل در میان گونه‌های مختلف، متفاوت می‌باشد. ماهیان تری پلویید در مقایسه با افراد دیپلویید ممکن است دارای رشدی سریعتر (ولنتی، ۱۹۷۵، پوردام، ۱۹۷۶، تورگارد و گال، ۱۹۷۹، ولترز و همکاران، ۱۹۸۱، رازانی و ماریان، ۱۹۸۶) رشدی مشابه (دان و آوتالیون، ۱۹۸۶، ریختر و همکاران، ۱۹۸۶، دانهم، ۱۹۹۰، حسین و همکاران، ۱۹۹۵) یا رشدی کمتر (رفستی، ۱۹۸۱، رایت و همکاران، ۱۹۸۲، چوروت و همکاران، ۱۹۸۶،کرازنای و ماریان، ۱۹۸۶، شاه و بیردمور،۱۹۸۶، ولترز، ۱۹۸۶) باشند (دانهم، ۲۰۰۴).

ماهیان تری پلوییدبه ندرت در مراحل اولیه حیاتشان و قبل از تاثیرات مرحله بلوغ، رشدی سریعتر از افراد دیپلوییدنارند. معمولا تا قبل از رسیدن به مرحله بلوغ ماهیان دیپلوییدرشدی سریعتر از افراد تری پلوییدنارند و پس از رسیدن به مرحله بلوغ رشد ماهیان تری پلوییدازانواع دیپلوییدپیشی می‌گیرد و ضریب تبدیل غذا به شکل موثری بهبود می‌یابد.

ضریب تبدیل غذایی در ماهی آمور (وایلی و وایک، ۱۹۸۶)، گربه ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) (هنکن و همکاران، ۱۹۸۷) و ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (الیواتلز و کاشیک، ۱۹۹۰) به خوبی مطالعه شده است. در این مطالعات فاکتورهایی همچون ضریب بازده پروتئین، به‌کارگیری پروتئین خالص، کارایی جذب انرژی، کل انرژی جذب‌شده و توازن نیتروژنی در این گونه‌ها بررسی شد و اختلاف شاخصی مشاهده نشد.

دانهم (۱۹۹۰) اعلام نمود که یکی از مزایای بالقوه حالت پلی‌پلوییدی تغییرات مثبت در ویژگی های لاشه می‌باشد. کاهش رشد گنادی به دورریز کمتر در مرحله فرآوری منجر می‌شود. کیفیت گوشت در ماهی تری پلوییدقزل‌آلای رنگین‌کمان در مقایسه با ماده‌های دیپلوییدبه لحاظ ممانعت از تغییرات پیش‌بلوغی، بهبود می‌یابد. اگرچه ترکیب تقریبی بدن در ماهیان جوان دیپلوییدو تری پلوییدقزل‌آلای رنگین‌کمان تفاوت چندانی نداشت. در تحقیقی که حسین و همکاران (۱۹۹۵) در رابطه با ترکیب بیوشیمیایی بدن تیلاپیای نیل دیپلوییدو تری پلوییدانجام دادند، تفاوتی ملاحظه نشد (دانهم، ۲۰۰۴).

ماندگاری نسبی ماهیان تری پلوییدمتفاوت است. بیامونگو و همکاران (۲۰۰۱) اعلام نمودند که ماهی تیلاپیای آبی، *Oreochromis aureus*، دیپلوییدو تری پلوییددر محیط پرورشی تانک بقای مشابهی را نشان دادند. بینیارز و همکاران (۱۹۹۷) مشاهده نمودند که ماندگاری طولانی مدت کپور تری پلویید(ماندگاری در سومین سال زندگی) با کمال تعجب در مقایسه با ماهیان دیپلوییدکمتر بوده‌است. نا-ناکورن و لگرند (۱۹۹۲) گزارش نمودند که گربه‌ماهی قدم زن تری پلوییدو، *Clarias macrocephalus*، در مقایسه با شاهدهای دیپلوییدماندگاری کمتری را نشان داد (دانهم، ۲۰۰۴).

مقاومت به بیماری ها در میان ماهیان تری پلوییدبه طور محدود مطالعه شده است. مطالعات فیزیولوژیکی نشان داده است ماهیان تری پلوییدباید مقاومت کمتری از خود نشان دهند(دانهم، ۲۰۰۴). تفاوت در ویژگی های خون‌شناختی ماهیان تری پلوییدو دیپلوییدمی‌تواند به تفاوت هایی در میزان مقاومت به بیماری ها منجر شود. سیستم ایمنی ماهیان تری پلوییدممکن است از انواع دیپلوییدضعیف‌تر باشد (دانهم، ۲۰۰۴). با این حال لاکهانانتاکان (۱۹۹۲) گزارش نمود که گربه ماهی های تری پلوییدو دیپلوییدمقاومت مشابهی را در برابر *Aeromonas hydrophila* از خود بروز دادند. همچنین مطالعات بادینو و همکاران (۲۰۰۶) بر روی ماهی توربوت *Psetta maxima* نشان داد که عملکرد فعالیت های تنفسی و فاگوسیتوزی به ازای هر میکرولیتر از خون در هر دو نوع تری پلوییدو دیپلوییدمشابه همدیگر می باشد و از لحاظ ترکیبات سرمی، فعالیت های لیزوزیمی یا ضد باکتریایی تفاوتی میان دو گروه مذکور وجود ندارد.

ماهیان تری پلویید همواره و به ضرورت عقیم هستند. عموماً ماده های تری پلویید کمترین تولید هورمون های جنسی را دارند. اگرچه نرهای تری پلویید تقریباً همیشه عقیم هستند، همانند انواع نر دیپلویید دارای یک پروفایل هورمون های جنسی می‌باشند. کپور علفخوار و سالمون تری پلویید ممکن است دارای رفتارهای جنسی باشند و حتی با ماهیان ماده تخمریزی نمایند اما حاصل تخمریزی آنها تخم هایی بدون لقاح می‌باشد (دانهم، ۲۰۰۴).

۸-۱-تاریخچه القای تری پلوییدی

تاکنون در جهان در زمینه القای تری پلوییدی بر روی آبزیان مطالعات متعددی در رابطه با ماهیان، صدف داران و سخت پوستان با انواع شوک های دمایی، فشار و شیمیایی (درباره صدف داران) انجام شده است که خلاصه ای از این مطالعات به ویژه در ارتباط با برخی گونه‌های اقتصادی و مطرح در جهان صورت گرفته است، ارائه می‌شود.

یکی از گونه های پرورشی در جهان که می‌تواند کاندیدای مناسبی برای تولید گله‌های بزرگ عقیم تری پلویید باشد، تیلاپیا است. کیم و همکاران (۱۹۹۱) توانستند تعداد زیادی ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) را با استفاده از شوک سرمایی ۱۴ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه و ۵ دقیقه بعد از زمان لقاح با انحباس دومین گویچه قطبی (بازدهی ۸۳/۳٪) ایجاد نمایند. در ماه ششم پرورش رشد گنادی در هر دو جنس ماهیان تری پلویید به شدت کاهش یافت (لوتز، ۲۰۰۱). جئونگ و همکاران (۱۹۹۲) شرایط مناسب برای القای تری پلوییدی را ۱۰±۰/۲ درجه سانتیگراد، ۵ دقیقه بعد از لقاح (بازدهی ۱۰۰٪) اعلام کردند. در این مطالعه رشد ماهیان تری پلویید و دیپلویید تا شش ماهگی شبیه به هم بود اما بعد از این مدت تریپلوییدها رشد بیشتری را نسبت به همنوعان دیپلویید خود یافتند. بررسی‌های گنادی نشان داد که ماهیان دیپلویید به مرحله بلوغ رسیده‌اند در حالی که ماهیان تری پلویید به مرحله عقیمی رسیده بودند. چنگ و همکاران (۱۹۹۳) با القای شوک گرما بر روی تیلاپیای آبی *O. aureus* تفاوت هایی را در رشد گنادی تری پلوییدها در مقایسه با دیپلوییدها در سن ۲۴ هفتگی یافتند اگرچه از لحاظ رشد اختلاف بارزی دیده نمی‌شد. مارتینز-دیاز و سلیس مالدونادو (۱۹۹۴) ۱۰۰٪ تری پلوییدی را در *O. niloticus* با استفاده از هر دو گروه شوک گرما و سرما گزارش نمودند. در این میان تفاوت بارزی از نظر رشد تا سن سه ماهگی مشاهده نشد و تیلاپیاهای تری پلویید ماندگاری و ناهنجاری های شکلی متفاوتی را از خود بروز دادند (۲۵٪ نتاج حاصل از شوک سرما و ۳۲٪ از نتاج حاصل از شوک گرما). در مطالعات دیگری که بر روی تاثیرات فشار، گرما و سرما در القای تری پلوییدی در ماهی *O. niloticus* انجام شد، حسین و همکاران (۱۹۹۵) گزارش کردند که ماهیان ماده تری پلویید هم از لحاظ عملکردی و هم از نظر هورمونی عقیم بودند در حالی که تری پلوییدهای نر دارای پروفایل هورمونی مشابه به ماهیان دیپلویید بودند اما گامت های آنها قابلیت لقاح نداشته و عقیم بودند. در این مطالعه تفاوتی از نظر میزان رشد در میان هر دوجنس دیپلویید و تریپلویید وجود نداشت (لوتز، ۲۰۰۱). همچنین برامیک و همکاران (۱۹۹۵) میزان رشد مشابهی را در

میان دیپلوییدها و تری پلوییدها تا زمان رسیدن به سن بلوغ گزارش نمودند. در پایان فصل رشد وزن ماهیان نر تری پلویید به‌طور متوسط ۶۶٪ بیشتر از نرهای دیپلویید بود و ماهیان ماده تریپلویید نیز در مقایسه با ماده های دیپلویید به‌طور میانگین ۹۵٪ بیشتر وزن داشتند(لوتز، ۲۰۰۱).

القای تری پلوییدی برای تولید ماهی عقیم در بعضی گونه‌های کپورماهیان همچون کپورعلفخوار، *Cternopharyngodon idella*، (کاسانی و کیتون، ۱۹۸۶) و کپور معمولی، *Cyprinus carpio*، (چرفاش و همکاران، ۱۹۹۰) مؤثر بوده‌است. در رابطه با ماهی کپور معمولی، *C. carpio*، چرفاش و همکاران (۱۹۹۴) میزان ماندگاری کل نتاج تری پلویید را حدود ۷۰٪ میزان مشاهده شده در گروه شاهد یک ساله (دیپلویید) یافت. با این که ماهیان تریپلویید عملکرد ماهی عقیم را نشان می‌دادند، میانگین وزن بدن آنها حدود ۸۵٪ گروه شاهد بود. در شرایط مختلف آزمایشی کپورهای تریپلویید نسبت به افراد دیپلویید رشد کمتری را نشان دادند(لوتز، ۲۰۰۱).

در ماهی آزاد اقیانوس اطلس کارتر و همکاران (۱۹۹۴) تاثیرات تریپلوییدی را بر مصرف غذا، رفتارهای تغذیه‌ای و رشد بررسی کردند و مشاهده نمودند که در صورت پرورش جداگانه هر گروه در ۴۰ روز اول پرورش تفاوت قابل ملاحظه‌ای در میزان رشد وجود دارد اما این اختلاف در ۵۲ روز بعد از میان می‌رود. در حالتی که ماهیان را به صورت ترکیبی (تری پلویید همراه با دیپلویید) پرورش داده می‌شوند، میزان رشد چندان اختلافی ندارد اما در میان افراد تری پلویید رفتارهای تهاجمی مشاهده گردید. در مطالعه دیگری که روی ماهی آزاد کوهو، *Oncorhynchus kisutch*، انجام شد ویتلر و همکاران (۱۹۹۵) متوجه شدند که ماهیان دیپلویید از مرحله لقاح تا تفریخ (۹۴٪ در مقابل ۴۳٪)، از مرحله تفریخ تا پرورش در استخر (۹۶٪ در برابر ۷۶٪)، در طول پرورش در آب شیرین (۹۲٪ در مقابل ۷۵٪) و در حین پرورش در آب دریا (۸۱٪ در برابر ۶۰٪) ماندگاری بهتری نسبت به افراد تری پلویید دارند(لوتز، ۲۰۰۱).

در کشور ما نیز مطالعاتی درباره القای تری پلوییدی بر روی بعضی گونه ها انجام شده است. القای تری پلوییدی بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان برای اولین بار در ایران توسط آذری‌تاکامی و همکاران (۱۳۷۶) با استفاده از شوک های گرمایی انجام شد که حاصل آن در بین تیمارهای مختلف کارایی به میزان ۲۷-۱۰۰٪ القای تری پلوییدی بوده است و بهترین بازده مربوط به دمای ۲۶ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۰ دقیقه بعد از لقاح بوده است. پروانه (۱۳۷۳) با القای شوک سرمایی بر ماهی کپور معمولی توانست ماهی تری پلویید ایجاد کند که تمایز جنسی در آنها با تاخیر انجام شد. پریور و پروانه (۱۳۷۲) توانستند با اجرای عملیات شوک سرمایی بر ماهی آمور تری پلویید به‌دست آورند.

کلباسی و جوهری (۱۳۸۷) امکان تولید جمعیت تمام ماده تری پلویید قزل آلای رنگین کمان را مورد بررسی قرار دادند که با استفاده از شوک گرمای ۲۶/۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه روی تخم ها و ۲۰ دقیقه بعد از لقاح موجب حصول تری پلوییدی به میزان ۸۰٪ گردید. از لحاظ میزان تکامل گنادها در سن ۸ ماهگی در جنس نر دیپلویید و تری پلویید مشابه به هم و در مراحل اولیه اسپرماتوژنز بودند اما برخلاف افراد ماده دیپلویید که

دارای اووسیت هایی در مرحله پیش زرده سازی یا پیش هسته سازی بودند، در جنس ماده تری پلوییدِ اووسیت وجود نداشت. همچنین مشاهده شد که میزان ناهنجاری های ظاهری در سلول های خونی مثل دمبلی شدن و تقسیم هسته گویچه های قرمز در افراد تری پلوییدِ به طور معنی داری از افراد دیپلوییدِ بیشتر است (جوهری و کلباسی، ۱۳۸۵). همچنین در مطالعه ای که درباره روند رشد و پارامترهای رشد وزنی ماهیان تری پلوییدِ تمام ماده پرورش یافته به شکل مجزا و مخلوط با ماهیان نر تری پلوییدِ در مقایسه با مخلوط نر و ماده دیپلوییدِ و تمام ماده دیپلوییدِ انجام گردید، مشاهده شد که بیشترین میزان رشد به گروه ماهیان تری پلوییدِ تمام ماده پرورش یافته به طور مجزا وجود داشته و مراتب بعدی به مخلوط نر و ماده تری پلوییدِ، نر و ماده دیپلوییدِ و تمام ماده دیپلوییدِ تعلق گرفته است (سوری نژاد و کلباسی، ۱۳۹۰).

۹-۱-ویژگیهای زیستی ماهی بنی

ماهی بِنی، *Barbus sharpeyi*، متعلق به جنس *Barbus* و از خانواده کپورماهیان Cyprinidae می‌باشد. این ماهی دارای بدنی کشیده سری کوچک و گوشتی با بافت متراکم و فشرده می‌باشد. رنگ ماهی بِنی در ناحیه پشت خاکستری و در قسمت های پایین بدن و شکم به رنگ خاکستری روشن می‌باشد (نیک پی،۱۳۷۶). (شکل۵-۱)

شکل۵-۱-شکل ظاهری ماهی بنی

در ماهی بنی سبیلک وجود ندارد. تعداد فلس ها روی خط جانبی ۳۵ ـ ۲۹ عدد و خارهای روی تیغه آبشش ۷ تا ۱۴ عدد می‌باشد (نجف پور،۱۳۷۴).

۱-۹-۱-پراکنش ماهی بِنی

بیش از ۱۷۰ گونه از باربوس ماهیان در دنیا شناسایی شده که عمدتاً در اروپا و جنوب آسیا و شمال آفریقا پراکنش دارند (شریفیان، ۱۳۸۴). درایران تاکنون ۲۰ گونه از این جنس شناسایی شده که عمده آنها در حوضه‌های آبریز دریای خزر، دریاچه ارومیه، مرکزی، دجله، خلیج فارس و هرمز پراکنش دارند ولی بیشترین

میزان تنوع و تراکم در حوضه آبریز دجله میباشد (رامین، ۱۳۷۹). در ایران در رودخانه های کارون و کرخه (نیک پی،۱۳۷۶) بهمن‌شیر، تالاب هورالعظیم و هور شادگان (نجف پور،۱۳۷۵) گزارش شده است.
این ماهی وابسته به آب های گرم و شیرین بوده، در آب های آرام با حرکت بسیار کم و دارای گیاهان آبزی یافت می‌شود (نجف پور،۱۳۷۵).

۲-۹-۱-تغذیه و عادات غذایی در ماهی بنی

بنی دارای یک مری کوتاه و فاقد معده است. روده نسبتا طویل و گشاد، دندان حلقی شبیه به دندانهای آسیاب است. رژیم غذایی این ماهی همه‌چیزخواری ارزیابی شده است (نیک پی،۱۳۷۵).
گزارش شده است که ماهی بنی علاوه بر پلت های ماهی کپور معمولی، به غذای پلت شده ماهی آزاد و قزل آلا نیز علاقه نشان می‌دهد. جمیلی (۱۳۶۹) گزارش نموده که بهترین غذای زنده برای این ماهی آرتمیا، کرم‌خاکی و دافنی است.

۳-۹-۱-تولیدمثل و تکثیر ماهی بنی

سن بلوغ ماهی بنی ۲-۱ سالگی بوده و در رودخانه ها و مناطق دارای جریان آب آرام و دارای گیاهان آبزی در اواخر زمستان و بهمن ماه تا اوایل بهار تخم‌ریزی می کند. تعداد تخم ها بین ۶۰ تا ۷۵ هزار عدد گزارش شده است (یزدی‌پور، ۱۳۷۰).
القاء مصنوعی ماهی بنی به وسیله عصاره تخلیص شده هیپوفیز کپور ماهیان انجام می شود. تزریق به میزان ۳ میلی گرم در کیلوگرم وزن بدن ماهی منجر به القاء تخم ریزی اولیه می شود.
تزریق دوم ۱۲ ساعت بعد از تزریق مقدماتی و به میزان ۰/۹ دوز اصلی به‌عنوان عامل بسیار موثر بر روی تخم ریزی نهایی محسوب می گردد. هم آوری ماهی بین ۷۵ تا ۸۵ درصد گزارش گردیده است. بعد از ۷۰ تا ۷۲ ساعت از انجام عمل لقاح در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد ۷۰ تا ۷۲ درصد تخم ها تبدیل به بچه ماهی نورس می گردد و رشد در ۱۴ روز اول به میزان ۹/۷۷ درصد وزن بدن گزارش شده‌است. مراقبت والدینی از تخم ها در این ماهی وجود ندارد. قطر تخم آبکشیده تا ۳/۷ میلی متر هم می رسد. طول دوره انکوباسیون ماهی بنی در دمای مختلف آب شامل ۱۶/۲ درجه سانتیگراد شش شبانه‌روز، ۲۰ درجه ۴ شبانه‌روز و ۲۷ درجه ۲/۵ شبانه‌روز طول می کشد (یزدی‌پور، ۱۳۷۰).

۱۰-۱-اهمیت ماهی بنی

ماهی بنی از گونه‌های بومی آب های شیرین کشور می‌باشد لذا در مقایسه با گونه های وارداتی و جدید فاقد محدودیت‌های اکولوژیک جهت معرفی به منابع آبی و استخرهای خاکی می‌باشد. خصوصاً که این ماهی

گوشت‌خوار نبوده و به‌عنوان گونه درنده و تهدیدکننده موجودات هرم های اکولوژیک در ساختار منابع آبی نمی‌باشد (شریفیان، ۱۳۸۴). ماهی بنی فیتوپلانکتون‌خوار بوده می‌تواند با شرایط استخرهای پرورشی سازگار شده و رشد نماید این ماهی در کشت توأم کپورماهیان حضور داشته و به‌عنوان رقیب اصلی ماهی کپور محسوب نمی‌گردد. این گونه در برنامه های سال های اخیر سازمان شیلات جزء گونه های مطرح جهت معرفی به ترکیب ماهیان پرورشی در استخرها بوده است و تحقیقات فراوانی در رابطه با جنبه های مختلف زیستی این ماهی انجام شده است (جمیلی، ۱۳۶۹، یزدی‌پور و مرعشی، ۱۳۷۰، نجف‌پور و همکاران، ۱۳۷۴، نیک‌پی و صفی خانی، ۱۳۷۵، شریفیان، ۱۳۸۴، مرتضوی‌زاده، ۱۳۸۷). طی ۲۰ سال اخیر تکثیر و پرورش این گونه به دو منظور استفاده در سیستم پرورش چند گونه‌ای یا رهاسازی در منابع آبی به منظور بازسازی ذخایر کاملاً توسعه یافته است.

از آنجایی که یکی از مشکلات پرورشی مطرح درباره این ماهی وزن نه چندان بالای این گونه (حدود ۶۰۰ تا ۷۰۰ گرم) در پایان فصل پرورش (حدود یک سال) بوده و با توجه به بازارپسندی آن در منطقه (جنوب‌غرب ایران و کشورهای همسایه)، هدف این پروژه در مرحله اول بررسی امکان القای تری پلوییدی در ماهی بنی و بازبینی پتانسیل های این گونه در پاسخ به شوک های القایی (سرما و گرما) از جمله یافتن دماهای کشنده و کارایی نتاج از لحاظ بازماندگی و میزان رشد و در پایان تعیین بهترین حالت برای به دست آوردن ماهیان تری پلویید از ماهی بنی بوده است. از سوی دیگر در صورت پاسخ مناسب ماهی بنی نسبت به القای شوک می توان در طرح های آتی برای ایجاد مولدین تتراپلویید و تهیه ماهیان تری پلویید از مولدین تتراپلویید برنامه‌ریزی نمود. شایان ذکر است که این مطالعه اولین تجربه صورت گرفته در رابطه با القای پلی پلوییدی بر روی ماهی بنی می باشد و تا کنون گزارشی در این باره منتشر نشده است.

۲- مواد و روش ها

۱-۲-تهیه مولدین، تکثیر ماهی بنی و القای شوک های دمایی بر روی تخم های استحصالی

برای اجرای عملیات تکثیر در این پروژه از مولدین بنی پرورش‌یافته با جیره‌های غذایی مناسب موجود در استخرهای پرورشی پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب کشور، استفاده گردید. ماهیانی که شرایط مناسب‌تر برای تکثیر را داشتند، انتخاب گردیدند و جهت گذراندن دوره آرامش به مخازن مخصوص واقع در هچری منتقل گردیدند. عملیات تکثیر و القای ماهیان به تخمریزی به روش یزدی‌پور وهمکاران (۱۳۷۰) انجام گردید. بدین صورت که برای آماده سازی عصاره هیپوفیز با در نظرگرفتن تعداد، جنسیت و وزن ماهیان، غده هیپوفیز مورد نیاز (۳ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) توزین گردیده، در یک هاون چینی استریل کاملاً به صورت پودر درآمده، به میزان محاسبه‌شده، حلال (محلول نمک ۷ گرم درلیتر از آب جوشیده سردشده) به آن افزوده شد. در پایان عصاره صاف شده با یک سرنگ خارج گردیده، در شرایط استریل تا زمان تزریق به مولدین نگه داشته شد. عصاره هیپوفیز در مرحله اول به مقدار ۰/۱ دوز مورد نیاز در عضله پایین باله پشتی تزریق گردید (شکل۱-۲).

شکل۱-۲ – تزریق عصاره غده هیپوفیز به مولدین بنی

حدود ۱۲ ساعت بعد تزریق نهایی به منظور تخم‌کشی از ماهیان و به میزان ۰/۹ دوز محاسبه شده به مولدین ماده انجام گردید. در همین زمان مولدین نر نیز به میزان ۲ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن تزریق گردیدند. از آنجایی که پس از تزریق هیپوفیز نیاز ماهی به اکسیژن حدود ۵۰٪ افزایش می‌یابد، با تنظیم جریان آب شیرهای ورودی به تانک نگهداری مولدین، این مورد تامین گردید. همچنین به منظور پیشگیری از تحریک شدید مولدین با استفاده از روکش مناسب محیط مخازن تاریک گردید. در طول مدت بعد از تزریق دوم مولدین از نظر وضعیت سلامت و تخم‌دهی مرتب بازرسی می‌شدند. سرانجام در روز تکثیر، مولدین آماده برای

تخم‌ریزی انتخاب گردیده قسمت انتهایی بدن و دم آنها با استفاده از یک حوله کاملا خشک شده و تخم ها از محفظه شکمی مولدین درون یک ظرف پلاستیکی جمع آوری گردید (شکل ۲-۲).

شکل۲-۲- جمع‌آوری تخم از مولدین ماهی بنی

از مولد نر آماده نیز اسپرم موردنیاز به دست آمده و به تخم ها افزوده شد که نسبت نر به ماده در عملیات تکثیر ۲ به ۱ بوده است. لقاح در این گونه به صورت خشک بوده و زمان از لحظه افزوده شدن اسپرم ثبت گردید. در طول این مدت تخم ها با استفاده از یک پر استریل مخلوط می‌شدند. بر اساس طرح پیش‌بینی شده برای هر تیمار تخم ها به حمام آب با دمای مشخص منتقل گردیده و به مدت لازم در معرض دمای موردنظر قرار گرفت. پس از اتمام دوره شوک دهی مرحله شستشوی تخم ها انجام گردید. مخلوط تخم ها به طور پیوسته با پر همزده می‌شد. جهت از بین بردن چسبندگی محلول شستشو پس از تقریباً هر ده دقیقه تعویض گردیده، بقایای تخمک های چسبیده و اسپرم ها دور ریخته می‌شد. وقتی تخم ها حالت گرد و جدا از هم پیدا می‌کردند با محلول تانن شستشو داده شده و در خاتمه هم آب تمیز به تخم ها افزوده شده، پس از ته‌نشین شدن تخم ها آب نیز از ظرف خارج می‌گردید (شکل ۳-۲).

شکل۳-۲ –شستشوی تخم های لقاح یافته در حین عملیات تکثیر

بعد از عملیات شستشو تخم ها به میزان ۵۰ گرم به هر انکوباتور انتقال داده شد که براساس نوع تیمار برچسب‌گذاری شده بودند (شکل۳-۲). با توجه به این که هر گرم تخم ماهی بنی (آب کشیده) حاوی ۳۵۰-۴۰۰ عدد تخم می‌باشد، بنابراین میزان تخم ریخته‌شده در هر انکوباتور تقریبا معادل ۲۰۰۰۰ عدد بوده است. به منظور تامین شرایط مناسب برای تخم ها، جریان ملایمی از آب از پایین انکوباتور به سمت بالا تنظیم شد تا تخم ها مرتب در حال حرکت باشند (شکل ۴-۲). دمای آب انکوباتورها ۲۳ درجه سانتیگراد اندازه‌گیری شد.

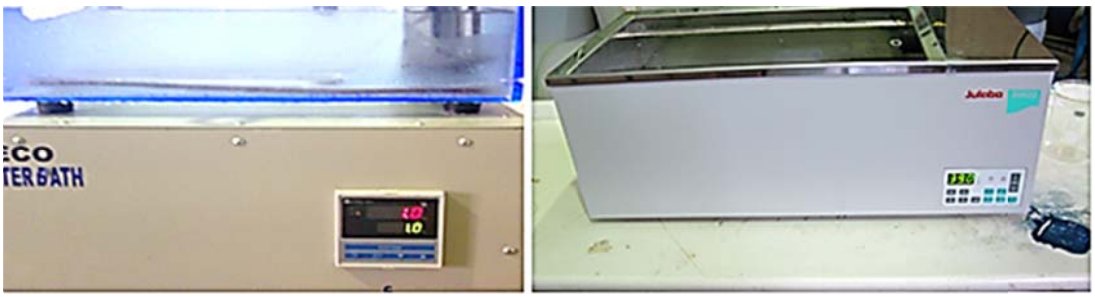
شکل ۴-۲- عملیات انتقال تخم ها به انکوباتور و تنظیم جریان مناسب آب

در طول دوره انکوباسیون تخم ها، میزان لقاح برای هر تیمار ثبت گردید. پس از طی دوره انکوباسیون و خروج لاروها از تخم، کیسه زرده به تدریج تحلیل رفته و تغذیه لاروها با استفاده از شیر خشک آغاز شد. در طول زمان نگهداری لاروها در زوک ها، پاک سازی و دورریزی مواد زاید صورت می‌گرفت.

استخرهایی که برای نگهداری لاروها پیش بینی شده بودند، مراحل آماده‌سازی را با استفاده از کود حیوانی، سم تری کلروفون و کود فسفاته طی نمودند. همچنین قفس های ویژه نگهداری لاروها در استخر همراه با شماره مربوط به تیمار آماده و در استخرها نصب گردیدند (شکل ۵-۲). لازم به ذکر است با توجه به فراوانی تعداد تیمارها و تکرارها و محدودیت های موجود جهت پرورش، تکرارهای هر تیمار به صورت مشترک در یک قفس قرار گرفتند.

شکل ۵-۲- عملیات ساخت و نصب قفس ها در استخرهای پرورشی

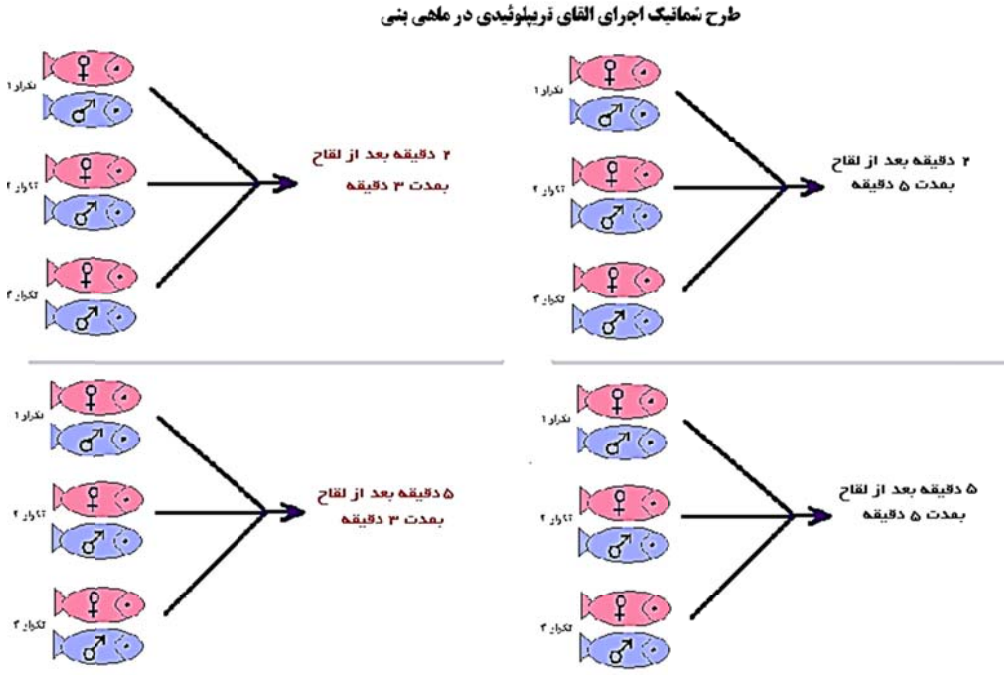
در روز اجرای عملیات تکثیر پیش از هر چیز ابزار موردنیاز برای القای شوک دمایی که شامل حمام آب سرد و گرم بود، آماده گردید و دمای تعیین شده برای شوک‌ها تنظیم گردید (شکل ۶-۲).
جهت نگهداری تخم ها در حمام آب از یک سری ساچوک با توری های تعبیه شده متناسب با قطر تخم های ماهی بنی استفاده گردید.



شکل ۶-۲– دستگاه حمام آب مورد استفاده جهت القای شوک های دمایی به تخم ها

شوک های دمایی پیش‌بینی‌شده در این پروژه شامل دو گروه سرما و گرما بوده که در هر کدام فاکتورهایی همچون زمان القای شوک بر تخم ها و طول مدت قرارگرفتن در معرض دمای شوک متغیر بودند. طرح کلی از

تیمارهای موردنظر در تصویر ۷-۲ دیده می‌شود. دماهای موردنظر برای شوک گرما شامل ۳۴، ۳۶ و ۳۸ درجه سانتیگراد و دماهای شوک سرما شامل ۱، ۲ و ۴ درجه سانتیگراد بوده‌اند.



شکل ۷-۲- الگوی طراحی شده جهت اجرای شوک های دمایی بر روی تخم های لقاح یافته ماهی بنی

پس از استحصال تخم، اسپرم موردنیاز را آماده نموده و از لحظه انجام لقاح زمان محاسبه می‌گردید. طبق جدول کاری تعیین‌شده مخلوط به پنج قسمت تقسیم می‌شد که چهار قسمت جهت اجرای شوک ها و یک قسمت به‌عنوان شاهد بدون تغییر دما و تنها به صورت یک تکثیر طبیعی مسیر خود را ادامه می‌داد. این روال برای هر دما به تعداد ۳ بار (سه تکرار) انجام شد. تخم ها در هر کدام از تیمارها در زمان معین‌شده از لحظه لقاح در معرض دمای موردنظر قرار می‌گرفتند و در طول این مدت به وسیله یک عدد پر تمیز به‌هم زده می‌شدند تا دچار چسبندگی نشوند. پس از طی زمان مقرر در دمای شوک از حمام آب خارج گردیده و بقیه عملیات همانند یک تکثیر معمولی برای ماهی بنی طی گردید که شامل شستشوی چندباره تخم ها با محلول لقاح تا رسیدن به حدی که تخم ها جدا از هم و سفت شده باشند و در نهایت شستشو با محلول تانن بود. سپس تخم ها به زوک های از پیش آماده‌شده منتقل گردیده و جریان آب زوک در حد مناسب برای تخم ها تنظیم گردید.

لازم به ذکر است که برای شناسایی بهتر و آسان تر تیمارهای این پروژه هر دما با یک حرف انگلیسی و شرایط اجرای شوک دمایی از نظر طول مدت شوک و مقطع زمانی شوک دهی و هر کدام از تکرارها با حروف ۱، ۲، ۳ و ۴ مشخص گردید که مشخصات کامل آنها در جدول ۱-۲ آمده است. به طور مثال تیمار C_{3-2} بیانگر شوک

۳۴ درجه سانتیگراد است که ۵ دقیقه بعد از لقاح و به مدت ۳ دقیقه شوک بر روی تخم ها اجرا شده و در ضمن تکرار دوم از این تیمار می‌باشد.

جدول۱-۲- نامگذاری تیمارها

نام تیمار	دما (°C)	مقطع زمانی اجرای شوک (دقیقه بعد از لقاح)	طول مدت شوک (دقیقه)
A_1	۳۸	۲	۳
A_2	۳۸	۲	۵
A_3	۳۸	۵	۳
A_4	۳۸	۵	۵
B_1	۳۶	۲	۳
B_2	۳۶	۲	۵
B_3	۳۶	۵	۳
B_4	۳۶	۵	۵
C_1	۳۴	۲	۳
C_2	۳۴	۲	۵
C_3	۳۴	۵	۳
C_4	۳۴	۵	۵
D_1	۴	۲	۳
D_2	۴	۲	۵
D_3	۴	۵	۳
D_4	۴	۵	۵
E_1	۲	۲	۳
E_2	۲	۲	۵
E_3	۲	۵	۳
E_4	۲	۵	۵
W_{38}	شاهد ۳۸ درجه سانتیگراد	-	-
W_{36}	شاهد ۳۶ درجه سانتیگراد	-	-
W_{34}	شاهد ۳۴ درجه سانتیگراد	-	-
W_4	شاهد ۴ درجه سانتیگراد	-	-
W_2	شاهد ۲ درجه سانتیگراد	-	-

۲-۲-پرورش لارو و بچه‌ماهیان بنی

در طول مراحل اولیه پرورش در زوک ها درصد لقاح و بازماندگی لاروها در هر یک از تکرارها محاسبه و ثبت گردید. تغذیه لاروها پس از تخم‌گشایی با استفاده از شیرخشک صورت گرفت و به صورت منظم عملیات

پاک‌سازی، ضدعفونی و نظارت های لازم بر روی لاروها انجام شد. حدود ۱۰ روز پس از عملیات تکثیر و زمانی که لاروها آماده برای رهاسازی در استخرها بودند، همزمان استخرها نیز در دوره زمانی مناسب با استفاده از کوددهی و سمپاشی‌های لازم به شرایط مناسب برای رهاسازی لاروها رسیدند. از آنجایی که برای بررسی‌های بعدی و مقایسه میان تیمارها نیاز به محدوده مستقل برای هریک از تیمارهای آزمایش بود و همچنین با توجه به تعداد زیاد تکرارهای هر تیمار و کل حالتهای موجود در این تحقیق و محدودیت های مکانی موجود در استخرهای موجود در پژوهشکده، تصمیم برآن شد که لاروها در قفس های پرورشی به ابعاد ۱متر × ۲متر × ۱/۵متر (ارتفاع کیسه تور نصب‌شده بر هر قفس ۱/۵متر بود) که مخصوص این منظور تهیه شدند، با تراکم متناسب پرورش یابند. فاصله کف کیسه تور از کف استخر حدوداً بین ۴۰ تا ۶۰ سانتی‌متر متغیر بود.

عملیات انتقال لاروها از هچری به استخر در ساعت های اولیه صبح و پس از بسته‌بندی لاروها در پاکتهای پلاستیکی همراه با تزریق اکسیژن صورت گرفت. پس از هم‌دما نمودن هر یک از بسته های پلاستیکی با دمای آب استخر، لاروها در قفس مربوطه رها می‌گردیدند. تراکم موردنظر برای رهاسازی لاروها در قفس حدود ۳۵۰-۳۰۰ عدد بوده است (شکل ۸-۲).

شکل ۸-۲- انتقال لاروها به قفس های پرورشی

در طول دوران پرورش لاروها در قفس های پرورشی تغذیه مناسب با استفاده از جیره‌های غذایی مخصوص انجام می‌گردید. این سیستم پرورشی مشکلات فراوانی را از جمله گرفتگی مداوم توری های قفس، تجمع گل‌ولای و گیاهان میکروسکپی و ماکروسکوپی بر روی تورها، خطر احتمال ورود موجودات متفرقه به درون تورها، حمله پرندگان به ماهی های درون قفس ها به همراه داشت (شکل ۹-۲).

شکل۹-۲- تصویری از پرندگان مهاجم به قفس های پرورشی

برای حل مشکلات مذکور تدابیری اندیشده شد. به طور مثال توری قفس ها به صورت منظم توسط کارگران درون استخر تمیز و شستشو می‌گردید. ضمن آن که در طول حضور ماهیان در استخر و متناسب با رشد آنها توری های با سایز بزرگتر انتخاب گردیده و جایگزین توری های قبلی می‌گردید (شکل ۱۰-۲). همچنین برای پیشگیری از ورود پرندگان شکارچی یا موجودات آبزی مزاحم روی قفس ها با استفاده از یک توری کاملاً پوشیده شد.

شکل۱۰-۲ – عملیات تعویض تور قفس ها در طول دوره پرورش

در مراحل پیشرفته‌تر رشد ماهیان، غذا با استفاده از تشتک های مخصوص در قفس قرار داده می‌شد و به این ترتیب امکان بررسی وضعیت تغذیه ماهیان نیز فراهم می گردید.

۳-۲-انتقال بچه ماهیان به کارگاه در پایان فصل پرورش

مرحله پرورش در قفس ها حدود ۶ ماه طول کشید و در پایان این مرحله بچه‌ماهیان پس از جمع‌آوری هر قفس به کارگاه منتقل گردیدند و در مخازن ۳۰۰ لیتری نگهداری شدند. در طول مدت کوتاه حضور در کارگاه، با استفاده از جریان مناسبی از آب و هواده مناسب شرایط مطلوب برای ماهیان فراهم گردید.

پس از انتقال ماهیان به کارگاه سریعا نسبت به انجام عملیات آزمایشگاهی اقدام گردید. در این مرحله پس از جابجایی ماهیان به آزمایشگاه ژنتیک، گسترش‌گیری از ماهیان انجام شد.

۴-۲-تهیه گسترش خونی از ماهیان

اندازه‌گیری ابعاد گویچه قرمز در خون ماهی یک روش غیرمستقیم برای تشخیص ماهیان تری پلوئید به شمار می‌آید که نیاز چندانی به تجهیزات گران‌قیمت یا مهارتهای فردی بالا ندارد و کاربرد آن را در مزارع پرورشی و مقاصد تجاری به صرفه می‌سازد. در بسیاری از مطالعات صورت گرفته این روش به‌عنوان یک روش مناسب و هم ردیف با تهیه کاریوتایپ از لحاظ اعتبار به شمار می‌آید و کاربرد آن جهت تشخیص حالت تری پلوئید در ماهیان آب شور و شیرین گسترش یافته است (ایهسن و همکاران، ۱۹۹۰، فلیپ و همکاران، ۲۰۰۱). در موارد متعدد استفاده از ابعاد گویچه قرمز به عنوان معیار جهت تعیین وضعیت پلوئیدی مورد استفاده قرار گرفته است (ولترز و همکاران، ۱۹۸۱، بنفی و ساترلین، ۱۹۸۴، بنفی، ۱۹۹۹، پوردام، ۱۹۹۳، باساواراجو و همکاران، ۲۰۰۲).

پیش از خون‌گیری از ماهی وسایل مورد نیاز که شامل اسکالپل،لام تمیزشده با الکل (عاری از چربی) و فاقد هرگونه آلودگی، دستمال کاغذی و دستمال لنز می‌باشند را فراهم نموده، پس از نیمه‌بیهوش نمودن ماهی وزن و طول اندازه گیری شده، در جدول مخصوص ثبت گردید. از هر گروه حداقل تعداد ۴۰ فرد (یا تعداد باقیمانده از گروه) برای تهیه گسترش خونی با استفاده از روش هوماسون (۱۹۷۹) مورد مطالعه قرار گرفت. با استفاده از اسکالپل دم ماهی را بریده و یک قطره از خون آن بر روی لام قرار داده شد.سپس با استفاده از یک لام تمیز دیگر با زاویه مناسب قطره خون بر روی لام پخش گردید. حدود ۱۵-۲۰ دقیقه فرصت مهلت داده شد تا گسترش ایجاد شده بر روی لام کاملاً خشک شود. سپس با استفاده از اتانول فیکس گردید. در مرحله بعد گسترش با استفاده از محلول گیمسای ۱۵٪ رنگ‌آمیزی شده و حدود ۳۰-۴۰ دقیقه زمان داده شد تا رنگ لازم را به خود بگیرد. لام با آب مقطر شستشو داده شده و کاملاً خشک گردید.

۲-۵-ثبت اطلاعات مربوط به گویچه های قرمز

پس از آماده شدن لام گسترش، با استفاده از یک میکروسکوپ نوری (Nikon Eclipse 50i) ابتدا با کمک لنز 40x محدوده مناسب برای بررسی گویچه های قرمز خون را تعیین نموده و سپس با استفاده از لنز 100x از گسترش مورد نظر عکس تهیه شد. برای محاسبات مورد نیاز از برنامه ImageJ (Ver. 1.44p) استفاده شد و در هر عکس سلول هایی که فرم نرمال گویچه قرمز داشتند، مورد بررسی قرار گرفتند. موارد مدنظر شامل داشتن هسته کامل، شکل نرمال بیضوی در گویچه، وضوح مناسب برای اجرای اندازه‌گیری طول هسته و سلول بوده اند. لازم به ذکر است که قبل از اندازه‌گیری، تنظیمات مربوط به برنامه ImageJ از جمله وارد نمودن مقیاس (scale) ثبت شده در هنگام عکس‌برداری با میکروسکپ به طور کامل انجام گردید. تصویر موجود در میکروسکپ به هنگام استفاده از لنز 100x معیاری را در صفحه به صورت یک خط با اندازه ۱۰میکرومتر نشان می‌دهد که عیناً همین مقدار در برنامه گفته شده وارد گردیده، ارزش‌گذاری شد. در هر گسترش حداقل ۳۰ عدد از گویچه های قرمز مورد محاسبه قرار گرفتند. به این ترتیب که قطر بزرگ و کوچک هر گویچه قرمز و هسته آن اندازه گیری شد و داده‌های آن در یک صفحه گسترده (Excell) ثبت گردید. با استفاد از داده‌های به‌دست‌آمده حجم و مساحت سلول و هسته با کمک فرمول مربوطه برای هر سلول مورد بررسی به‌شکل زیر محاسبه گردید:

$$\boldsymbol{V} = \frac{4}{3} \times \boldsymbol{\pi} \times (\frac{\boldsymbol{a}}{2}) \times (\frac{\boldsymbol{b}}{2})^2$$

در این فرمول a قطر بزرگ و b قطر کوچک، V حجم و S مساحت در سلول یا هسته می باشد.

$$\boldsymbol{S} = \boldsymbol{\pi} \times \frac{\boldsymbol{a}}{2} \times \frac{\boldsymbol{b}}{2}$$

۲-۶-آنالیز آماری و تحلیل داده‌ها

پس از ثبت مقادیر محاسبه شده فاکتورهای مختلف برای سلول های افراد در هر گروه (حجم، مساحت و قطر بزرگ سلول و هسته)، میانگین فاکتورهای مذکور در گروه های شاهد محاسبه گردید تا به‌عنوان testvalue در آزمون T-test مورد استفاده قرار گیرد. تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار آماری(SPSS (ver.16.0.0 صورت گرفت. با استفاده از آزمون مقایسه میانگین، میانگین داده‌های هر فرد با میانگین شاهد مربوطه مورد آزمون واقع شد. این مقایسه برای هر فرد در گروه های مختلف برای کل فاکتورهای اندازه گیری‌شده صورت گرفت. معنی‌دار بودن آزمون یعنی وجود اختلاف معنی‌داری بین هر فرد و شاهد مربوطه، زمانی تایید می‌گردد که مقدار معنی‌داری (P-Value) کمتر از ۰/۰۵ باشد. هر فردی که در این آزمون اختلاف معنی‌داری آن مورد تایید بوده، در مرحله بعد نسبت فاکتور موردنظر (مثلاً قطر بزرگ یا حجم هسته) به میانگین آن در گروه شاهد مربوط به آن تیمار محاسبه گردید. از آنجایی که در افراد تری پلویید به دلیل داشتن یکسری اضافه از کروموزوم ها حجم هسته بزرگتر می‌باشد لذا نسبت به‌دست آمده بیشتر از یک و حدود ۱/۵ می باشد (واتندورف، ۱۹۸۶، بنفی، ۱۹۸۴، مک‌کارتر، ۱۹۸۸)، چنین افرادی به‌عنوان افراد تری پلویید تلقی می‌شوند. در بسیاری از مطالعات پیشین

قطر بزرگ هسته به‌عنوان بهترین شاخص جهت تعیین سطح پلوییدی در ماهیان عنوان شده است (دوروتا و همکاران، ۲۰۰۶). در ادامه با استفاده از آزمون ANOVA مقایسه میانگین فاکتورهای شاخص بین افراد تری پلویید و دیپلویید (شاهد) صورت گرفت.

جهت تعیین بازدهی القای تری پلوییدی در گروه های مختلف از فرمول زیر استفاده شد:

درصد افراد تری پلویید= (نسبت تعداد افراد تری پلویید به مجموع افراد تری پلویید و دیپلویید) ×۱۰۰

بازده تری پلوییدی= (درصد بازماندگی لارو در هر تیمار نسبت به گروه شاهد × درصد افراد تری پلویید) ×۱۰۰

از آنجایی که یکی از سوالات مطرح در طراحی اولیه این پروژه بررسی وجود اختلاف در میزان رشد افراد تری پلویید در مقایسه با افراد دیپلویید بوده است، بدین منظور با استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) طول و وزن ماهیان شناسایی شده به‌عنوان تری پلویید و تیمار شاهد در پایان دوره پرورش، مقایسه گردید.

۳-نتایج

۱-۳-تکثیر و القای تری پلوییدی در ماهی بنی

با استفاده از عصاره هیپوفیز ماهی کپور که به صورت تجاری در بازار موجود است و تزریق آنها به مولدین ماهی بنی طی دو مرحله، در مدتی کمتر از ۲۴ ساعت مولدین به مرحله تخم‌کشی رسیدند. میانگین طول و وزن مولدین ماده به ترتیب ۴۶/۱ سانتی‌متر و ۱/۱۲ کیلوگرم و مولدین نر ۴۳/۰۸ سانتی متر و ۰/۷۵۹ کیلوگرم بوده است. دمای آب در طول مراحل تخم‌کشی و تفریخ بین ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتیگراد متغیر بود. میزان تخم استحصالی از مولدین بین ۲۵ تا ۱۵۰ گرم متغیر بود که برای هر انکوباتور ۵۰ گرم از تخم های لقاح یافته مورد استفاده قرار گرفت.

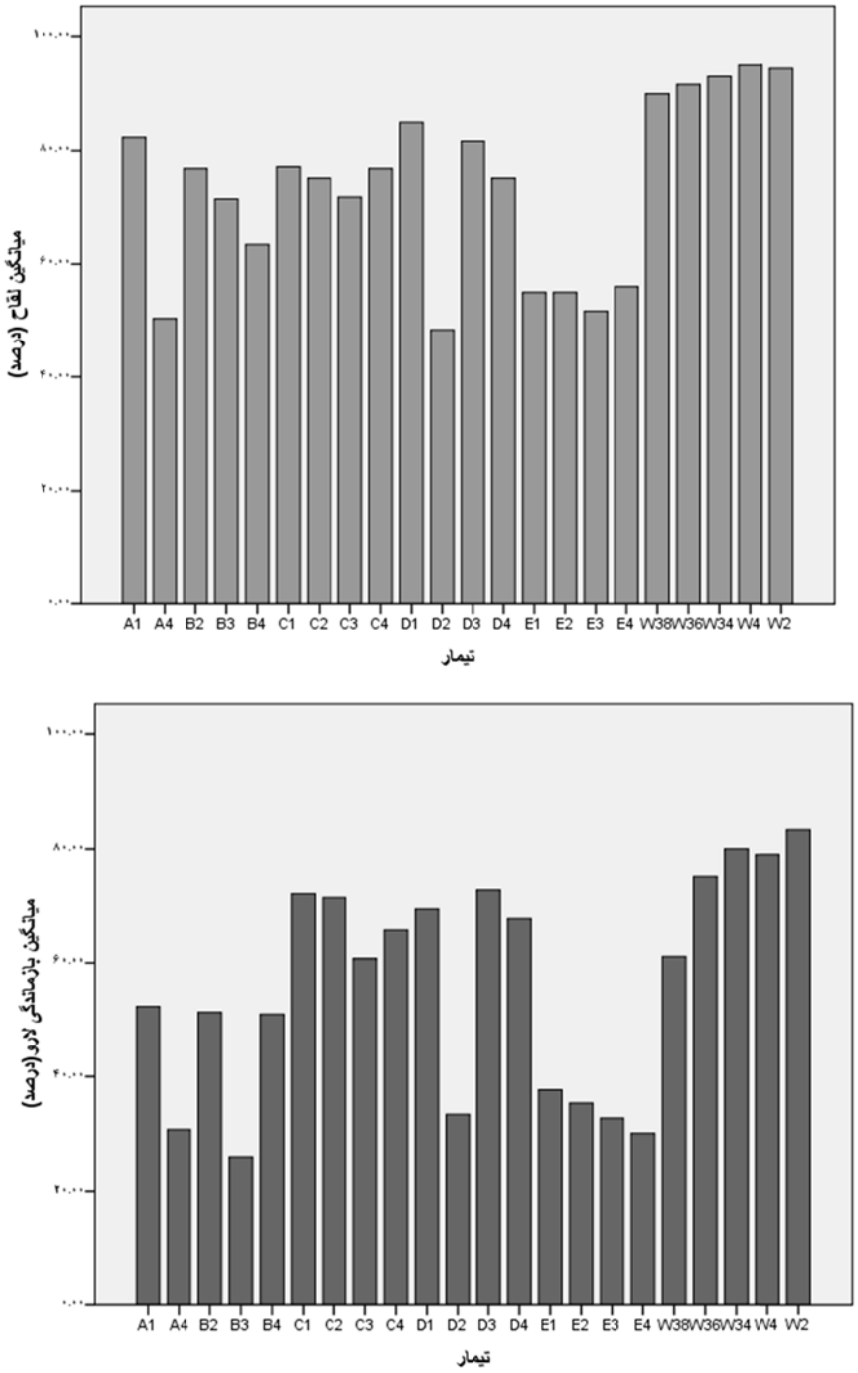
۲-۳-ماندگاری تخم ها و لاروها

از آنجایی که در برخی تیمارهای از پیش‌طراحی‌شده، شدت شوک دمایی خیلی بیشتر از دمای اپتیمم برای عملیات لقاح تخم ها در شرایط طبیعی برای ماهی بنی بوده است، احتمال آن می‌رفت که در بعضی دماها تخم ها قادر به ادامه روند رشد و تکاملی خود نباشند و بازده کار پایین باشد. نتایج نشان دادکه تخم هایی که در معرض دماهای ۳۹ و ۱ درجه سانتیگراد قرار گرفتند، توانایی ادامه روند تکاملی خود را نداشته و در همان مراحل ابتدایی نگهداری در زوک ها کاملاً از بین رفتند. لازم به ذکر است که جهت کسب اطمینان از این موضوع تکثیر دوبار تکرار گردید که نتیجه مشابه به‌دست آمد. لذا برای شوک گرما به جای ۳۹ درجه سانتیگراد، دمای ۳۸ درجه سانتیگراد جایگزین گردید که در این دما نیز در دو حالت از چهار حالت کلی (از نظرمقطع زمانی شوک‌دهی و طول مدت شوک) درصد تفریخ و بازماندگی لارو بسیار پایین بود. این دو حالت شامل ۲ دقیقه بعد از لقاح و ۵ دقیقه مدت شوک‌دهی و ۵ دقیقه بعد از لقاح و۳ دقیقه طول مدت شوک‌دهی بودند. یک روز بعد از انجام عملیات تکثیر مشاهده گردید که تخم های حاصل از تیمارهای فوق برخلاف روند طبیعی تکامل و رشد (ساخت رنگیزه) که سبب می‌شود رنگ تخم های لقاح‌یافته به شکل قهوه‌ای و سپس سیاه تغییر یابد به صورت سفید مایل به زرد درآمده که نشانه توقف روند رشد در این گروه ها بود. نتایج مربوط به مراحل اولیه تکثیر در تیمارهای مختلف، در جدول۱-۳ مشاهد می شود.

از نظر میزان لقاح و بازماندگی لارو در بین تیمارهای مختلف، بهترین شرایط در شوک های گرمایی در تیمارهای ۳۴ و ۳۶ درجه و در شوک های سرمایی در گروه ۴ درجه ملاحظه می‌شود. در تیمارهای ۲ درجه سانتیگراد میزان لقاح به حدود نصف رسیده است. همچنین در تیمار A_4 نیز این مقدار دچار افت شده است. در ضمن تیمارهای شاهد در رابطه با این فاکتورها وضعیت بهتری را نشان می دهند. نمودارهای مربوط به نتایج فوق در شکل ۳-۳ آورده شده است.

جدول۱-۳- داده های مربوط به میزان لقاح و بازماندگی لارو در تیمارهای مختلف

تیمار	درصد لقاح (فاصله اطمینان ۹۵٪)	درصد بازماندگی لارو (فاصله اطمینان ۹۵٪)
A1	۶/۴۸±۸۲/۳۳	۳/۷۱±۵۲
A2	۵/۷±۸۰	۲/۸۸±۵
A3	۸/۰۲±۸۶	۳/۳۳±۳/۳۳
A4	۱۷/۸۹±۵۰/۳۳	۱/۷۶±۳۰/۶۶
B1	۵/۴۸±۷۴/۶۶	۱/۶۶±۳۱/۶۶
B2	۱/۶۶±۷۶/۶۶	۳/۵۲±۵۱/۳۳
B3	۱۵/۶۷±۷۱/۳۳	۱۳/۰۱±۲۶
B4	۴/۴±۶۳/۳۳	۲/۶۴±۵۱
C1	۳/۷۸±۷۷	۱/۵۲±۷۲
C2	۲/۸۸±۷۵	۲/۴۰±۷۱/۳۳
C3	۷/۲۶±۷۱/۶۶	۱/۷۶±۶۰/۶۶
C4	۴/۴۰±۷۶/۶۶	۱/۲۰±۶۵/۶۶
D1	۲/۸۸±۸۵	۲/۹۶±۶۹/۳۳
D2	۲۵/۲۲±۴۸/۳۳	۱۶/۹۱±۳۳/۳۳
D3	۸/۸۱±۸۱/۶۶	۱/۴۵±۷۲/۶۶
D4	۸/۶۶±۷۵	۲/۱۸±۶۷/۶۶
E1	۲۷/۵۳±۵۵	۱۸/۹۴±۳۷/۶۶
E2	۲۷/۵۳±۵۵	۱۸/۱۲±۳۵/۳۳
E3	۲۶/۱۹±۵۱/۶۶	۱۶/۳۴±۳۲/۶۶
E4	۲۸±۵۶	۱۵/۲۷±۳۰
W38	۲/۸۸±۹۰	۱±۶۱
W36	۰/۸۸±۹۱/۶۶	۲/۸۸±۷۵
W34	۱/۵۲±۹۳	۲/۸۸±۸۰
W4	۰±۹۵	۲/۰۸±۷۹
W2	۰/۶۶±۹۴/۳۳	۱/۶۶±۸۳/۳۳



شکل ۱-۳- نمودار مقایسه میزان لقاح و بازماندگی لارو در تیمارهای مختلف

۳-۳-پرورش در استخر

در طول زمان نگهداری لاروها در قفس های پرورشی مشکلات فراوانی از قبیل گرفته‌شدن منافذ کیسه توری قفس ها توسط گل و لای یا ریزجلبکها، حمله پرندگان برای صید لاروها، تهاجم موجودات مزاحم به قفس ها وجود داشت که تلاش بر این بود با اتخاذ روش های مؤثر تا حد امکان شرایط مناسبی فراهم گردد. از جمله این

راهکارها نصب توری محافظ بر سطوح بیرونی قفس ها، وارسی مداوم توری قفس ها از لحاظ نداشتن رسوبات بر سطح آنها یا عدم وجود پارگی در کیسه تور و تمیزنمودن منظم توری ها و یا تعویض آنها در فاصله های زمانی مشخص متناسب با رشد لاروها بوده است. قفس ها به صورت ردیفی و بر روی دو رشته کابل در امتداد طول استخر قرار گرفتند. از مشکلات دیگری که در حین اجرای پروژه با آن برخورد شد عدم تعادل قفس های مذکور در هنگام تغییر سطح آب استخر بود که این موضوع در بعضی حالت ها موجب کم‌شدن فضای مفید برای بچه ماهیان می‌گردید. برای حل این مشکل از یکسری بویه استفاده شد تا متناسب با سطح آب استخر، غوطه‌وری لازم را برای قفس ها ایجاد نماید.

همزمان با کاهش دمای آب در حدود آذرماه و بیم بروز تلفات، بچه ماهیان موجود در هر قفس (تعداد بچه ماهیان باقیمانده در هر قفس در جدول۲-۳ ذکر شده است) پس از جابجایی به یک تانک پرورشی در محوطه کارگاه، جهت بررسی گویچه های قرمز خون به آزمایشگاه منتقل گردیدند. لازم به ذکر است که در مرحله نگهداری موقت در کارگاه در شب اول به دلیل اختلال به وجود آمده در شیر آب ورودی به تانک در یکی از تیمارها (۳۶ درجه سانتیگراد، دو دقیقه بعد از لقاح و طول مدت شوک ۳ دقیقه که در این پروژه به نام B_1 شناخته می‌شد) بچه‌ماهیان تلف گردیده و این تیمار از روند مطالعاتی حذف گردید.

۴-۳-وضعیت رشد بچه ماهیان در دوره پرورش

مقادیر اندازه‌گیری شده برای طول و وزن لارو ماهی بنی در زمان رهاسازی (ده روزه) به ترتیب به میزان ۰/۸ تا یک سانتی متر و ۰/۰۱ گرم بوده است. نتایج حاصل از اندازه‌گیری طول و وزن نمونه های مورد مطالعه (۱۰ نمونه از هر تیمار در هر بار اندازه‌گیری) در طول دوره پرورش و همچنین نتایج مربوط به وزن و طول نمونه‌های برداشت‌شده در پایان پروژه (آذرماه) (بدون درنظرگرفتن وضعیت پلوییدی) در جدول ۲-۳ مشاهده می‌شود.

همانگونه که در جدول مشاهده می‌شود بیشترین و کمترین میانگین‌های طولی و وزنی به تیمارهای A_4 و E_4 تعلق دارند. همچنین در اغلب تیمارهای مورد مطالعه میانگین‌های محاسبه‌شده (به جز تیمارهای دمای ۳۴ درجه سانتیگراد) در مقایسه با تیمارهای شاهد مربوطه، در سطح بالاتری قرار دارند.

جدول۲-۳- میانگین وزنی و طولی و بازماندگی تیمارهای مختلف در طول دوره پرورش(*- نمونه های این تیمار در مراحل نهایی پروژه تلف شدند)

نام تیمار	نتایج بیومتری در ماه دوم		نتایج بیومتری در ماه		نتایج بیومتری در ماه هفتم		تعداد باقیمانده
	میانگین وزن	میانگین	میانگین	میانگین	میانگین وزن	میانگین طول	
A_1	۰/۱±۰/۰۱	۲۴/۸۵±۰/۵۹	۰/۹۰±۰/۱۲	۴۷/۸۰±۱/۸۲	۲/۴۲±۰/۵۷	۶۷/۷۳±۲/۷۵	۵۴
A_4	۱/۸۷±۰/۴۳	۵۹/۶۰±۲/۶۳	۳/۵۲±۰/۱۲	۷۴/۱۴±۱/۳۵	۴/۵۲±۰/۳۷	۸۸±۱/۷۵	۳۹
B_1	۱/۳۴±۰/۲۵	۵۵/۴۰±۱/۲۸	۳/۳۷±۰/۷۱	۷۴/۳۳±۴/۸۴	*	*	*
B_2	۰/۹۲±۰/۰۸	۴۸/۵۰±۱/۸۴	۲/۷۲±۰/۴۶	۶۸/۴±۴/۵۴	۳/۶۲±۰/۳۸	۷۹/۱۸±۱/۸۳	۴۷
B_3	۰/۲۵±۰/۱۰	۳۱/۵۰±۳/۹۲	۱/۹۲±۰/۰۲	۶۱/۲۰±۱/۱۵	۳/۱۷±۰/۷۵	۷۱/۳۳±۶/۸۶	۲۷
B_4	۰/۸۲±۰/۰۶	۴۴/۵۰±۰/۲۱	۱/۸۵±۰/۰۶	۶۱/۲۰±۰/۸۶	۲/۳۴±۰/۱۱	۶۶/۲۳±۱/۴۳	۳۵
C_1	۰/۹۲±۰/۱۶	۴۶/۴۰±۲/۹۰	۱/۶۸±۰/۰۷	۶۲/۸۰±۳/۰۵	۱/۶۸±۰/۰۷	۶۳/۴۳±۰/۹۱	۵۰
C_2	۰/۲۴±۰/۰۲۶	۳۱/۳۰±۰/۹۷	۱/۴۴±۰/۰۶	۵۷±۰/۶۶	۱/۵۰±۰/۰۵	۶۲/۴۵±۰/۶۸	۶۵
C_3	۰/۴۹±۰/۱۰	۳۶/۲۵±۲/۴۴	۱/۹۶±۰/۲	۶۲/۴±۲/۲۰	۱/۹۶±۰/۱۵	۶۶/۸۳±۱/۴۹	۴۵
C_4	۰/۴۰±۰/۲۲	۳۴/۶۰±۴/۷۳	۱/۳۳±۰/۲۰	۵۳±۲/۴۹	۲/۱۶±۰/۱۱	۶۸/۶۳±۱/۰۷	۷۴
D_1	۰/۳۱±۰/۰۴	۲/۴۲±۰/۵۷	۱/۲۴±۰/۲۱	۵۱/۱۶±۲/۶۸	۳/۴۱±۰/۳۱	۷۴/۸۳±۲/۴۶	۴۶
D_2	۰/۱۵±۰/۰۲	۲۵/۱۴±۱/۳۷	۱/۲۱±۰/۲۳	۵۰±۲/۸۵	۳/۷۸±۰/۵۵	۷۶/۱۲±۳/۵۶	۳۳
D_3	۰/۴۴±۰/۱۳	۳۸±۳/۲۱	۰/۴۰±۰/۰۶	۳۴/۷±۱/۷۵	۲/۹۶±۰/۵	۶۴/۹۶±۴/۰۱	۲۴
D_4	۰/۴۲±۰/۰۷	۳۶±۱/۶۵	۱/۶۵±۰/۳۹	۵۵/۴±۴/۰۳	۱/۸۳±۰/۱۶	۶۱/۸۰±۱/۵۹	۴۲
E_1	۰/۲۱±۰/۰۳	۲۸/۹±۱/۳۰	۱/۲۴±۰/۱۴	۵۱/۶±۴/۰۳	۳/۵۳±۰/۶۱	۷۱±۳/۸۷	۳۱
E_2	۰/۰۵±۰/۰۰	۲۰/۶±۰/۶۵	۳/۹۵±۱/۹۶	۶۸/۷۵±۱۰/۰۹	۳/۰۹±۱/۳۵	۶۵/۸۵±۳/۵۱	۴۵
E_3	۰/۲۹±/۰۲	۳۲/۷۰±۰/۷۳	۱/۱۰±۰/۰۹	۵۰/۶۲±۱/۴۷	۲/۳۰±۰/۳۵	۶۷/۳۸±۲/۰۷	۴۳
E_4	۰/۲۱±۰/۰۲	۲۹/۶۰±۰/۶۸	۱/۲۱±۰/۱۶	۵۱±۲/۲۸	۱/۶۲±۰/۲۶	۵۹/۷۵±۱/۸۴	۴۴
W_{38}	۰/۴۵±۰/۰۶	۳۶±۲/۴۰	۲/۴۱±۰/۵۴	۶۳/۳۷±۵/۳۰	۲/۵۰±۰/۲۱	۶۷/۸۱±۱/۵۹	۳۲
W_{36}	۰/۱۴±۰/۰۱	۲۵/۵±۱/۰۳	۱/۲۶±۰/۱۴	۵۲/۳۳±۱/۹۴	۳/۴۵±۰/۴۸	۷۳/۰۵±۲/۷۷	۳۸
W_{34}	۰/۲۳±۰/۰۲	۳۰/۸±۰/۶۱	۱/۳۸±۰/۱۶	۵۹/۲±۲/۵۹	۵/۰۵±۰/۳۹	۸۵/۷۴±۲/۴۲	۳۲
W_4	۰/۴۲±۰/۰۲	۳۷/۴۲±۰/۹۷	۰/۴۳±۰/۰۳	۳۶/۷±۰/۸۱	۱/۶۷±۰/۲۰	۵۸/۸۸±۱/۵۹	۶۰
W_2	۰/۳±۰/۰۳	۳۲/۷±۱/۳۳	۰/۴۰±۰/۰۳	۳۶/۲±۰/۹۲	۲±۰/۴۸	۵۲/۳۸±۱/۷۲	۵۸

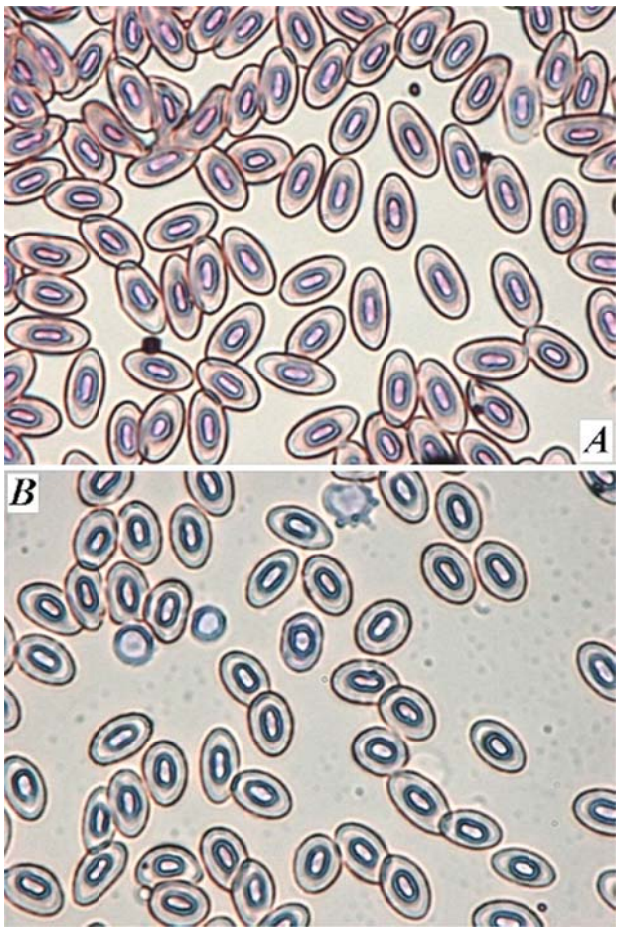
پس از انجام مطالعات مربوط به اندازه گیری ابعاد گویچه های قرمز خونی در میان افراد مورد بررسی و مقایسه آنها با گروه های شاهد نظیر هر تیمار، مواردی که از لحاظ تری پلوییدی مورد تایید قرار گرفتند، در مرحله بعد از نظر وضعیت رشد و شاخص های ظاهری نیز مقایسه شدند. برای این منظور از آزمون مقایسه میانگین ها بهره گرفته شد و نتیجه این بررسی ها که شامل مقایسه تیمارها با گروه شاهد نظیر آنها می باشد، در بخش ضمیمه ارائه شده است. در بین تیمارهای دمای ۳۸ درجه تیمار A_4 هم ازلحاظ طول و هم وزن برتری محسوسی را نسبت به سایر گروه ها از جمله تیمار شاهد نشان می‌دهد که این اختلاف با آزمون T-test نیز بررسی شده و سطح

معنی‌داری آن برای هر دو عامل طول و وزن کمتر از ۰/۰۵ بوده است. نتایج مربوط به مقادیر طول و وزن افراد تری پلوییدهر تیمار در مقایسه با شاهد ذیربط و نتیجه حاصل از اجرای آزمون معنی‌داری برای این فاکتورها در افراد مذکور در بخش ضمیمه آورده شده است.

۵-۳-نتایج بررسی سلول های خونی

همانند سایر ماهیان، گویچه های قرمز ماهی بنی نیز به شکل بیضوی و دارای هسته‌ای متراکم و فشرده می‌باشند. پس از بررسی گویچه های قرمز در افراد هر گروه از لحاظ فاکتورهایی همچون قطر بزرگ و کوچک، حجم و مساحت در سلول و هسته و آزمایش نتایج حاصله با استفاده از آزمون T-test افرادی که از نظر سطح معنی داری در حد قابل قبول بودند ($P<0.05$) به‌عنوان داده قابل استناد از نظر القای پلی پلوییدی نگه داشته شده و در مراحل بعدی آنالیز مورد استفاده قرار گرفتند. سپس نسبت فاکتورهای محاسبه شده به شاهد برای هر فرد اندازه‌گیری شد. در این مرحله مشاهده شد که فاکتورهای اندازه‌گیری شده در رابطه با هسته تخمین بهتری را جهت تعیین وضعیت پلوییدی افراد به دست می دهند که این موضوع نیز قبلاً در چندین پژوهش انجام شده در این ارتباط از جمله بک و بیگر (۱۹۸۳) به دست آمده است. لذا افرادی که نسبت های مذکور در آنها (به ویژه قطر بزرگ و حجم هسته) بیانگر وجود افزایش بوده (از ۱/۳ و بیشتر) به‌عنوان افراد تری پلوییدبه حساب آمدند.

آمار افراد بررسی شده در هر گروه و نتیجه به‌دست آمده از لحاظ سطح پلوییدی در جدول ۳-۳ آورده شده است. برای محاسبه درصد تری پلوییدی در هر تیمار، نسبت تعداد افراد تعیین شده به عنوان تری پلوییدبه کل افراد مطالعه شده در آن گروه در ۱۰۰ ضرب گردید. همچنین راندمان تری پلوییدی در هر گروه نیز محاسبه شده است.



شکل ۲-۳- تصویر میکروسکپی گویچه های قرمز در افراد دیپلویید و تری پلویید ، *A*- نمونه دیپلویید، *B*- نمونه تری پلویید (بزرگنمایی:۱۰۰۰)

جدول ۳-۳- نتایج حاصل از بررسی افراد جهت تعیین سطح پلوییدی و بازده القای تری پلوییدی

نام تیمار	تعداد کل سلول های بررسی شده	تعداد افراد بررسی شده	تعداد افراد تری پلویید	بازماندگی لارو (فاصله اطمینان ٪۹۵)	بازماندگی نسبی لارو (نسبت به تیمار شاهد) (٪)	بازده تری پلوییدی (٪)
A_1	۱۲۰۰	۴۰	۳۳	۵۲±۳/۷۱	۸۵	۷۰/۳
A_4	۱۱۷۰	۳۹	۳۷	۳۱±۱/۷۶	۵۰	۴۷/۷
B_2	۱۲۰۰	۴۰	۲۲	۵۱±۳/۵۲	۶۸	۳۷/۶
B_3	۸۱۰	۲۷	۱	۳۸±۱/۱۵	۳۵	۳/۹
B_4	۱۰۵۰	۳۵	۱۱	۵۱±۲/۶۴	۶۸	۲۱/۴
C_1	۱۲۰۰	۴۰	۲۷	۷۲±۱/۵	۹۰	۶۰/۸

C_2	۱۲۰۰	۴۰	۳۳	۷۱±۲/۴	۸۹	۷۳/۶
C_3	۱۲۰۰	۴۰	۱۴	۶۱±۱/۷۶	۷۶	۲۶/۵
C_4	۱۲۰۰	۴۰	۳۶	۶۶±۱/۲۰	۸۲	۷۳/۹
D_1	۱۲۰۰	۴۰	۱۰	۶۹±۲/۹۶	۸۸	۲۱/۹
D_2	۹۹۰	۳۳	۱۳	۴۶±۴/۹	۴۲	۱۶/۶
D_3	۷۲۰	۲۴	۶	۷۲±۱/۴	۹۲	۲۳
D_4	۱۲۰۰	۴۰	۱۸	۶۷±۲/۱	۸۶	۳۸/۵
E_1	۹۳۰	۳۱	۱	۵۴±۳/۲۱	۴۵	۲/۹
E_2	۱۲۰۰	۴۰	۱	۵۲±۴/۰۹	۴۳	۲/۱
E_3	۱۲۰۰	۴۰	۲	۴۹±۰/۸۸	۳۹	۲
E_4	۱۲۰۰	۴۰	۳	۴۸±۴/۴	۳۶	۲/۷
W_{38}	۹۶۰	۳۲	۰	۶۱±۱	–	–
W_{36}	۱۱۴۰	۳۸	۰	۷۵±۲/۸۸	–	–
W_{34}	۹۶۰	۳۲	۰	۸۰±۲/۸۸	–	–
W_4	۱۲۰۰	۴۰	۰	۷۹±۲/۰۸	–	–
W_2	۱۲۰۰	۴۰	۰	۸۳±۱/۶	–	–

بر اساس جدول فوق بیشترین درصد تری پلوییدی ایجادشده در گروه های A_4 ، C_4 و C_2 مشاهده می شود. از سوی دیگر در گروه های B_3، E_1، E_2، E_3 و E_4 کمترین تعداد افراد تری پلوییدی یافت شده است. بالاترین بازدهی تری پلوییدی در گروه های C_2 و C_4 به دست آمد.

نتایج حاصل از محاسبه فاکتورهای اندازه‌گیری شده در گویچه های قرمز و مقایسه آنها بین افراد دیپلویید و تری پلویید در جدول ۴-۳ آمده است.

جدول ۴-۳- نتایج حاصل از اندازه‌گیری ابعاد سلول و هسته در گروه های مختلف (برحسب میکرومتر)

تیمار	±SE میانگین قطر بزرگ سلول	±SE میانگین قطر کوچک سلول	±SE میانگین قطر بزرگ هسته	±SE میانگین قطر کوچک هسته	±SE میانگین حجم سلول	±SE میانگین حجم هسته	±SE میانگین مساحت سلول	±SE میانگین مساحت هسته
A_1	۱۰/۴۰±۰/۰۶	۵/۸۵±۰/۰۳	۵/۴۹±۰/۰۲	۳/۰۶±۰/۰۲	۱۸۶/۸۸±۲/۱۱	۲۷/۱۴±۰/۳۶	۴۷/۷۱±۰/۳۴	۱۳/۱۸±۰/۱
A_4	۱۳/۷۵±۰/۱۶	۶/۲۷±۰/۰۴	۶/۹۰±۰/۰۷	۳/۱۴±۰/۰۳	۲۸۴/۴۰±۵/۰۳	۳۶/۰۳±۰/۸۶	۶۷/۵۶±۰/۹۳	۱۷±۰/۲۶
B_2	۱۳±۰/۳	۶/۵۴±۰/۰۹	۶/۳۱±۰/۱۶	۳/۲۴±۰/۰۵	۲۹۵/۵۳±۱۲/۷۰	۳۵/۴۸±۱/۶۸	۶۶/۹۹±۲/۱۸	۱۶/۰۹±۰/۵۴
B_3	۱۱/۳۳±۰/۲۹	۶/۰۳±۰/۴۹	۵/۱۷±۰/۰۷	۲/۷۷±۰/۱۲	۲۱۸/۶۰±۳۰/۴۷	۲۱/۳۴±۲/۱۵	۵۳/۴۶±۳/۱۳	۱۱/۲۹±۰/۶۲
B_4	۱۱/۷۵±۰/۴۶	۶/۲۷±۰/۰۷	۵/۸۵±۰/۲	۳/۱۴±۰/۰۳	۲۴۳/۶۲±۱۱/۷۴	۳۰/۹۰±۱/۴۵	۵۷/۸۳±۲/۴۵	۱۴/۴۶±۰/۵۷
C_1	۱۰/۸۵±۰/۱۵	۶/۵۵±۰/۰۴	۵/۲۶±۰/۰۸	۳/۱۹±۰/۰۴	۲۴۵/۱۲±۵/۸۶	۲۸/۸۰±۱/۱۲	۵۵/۷۶±۱/۰۱	۱۳/۲۵±۰/۳۵
C_2	۱۱/۱۴±۰/۲۳	۶/۰۱±۰/۰۸	۵/۵۸±۰/۱	۳/۱۷±۰/۰۵	۲۱۵/۹۷±۱۲/۰۴	۳۰/۲۱±۱/۵۳	۵۲/۸۶±۱/۸۴	۱۳/۹۳±۰/۴۳
C_3	۱۰/۷۹±۰/۰۷	۵/۹۰±۰/۰۵	۵/۲۵±۰/۰۷	۳/۰۳±۰/۰۵	۱۹۷/۳۳±۳/۰۲	۲۵/۷۲±۱/۰۲	۴۹/۹۰±۰/۴۵	۱۲/۵۰±۰/۲۹
C_4	۱۰/۶۲±۰/۰۶	۶/۲۵±۰/۰۴	۵/۴۳±۰/۰۳	۳/۱۶±۰/۰۳	۲۱۷/۶۴±۲/۷۱	۲۸/۷۸±۰/۶۳	۵۲/۰۱±۰/۳۵	۱۳/۴۷±۰/۱۸
D_1	۱۰/۷۴±۰/۰۹	۶/۵۳±۰/۰۶	۵/۴۹±۰/۰۷	۳/۲۶±۰/۰۳	۲۴۰/۴۱±۵/۴۲	۳۱±۰/۷۸	۵۴/۹۸±۰/۷۹	۱۴/۰۶±۰/۲۴
D_2	۱۰/۸۶±۰/۱۴	۶/۵۳±۰/۰۵	۵/۳۴±۰/۰۷	۳/۲۷±۰/۰۵	۲۴۳/۰۸±۴/۳۰	۳۰/۶۵±۱/۲۳	۵۵/۵۶±۰/۷۳	۱۳/۷۷±۰/۳۵
D_3	۱۱/۱۹±۰/۴۲	۶/۴۵±۰/۲	۵/۶۸±۰/۲۹	۳/۲۴±۰/۰۸	۲۴۸/۲۷±۲۵/۷۳	۳۲/۲۶±۳/۲۷	۵۶/۸۳±۳/۸۳	۱۴/۵۵±۱/۰۹
D_4	۱۰/۸۰±۰/۰۹	۶/۴۸±۰/۰۷	۵/۳۷±۰/۰۴	۳/۵۳±۰/۰۷	۲۳۸/۴۵±۵/۹۶	۳۵/۶۱±۱/۴۷	۵۴/۸۷±۰/۷۹	۱۴/۸۸±۰/۳۴
E_1	۱۰/۲۱±۰/۳۷	۶/۳۵±۰/۳۸	۴/۹۹±۰/۱۰	۳/۱۶±۰/۰۷	۲۱۸/۸۵±۳۰/۹۰	۲۵/۵۶±۱/۱۶	۵۱/۰±۴/۵۸	۱۲/۳۹±۰/۳۱
E_2	۱۰/۳۲±۰/۲۶	۶/۵۴±۰/۲۲	۵/۱۲±۰/۲۴	۳/۲۱±۰/۱۱	۲۳۱/۶۸±۲۱/۲۴	۲۷/۷۶±۰/۶	۵۲/۹۵±۳/۱	۱۲/۸۸±۰/۱۶
E_3	۹/۹۹±۰/۰۱	۵/۷۵±۰/۲۵	۷/۰۱±۰/۵	۳/۳۰±۰/۴۴	۱۷۳/۴۵±۱۴/۷۶	۴۲/۲۷±۱۲/۹۵	۴۴/۹۶±۱/۸۸	۱۸/۳۸±۳/۵۲
E_4	۱۰/۳۱±۰/۱۶	۶/۸۳±۰/۰۹	۵/۵۱±۰/۲۱	۳/۴۵±۰/۲۶	۲۵۲/۴۳±۶/۴۰	۳۵/۵۵±۶/۵۲	۵۵/۲۵±۰/۸۶	۱۵/۰۱±۱/۶۵
W_{38}	۱۰/۳۲±۰/۰۸	۶/۵۶±۰/۰۵	۴/۴۳±۰/۰۷	۲/۴۳±۰/۰۵	۲۳۴/۱۰±۴/۴۵	۱۴/۴۴±۰/۷۳	۵۳/۱۱±۰/۶۶	۹/۴۷±۰/۲۹
W_{36}	۱۰/۴۴±۰/۰۶	۶/۲۵±۰/۰۴	۴/۷۶±۰/۰۶	۲/۵۷±۰/۰۶	۲۱۴/۴۹±۲/۹۵	۱۷/۳۵±۰/۹۷	۵۱/۱۴±۰/۴۳	۹/۶۸±۰/۳۳
W_{34}	۱۰/۶۰±۰/۱۲	۶/۳۸±۰/۰۵	۴/۴۸±۰/۱۱	۲/۳۷±۰/۰۷	۲۲۷/۵۲±۵/۱۲	۱۴/۴۰±۱/۲۲	۵۳/۰۷±۰/۸۴	۸/۵۱±۰/۴۴
W_4	۱۰/۳۳±۰/۰۶	۶/۰۸±۰/۰۴	۴/۸۰±۰/۰۷	۲/۵۶±۰/۰۵	۲۰۱/۳۴±۳/۴۳	۱۷/۳۹±۰/۸۹	۴۹/۲۸±۰/۵۲	۹/۷۷±۰/۳۲
W_2	۱۰/۳۴±۰/۰۶	۶/۱۷±۰/۰۴	۵/۰۸±۰/۰۷	۲/۷۸±۰/۰۵	۲۰۶/۶۵±۲/۹۵	۲۱/۵۸±۰/۸۶	۴۹/۹۸±۰/۴۶	۱۱/۲۲±۰/۳۱
میانگین کل شاهدها	۱۰/۴۰±۰/۰۳	۶/۲۷±۰/۰۲	۴/۷۳±۰/۰۳	۲/۵۵±۰/۰۲	۲۱۵/۶۱±۱/۸۸	۱۷/۲۵±۰/۴۶	۵۱/۱۶±۰/۲۸	۹/۸±۰/۱۶

محدوده اندازه قطر بزرگ گویچه های قرمز افراد دیپلویید بررسی شده در این تحقیق (۱۰/۴۰±۰/۰۱میکرومتر) در محدوده اعلام شده برای اغلب ماهیان استخوانی (بین ۸ تا ۱۵میکرومتر) قرار دارد (رگنار، ۱۹۹۲). براساس اطلاعات حاصله از فاکتورهای اندازه‌گیری شده در تیمارهای مختلف و مقایسه آنها با تیمارهای شاهد چنین به نظر می رسد که کمترین میزان تغییرات در فاکتورهایی همچون قطر کوچک سلول و هسته و قطر بزرگ سلول

وجود داشته است. بارزترین تغییرات در فاکتورهای حجم و قطر بزرگ هسته به چشم می خورد که این موضوع با یافته های قبلی درباره تاثیر تغییرات پلوییدی بر قطر بزرگ هسته و حجم آن (دوروتا و همکاران، ۲۰۰۶، جنکان و همکاران، ۲۰۰۷، وزنیکی و کازمینسکی، ۲۰۰۲، بلرین و همکاران، ۲۰۰۴) منطبق می باشد. معنی‌داری اختلاف مشاهده‌شده در رابطه با فاکتورهای مذکور با استفاده از روش T-test مورد تایید قرار گرفت و $P < ۰/۰۵$ بوده است.

۴- بحث و نتیجه‌گیری

اگرچه تاکنون در رابطه با بسیاری از گونه های ماهیان القای تری پلوییدی تجربه شده است اما در این تحقیق برای اولین بار چنین آزمونی در رابطه با ماهی بنی که یکی از ماهیان بومی خوزستان و کشورهای همسایه می‌باشد، صورت گرفت که طبعاً به دلیل نبود پیش‌زمینه اطلاعاتی درباره نحوه پاسخ به القای شوک در این ماهی، مشکلات و سوالات فراوانی در این ارتباط مطرح بود. یکی از اهداف اصلی این تحقیق نیز بررسی نتیجه القای شوک های دمایی در ماهی بنی و به دست آوردن محدوده دمایی مناسب برای القای تری پلوییدی بوده است.

در این مطالعه تکثیر و تخمکشی از مولدین ماهی بنی با استفاده از عصاره هیپوفیز با موفقیت انجام شد و تخم های لقاح‌یافته طبق برنامه طراحی‌شده جهت القای شوک های گرمایی و سرمایی در شرایط دمایی مربوطه قرار گرفتند. از جمله پرسش های مطرح در این مطالعه بیشینه و کمینه دمایی که تخم های ماهی بنی توانایی مقاومت در برابر آن را داشتند یا به‌عبارتی دیگر تعیین دماهای کشنده بود. اگرچه این موضوع قابل پیش بینی بود که بازدهی عملیات تکثیر با وجود شرایط نامساعد دمایی مثل گرمای حدود ۴۰ درجه سانتیگراد یا نزدیک به صفر به شدت تحت تاثیر قرار می‌گیرد و دچار افت می‌شود. از سوی دیگر دمای مناسب برای القای تریپلوییدی در یک گونه در محدوده چنددرجه‌ای حد بالایی یا پایینی کشنده برای آن گونه است (امینی، ۱۳۸۸). این موضوع در رابطه با ماهی بنی با آزمایشهای فراوان به نتیجه رسید و مشخص شد که این گونه در دمای ۳۹ درجه سانتیگراد (شوک گرمایی) و ۱ درجه سانتیگراد (شوک سرمایی) قادر به ادامه روند طبیعی تکامل در تخم های لقاح‌یافته نبوده و حاصل آن بروز تلفات در تخم ها می‌باشد. لذا براساس تجربه های این تحقیق، نزدیک‌ترین دما به دماهای کشنده برای شوک گرمایی و سرمایی در ماهی بنی به ترتیب ۳۸ و ۲ درجه سانتیگراد تعیین گردید. در برخی تیمارها از جمله A_4 و تیمارهای دمای ۲ درجه سانتیگراد میزان بازدهی عملیات تکثیر تحت تاثیر شرایط نامناسب دمایی افت محسوسی داشته اما در دمای ۴ درجه سانتیگراد وضعیت بهتری وجود داشت. همچنین در گروه شوک های گرمایی، تیمارهای دمای ۳۴ درجه سانتیگراد شرایط بهتری را نسبت به دیگر تیمارها نشان می‌دهد که این امر می‌تواند به دلیل فاصله گرفتن از دمای کشنده نسبت به سایر دماها باشد. بیشترین و کمترین میزان بازماندگی لارو به ترتیب در شوک های ۳۴ درجه سانتیگراد و ۳۸ درجه سانتیگراد قابل مشاهده است که در حالت دوم این موضوع نیز به دلیل شرایط دمایی محیط به ویژه طولانی بودن مدت قرارگیری در معرض دمای نزدیک به دمای کشنده منطقی به نظر می رسد. در مطالعات دیگری که جهت القای تری پلوییدی بر روی ماهیان دیگر صورت گرفته از جمله گورشکوف و همکاران (۱۹۸۸) بر روی ماهی *Sparus aurata* با شوک گرمایی دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، چرفاش و همکاران (۱۹۹۰) و هولبک و همکاران (۱۹۸۸) بر روی ماهی کپور معمولی با شوک های سرما و گرما به ترتیب ۰ تا ۲ درجه سانتیگراد و ۴۰ درجه سانتیگراد و کاسانی و کیتون (۱۹۸۶) برای ماهی آمور با شوک گرما دمای ۴۲ درجه سانتیگراد، ردی و همکاران (۱۹۹۰) برای کپور

هندی روهو شوک گرمای ۴۲ درجه سانتیگراد، کدپرنگ و ناکورن (۲۰۰۰) برای ماهی بارب نقره ای (*Puntius gonionotus*)، شوک سرمای ۲ درجه سانتیگراد را مناسب یافتند. در رابطه با شوک های سرمایی در مطالعه حاضر علاوه بر آن که بازماندگی لاروها تحت تاثیر شوک های سرما کاهش یافت (به ویژه تیمارهای دمای ۲درجه سانتگراد)، تعداد افراد تری پلوییید نیز بسیار کم بوده است و در کل بازدهی القاء در گروه شوک های سرمایی بسیار پایین بوده است و به نظر میرسد استفاده از شوک های گرمایی برای ماهی بنی مناسب تر است. پیش از این نیز در رابطه با ماهی کپور هندی روهو استفاده از شوک های سرمایی ناموفق گزارش شده است (ردی و همکاران، ۱۹۹۰) یا درصد پایینی از القای تری پلوییدی را به همراه داشته است (لینهارت، ۲۰۰۱). ممکن است استفاده از دماهای بالاتر با طول مدت بیشتر در بهینه سازی بازدهی القاء موثر باشد. اگرچه طولانی تر شدن مدتی که تخم ها در معرض شوک قرار می گیرند، ممکن است خود به صورت یک عامل منفی عمل کند. به طور مثال درباره ماهی کپور معمولی طبق گزارش گوملسکی (۲۰۰۳) اگرچه مطالعات ابتدایی درباره القای تری پلوییدی با شوک های دمایی سرما صورت گرفته اما در مطالعات اخیر بیشتر شوک های گرمایی مورد استفاده قرارگرفته اند از این جهت که طول مدتی که تخم های لقاح یافته در معرض شوک قرار می گیرند در گروه شوک های گرمایی کوتاه تر است.

به طور کلی مهمترین عواملی که میزان اثربخشی شوک ها را تعیین می کنند به ترتیب اهمیت عبارتند از : زمان القای شوک، شدت شوک و طول مدت القاء (فلیپ و همکاران، ۱۹۹۷). مقادیر بحرانی هر کدام از این عوامل برای هر گونه اختصاصی بوده، برای به دست آوردن شرایط بهینه القاء، اپتیمایزنمودن این فاکتورها برای هر گونه ضروری است. علاوه بر اینها دمای آب محیط نگهداری مولدین پیش از اجرای شوک، تفاوت های گونه‌ای یا نژادی و اختلاف در کیفیت تخم ها در بین مولدین ماده می‌تواند اثربخشی یک روش را تحت تاثیر قرار دهد (دانهم، ۲۰۰۴). کدپرنگ و ناکورن (۲۰۰۰) در ماهی بارب نقره ای بهترین زمان القای سرمای دو درجه سانتیگراد را، ۳۰ ثانیه بعد از لقاح و به مدت ۱۰ دقیقه با ۷۲/۵٪ بازدهی تری پلوییدی اعلام نمودند. در رابطه با ماهی آمور، کپور معمولی، کپور هندی روهو، کپور سرگنده این زمان به ترتیب ۴، ۳، ۷ و ۴ دقیقه بعد از لقاح اعلام شده است (کاسانی و کیتون، ۱۹۸۶، هولبک و همکاران، ۱۹۸۸، ردی و همکاران، ۱۹۹۰، آلدریج و همکاران، ۱۹۹۰). در اغلب موارد مذکور بهترین طول مدت ادامه شوک بر روی تخم های لقاح یافته بین ۱ تا ۲ دقیقه اعلام گردیده است.

بررسی‌های صورت گرفته در رابطه با شاخصهای ابعادی گویچه های قرمز در ماهیان مورد مطالعه نشان می‌دهد که سلول های تری پلوییید به واسطه دارابودن یک سری اضافه از کروموزوم ها افزایش معنی‌داری را در حجم گویچه قرمز به ویژه هسته آن نشان می دهند که این یافته در مطالعات دیگر نیز به دست آمده است (بنفی و ساترلین،۱۹۸۴، فنگ، ۱۹۹۲، گارسیا-آبیادو و همکاران، ۱۹۹۹، اسپینوزا و همکاران، ۲۰۰۵).

در مقایسه با شرایط طبیعی پرورش ماهی بنی، ماهیانی که در این پروژه دوره پرورش را گذراندند (تیمارها و شاهدها)، رشد کمتری داشتند. نگهداری ماهی ها در محیط بسته قفس و نبود شرایط طبیعی پرورشی همچون بستر استخر و ارتباطات غذایی وابسته به آن، فضای حرکتی محدود و بسیاری دیگر از عوامل دخیل در رشد و نمو ماهی می توانند سبب میزان رشد پایین ماهیان در این مطالعه باشند.

در اغلب تیمارها به ویژه تعدادی که شدت شوک های وارده به نقطه دمایی کشنده نزدیک بوده بازده تری پلوییدی تحت تاثیر قرار گرفته بدین معنی که اگرچه در این گروه ها نسبت تعداد افراد تری پلویید بالاتر است اما در عین حال میزان لقاح و بقای لاروها نیز به دلیل شرایط سخت القایی متاثر شده و افت نموده است.

در مطالعه صورت گرفته بالاترین درصد القای تری پلوییدی در تیمار A_4 (دمای ۳۸ درجه سانتیگراد، ۵ دقیقه بعد از لقاح به مدت ۵ دقیقه)حاصل شد که به دلیل تلفات ناشی از دمای نزدیک به حد کشنده سبب کاهش بازدهی القاء گردید. بهترین بازده تری پلوییدی برای ماهی بنی به میزان ۷۳/۹ درصد در گروه تیمارهای ۳۴ درجه سانتیگراد به دست آمد که به نظر می رسد شرایط مناسب برای القای تری پلوییدی دراین گونه باشد.

با توجه به روند سریع رشد بیوتکنولوژی در صنعت آبزی پروری، بهره برداری از تکنیکهایی از جمله دستکاری ژنتیکی و یافتن نرماتیوها برای گونه های مهم پرورشی کشور امری ضروری به نظر می رسد اگرچه مهارت یافتن در آنها زمانی ضرورت می یابد که در قالب یک برنامه اصلاح نژاد به کار گرفته شوند (تیو، ۱۳۸۸). ماهی بنی با توجه به محبوبیتی که در منطقه خوزستان و کشورهای همسایه دارد و به منظور افزایش کارایی استخرهای پرورشی چندگونه‌ای، در سال های اخیر در محوریت برنامه‌های سازمان شیلات قرار گرفته که از نظر تکنیک های مرتبط با پروسه تکثیر و پرورش پیشرفتهای خوبی در این مسیر به دست آمده است. همانگونه که پیشتر ذکر شد اختلافات نژادی یا خانواده‌ای می‌تواند در میزان کارایی القاء تریپلوئیدی موثر باشد. هنوز درباره وضعیت ذخایر ژنی این ماهی در منطقه جنوب غربی ایران اطلاعی در دست نیست لذا با فراهم نمودن یک بانک ژنی زنده از ماهی بنی و طراحی برنامه های اصلاح نژادی می توان کارایی بالاتری را ایجاد نمود.

پیشنهادها

با نتایج به دست آمده در این پروژه می توان اظهار نمود که با استفاده از شوک های دمایی امکان القای تری پلوییدی در ماهی بنی وجود دارد و دماهای بحرانی در دو حالت گرما و سرما به ترتیب C □ ۳۹ وC □ ۱ می باشند. با توجه به نتایج حاصله در رابطه با شوک های سرمایی مورد استفاده در این مطالعه پیشنهاد می شود دماهای بالاتر از ۴ درجه سانتیگراد (۶-۵ درجه سانتیگراد) به مدت طولانی تر مورد آزمون قرار گیرند. به منظور بررسی وضعیت رشد در افراد تریپلوییدبه طور منطقی باید تا مرحله بلوغ جنسی صبر نمود اگرچه در مطالعه فعلی نشانه هایی از برتری رشد در برخی تیمارها مشاهده گردید اما برای مطالعه دقیق‌تر این موضوع پیشنهاد می‌شود این پایش اولاً در استخرهای خاکی مجزا برای هر تیمار صورت گیرد تا شرایط طبیعی پرورشی فراهم گردد و دوره پرورش نیز تا مرحله بلوغ ادامه یابد.

با توجه به مشکلات فراوان پرورش در استخرهای خاکی و اهمیت تشخیص فردی ماهیان، استفاده از یک روش نشانه‌گذاری مطمئن برای ماهیان مورد مطالعه می‌تواند موثر باشد.

همچنین به منظور کاهش تلفات ناشی از القای شوک به تخم ها، می‌توان تهیه مولدین تتراپلوییدرا مدنظر داشت چرا که با استفاده از مولدین تتراپلوییدو تلاقی آنها با مولدین دیپلوییدمی توان کارایی صددرصد در تولید افراد تری پلوییدرا انتظار داشت ضمن آن که در نتاج حاصل از این روش هتروزیگوسیتی بالاتری نسبت به روش مستقیم القای تری پلوییدی به دست می آید و بدین ترتیب ضمن تهیه یک گله از مولدین تتراپلوییدهزینه های ناشی از تلفات در روش مستقیم تولید ماهیان تری پلوییدرا نیز حذف نمود (وبر و هوستوتلر، ۲۰۱۲).

بررسی وضعیت ذخایر این گونه در منطقه و جمع‌آوری مولدین از مناطق مختلف پراکنش آن (در صورت امکان از همکاری کشورهای همسایه در این ارتباط بهره برده شود) و نگهداری و پایش آنها در قالب یک برنامه مدون و طولانی مدت می‌تواند زمینه مناسبتری را برای اجرای برنامه‌های اصلاح نژادی از جمله دستکاری های کروموزومی فراهم نماید. ضمن آن که با توجه به شرایط محیطی نامناسب در منطقه، ایجاد این بانک می‌تواند ضامن بقا و حفاظت از تنوع گونه‌ای این ماهی در کشورمان باشد.

تشکر و قدردانی

شایسته است که از کلیه عزیزانی که در این پروژه ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی صورت گیرد. از ریاست محترم پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب کشور جناب آقای دکتر غفله مرمضی و معاونت محترم تحقیقاتی جناب آقای دکتر اسکندری، آقای مهندس مرتضوی زاده ریاست محترم بخش آبزی پروری، پرسنل خدوم بخش به ویژه در قسمت کارگاههای تکثیر و پرورش، آقایان مهندس کاهکش، مکوندی، کریمیان پور، عیدی زاده، غلیم پور و سایر عزیزانی که صمیمانه ما را همراهی نمودند، کمال تشکر و امتنان را داریم. لازم است از همکاری های بی دریغ آقای سلجوقی که در امر راه اندازی قفس ها در استخر زحمات فراوانی را متقبل شدند، تشکر فراوان بنماییم.

منابع

۱. آذری‌تاکامی، قباد، فرهاد امینی و محمدرضا کلباسی. ۱۳۷۶. القاء تری پلوییدی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به‌وسیله شوک‌های گرمایی. مجله دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۲، شماره ۲، صفحه ۵۱-۵۹.

۲. پروانه، س. ا.، ۱۳۷۳. ایجاد تری پلوییدی در کپور معمولی. سازمان تحقیقات و آموزش شیلات ایران، مرکز تحقیقات شیلاتی استان گیلان، ۴۵صفحه.

۳. پریور، کاظم و پروانه، س. ا.، ۱۳۷۲. گزارش نهایی طرح پژوهشی ایجاد تری پلوییدی ماهی سفید و آمور. سازمان تحقیقات و آموزش شیلات ایران، مرکز تحقیقات شیلاتی استان گیلان، ۵۰صفحه.

۴. تیو، داگلاس. ۱۳۸۸. مبانی ژنتیک ، اصلاح نژاد و بیوتکنولوژی ماهیان. ترجمه فرهاد امینی، تهران: انتشارات جهاد دانشگاهی واحد تهران (ویراست دوم)، ۴۴۲ص.

۵. جمیلی، شهلا.، ۱۳۶۹، اثر تغییرات شوری در رشد و قدرت تحمل ماهی بنی. گزارش نهایی پروژه سازمان تحقیقات و آموزش شیلات ایران، ۴۴ صفحه.

۶. جوهری، سید علی و محمدرضا کلباسی. ۱۳۸۵. بررسی برخی تغییرات سلول های خونی در ماهیان تری پلویید قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله زیست‌شناسی ایران، جلد ۱۹، شماره ۴، صفحه ۴۹۲ تا ۴۹۵.

۷. رامین، محمود. ۱۳۷۹، بررسی گونه‌های اقتصادی باربوس‌ماهیان ایران. اولین همنشست ملی باربوس‌ماهیان ایران.

۸. سوری نژاد، ایمان و محمدرضا کلباسی. ۱۳۹۰. بررسی شاخص های رشد ماهیان تمام ماده و مخلوط نر و ماده دیپلوییید و تری پلوییید قزل آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* در سال دوم پرورش. مجله زیست‌شناسی ایران، جلد ۲۴، شماره ۴، صفحه ۵۱۷ تا ۵۲۷.

۹. شریفیان، منصور. ۱۳۸۴، تعیین نیازهای غذایی ماهی بنی. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، مرکز تحقیقات آبزی‌پروری جنوب کشور، ۵۰ صفحه.

۱۰. کلباسی محمدرضا.، ۱۳۸۶. جزوه درسی ژنتیک آبزیان. دانشگاه تربیت مدرس.

۱۱. کلباسی، محمدرضا و سید علی جوهری. ۱۳۸۷. بررسی امکان تولید جمعیت تمام ماده تری پلوییید قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، سال دوازدهم، شماره ۴۴، صفحه ۲۶۹ تا ۲۷۷.

۱۲. مرتضوی زاده، سید عبدالصاحب. ۱۳۸۷. بررسی امکان بیهوشی با داروی پروپوفول وتاثیرات این دارو بر سرم خون ماهی بنی (*Barbus sharpeyi*). پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات اهواز. ۸۳ صفحه.

۱۳. نجف‌پور، ناصر، غلامرضا اسکندری و سیمین دهقان‌مدیسه. ۱۳۷۴. شناسایی ماهیان آب شیرین استان خوزستان فاز اول، مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، ۹۶ صفحه.

۱۴. نیک‌پی، منصور و حاجت صفی‌خانی. ۱۳۷۵. گزارش نهایی پروژه بررسی بیولوژیک ماهی شیربت *Barbus grypus* و ماهی بنی *Barbus sharpeyi*. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران، صفحات ۱۰-۱، ۶۴-۵۲.

۱۵. یزدی‌پور، عبدالکریم و جواد مرعشی شوشتری. ۱۳۷۰، گزارش بیوتکنیک تکثیر مصنوعی ماهی بنی. مرکز تحقیقات شیلات استان خوزستان، اهواز، صفحات ۲۸-۱.

16. Ballarin, L., M. Dall'Oro, D. Bertotto, A. Libertini. 2004. Haematological parameters in *Umbrina cirrosa* (Teleosti, Scianidae): a comparison between diploid and triploid specimens. Comparative Biochemistry and physiology, Part A., 138:45-51.
17. Basavaraju, Y., G. C. Mair, H.M. Mohan Kumar, S. Pradeep Kumar, G.Y. Keshavappa, D.J. Penman, 2002. An evaluation of triploidy as a potential solution to the problem of precocious sexual maturation in common carp, *Cyprinus carpio*, in Karnataka, India. Aquculture, 204:407–418.
18. Benfey, T.J., A.M. Sutterlin and R.J. Thompson. 1984. Use of erythrocyte measurements to identify salmonids. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 41:980-984.
19. Betina, M.I., S.G. Vassetzky, and O.T. Kondratieva. 1985. Influence of hydrostatic pressure on fertilized loach eggs. Ontogenez, 16:365–374.
20. Blanc, J.M. and H. Poisson. 1988. Triploid hybridization between the rainbow trout and the Arctic char: incubation and stocking with young fish. Cybium, 12:229–238.
21. Bromage, J.M. Myers, and B.J. Mc Andrew. 1995. Comparative performance of growth, Biochemical composition and endocrine profiles in diploid and triploid tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture, 138:87–97.
22. Budino, B., R.M. Cal, M.C. Piazzon, J. Lamas. 2006. The activity of several components of the innate immune system in diploid and triploid turbot. Comparative Biochemistry and Physiology, 145:108-113.
23. Cassani, J.R. and W.E. Caton. 1986. Efficient production of triploid grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) utilizing hydrostatic pressure. Aquaculture, 55:43–50.
24. Diaz, N. F., P. Iturra, A. Veloso, F. Estay, and N. Colihueque. 1993. Physiological factors affecting triploid production in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture, 114:33
25. Don, J. and R.R. Avtalion. 1986. The induction of triploidy in *Oreochromis aureus* by heat shock. Theoretical and Applied Genetics, 72:186–192.
26. Dorota, F., Jankun, M., Woznicki. 2006. Chromosome number and erythrocyte nuclei length in triploid Siberian sturgeon *Acipenser baeri* Brandt. Caryologia, 59(4):319-321.
27. Dunham, R.A. 1990. Production and use of monosex or sterile fishes in aquaculture. Reviews in Aquatic Sciences, 2:1–17.
28. Dunham, R. A. 2004. Aquaculture and fisheries biotechnology: Genetic Approaches. CABI Publishing, 372pp.
29. Espinosa, E., A. Josa, L. Gill, J.I. Marti. 2005. Triploidy in Rainbow Trout Determined by Computer-Assisted Analysis. Journal of experimental zoology, 303A:1007–1012.
30. FAO, Fisheries and Aquaculture department. 2012. The state of world fisheries and aquaculture 2012. Rome, 209 pp.
31. Felip, A., S. Zanuy, M. Carrillo and F. Piferrer. 2001. Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. Genetica, 111: 175–195.
32. Galbreath, P.F., B. L. Samples. 2000. Optimization of thermal shock protocols for induction of triploidy in Brook Trout, North American Journal of Aquaculture, 62(4):249-259.
33. Garcia-Abiado, M.A.R., K., Dabrowski, J.E., Christensen, S., Czesny, P., Bajer. 1999. Use of erythrocyte measurements to identify triploid Saugeyes. North American Journal of Aquaculture, 61:4, 319-325.
34. Gomelsky, B. 2003. Chromosome set manipulation and sex control in common carp: a review. Aquatic Living Resources, 16:408–415.
35. Gregory, T.R. 2005. The Evolution of the Genome. USA: Elsevier Academic Press, 740pp.

36. Hardy, R.W. 1999. Collaborative opportunities between fish nutrition and other disciplines in aquaculture: an overview. Aquaculture, 177: 217–230.
37. Hashem, M. T. and A. EL–Agamy. 1977. Effect of fishing and maturation on Barbus bynni population of nozha hydrodrom- bull. INST. Ocean & fish, 7:137.
38. Humason, G. L. 1979. Animal tissue techniques, 4th edition. Freeman, San Francisco.Hussain, M.G., G.P.S. Rao, N.M. Humayun, C.F. Randall, D.J. Penman, D. Kime, N.R. Johnstone, R. 1985. Induction of triploidy in Atlantic salmon by heat shock. Aquaculture, 49:133–139.
39. Jankun, M., H., Kuzminski, G., Furgala-Selezniow. 2007. Cytologic ploidy determination in fish – an example of two salmonid species. Environmental biotechnology, 3(2):52-56.
40. Krasznai, Z. and T. Marian. 1986. Shock-induced triploidy and its effect on growth and gonad development of the European catfish, *Silurus glanis*. Journal of Fish Biology, 29:519-527.
41. Levanduski, M. J., J. C., Beck, and J. E., Seeb. 1990. Optimal thermal shocks for induced diploidynogenesis in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Aquaculture, 90:239– 250.
42. Linhart, O., P. Haffray, C. Ozouf-Costaz, M. Flajshans and M. Vandeputte. 2001. Comparison of methods for hatchery-scale triploidization of European catfish (*Silurus glanis* L.). Journal of Applied Ichthyology, 17:247-255.
43. Lou, Y. D., and C. E. Purdom. 1984. Diploid gynogenesis induced by hydrostatic pressure in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Journal of Fish Biology, 24:665–670.
44. Lutz, G.C. 2001. Practical genetics for aquaculture. Blackwell science, Fishing News Books. 235p.
45. McCarter, N.H. 1988. Verification of the production of triploid grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) with hydrostatic pressure. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 22:4, 501-505.
46. Palti, Y., J. J. Li, and G. H. Thorgaard. 1997. Improved efficiency of heat and pressure shocks for producing gynogenetic rainbow trout. Progressive Fish-Culturist, 59:1–13.
47. Piferrer, F., M., MaCal, B., A´ lvarez-Bl´azquez, L. Sa´nchez, P., Martinez. 2000. Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*): I. Ploidy determination and the effects of cold shocks. Aquaculture, 188:79–90.
48. Piferrer, F., A., Beaumont, J. C., Falguière, M., Flajšhans, P., Haffray, L., Colombo. 2009. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. Aquaculture, 293:125–156.
49. Purdom, C.E. 1976. Genetic techniques in flatfish culture. Journal of Fisheries Research Board of Canada, 33:1088–1093.
50. Ragnar, F. 1992. Fish blood cells. In: W. S. Hoar, D. J. Randall, A. P. Farrell (eds.), Fish physiology, Vol. 12B, pp. 3-6. Academic Press, London.
51. Reddy, P.V.G.K., G.V. Kowtal, M.S. Tantia. 1990. Preliminary observations on induced polyploidy in Indian major carps, *Labeo rohita* (Ham.) and *Catla catla* (Ham.). Aquaculture, 87: 279-288.
52. Richter, C.J.J., A.M. Henken, E.H. Eding, J.H. van Dossum, and P.de Boer. 1986. Induction of triploidy by cold shocking eggs and performance of triploids on the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). In: Symposium E26. European Inland Fisheries Advisory Commission, Bordeaux, France.
53. Seeb, J.E., G.H. Thorgaard, and F.M. Utter. 1988. Survival and allozyme expression in diploid and triploid hybrids between chum, chinook and coho salmon. Aquaculture, 72:31–48.
54. Solar, I. I., E.M., Donaldson and G.A., Hunter. 1984. Induction of triploidy in rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson) by heat shock and investigation of early growth. Aquaculture, 42:57–67.
55. Subasinghe, R. and D. Soto. 2010. Current status and options for biotechnologies in fisheries and aquaculture in developing countries. FAO International Technical conference, Guadalajara, Mexico.
56. Tiwary, B.K., R. Kirubagaran, A.K. Ray. 2004. The biology of triploid fish. Reviews in fish biology and fisheries, 14:391-402. DOI: 10.1007/s11160-004-8361-8.
57. Thorgaard, G. and G.A.E., Gall. 1979. Adult triploids in a rainbow trout family. Genetics, 93:961–973.
58. Valenti, R.J. 1975. Induced polyploidy in *Tilapia aurea* (Steindachner) by means of temperature shock treatment. Journal of Fisheries Biology, 7:519–528.
59. Weber, G. M., M. A. Hostuttler. 2012. Factors affecting the first cleavage interval and effects of parental generation on tetraploid production in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 344-349:231–238.
60. Wolters, W.R., C.L., Chrisman, and G.S. Libey. 1981. Induction of triploidy in channel catfish. Transactions of the American Fisheries Society, 110:310–312.
61. Woznicki, P. and H., Kuzminski. 2002. Chromosome number and erythrocyte nuclei length in triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Caryologia, 55(4):295-298.

پیوست

نتایج حاصل از انجام آزمون معنی داری در رابطه با شاخص های اندازه گیری شده (V.Cell: حجم سلول، V.nuc: حجم هسته، L.Cell: قطر بزرگ سلول، L.nuc: قطر بزرگ هسته، sig: میزان معنی داری، صفر: داده معنی دار نبوده، یک: داده معنی دار بوده است.)

نام تیمار	V.Cell	Sig	V.nuc	Sig	L.Cell	Sig	L.nuc	Sig
A1	0		1	0	0		1	0
A1	0		1	0	0		1	0
A1	0		1	0	0		1	0
A1	0		1	0	1	0	1	0
A1	0		1	0	0		1	0
A1	0		1	0	0		1	0
A1	0		1	0	0		1	0
A1	0		1	0	0		1	0
A1	0		1	0	0		1	0
A1	0		1	0	1	0.02	1	0
A1	0		1	0	0		1	0
A1	0		1	0	1	0	1	0
A1	0		1	0	1	0	1	0
A1	0		1	0	0		1	0
A1	0		1	0	0		1	0
A1	0		1	0	1	0.004	1	0
A1	0		1	0	0		1	0
A1	0		1	0	1	0.008	1	0
A1	0		1	0	1	0	1	0
A1	0		1	0	1	0	1	0
A1	0		1	0	0		1	0
A1	0		1	0	0		1	0
A1	0		1	0	0		1	0
A1	0		1	0	0		1	0
A1	0		1	0	0		1	0
A1	0		1	0	0		1	0
A1	0		1	0	0		1	0
A1	0		1	0	0		1	0
A1	0		1	0	0		1	0
A1	0		1	0	1	0	1	0
A1	0		1	0	0		1	0
A1	0		1	0	0		1	0
A1	0		1	0	0		1	0

نام تیمار	V.Cell	Sig	V.nuc	Sig	L.Cell	Sig	L.nuc	Sig
A1	0		1	0	1	0.01	1	0
A1	0		1	0	0		1	0
A4	1	0	1	0	1	0	1	0
A4	1	0	1	0	1	0	1	0
A4	1	0	1	0	1	0	1	0
A4	1	0	1	0	1	0	1	0
A4	1	0	1	0	1	0	1	0
A4	0		1	0	1	0	1	0
A4	1	0	1	0	1	0	1	0
A4	1	0	1	0	1	0	1	0
A4	0		1	0	1	0.01	1	0
A4	0		1	0	1	0	1	0
A4	1	0	1	0	1	0	1	0
A4	1	0	1	0	1	0	1	0
A4	1	0	1	0	1	0	1	0
A4	1	0	1	0	1	0	1	0
A4	1	0	1	0	1	0	1	0
A4	1	0	1	0	1	0	1	0
A4	1	0	1	0	1	0	1	0
A4	1	0	1	0	1	0	1	0
A4	1	0	1	0	1	0	1	0
A4	1	0	1	0	1	0	1	0
A4	1	0	1	0	1	0	1	0
A4	1	0.01	1	0	1	0	1	0
A4	1	0	1	0	1	0	1	0
A4	1	0	1	0	1	0	1	0
A4	0		1	0	1	0	1	0
A4	1	0.01	1	0	1	0	1	0
A4	1	0	1	0	1	0	1	0
A4	1	0	1	0	1	0	1	0
A4	1	0	1	0	1	0	1	0
A4	1	0	1	0	1	0	1	0
A4	1	0	1	0	1	0	1	0
A4	1	0	1	0	1	0	1	0
A4	1	0	1	0	1	0	1	0
A4	1	0	1	0	1	0	1	0

نام تیمار	V.Cell	Sig	V.nuc	Sig	L.Cell	Sig	L.nuc	Sig
A4	1	0	1	0	1	0	1	0
A4	1	0	1	0	1	0	1	0
A4	1	0	1	0	1	0	1	0
B2	0		1	0	0		1	0
B2	0		1	0	0		1	0
B2	1	0	1	0	1	0	1	0
B2	0		1	0	0		1	0
B2	1	0	1	0	1	0	1	0
B2	1	0	1	0	1	0	1	0
B2	1	0	1	0	1	0	1	0
B2	1	0	1	0	1	0	1	0
B2	1	0	1	0	1	0	1	0
B2	1	0	1	0	1	0	1	0
B2	1	0	1	0	1	0	1	0
B2	1	0	1	0	1	0	1	0
B2	1	0	1	0	1	0	1	0
B2	1	0	1	0	1	0	1	0
B2	1	0	1	0	1	0	1	0
B2	1	0	1	0	1	0	1	0
B2	1	0	1	0	1	0	1	0
B2	0		1	0	1	0	1	0.01
B2	1	0	1	0	1	0	1	0
B2	1	0	1	0	1	0	1	0
B2	0		1	0	1	0	1	0
B3	1	0	1	0	1	0.007	1	0
B4	0		1	0	0		1	0
B4	1	0	1	0	0		0	
B4	0		1	0	0		1	0
B4	0		1	0	0		1	0
B4	1	0	1	0	1	0	1	0
B4	1	0	1	0	1	0	1	0
B4	1	0	1	0	1	0	1	0
B4	0		1	0	1	0	1	0
B4	1	0	1	0	1	0	1	0
B4	1	0	1	0	1	0	1	0
B4	1	0	1	0	0		1	0

نام تیمار	V.Cell	Sig	V.nuc	Sig	L.Cell	Sig	L.nuc	Sig
B4	0		1	0	1	0.01	1	0
B4	0		1	0	0		1	0
B4	0		1	0	1	0	1	0
C1	1	0.01	1	0	0		1	0
C1	0		1	0	0		1	0
C1	0		1	0	0		1	0.002
C1	1	0	1	0	1	0	1	0
C1	0		1	0	0		1	0
C1	0		1	0	0		1	0
C1	1	0	1	0	1	0	1	0
C1	0		1	0	0		1	0
C1	1	0	1	0	0		1	0
C1	0		1	0	0		1	0
C1	0		1	0	0		1	0
C1	1	0.01	1	0	0		1	0
C1	1	0	1	0	0		1	0
C1	0		1	0	0		1	0
C1	1	0	1	0	1	0	1	0
C1	0		1	0	0		1	0
C1	0		1	0	0		1	0
C1	0		1	0	0		1	0
C1	0		1	0	0		1	0
C1	0		1	0	1	0	1	0
C1	1	0	1	0	1	0.006	1	0
C1	1	0.01	1	0	0		1	0
C1	1	0	1	0	1	0	1	0
C1	1	0	1	0	1	0	1	0
C2	0		1	0	1	0.03	1	0
C2	0		1	0	0		1	0
C2	0		1	0	0		1	0
C2	0		1	0	0		1	0
C2	0		1	0	1	0.001	1	0
C2	0		1	0	1	0.005	1	0
C2	0		1	0	0		1	0
C2	0		1	0	1	0	1	0
C2	0		1	0	1	0.02	1	0

نام تیمار	V.Cell	Sig	V.nuc	Sig	L.Cell	Sig	L.nuc	Sig
C2	0		1	0	1	0	1	0
C2	0		1	0	0		1	0
C2	0		1	0	1	0	1	0
C2	0		1	0	0		1	0
C2	0		1	0	0		1	0
C2	0		1	0	0		1	0
C2	0		1	0	0		1	0
C2	0		1	0	0		1	0
C2	0		1	0	1	0.009	1	0
C2	0		1	0	0		1	0
C2	0		1	0	0		1	0
C2	0		1	0	0		1	0
C2	0		1	0	1	0.005	1	0
C2	1	0	1	0	1	0	1	0
C2	1	0	1	0	1	0	1	0
C2	0		1	0	0		1	0
C2	1	0	1	0	1	0	1	0
C2	0		1	0	1	0.01	1	0
C2	0		1	0	0		1	0
C2	0		1	0	0		1	0
C2	0		1	0	0		1	0
C2	0		1	0	0		1	0.001
C2	0		1	0	0		1	0
C2	1	0	1	0	1	0	1	0
C3	0		1	0	0		1	0
C3	0		1	0	0		1	0
C3	0		1	0	0		1	0
C3	0		1	0	0		1	0
C3	0		1	0	0		1	0
C3	0		1	0	1	0.001	1	0
C3	0		1	0	1	0	1	0
C3	0		1	0	1	0.001	1	0
C3	0		1	0	0		1	0
C3	0		1	0	0		1	0
C3	0		1	0	0		1	0.001
C3	0		1	0	0		1	0

نام تیمار	V.Cell	Sig	V.nuc	Sig	L.Cell	Sig	L.nuc	Sig
C4	1	0	1	0	0		1	0
C4	0		1	0	0		1	0
C4	0		1	0	0		1	0
C4	0		1	0	1	0	1	0
C4	0		1	0	0		1	0
C4	0		1	0	0		1	0
C4	1	0	1	0	0		1	0
C4	0		1	0	0		1	0
C4	0		1	0	1	0	1	0
C4	0		1	0	0		1	0
C4	0		1	0	0		1	0
C4	1	0.01	1	0	0		1	0
C4	0		1	0	1	0	1	0
C4	0		1	0	0		1	0
C4	1	0	1	0	0		1	0
C4	0		1	0	1	0	1	0
C4	1	0.01	1	0	0		1	0
C4	0		1	0	0		1	0
C4	0		1	0	0		1	0
C4	0		1	0	1	0	1	0
C4	0		1	0	0		1	0
C4	0		1	0	0		1	0
C4	0		1	0	0		1	0
C4	0		1	0	0		1	0
C4	0		1	0	0		1	0
C4	0		1	0	1	0.02	1	0
C4	0		1	0	0		1	0
C4	0		1	0	1	0.001	1	0
C4	0		1	0	0		1	0
C4	0		1	0	0		1	0
C4	0		1	0	0		1	0
C4	0		1	0	0		1	0
C4	0		1	0	1	0.01	1	0
D1	1	0	1	0	1	0	1	0
D1	1	0	1	0	1	0	1	0
D1	1	0	1	0	1	0	1	0

نام تیمار	V.Cell	Sig	V.nuc	Sig	L.Cell	Sig	L.nuc	Sig
D1	1	0	1	0	1	0.02	1	0
D1	1	0	1	0	0		1	0
D1	1	0	1	0	1	0.001	1	0
D1	1	0	1	0	0		1	0.001
D1	1	0	1	0	1	0	1	0
D1	1	0	1	0	0		1	0
D1	1	0	1	0	1	0	1	0
D1	1	0	1	0	1	0.007	1	0.04
D2	1	0	1	0	1	0	1	0
D2	1	0	1	0	0		1	0.001
D2	1	0	1	0	0		1	0
D2	1	0	1	0	1	0	0	
D2	1	0	1	0	0		1	0.003
D2	1	0	1	0	0		1	0
D2	1	0	1	0	1	0	1	0
D2	1	0	1	0	1	0	1	0
D2	1	0	1	0	1	0	1	0
D2	1	0	1	0	1	0	1	0
D2	1	0	1	0	1	0	1	0
D2	0		1	0	0		1	0
D2	1	0	1	0	1	0.02	1	0
D3	0		1	0	0		1	0
D3	1	0	1	0	0		1	0
D3	1	0	1	0	1	0	1	0
D3	1	0	1	0	1	0.03	1	0
D3	0		1	0	0		1	0
D3	1	0	1	0	1	0	1	0
D4	1	0	1	0	1	0	1	0
D4	1	0	1	0	1	0	1	0
D4	1	0	1	0	1	0	1	0
D4	0		1	0	1	0	1	0
D4	1	0	1	0	1	0	0	
D4	1	0.01	1	0	0		1	0
D4	1	0.01	1	0	1	0	1	0
D4	1	0	1	0	0		1	0
D4	1	0	1	0	1	0	1	0

نام تیمار	V.Cell	Sig	V.nuc	Sig	L.Cell	Sig	L.nuc	Sig
D4	1	0	1	0	0		1	0
D4	1	0	1	0	0		1	0
D4	1	0	1	0	1	0	1	0
D4	1	0	1	0	1	0.008	1	0
D4	1	0	1	0	1	0	1	0
D4	1	0	1	0	0		1	0
E1	1	0	1	0	0		0	
E2	1	0	1	0	1	0.001	0	
E2	0		1	0	0		1	0.02
E3	0		1	0	0		1	0
E4	1	0	1	0	0		0	
E4	1	0	1	0	0		1	0

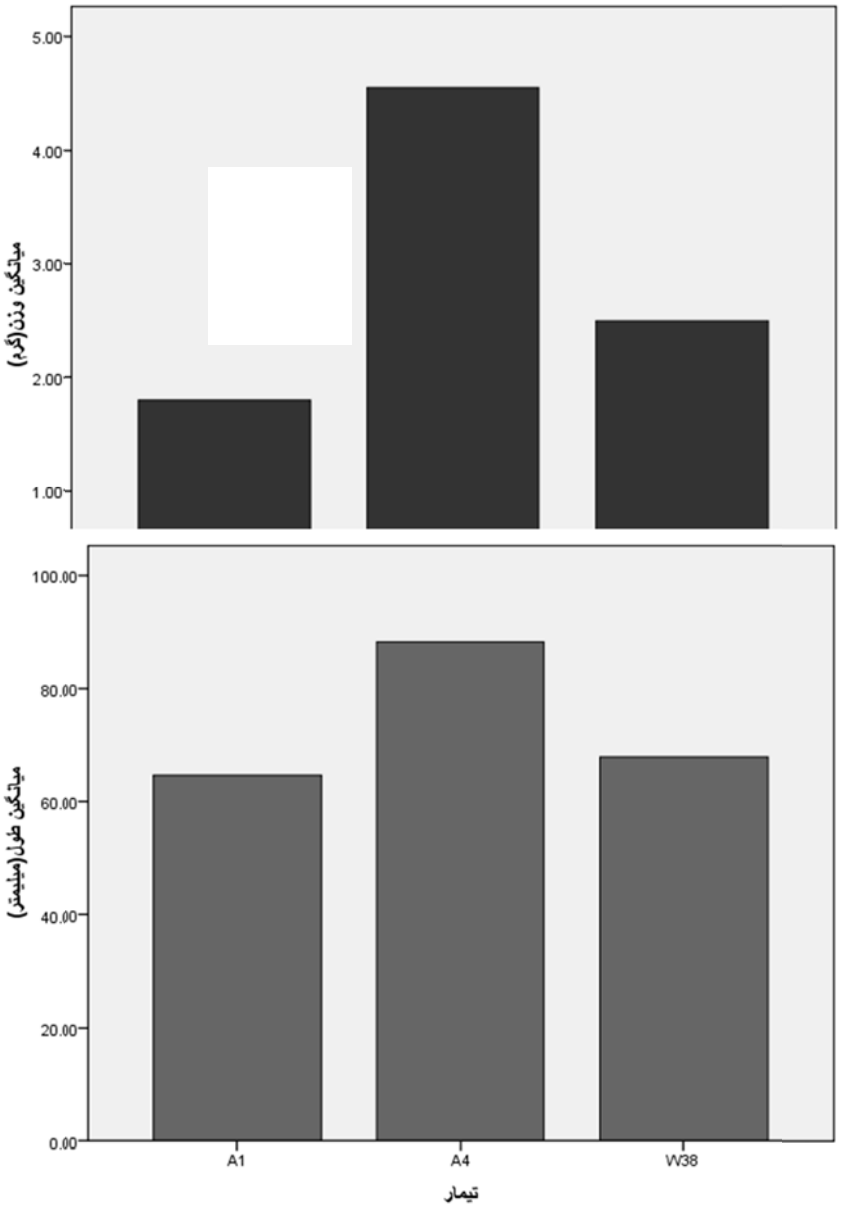
- **نتایج حاصل از اندازه گیری شاخصهای طول و وزن در افراد تری پلوییدهر تیمار در مقایسه با شاهد نظیرآن**

نام تیمار	میانگین طول (میلیمتر)	خطای استاندارد میانگین	میانگین وزن (گرم)	خطای استاندارد میانگین
A1	۶۴/۶۱	۲/۰۳	۱/۸۰	۰/۲۶
A4	۸۸/۲۴	۱/۸۵	۴/۵۵	۰/۳۹
W38	۶۷/۸۱	۱/۵۹	۲/۵۰	۰/۲۱
B2	۷۸/۱۰	۲/۴۶	۳/۴۳	۰/۵۶
B3	۶۹/۳۸	۷/۵۵	۳	۰/۸۳
B4	۶۸/۹۲	۲/۰۶	۲/۲۵	۰/۲۱
W36	۷۳/۰۵	۲/۷۷	۳/۴۵	۰/۴۸
C1	۶۳/۲۰	۱/۱۱	۱/۶۸	۰/۰۸
C2	۶۲/۷۹	۰/۷۴	۱/۵۲	۰/۰۶
C3	۷۱/۳۸	۲/۵۹	۲/۴۳	۰/۲۷
C4	۶۹/۳۶	۱/۰۷	۲/۲۳	۰/۱۲
W34	۸۵/۷۴	۲/۴۲	۵/۰۵	۰/۳۹
D1	۶۴/۳۰	۱/۵۷	۲/۰۲	۰/۱۹
D2	۶۴/۹۲	۲/۵۲	۲/۱۶	۰/۲۵
D3	۵۲/۸۳	۲/۸۶	۲/۶۵	۱/۴۷
D4	۵۵/۶۴	۱/۹۶	۱/۲۹	۰/۱۴
W4	۵۸/۸۸	۱/۵۹	۱/۶۷	۰/۲۰
E1	۷۱	۳/۸	۳/۵۳	۰/۶
E2	۶۵/۸۵	۳/۵۱	۳/۰۸	۱/۳۵
E3	۶۳/۰۰	۷	۱/۶۵	۰/۳۵
E4	۵۵/۶۷	۱/۴۵	۱/۱۰	۰/۰۶
W2	۵۲/۳۸	۱/۷۲	۲	۰/۴۸

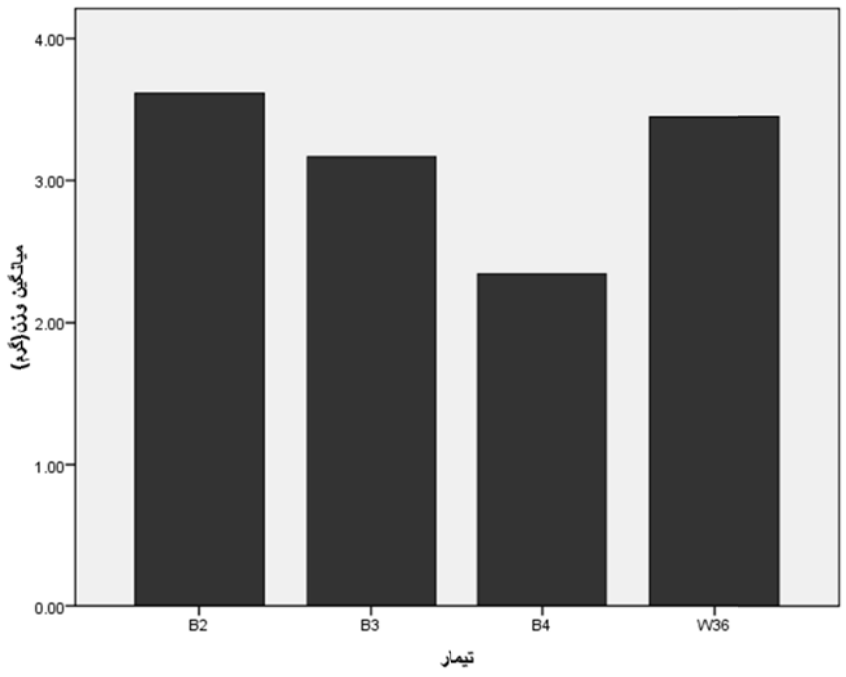
- **نتیجه آزمون T-test در رابطه با شاخصهای طول و وزن افراد تری پلوییید در هر گروه**

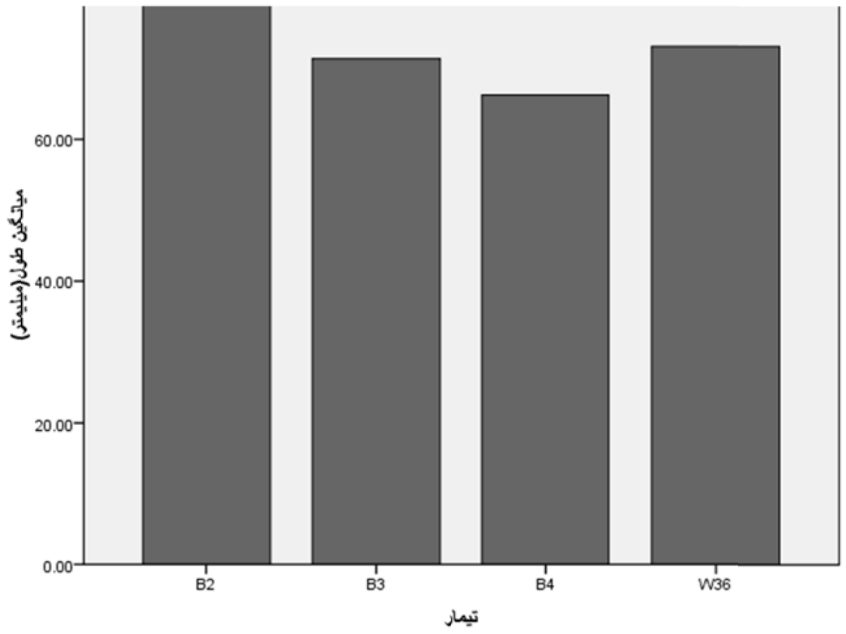
نام تیمار	نتیجه آزمون t-test برای فاکتور طول	نتیجه آزمون t-test برای فاکتور وزن
A_1	sig> ۰/۰۵	sig> ۰/۰۵
A_4	sig.< ۰/۰۵ و اختلاف بیشتر از شاهد	sig.< ۰/۰۵ و اختلاف بیشتر از شاهد
B_2	sig>۰/۰۵	sig>۰/۰۵
B_3	sig>۰/۰۵	sig>۰/۰۵
B_4	sig>۰/۰۵	sig>۰/۰۵
C_1	sig.< ۰/۰۵ و اختلاف کمتر از شاهد	sig.< ۰/۰۵ و اختلاف کمتر از شاهد
C_2	sig.< ۰/۰۵ و اختلاف کمتر از شاهد	sig.< ۰/۰۵ و اختلاف کمتر از شاهد
C_3	sig.< ۰/۰۵ و اختلاف کمتر از شاهد	sig.< ۰/۰۵ و اختلاف کمتر از شاهد
C_4	sig.< ۰/۰۵ و اختلاف کمتر از شاهد	sig.< ۰/۰۵ و اختلاف کمتر از شاهد
D_1	sig.>۰/۰۵	sig.>۰/۰۵
D_2	sig.>۰/۰۵	sig.>۰/۰۵
D_3	sig.>۰/۰۵	sig.>۰/۰۵
D_4	sig.>۰/۰۵	sig.>۰/۰۵
E_1	(تعداد برای انجام مقایسه کافی نبود)	(تعداد برای انجام مقایسه کافی نبود)
E_2	(تعداد برای انجام مقایسه کافی نبود)	(تعداد برای انجام مقایسه کافی نبود)
E_3	sig.>۰/۰۵	sig.>۰/۰۵
E_4	sig.>۰/۰۵	sig.>۰/۰۵

- **نمودارهای مربوط به مقایسه طول و وزن افراد تری پلویید در هر گروه در مقایسه با شاهد نظیر آنها**

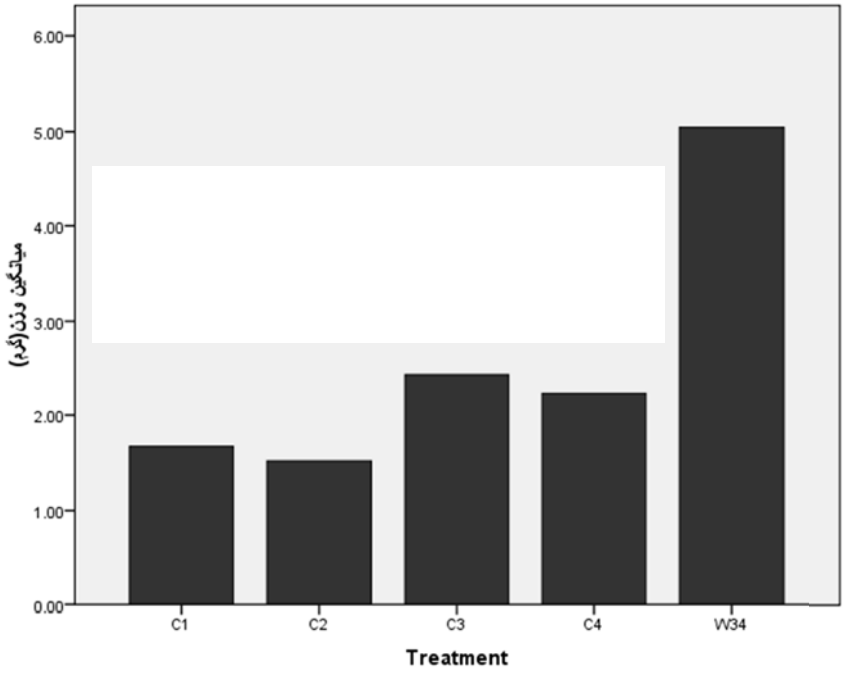


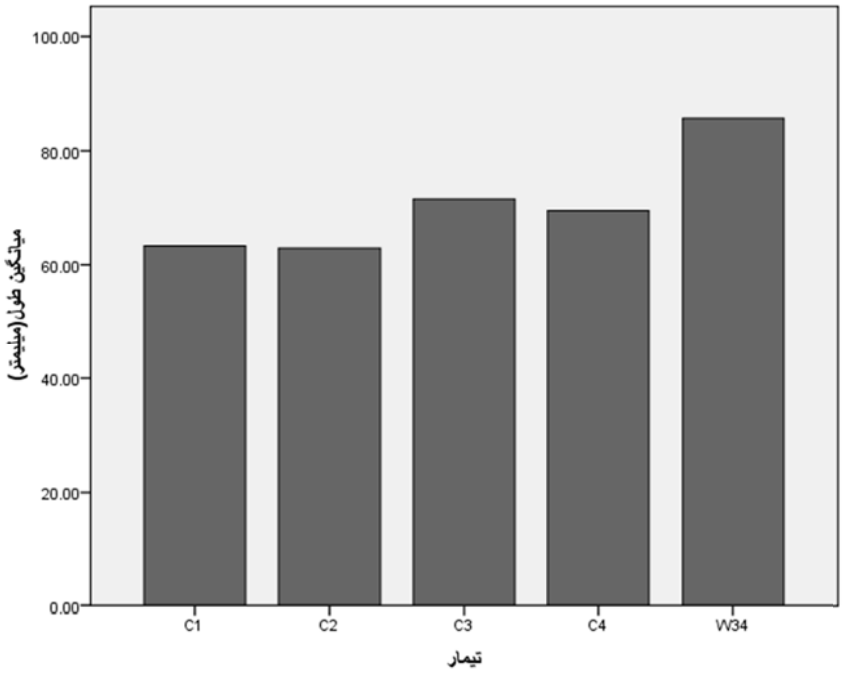
- **نمودار طول و وزن افراد تری پلوییید در تیمارهای ۳۸ درجه سانتیگراد در مقایسه با شاهد.**



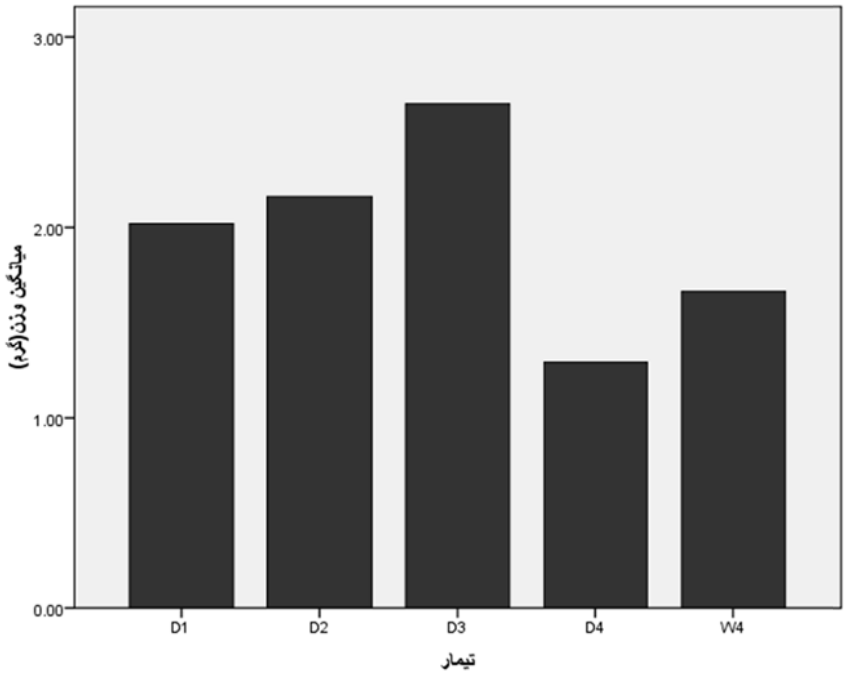


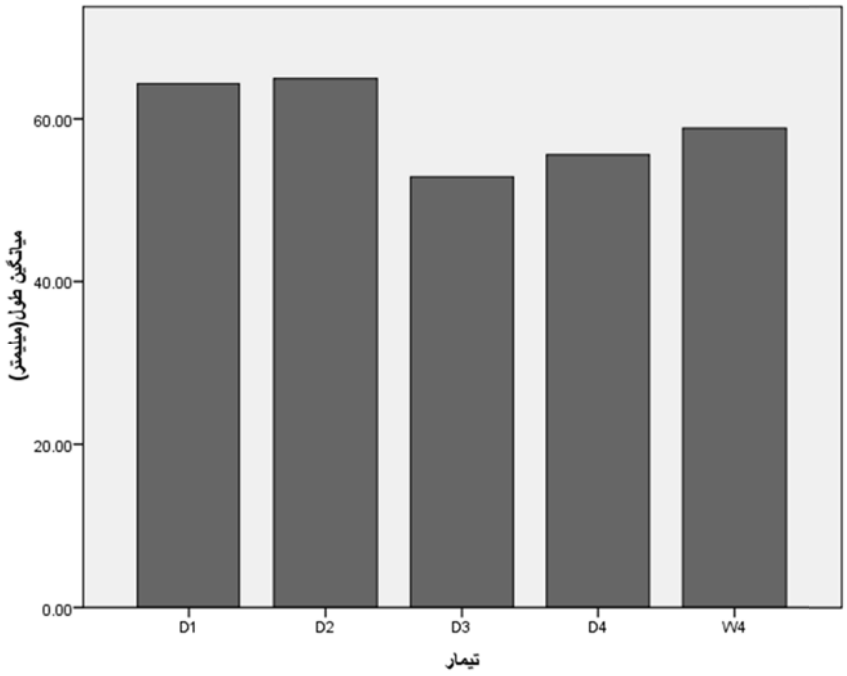
- **نمودار طول و وزن افراد تری پلوئید در تیمارهای ۳۶ درجه سانتیگراد در مقایسه با شاهد.**



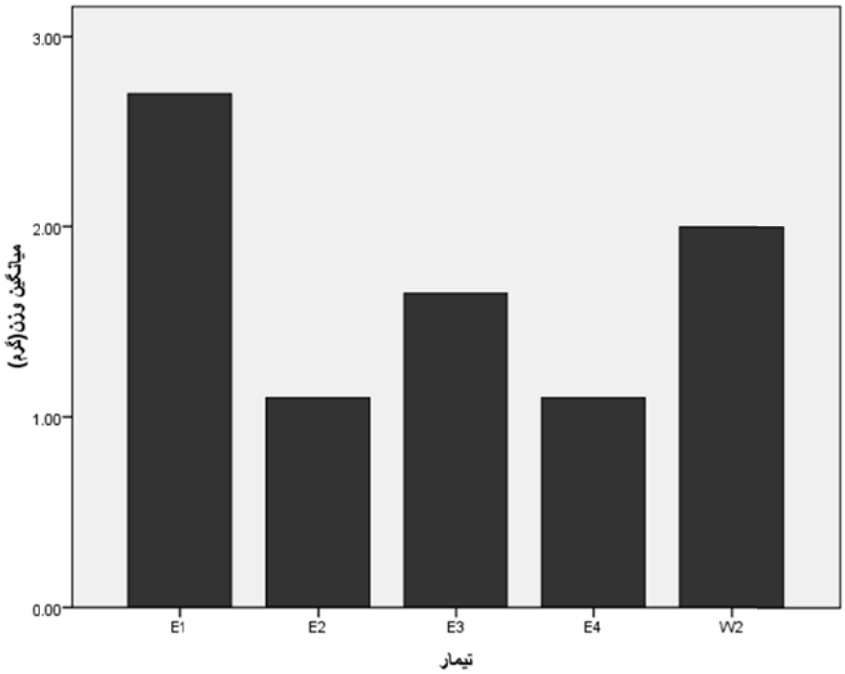


- **نمودار طول و وزن افراد تری پلوئید در تیمارهای ۳۴ درجه سانتیگراد در مقایسه با شاهد.**

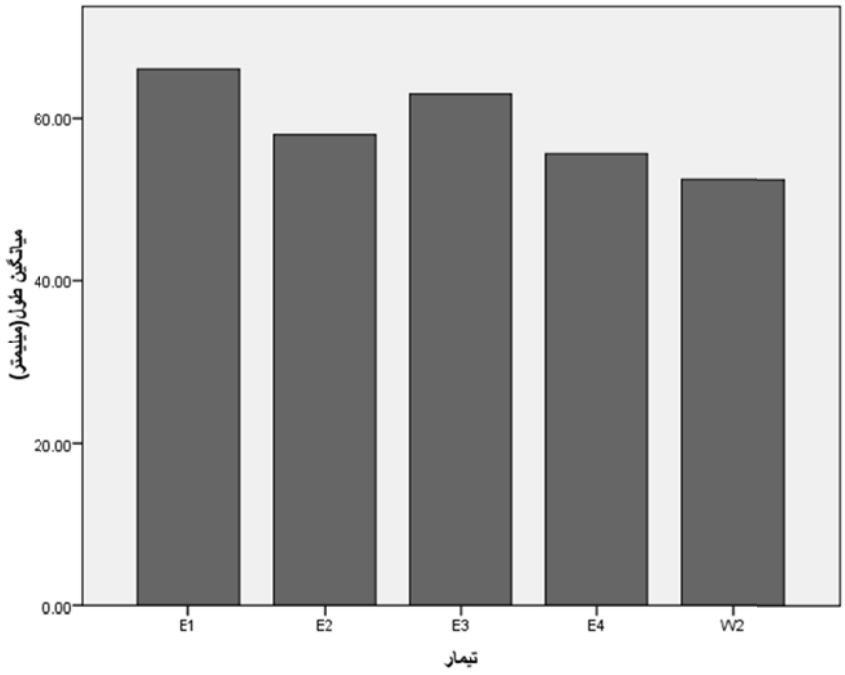




- **نمودار طول و وزن افراد تری پلوییید در تیمارهای ۴ درجه سانتیگراد در مقایسه با شاهد.**



- **نمودار طول و وزن افراد تری پلوییید در تیمارهای ۲ درجه سانتیگراد در مقایسه با شاهد.**



Abstract

Barbus sharpeyi is a local fish of Khouzestan that is planned to be a target for aquaculture in recent programs of fisheries organization. Considering importance of this species in its dispersal region, the main goal of this project was evaluation of possibility for triploidy induction and its potential in response to the heat shocks, efficiency of viability and growth and finally reporting the best condition for triploidy induction in Benny. Induction of thermal shocks was executed in for cold and heat shocks (2 and 4°C for cold and 34, 36 and 38°C for heat). Time of induction and its duration varied between 2 and 5 minutes after the fertilization for 3 and 5 minutes. Each treatment was repeated for 3 times. The ploidy level was determined based on size of nucleus diameters in erythrocytes. Analysis of data was done by SPSS (ver. 16) using T-test and ANOVA method. Results showed that the maximum number of triploid individuals was obtained in treatment of 38°C, 2 min after the fertilization by duration of 3 minutes but as the condition was not suitable for the viability of the eggs, losses of the larvae was high in this group. The best efficiency of triploidization in B. sharpeyi belongs to the 34°C, 2 to 5 minutes after the fertilization for duration of 5 minutes. Nuclear dimensions showed an increase in triploids and confirmed that this characteristic can be used as a reliable factor to distinguish polyploidy. Results of this study showed that B. sharpeyi has the ability for polyploidy inductions specially heat shocks. Evaluation of growth in matured fishes, use of proper tagging systems to distinguish the treatments and designing a plan for bioconserving and genetic improvement of this species is recommended.

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute – Aquaculture Research Center-South of Iran

---

Project Title : Preliminary study on induction of triploidy in Benni (*Barbus sharpeyi)* by thermal shocks
Approved Number: 2-74-12-87011
Author: *Elham Jorfi*
Author: Elham Jorfi
Project Researcher : Elham Jorfi
Collaborator(s) *:* Mortazavizadeh, S.A.S., Sanjari, M., Amiri, F., Youneszadeh, M.F., Nikpey, M.,Gh.Eskandari,F.Basak kahkesh
Advisor(s): Farhad Amini
Supervisor: –

Location of execution : Khouzestan provi nce
Date of Beginning : 2009
Period of execution : 2 Years & 6 Months
Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute
Date of publishing : 2016

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute – Aquaculture Research Center- South of Iran

Project Title :

Preliminary study on induction of triploidy in Benni (*Barbus sharpeyi)* by thermal shocks

Project Researcher :

Elham Jorfi

Register NO.
47800