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 – مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی
شهید مطهری یاسوج

عنوان:

تولید جمعیت تریپلوییید اینترپلوئید
با استفاده از روش غیر مستقیم (غیرالقایی)
در ماهی قزل آلای رنگین کمان
(*Oncorhynchus mykiss*)

مجری:
حبیب اله گندمکار

شماره ثبت
۵۲۴۵۳

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج

عنوان طرح/پروژه : تولید جمعیت تریپلویید اینترپلوئید با استفاده از روش غیر مستقیم (غیرالقایی) در ماهی قزل آلای رنگین کمان(Oncorhynchus mykiss)
کد مصوب: ۹۰۰۰۲-۱۲-۱۲-۲
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : حبیب‌اله گندمکار
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : حبیب‌اله گندمکار
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : عین‌اله گرجی پور، سید عبدالحمید حسینی، حسین مرادیان، جواد مهدوی، عیسی فلاحت نصرآباد، ابوالحسن راستیان‌نسب، محسن محمد پور، حسینعلی عبدالحی، سهراب رضوانی گیل-کلایی
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -
محل اجرا : استان کهگیلویه و بویراحمد
تاریخ شروع : ۹۰/۱۱/۱
مدت اجرا : ۲ سال و ۵ ماه
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۶
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»

طرح/پروژه : تولید جمعیت تریپلوییید اینترپلوئید با استفاده از روش غیر مستقیم (غیرالقایی) در ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

کد مصوب : ۹۰۰۰۲-۱۲-۱۲-۲

شماره ثبت (فروست) : ۵۲۴۵۳ تاریخ : ۹۶/۷/۲۹

با مسئولیت اجرایی جناب آقای حبیب‌اله گندمکار دارای مدرک تحصیلی کارشناسی ارشد در رشته شیلات می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش اصلاح نژاد و تکثیر و پرورش آبزیان مورد ارزیابی و با رتبه خوب تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده □ مرکز ■ ایستگاه □

با سمت کارشناس مسئول آزمایش در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج مشغول بوده است.

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱-مقدمه ۲
۱-۱-کلیات ۲
۱-۲- مروری بر منابع ۶
۱-۲-۱- القاء تتراپلوییدی در ماهیان ۶
۱-۲-۲- روش‌های شناسایی ماهیان دستکاری شده کروموزومی ۸
۱-۲-۳- رابطه اندازه تخم و بقاء ۹
۲- مواد و روشها ۱۱
۲-۱- روش کار ۱۱
۲-۲- آزمایش‌های فلوسایتومتری ۱۴
۳- نتایج ۱۶
۳-۱- اثرات دما، زمان و دوره‌ی شوک دهی در القاء تتراپلوییدی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان ۱۶
۳-۲- مشاهده کروموزوم ها ۲۱
۳-۳- نتایج فلوسیتومتری ۲۳
۴- بحث ۲۵
۴-۱- میزان بازماندگی گروه‌های مختلف تیمار تا مرحله چشم زدگی ۲۵
۴-۲- میزان بازماندگی گروه‌های مختلف تیمار از مرحله چشم زدگی تا مرحله تفریخ ۲۷
۴-۳- میزان بازماندگی گروه‌های مختلف تیمار از مرحله تفریخ تا شنای فعال ۲۷
۵- نتیجه‌گیری ۲۹
پیشنهادها ۳۰
منابع ۳۱
پیوست ۳۴
چکیده انگلیسی ۳۷

چکیده

ایجاد جمعیت تریپلوئید روشی مناسب برای عقیم سازی ماهیان می باشد که در عرصه جهانی صرفه اقتصادی پیدا نموده است. (مزایای اقتصادی زیادی را در صنعت آبزی پروری به همراه دارد.) این تحقیق با هدف ایجاد جمعیت تریپلوییید- اینترپلوییید از طریق آمیزش ماهیان تتراپلوییید ماده و دیپلوییید نر انجام گردید. برای ایجاد جمعیت تتراپلوییید از شوک گرمایی استفاده شد ومناسب ترین دما و همچنین زمان شوک دهی مورد بررسی قرار گرفت . نتایج نشان دادند که ۲۴ ساعت بعد از شوک تا تغذیه فعال بیشترین تلفات در تیمار ۶ (با میانگین ۴۰/۱ ٪) و کمترین تلفات در تیمار ۳ (با میانگین ۳۳/ ٪) بود. نتایج آزمایشات فلوسیتومتری DNA تیمارها نشان داد که برخی از ماهیان پلی پلوئید بوده است. مقایسه سطوح ژنوم ماهیان تتراپلوئید نسبت به نمونه های شاهد و همچنین در مقایسه با سطوح ژنوم مرغ (به عنوان شاخص استاندارد تعیین سطح ژنوم) وجود ماهیان تتراپلوئید را در این پروژه تائید نمود. در یک جمع بندی کلی می‌توان بیان نمود که جهت القاءی تتراپلوییدی در ماهی قزل-آلای‌رنگین‌کمان دمای مناسب جهت القاء شوک حرارتی، C ۲۸° و زمان مناسب آغاز شوک دهی ۶۵ ساعت ـ درجه پس از لقاح به مدت ۷ دقیقه است.

کلمات کلیدی : بلوغ جنسی، تتراپلوئید، شوک گرمایی، فلوسیتومتری *DNA* ، قزل آلای رنگین کمان

۱-مقدمه

۱-۱-کلیات

قزل‌آلای رنگین کمان بیشترین سهم تولید آزادماهیان پرورشی را پس از آزاد ماهی اطلس *Salmo salar* به خود اختصاص می دهد و به طور قابل ملاحظه ای از سطح تولید بالاتری نسبت به سایر گونه های آزادماهیان از جمله قزل آلای دریایی برخوردار است. هم اکنون بخشی از تولید تجاری این گونه در سطح جهانی متعلق به تولید ماهیان دستکاری شده کروموزومی، شامل انواع تریپلوید، تریپلوییدتمام ماده و آمیخته های بین گونه ای آن با سایر آزادماهیان است (درفشان، ۱۳۸۵).

پدیده بلوغ جنسی یکی از مهم ترین مشکلات پرورش دهندگان آبزیان خصوصاً ماهیان سردآبی است. بلوغ جنسی در آزادماهیان منجر به کاهش رشد (Purdom, 1993)، کاهش مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا، کاهش کیفیت لاشه و رنگدانه‌های موجود در بافتها می شود. علاوه بر این، تفاوت رشد وابسته به جنسیت در بسیاری از ماهیان (نظیر آزادماهیان) به اثبات رسیده است (Felip *et al., 2001*)، لذا تولید و پرورش ماهیان عقیم یا تمام ماده به دلیل حذف کامل بلوغ و یا تاخیر در بروز آن در آبزیان پرورشی ارجحیت دارد (Dunhum, *2004*).

به تدریج با درک اصول و قوانین ژنتیک و نیز توسعه آبزی پروری به عنوان یکی از صنایع مهم زیر بخش کشاورزی، کاربرد روش های مدرن و نوین در آبزیان توسعه یافت. در این خصوص زیست فنآوری های جدید نظیر دستکاری کروموزومی و القاءی پلوییدی به عنوان یکی از عوامل موثر در زمینه تولید آبزیان پرورشی در اواخر دهه ۱۹۸۰ و اوایل دهه ۱۹۹۰ به طور کامل مورد پذیرش و کاربرد قرار گرفت به طور کلی می توان گفت که از اوایل دهه ۱۹۸۰، تحقیقات ژنتیکی در زمینه شیلات و آبزیان توسعه مداوم خود را آغاز نمود و امروزه این تحقیقات به صورت گسترده و چشمگیر در جنبه های مختلف آبزی پروری در حال آزمایش و تجاری‌سازی است. انواع مختلفی از این فناوری ها مانند بهگزینی، آمیخته گری، تغییر جنسیت، اصلاح نژاد و القاء پلوییدی در حال حاضر در مقیاس تجاری مورد استفاده قرار می گیرند(درفشان، ۱۳۸۵)

در ماهی‌ها رسیدگی تخمک ها قبل از لقاح و درخلال میوز *I* رخ می‌دهد و تخمک نابالغ در میوز *II* باقی می ماند که در این حالت تخمک‌ها دارای دو سری کروموزوم هستند. به محض فعال سازی تخمک (معمولاً به وسیله لقاح، تغییر در فشار اسمزی یا تماس با اسپرم گونه دیگر)، میوز *II* از سر گرفته می شود و جداشدن دو کروموزوم خواهری اتفاق می افتد. یک دسته از این کروموزوم‌ها مربوط به گویچه قطبی، در حالی که دسته دیگر مربوط به تخمک است. هسته سلول تخمک با هسته سلول اسپرم امتزاج می یابند و یک سلول تخم دیپلوییدبوجود می آید. اگر ادامه فعالیت میوز *II* مختل شود (به صورت طبیعی یا به وسیله القاء شوک)، جدایی کروموزوم ها صورت نمی گیرد و دو دسته کروموزوم در سلول تخم باقی می‌ماند. در این حالت اگر لقاح اتفاق بیفتد یک دسته کروموزومی مربوط به اسپرم به تخمک منتقل شده و باعث بوجود آمدن تخم تریپلوییدمی شود.

تتراپلوییدی (دارا بودن چهار سری کروموزوم در هر سلول) نوع دیگری از پلوییدی در ماهیان است که روش تولید آن همانند تریپلوییدی با استفاده از شوک های فیزیکی یا شیمیایی است. با این تفاوت که شوک دیر هنگام و بعد از جدایی دومین گویچه قطبی و قبل از اولین تقسیم میتوزی سلول تخم است.

تتراپلوییدی می‌تواند به عنوان یک منبع مهم در تولید ماهیان تریپلوییدکاملاً عقیم محسوب شود. همچنین از گله تتراپلوییدمی‌توان از یک منبع بالقوه برای استفاده در سطوح دیگر پلوییدی مثل پنتا، هگزا، هپتاپلوییدی نام برد. امکان القای پلوییدی با استفاده از انواع شوک های شیمیایی (Phillips et al.,1986)، الکتریکی (Springate and Bromage., 1985) و فشار هیدرواستاتیک (Mair., 1993) وجود دارد. اما استفاده از شوک های دمایی خصوصاً شوک گرمایی برای آزادماهیان بنا به دلایلی نظیر سهولت کاربرد و قابلیت اعمال بر حجم بالایی از تخم ها، مرسوم ترین روش محسوب می شود (کلباسی.،۱۳۷۲،Phillips et al.,1986)

لذا سه هدف عمده این تحقیق عبارتند از:

الف- تعیین شوک بهینه حرارتی جهت القاء تتراپلوییدی در قزل‌آلای رنگین کمان

ب- اثر اندازه متفاوت تخمک بر روی القاء و بازده تتراپلوییدی

ج- مقایسه برخی شاخص های زیستی گله تتراپلوییدبا دیپلوییدتا آغاز تغذیه خارجی

۱-۱-۱- تتراپلوییدی

تتراپلوییدی یک راه ممکن برای دستکاری ژنوم در ماهیان است. یکی از کاربردهای مهم آن در ماهی‌ها تولید جمعیت های تریپلوییدتماماً عقیم است که توسط لقاح بین تتراپلوییدها و دیپلوییدها تولید می شود. تریپلوییدی به عنوان یک روش برای کاهش اثرات ناشی از بلوغ در آبزی پروری کاربرد دارد.

جلوگیری از بلوغ جنسی باعث تولید گوشت به مراتب بیشتر در ماهیان عقیم می‌شود و همچنین از تلاقی بین گونه های پرورشی فرار کرده از محیط پرورش و گونه های طبیعی ممانعت به عمل می‌آورد. تلاش برای تولید ماهیان عقیم به دو طریق هورمونی و ژنتیکی امکان پذیر است. نگرانی های جامعه در مصرف ماهیانی که مورد تیمار هورمون های استروییدی که موجب به تاخیر افتادن یا تغییر دادن تکامل جنسی در تولیدمثل ماهیان می شود، استفاده از آنها را محدود کرده است. به علاوه تیمارهای هورمونی ممکن است اثرات زیان آوری بر روی رشد و رفتارهای تولیدمثلی داشته باشد، از این‌رو روش های ژنتیکی مؤثرتر از روش‌های هورمونی هستند. ماهیان تریپلوییدبه دلیل داشتن یک دسته کروموزوم اضافی و به واسطه اخلال در تقسیم میوز به هنگام گامتوژنز معمولاً عقیم هستند. همچنین آنها از رشد بهتری در مقایسه با دیپلوییدها، معمولاً پس از بلوغ جنسی، برخوردار هستند. (Fleming and Gross., 1990, Wallace and Aasjord., 1984).

ایجاد تریپلوییدی در ماهیان به دو روش مستقیم (القایی) یا غیرمستقیم (غیرالقایی) امکان پذیر است. در روش القاءیی با استفاده از شوک های فیزیکی (شوک های دمایی و یا فشار) و یا شوک های شیمیایی در هنگام تقسیم دوم میوز در مرحله متافاز، از خروج گویچه قطبی دوم جلوگیری به عمل آمده و به این طریق جنین های تریپلویید تولید می شود. در روش غیرالقاءیی ابتدا، مولدین تتراپلویید از طریق اختلال در اولین تقسیم جنینی پس از لقاح با استفاده از شوک های فیزیکی یا شیمیایی تولید می گردد و سپس با آمیزش ماهیان تتراپلویید نر و دیپلویید ماده و یا آمیزش معکوس آن، ماهیان تریپلویید حاصل می گردد (شکل۲). از مزایای روش غیر القاءیی موفقیت کامل در تولید ماهیان تریپلویید (Myers et al., 1995)ونیز بهبود نسبی بازماندگی است (Benfey and Sutterlin,. 1984).به نظر می رسد که روش غیرالقاءیی عملی‌تر و سودمندتر از القاء تریپلوییدی به وسیله شوک ها در مراحل اولیه تخم باشد. از این‌رو ماهیان مورد استفاده برای تولید مورد تیمار مستقیم، واقع نشده و والدین دیپلویید و تتراپلویید می توانند برای بهبود تولید، انتخاب شوند و تولید ماهیان تریپلویید با خصوصیات یکسان یا حتی برتر را سبب شوند. شرط لازم برای چنین استراتژی تکثیر توسعه و تکامل نسل تتراپلوییدها است.

تتراپلوییدی برای اولین بار به صورت آزمایشی در گیاهان، دوزیستان، و پستانداران با استفاده از مواد شیمیایی (کلشی سین یا سیتو کالاسین B) القاء شد (Rideout et al., 2005).القاء مصنوعی تتراپلوییدی در گونه های مختلف ماهیان به وسیله شوک دیرهنگام صورت می‌گیرد. این شوک ها پس از جدایی دومین گویچه قطبی و قبل از اولین تقسیم و یا در حین اولین تقسیم میتوزی سلول به کار برده می شوند (شکل ۱).

تتراپلوییدهای خودبخودی در ماهی لوچ گزارش شده است (Arai et al., 1991). تتراپلوییدی می تواند از هیبریدگیری (به طور مثال در کپور) نیز بوجود بیاید. از آنجا که القاءی تتراپلوییدی توسط شوک گرمایی سهل الوصول تر از دیگر شوک های فیزیکی است، لذا معمولترین روش جهت دستکاری کروموزومی در ماهیان محسوب می‌شود (Abdel-Rahman., 1999).

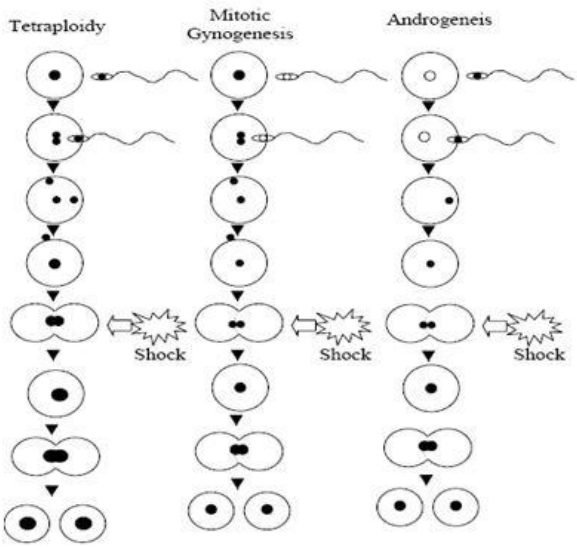
القاءی تتراپلوییدی در ماهیان به وسیله توقف تسهیم در اولین تقسیم به وسیله استفاده از روش های شیمیایی یا فیزیکی (شوک گرمایی یا سرمایی ، شوک فشاری) صورت می‌گیرد. القاء تتراپلوییدی بر اساس سرعت تکامل جنینی تنظیم می شود و از این رو برای انواع مختلف گونه های ماهیان متفاوت است. فاکتورهایی همچون زمان پس از لقاح، دماهای مختلف یا میزان بلوغ تخمک‌ها می‌تواند در موفقیت عمل پلوییدی مؤثر باشند. تخم‌هایی که کیفیت پایینی دارند به شوک حرارتی نیز واکنشی ضعیف نشان می دهند و میزان بازماندگی در آن‌ها خیلی پایین است (Diaz et al., 1993).

سطوح مختلف پلوییدی بر بقاء لاروها تاثیر گذار است به طوری‌که بقاء لاروها به دلیل استفاده از شوک های مختلف پایین آمده و باعث افزایش مرگ و میر در طی مراحل اولیه لاروی می‌شود. همچنین در برخی گونه‌ها رشد تتراپلوییدها نیز به طور مشخص پایین تر از دیپلوییدها گزارش شده است (Arai, K., 2001).

مطالعات برروی ماهی قزل آلای رنگین کمان مشخص نموده اند که تریپلوییدهای حاصل از تلاقی تتراپلویید و دیپلویید مزایای برتری نسبت به تریپلوییدهای میوزی و گروه شاهد دارند (Myers and et al., 1995., Chourrout et al.,1986). به‌علاوه نرهای تتراپلویید قزل آلای رنگین کمان گامتهایی تماماً دیپلویید تولید می کنند در حالیکه ماده های تتراپلویید اصولاً اووسیت های دیپلویید با تعدادی اووسیت های تریپلویید و تتراپلویید تولید می نمایند (Myers and Nakayama., 1987).

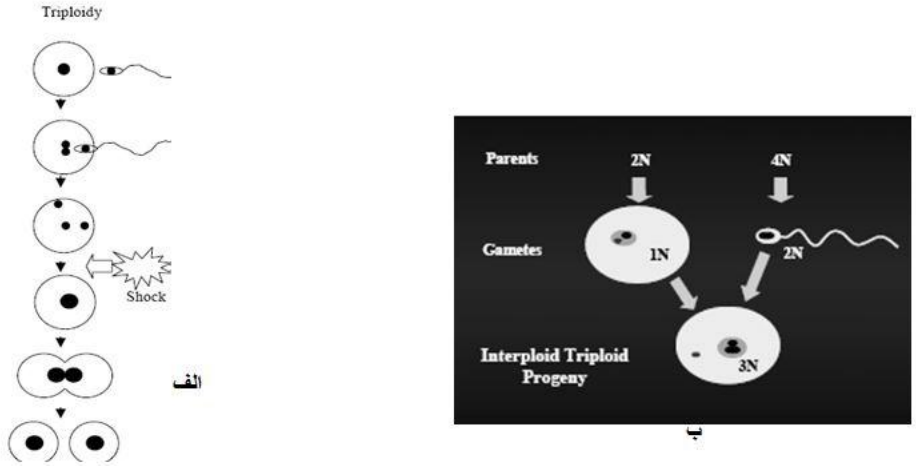
جهت شناسایی ماهیان دستکاری شده می‌توان از روش های مختلفی استفاده کرد که به طور کلی شامل روش های مستقیم (نظیر کاریوتایپ) و روش های غیر مستقیم (نظیرگسترش خونی، آنالیز NORs[1]، استفاده از مارکرهای ژنتیکی و فلوسایتومتری) است.

روش های غیر مستقیم معمولاً برای شناسایی و بررسی صحت پلوییدی استفاده می گردد. در این میان روش های گسترش خونی و آنالیز NORs به دلیل سادگی و سرعت مناسب، بیشترین کاربرد را دارند.



شکل(۱): نمای شماتیک القاء تتراپلوییدی، ماده زاد میتوزی و نرزاد به وسیله جلوگیری از اولین تقسیم میتوزی. در تتراپلوییدی ممانعت بعد از مضاعف شدن DNA رخ می دهد(Myers., 1986)

[1]- Nucleolar organize region: مناطق سازمان دهنده در هسته سلول



شکل (۲): نمای شماتیک روش‌های مستقیم (الف) و غیرمستقیم (ب) القاءی تریپلوییدی در ماهی قزل آلای رنگین کمان، در روش غیر مستقیم از مولدین نر تتراپلویید و مولدین ماده دیپلویید جهت تولید ماهیان تریپلویید عقیم استفاده میشود. در روش مستقیم با استفاده از شوک زود هنگام تریپلوییدی القاء می‌شود .

۲-۱- مروری بر منابع

۱-۲-۱- القاء تتراپلوییدی در ماهیان

اولین مطالعه در مورد القاء تتراپلوییدی در قزل‌آلای رنگین کمان و ماهی آزاد اقیانوس اطلس، به وسیله نگهداری تخم های تازه لقاح یافته برای مدت زمان کوتاه در محلول سیتوکالاسین B انجام شد. هدف این کار به دست آوردن قزل‌آلای تریپلویید به وسیله لقاح تخم معمولی با اسپرم حاصل از ماهیان نر تتراپلویید بود.

در جدول ۲-۱ نتایج القاء تتراپلوییدی در قزل‌آلای رنگین کمان با استفاده از شوک‌های فیزیکی (حرارتی و فشار) بهینه، آورده شده است. مزیت بالقوه تتراپلوییدی افزایش هتروزیگوسیتی و نیز امکان استفاده از آنها به عنوان مولد برای تولید ماهیان تریپلویید است (Diter et al., 1988,). از معایب تتراپلوییدی می‌توان به افزایش حجم سلول ها و در نتیجه کاهش تعداد سلول‌ها اشاره کرد. به عنوان مثال بزرگی سر اسپرم، عبور آن از میکروپیل تخمک‌های هاپلویید را مشکل یا غیرممکن می‌سازد .(Chourrout and Nakayama., 1987 Blanc et al., 1993). همچنین می تواند مشکلاتی در جفت شدن و جدا شدن کروموزوم های همولوگ در خلال تقسیم میوز و بوجود آورند که منجر به آنیوپلوییدی می‌شود (McCombie et al., 2005).

فویسیلی و شاروت[1] (۱۹۹۲) بیان نمودند که استفاده از شوک فشار جهت القاء تتراپلوییدی بیشتر از شوک گرمایی مؤثر است. (Chourrout and Foisil., 1992).

دایتر[2] و همکاران در سال ۱۹۹۳ با استفاده از شوک حرارتی تخم های لقاح یافته با اسپرم های سالم و پرتو دیده قزل آلای رنگین کمان مبادرت به تولید تتراپلوییدها و ماده زادهای میتوزی نمودند. دمای مورد استفاده در

[1] Foisili & Chourrout
[2] Diter

شوک ۲۷-۳۳ درجه سانتیگراد و در فواصل زمانی ۲ ساعت تا ۴ ساعت و ۴۰ دقیقه پس از فعال شدن تخم و به مدت زمان ۲ الی ۳۰ دقیقه بود. در این آزمایش مشخص شد که شدت شوک بالا (۳۱°C-۳۰) در زمان‌های بالا (۴ ساعت) دارای بقاء بالاتری است. درصد بقاء بین ۱/۶ تا ۴۸/۶ محاسبه شد در حالیکه درصد بقاء در گروه شاهد بین ۷۴ تا ۹۶ درصد محاسبه گردیده بود. تشخیص پلوییدی با استفاده از آزمایشات کاریولوژیک صورت پذیرفت (Diter et al., 1993).

در ایران نیز مطالعه ای بر روی القاء تتراپلوییدی در ماهی قزل آلای رنگین کمان صورت گرفته است. در این تحقیق جهت القاء تتراپلوییدی در ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان از شوک دمایی ۲۸ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های متفاوت پس از لقاح (۸۱ و ۷۶/۵، ۷۲، ۶۷/۵، ۶۳، ۵۸/۵، ۵۴، ۴۹/۵ ساعت ـ درجه در دمای آب انکوباسیونC ۸°) و مدت زمان‌های متفاوت شوک دهی (۱۲و ۸، ۱۰ دقیقه) استفاده شد. دمای مناسب و مدت شوک دهی به ترتیب ۲۸ درجه سانتیگراد و ۱۲ دقیقه در فاصله زمانی ۷۴ ساعت- درجه پس از لقاح جهت القاء تتراپلوییدی در نظر گرفته شد. تشخیص تتراپلوییدی در ماهیان به وسیله آنالیز NORs و اندازه‌گیری ابعاد هسته گلبول قرمز صورت پذیرفت . کلباسی،م. ر.، باقری، م.، پورکاظمی، م.، عبدالحی، ح.، ۱۳۸۲، "بررسی ایجاد ماهیان تتراپلوییدقزل آلای رنگین کمان Oncorhynchus mykiss به وسیله شوک گرمایی"، *مجله علمی شیلات ایران*، سال دوازدهم، شماره۴، ص ص ۱۴۳-۱۵۲

شاروت و همکاران دانستند که بقاء لاروها و انگشت قدهای تتراپلوییدنسبت به تریپلوییدها و دیپلوییدازوالدین یکسان بسیار پایین‌تر است. یک دلیل برای کاهش بازماندگی تتراپلوییدها کاهش تعداد سلول ها، افزایش یافتن حجم سلول و متعاقباً متناسب نبودن سطح نسبت به حجم سلول است و در نتیجه کارکرد فیزیولوژیکی سلول دستخوش اختلال می‌شود. این عمل می تواند متابولیسم سلولی را محدود کند و یا از عملکرد آن جلوگیری به عمل آورد. مثلاً در کپور علفخوار تتراپلوییدتعداد سلولها ۵۴٪ دیپلوییدها است. (Cassani et al., 1990)

رشد تتراپلوییدها در سال اول پرورش پایین تر از دیپلوییدها است ولی گزارش‌های متفاوتی در خصوص نرخ رشد تتراپلوییدها وجود دارد. نرخ رشد تتراپلوییدهای قزل‌آلای‌رنگین‌کمان ۲۵ درصد پایین‌تر از دیپلوییدها است(Chourrout et al.,1986) تفاوت های متابولیکی ممکن است تفاوت در رشد و بقاء بین تتراپلوییدها و دیپلوییدها را تفسیر کند.(Fauconneau et al .,1989) از طرفی دیگر، بعد از گذشت ۹ ماه وزن مشابه برای تتراپلوییدها و دیپلوییدهای قزل‌آلای رنگین کمان گزارش شده که علت آن می تواند کیفیت مناسب تخم و پس زمینه ژنتیکی مناسب آنها باشد. (Horstgen-Schwark, G., 1993)

القاء تتراپلوییدی در گونه های با اهمیت اقتصادی دیگر نیز با استفاده از شوک های فیزیکی (دمایی و فشار) انجام گرفته است (جدول۲).

۲-۲-۱- روش‌های شناسایی ماهیان دستکاری شده کروموزومی

تتراپلوییدها به طور مشخص اریتروسیت های بزرگتر و ابعاد هسته ای بزرگ تری از دیپلوییدها دارند (Onozato, H. 1985). در ماهی لوچ، *Misgurnus mizolepis* ،نیز برای تعیین سطوح پلوییدی از روش اندازه گیری ابعاد گلبول قرمز استفاده شده است. (Onozato, H. 1985)

فیلیپس[1] و همکاران (۱۹۸۶) و فلاجشنس[2] و همکاران (۱۹۹۲) روشی را برای تعیین سطح پلوییدی به کار بردند که امکان شناسایی نمونه های مختلف پلوییدی را فراهم می کرد. آنها از این مطلب که در بعضی از گونه های ماهیان تعداد هستک ها در اینترفاز سلول سطح پلوییدی را منعکس می کنند، استفاده نمودند (Phillips et al., 1986, Flajshans and Dobosz ., 1992).

بابیاک[3] و همکاران (۱۹۹۸) از این روش در قزل‌آلای‌رنگین‌کمان دستکاری شده توسط شوک حرارتی برای شناسایی تتراپلوییدها استفاده نمودند. محققین دیگری نشان دادند که آنالیزهای کمتر از ۴۰ سلول در مرحله اینترفاز سلولی توانایی مثبت در شناسایی هاپلویید، دیپلویید و تریپلویید گونه سیم دریایی *Abramis brama* دارد (Babiak et al.,1998). کلباسی و همکاران (۱۳۸۲) از هر دو روش اندازه گیری ابعاد هسته ی گلبول قرمز و آنالیز NORs به منظور تعیین سطح تتراپلوییدی بهره بردند.(کلباسی،م. ر.، باقری، م.، پورکاظمی، م.، عبدالحی، ح.، ۱۳۸۲)

جدول(۱) برخی گزارش‌ها در خصوص القاء تتراپلوییدی در گونه‌های مهم تجاری ماهیان

گونه	نوع شوک	درجه حرارت شوک (°C) و یا شدت فشار(PSI)	زمان شوک پس از لقاح (دقیقه)	دوره شوک (دقیقه)	روش سنجش پلوییدی	ماخذ
کپور سرگنده *Hypophthalmichthys nobilis*	گرمایی	۴۱	۵۵	۲ – ۱/۵	کاریولوژیک	[۳۹]
	فشار(atm)	–	۳۶	۱/۵		[۶]
سوف زرد *Perca flavescens*	فشار	–	۱۹۲	۱۶ یا ۲۴	کاریولوژیک	[۴۸]
لای ماهی *Tinca tinca*	گرمایی	۴۰/۵	۴۵	۱/۵	سنجش ابعاد هسته ، کاریولوژیک	[۳۴]
	فشار	–	۵۰	۱		
لوچ ماهی *Misgurnus mizolepis*	گرمایی	۴۰/۵	۲۸	۳	سنجش ابعاد هسته، کاریوتایپ، محتوای DNA	[۵۴]

[1] Philips
[2] Flajshanse
[3] Babiak

گونه	نوع شوک	درجه حرارت شوک (°C) و یا شدت فشار(PSI)	زمان شوک پس از لقاح (دقیقه)	دوره شوک (دقیقه)	روش سنجش پلوییدی	ماخذ
ماهی سیم *Megalobrama amblycephala*	گرمایی	۴۰	۳۳	۲	کاریوتایپ، سنجش ابعاد هسته	[۷۶]
کپور معمولی *Cyprinus carpio*	گرمایی	۴۰	۴۴	۲/۵	سنجش ابعاد هسته، محتوای DNA	[۳۷]
تیلاپیای نیل *Oreochromis niloticus*	گرمایی	۴۲	۲۴	۳	کاریوتایپ، سنجش ابعاد هسته	[۵۱]
کپور علف‌خوار *Ctenopharyngodon idella*	گرمایی	۴۲	۶۰	۱/۵	کاریولوژیک	[۷۱]
	فشار	۹۰۰۰	۷۵	۲۰		

۳-۲-۱- رابطه اندازه تخم و بقاء

تفاوت اندازه تخم در بین دو گونه ممکن است سبب تفاوت در بقاء از لقاح تا مرحله چشم‌زدگی شود. هیچ رابطه‌ای بین اندازه تخم و بقاء جنینی تا مرحله تفریخ در قزل‌آلای جویباری دیده نشد (Zhang et al., 1993).

در شرایط اکسیژنی بالا (نزدیک به ۱۰۰٪ اشباع)، هیچ تفاوتی در نرخ بقاء بین تخم‌های بزرگ و کوچک مشاهده نمی‌شود، اما تحت شرایط آنی و موقت کاهش اکسیژن (۱۸٪ اشباع) تخم‌های کوچکتر بقاء کمتری از تخم‌های بزرگتر دارند (Einum et al., 2002).

در مطالعه‌ای بر روی قزل‌آلای خال قرمز *Salmo trutta* در شرایط مساعد پرورش بچه ماهیان منتج شده از تخم-های بزرگتر دارای مزایای رشد و بقاء بالاتری نسبت به تخم‌های کوچکتر بودند (Einum and Fleming ., 1995).

اثرات اندازه تخمک بر روی رشد و بقاء لاروها در قزل‌آلای رنگین کمان مطالعه شده است. تخم‌هایی با اندازه قطر بین ۳/۳ تا ۵/۶ میلی‌متر که از ماده‌های ۲ ساله و ۳ ساله به دست آمده بودند، مورد آزمایش قرار گرفتند. بچه ماهیان حاصل از تخم‌های بزرگ در هر دو گروه مولدین بزرگتر بودند. در هفته چهارم پس از تغذیه فعال رابطه بین اندازه تخم و وزن لاروها از بین رفت، فرض بر این است که اثرات ژنتیکی و محیطی از این زمان به بعد مؤثر باشند. رشد ویژه نیز در پس از لقاح رابطه‌ای با اندازه اولیه تخم نداشت. اندازه تخم تنها تا مرحله چشم زدگی در نرخ بقاء مؤثر است و بعد از آن رابطه‌ای بین اندازه تخم و بقاء لاروها وجود ندارد (Teskeredzi et al., 1993).

تفاوت در اندازه تخم قزل‌آلای قطبی *Salvelinus alpinus* در بقاء و رشد لاروهای تازه تفریخ شده مشخص شده است. لاروهای تازه تفریخ شده از لاروهای بزرگتر، دارای اندازه بزرگتر و رشد سریعتر بودند. مرگ و میر ابتدایی آن‌ها نسبت به لاروهای حاصله از تخم‌های کوچکتر پایین‌تر است. کیسه زرده در لاروهای تخم‌های

بزرگتر به تناسب بزرگتر هستند. همچنین در این گروه تخم‌ها لاروها به نسبت کمتر دارای ناهنجاری هستند (Winckler-Sosinski., 2005).

همان‌طور که بیان شد تولید گله تتراپلوییدها و رسیدن تتراپلوییدها به مرحله بلوغ جنسی و تولید گامت دیپلوییدها، می‌تواند در تولید تریپلوییدهای کاملاً عقیم نقش مؤثری دارند. تریپلوییدها تولیدی در بعد از بلوغ جنسی رشدی بیشتر از دیپلوییدها دارند. کیفیت لاشه مناسبتری دارند، در نتیجه به‌دلیل تولید گوشت بیشتر هزینه خانوار را کاهش می‌دهد. همچنین سود بیشتری را نسیب بهره‌بردار می‌نماید. از این‌روکلید به دست آوردن تتراپلوییدهای قابل زیست و با قابلیت تولیدمثل در به دست آوردن شرایط بهینه برای القاء تتراپلوییدی است. ازآنجا که اثر اندازه تخم و همچنین میزان کیفیت تخم‌ها می‌تواند در القاء تتراپلوییدی و همچنین بازده تتراپلوییدی مؤثر باشد و تاکنون مطالعه‌ای در مورد اثرات القاء پلوییدی بر اندازه تخمک مطالعه‌ای در داخل کشور کشور صورت نپذیرفته است، انجام این تحقیق مورد توجه قرار گرفت. در خصوص القاء تتراپلوییدی تنها یک مطالعه‌ی موردی صورت گرفته است، همچنین به دلیل تفاوت بین گروه‌های مختلف ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان در واکنش به القاء تتراپلوییدی و همچنین اطلاعاتی از نحوه اثر القاءی پلوییدی بر اندازه تخمکی متفاوت در این گونه وجود ندارد ، لذا تحقیق حاضر به منظور تعیین شوک بهینه حرارتی جهت القاءی تتراپلوییدی با توجه به اندازه تخمکی متفاوت در ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان طراحی و اجرا گردید.

۲- مواد و روش‌ها

۱-۲-روش کار

این پروژه با هدف تولید جمعیت تریپلوییید در ماهی قزل آلای رنگین کمان با استفاده از شوک حرارتی در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سودابی انجام پذیرفت.

در این تحقیق ازتخم ماهیان مولد ماده (تخمک با قطر بالای ۵ میلی متر و زیر ۵ میلی متر) با میانگین ۴-۳ سال واسپرم مولدین نر ۳-۲سال به نسبت ۲: ۱ برای لقاح استفاده شد.

شکل (۳): عملیات تکثیر

شکل (۴): عملیات بیوتکنیک و مراحل تکثیر

شکل (۵): عملیات شوک دهی دمایی

شکل(۶): لاروهای تولیدی با کیسه زرده

شکل (۷): عملیات تقسیم تیمارها

پس از استحصال تخم و مخلوط کردن تخم و اسپرم به منظور حذف اسپرم اضافی تخم ها با آب تمیز شسته شده و به منظور سپری کردن زمان مناسب موقتاً در تراف نگهداری شدند. برای اعمال شوک گرمایی از آکواریوم شیشه ای، دو عدد بخاری آکواریوم با ترموستات حرارتی و پمپ هوا، سنگ هوا و یک عدد دماسنج الکلی استفاده گردید. پس از لقاح و طی شدن زمان مورد نیاز (که زمان مورد نیاز پس از لقاح برای اعمال

شوک دهی لحظه اضافه کردن آب بر روی مخلوط تخم و اسپرم در نظر گرفته شد) برای هر تیمار ۳۰۰۰ تخم لقاح یافته(براساس میانگین تعداد در گرم و توزین نمودن بوسیله ترازوی دیجیتال با دقت ۱/ گرم) را به سبد ها و سینی هایانکوباسیون منتقل و شوک دهی طبق ۸ تیمار ذکر شده در جدول (۲) با استناد به مقالات(Chourrout,1982.1984.1985&,benfey,2009&Horstgen,2006) و باقری در سال ۱۳۸۰انجام پذیرفت.

جدول ۲- برخی شوک‌های فیزیکی بهینه شده جهت القاء تتراپلوییدی در قزل‌آلای رنگین کمان

درجه حرارت شوک (°C)	زمان شوک پس از لقاح (ساعت)	دوره شوک (دقیقه)	نوع شوک	زمان شوک پس از لقاح(ساعت-درجه)	بازده شوک (٪)	ماخذ
۲۸	۸/۵	۱۰	گرمایی	۸۵	۱۵	[۱۹]
۳۶	۶-۵/۵	۱	گرمایی	۶۰-۵۵	۱۰	[۶۹]
۲۸	۸/۵	۱۲	گرمایی	۷۵	۸/۴	[۴]
۳۲-۳۱/۵	۳/۴۵	۵-۴	گرمایی	۳۴/۵	۱۲	[۲۷]
-	۵/۵-۵/۳	۵	فشار	۵۵	۳۵	[۲۴]
-	۵/۵۰	۴	فشار	۵۲	۳۰	[۲۰]

پس از اتمام شوک دهی تخمهای شوک داده شده بصورت مجزا به سینی های انکوباسیون منتقل شده تا ادامه مراحل جنسی را در آنجا سپری کنند. تیمارهای فوق در ۳ تکرار انجام و یک گروه تخم بدون اعمال شوک دهی به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد.

برای جلو گیری از تابش نور مستقیم به تخم ها خوابانده شده در سینی و تراف ها از صفحات یونولیتی استفاده گردید.

برای جمع آوری وثبت تلفات تخم ها و مقایسه با گروه شاهد (القاء بدون شوک دمائی) ، بصورت دستی تعداد تلفات ۲۴ ساعت بعد از شوک دهی، تعداد تلفات از مراحل لقاح تا شروع تغذیه فعال شمارش و ثبت گردید.

برای تعیین میزان بدشکلی لاروها به دلیل القاء شوک گرمایی با استفاده از فرمول زیر تعیین گردید.

$$\text{درصد بدشکلی} = \frac{\text{تعداد لاروها بد شکل}}{\text{تعداد کل موجودی لاروها در هرتیمار}} \times ۱۰۰$$

در نهایت برای محاسبه درصد بازماندگی لاروهای هر تیمار از لقاح تا مرحله شنای عمودی از رابطه زیر استفاده شد (Bidwell;۱۹۸۵).

درصد بازماندگی = تعداد لاردهای بدست آمده در شنای عمودی / تعداد تخم های اولیه پس از لقاح در ابتدای آزمایش

برای تعیین درصد القاء تتراپلوییدی به روش محاسبه سلولهای خونی و تعداد هستکهای سلول از روش زیر استفاده گردید (Brydges,Benfey;۱۹۹۱).

درصد القاء تریپلوییدی = تعداد ماهیان تتراپلویید / تعداد ماهیان تتراپلویید + تعداد ماهیان دیپلویید

برای نتیجه نهایی آزمایشات وتعیین تیماری که حداکثر درصد بازماندگی تتراپلوییدی را داشته باشد از رابطه زیر استفاده شد (Brydges,Benfey; ۱۹۹۱).

بازده تتراپلوییدی = میزان بازماندگی لاروها تا مرحله شنای عمودی × درصد پلوییدی / 100

۲-۲-آزمایش‌های فلوسایتومتری

این روش به منظور مقایسه مقدار DNA هسته سلول های گلبول های قرمز خون ماهیان قزل آلا از گروه های مختلف آزمایشی مطابق روش های توصیف شده توسط Birstein و همکاران (۱۹۹۳)، Fenerich و همکاران (۲۰۰۴) به منظور بهینه سازی به شرح زیر مورد استفاده قرار گرفت

۱. علامتگذاری ماهیان بااستفاده از تگ در باله پشتی ماهیان
۲. خونگیری از ماهیان پس از بیهوشی با استفاده از سرنگ هپارینه انجام گرفته و نمونه ها (۰.۵-۱ میلی لیتر) در مجاورت یخ به بخش فلوسایتومتری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران و دانشگاه علوم پزشکی شیراز در چند مرحله (فاصله زمانی سه ساعت از زمان خونگیری تا ارسال نمونه ها و رسیدن به مقصد) منتقل شدند.
۳. مقادیر اندکی از خون هپارینه (5µl) به همراه 200µl از بافر تریس (۶.۴۲ گرم تریس در ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر با ph=7-7.4) به خوبی شستشو داده شده (حداقل دو مرتبه) و پس از هر مرتبه شستشو، سانتریفوژ (۱۰ دقیقه، 2500rpm) شدند.
۴. پس از انجام سانتریفوژ نهائی، مایع رویی جداسازی شده و رسوب در 100µl از بافر تریس حل گردید.
۵. به منظور تخریب رشته های RNA، آنزیم RNAase به میزان 500µl (۰.۰۲۵گرم در ۵ میلی لیتر بافر تریس) اضافه شده و به مدت حدود ۳۰ دقیقه در $37^{\circ}c$ نگهداری شد.

۶. پس از طی زمان مذکور، 100µl از Triton X-100 (۱ میلی لیتر در ۹ میلی لیتر آب مقطر) اضافه و به خوبی با نمونه ها مخلوط گردید.

۷. سپس 500µl از یدید پروپیدیوم(۰.۰۰۰۱ گرم در ۱۰ میلی لیتر بافر تریس) به محلول فوق اضافه شده و به خوبی مخلوط شد.

۸. سپس آنالیز با استفاده از دستگاه (Company Coulter USA)Coulter EPICS-XL با تابش آرگون در طول موج 488nm و فیلتر 625nm انجام گردید.

۹. سیگنال های فلورسانس با استفاده از نرم افزار Multicycle به صورت هیستوگرام بررسی شدند.

۱۰. تعداد۱۰ قطعه ماهی از هر گروه آزمایشی در دوبار تکرار مورد آزمون قرار گرفته و میانگین محاسبه شده برای حدود ۱۰ الی ۳۰ هزار گلبول قرمز در هر بار آزمون به عنوان پیک اندازه گیری شده برای مقدار DNA هر گروه آزمایشی معرفی شدند.

شکل(۸): دستگاه فلوسیتومتری جهت آنالیز نمونه ها

۳- نتایج

۱-۳- اثرات دما، زمان و دوره‌ی شوک دهی در القاء تتراپلوییدی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان

اثر عوامل مختلف شامل دما ، زمان، دوره شوک دهی و قطر بر روی بازماندگی تا مرحله چشم زدگی، از مرحله چشم زدگی تا مرحله تفریخ، از تفریخ تا مرحله شنای فعال، درصد تتراپلوییدی و بازده تتراپلوییدی بررسی شد. نتایج نشان داد که عوامل اصلی شوک حرارتی شامل دمای شوک، زمان آغاز شوک دهی و دوره شوک دارای تأثیر معنی داری مستقیم در میزان بازماندگی تخم‌های لقاح یافته، درصد القاءی تتراپلوییدی و بازده تتراپلوییدی هستند ($p < 0.05$) و اثرات معنی دار آن‌ها به صورت منفرد و یا به صورت تلفیقی از دو عامل و یا هر سه عامل مذکور قابل شناسایی است.

۱-۱-۳- اثر دمای شوک بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در بین تیمارهای مختلف

در مقایسه میانگین‌ها مشخص گردید که در هر دو گروه تخمکی (بالای ۵ میلی‌متر و زیر ۵ میلی‌متر) به طور کلی با افزایش دما، بازماندگی تا مرحله چشم زدگی کاهش یافت. در مرحله تفریخ و شنای فعال میزان بازماندگی با افزایش دمای شوک دهی تقریباً بدون تغییر باقی ماند. درصد تتراپلوییدی و بازده تتراپلوییدی در هردو گروه با افزایش دمای شوک دهی (۳۲-۳۰) کاهش یافت با این تفاوت که درصد تتراپلوییدی درگروه تخمکی بالای ۵ میلی‌متر در تیمارهای ۳۰ درجه سانتی‌گراد صفر به دست آمد. بالاترین درصد تتراپلوییدی در گروه تخمکی بالای ۵ میلی متر در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد (۱۹/۸) و پایین‌ترین آن در گروه تخمکی بالای ۵ میلی‌متر در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد (صفر) به دست آمد. همچنین در گروه تخمکی زیر ۵ میلی متر بالاترین درصد در دماهای ۲۸ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد بدست آمد (به ترتیب معادل ۱۱/۹و ۱۱/۲) که تفاوت معنی داری در بین این دو دما وجود نداشت ($p>0.05$) .بررسی‌ها نشان داد که دماهای ۲۸، ۳۰ و۳۲ درجه سانتی‌گراد، در گروه تخمکی زیر ۵ میلی‌متر منجر به القاء تتراپلوییدی می‌شود ولی در گروه تخمکی بالای ۵ میلی‌متر تنها دماهای ۲۸ و ۳۲ درجه سانتی‌گراد القاءتتراپلوییدی را در پی دارد (جدول ۳).

جدول(۳): اثر دمای شوک بر شاخص‌های قطر تخمک قزل‌آلای‌رنگین کمان

دما (°C)	۲۸		۳۰		۳۲	
شاخص‌های اندازه-گیری شده**	تخمک> ۵ mm	تخمک< ۵ mm	تخمک > ۵ mm	تخمک< ۵ mm	تخمک > ۵ mm	تخمک< ۵ mm
٪ بازماندگی تا چشم زدگی	۶۹ ± ۱۷/۶^{A}	± ۲۸/۱ ^{a} ۴۶/۵۴	±۲۱/۵^{a} ۴۷/۴۸	± ۲۹ ^{B} ۵۶/۴۵	± ۳۲/۷^{b} ۲۸/۵۸	۲۵/ ۳ ± ۳۶ ^{C}
٪ بازماندگی از چشم زدگی تا تفریخ	۷۳/۵ ± ۱۸/۵ ^{A}	± ۱۸/۵ ^{ab} ۶۷/۵۳	±۱۶/۴ ^{b} ۶۶/۲۷	± ۱۶/۱^{A} ۷۳/۴۵	۱۶/۱^{a} ۷۲/۱۶±	۶۹/۸ ± ۱۹/۵^{A}

دما (°C)	۲۸		۳۰		۳۲	
٪ بازماندگی از تفریخ تا شنای فعال	۶۷/۷ ±۱۸/۳^{A}	± ۱۸/۵ ^{ab} ۶۴/۵	± ۱۶/۱^{A} ۶۷/۰۱	± ۱۸/۶ ^{b} ۶۰/۳۶	± ۱۶/۶^{A} ۷۲/۴۸	± ۱۶/۲^{a} ۶۸/۲
درصد تتراپلوییدی***	۱۹/۸ ± ۳/۷^{A}	۱۱/۹ ± ۳/۱^{a}	^{C}۰	۱۱/۱۶ ± ۲/۴^{a}	۲/۲۵ ± ۱/۳^{B}	۴/۲± ۱/۶^{b}
بازده تتراپلوییدی***	۷/۵ ± ۱/۵^{A}	۲/۱± ۰/۶۲^{a}	^{C} ۰	۱/۷ ± ۰/۴۷^{ab}	۱/۴ ± ۰/۸^{B}	۱/۴ ±۰/۵۷^{b}

*با استفاده از آزمون دانکن در هر گروه تخمکی (بالای ۵ میلی‌متر و زیر ۵ میلی‌متر)، میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک باشند فاقد تفاوت معنی دار در شاخص های مورد ارزیابی هستند ($p > 0.05$). ** میانگین ± انحراف معیار . *** میانگین ± خطای معیار. حروف بزرگ مربوط به گروه تخمکی بالای ۵ میلی‌متر و حروف کوچک مربوط به پروه تخمکی زیر ۵ میلی‌متر است.

۲-۱-۳- اثر دوره (زمان) شوک دهی بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در بین تیمارهای مختلف

در جدول(۳): اثر دوره شوک دهی در هر دو گروه تخمکی مورد بررسی قرار گرفته است. با مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در هر دو گروه مشخص شد که با افزایش دوره شوک بازماندگی در هر سه مرحله مورد سنجش، لقاح تا چشم زدگی، چشم زدگی تا تفریخ و تفریخ تا شنای فعال کاهش یافت. به طوری که میزان بازماندگی در مرحله تخم چشم زده در دوره ۱۰ دقیقه کمترین میزان خود را در هر دو گروه داراست. به طور کلی میزان بازماندگی تخم‌ها در مرحله چشم زدگی در گروه تخمکی زیر ۵ میلی‌متر کمتر از گروه تخمکی بالای ۵ میلی‌متر است. درصد تتراپلوییدی و بازده تتراپلوییدی در هر دو گروه با افزایش دوره شوک دهی افزایش می‌یابد. بالاترین درصد تتراپلوییدی و بازده تتراپلوییدی در گروه تخمکی بالای ۵ میلی‌متر مربوط به دوره ۱۰ دقیقه است (به ترتیب معادل ۱۰/۹٪ و ۱/۷٪) که اختلاف معنی داری با دیگر گروه‌ها داشت ($p < 0.05$)، در حالی که بالاترین درصد و بازده تتراپلوییدی در گروه تخمکی زیر ۵ میلی‌متر در دوره ۵ دقیقه (به ترتیب شامل ۱۱/۶٪ و ۲/۸٪) مشاهده شد.

جدول(۴): اثر دوره‌ی شوک بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده صرف نظر از زمان، دمای شوک و قطر تخمک قزل‌آلای رنگین کمان.

دوره (دقیقه)	۱		۵		۱۰	
شاخص‌های اندازه-گیری شده**	تخمک> ۵ mm	تخمک< ۵ mm	تخمک > ۵ mm	تخمک < ۵ mm	تخمک > ۵ mm	تخمک< ۵ mm
٪ بازماندگی تا چشم زدگی	۷۵/۵ ± ۱۰/۱^{A}	۶۳/۲ ± ۱۹/۷^{a}	۳۹/۲ ± ۳۳/۸^{B}	۳۸/۸ ± ۲۴/۴^{b}	۳۶/۲ ± ۳۵/۴^{B}	۲۰/۵ ± ۲۵/۵^{c}
٪ بازماندگی از چشم زدگی تفریخ	۷۸/۳ ± ۱۲/۹^{A}	۷۹/۴ ± ۸/۷^{a}	۷۰/۹ ± ۱۹/۷^{AB}	۶۲/۴ ± ۱۴/۸^{b}	۶۵/۹ ± ۲۰/۸^{B}	۵۶/۴ ± ۱۹/۹^{c}

دوره (دقیقه)	۱		۵		۱۰	
٪ بازماندگی از تفریخ تا شنای فعال	۷۳/۴ ± ۱۳/۲^{A}	۷۲/۳ ± ۷/۳^{a}	۶۳/۴ ± ۲۰/۷^{B}	۶۳/۵ ± ۱۴/۵^{b}	± ۱۶/۸^{B} (۶۴/۲	۴۸/۳ ± ۲۵/۳^{c}
درصد تتراپلوییدی***	۵/۷ ± ۲/۲^{B}	۵/۴ ± ۱/۷^{c}	۵/۶ ± ۲/۶^{B}	۱۱/۶ ± ۲/۵^{a}	۱۰/۹ ± ۲/۹^{A}	۱۰/۲ ± ۳/۱^{b}
بازده تتراپلوییدی***	۳/۲ ± ۱/۲^{B}	½ ± ۰/۶^{c}	(۱/۶ ± ۰/۸^{B}	۲/۸ ± ۰/۷^{a}	۴/۱ ± ۱/۱^{A}	۰/۴۱ ± ۰/۲^{b}

*با استفاده از آزمون دانکن در هر گروه تخمکی (بالای ۵ میلی‌متر و زیر ۵ میلی‌متر)، میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک باشند فاقد تفاوت معنی دار در شاخص های مورد ارزیابی هستند ($p > 0.05$). ** میانگین ± انحراف معیار . *** میانگین ± خطای معیار. حروف بزرگ مربوط به گروه تخمکی بالای ۵ میلی‌متر و حروف کوچک مربوط به پروه تخمکی زیر ۵ میلی‌متر است.

۳-۱-۳-اثر زمان (ساعت ـ درجه) آغاز شوک بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در بین تیمارهای مختلف

نتایج نشان داد که روند منظمی با افزایش زمان آغاز شوک در میزان بقاء وجود ندارد. با این حال در خصوص میزان بازماندگی در هر دو گروه تخمکی در مرحله چشم زدگی تفاوت معنی داری در بین زمان‌های مختلف پس از لقاح وجود دارد($p< 0.05$). در هر دو گروه بیشترین میزان بازماندگی به ترتیب مربوط به زمان‌های ۷۵ و ۴۵ ساعت ـ درجه پس از لقاح و کمترین آن مربوط به زمان ۵۵ ساعت ـ درجه پس از لقاح است. درصد و بازده تتراپلوییدی در هر دوگروه، در بین تیمارهای زمانی مختلف دارای اختلاف معنی داری است ($p< 0.05$). در تیمارهای زمانی متفاوت در گروه تخمکی بالای ۵ میلی‌متر بیشترین درصد تتراپلوییدی به ترتیب مربوط به ۶۵ و ۵۵ ساعت ـ درجه پس از لقاح و کمترین آن مربوط به زمان ۷۵ ساعت درجه بود که درصد تتراپلوییدی آن معادل صفر است. بیشترین بازده تتراپلوییدی در این گروه به ترتیب مربوط به ۶۵ و ۵۵ ساعت ـ درجه (۶/۴٪ و ۴/۸٪) و کمترین آن مربوط به ۷۵ ساعت ـ درجه است در بین این گروه اختلاف معنی داری در زمان آغاز شوک متفاوت وجود دارد ($p< 0.05$). در گروه تخمکی زیر ۵ میلی‌متر نیز بیشترین درصد تتراپلوییدی به ترتیب در زمان‌های ۶۵ و ۴۵ ساعت ـ درجه (۱۹٪ و ۱۳٪) و کمترین آن در زمان ۵۵ ساعت درجه پس از لقاح بود (صفر). در حالی که بازده تتراپلوییدی بیشترین مقادیر را به ترتیب در زمان‌های ۴۵ و ۶۵ ساعت ـ درجه و کمترین مقدار را در زمان ۵۵ ساعت ـ درجه دارا بود. در این گروه نیز اختلاف معنی داری ($p< 0.05$) در بین زمان‌های مختلف پس از لقاح وجو داشت (جدول ۵).

جدول(۵): اثر زمان آغاز شوک بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده صرف نظر از دما، دوره‌ی شوک و قطر تخمک قزل‌آلای‌رنگین‌کمان

زمان آغاز شوک(ساعت ـ درجه)	شاخص‌های اندازه‌گیری شده**	٪ بازماندگی تا چشم زدگی	٪ بازماندگی از چشم زدگی تفریخ	٪ بازماندگی از تفریخ تا شنای فعال	درصد تتراپلوییدی***	بازده تتراپلوییدی***
۴۵	تخمک <۵ mm	**AB** ۵۱/۸ ± ۳۴/۶	**B** ۶۷/۷ ± ۲۵/۹	**B** ۶۷/۳ ± ۲۲/۸	**C** ۳/۹ ± ۲/۱	**C** ۲/۱ ± ۱/۲
	تخمک> ۵ mm	**a** ۵۱/۴ ± ۲۴/۴	**A** ۷۱/۹ ± ۱۴/۳	**A** ۶۵/۴ ± ۱۷/۶	**B** ۱۳ ± ۳/۱	**b** ۳/۵ ± ۰/۸۵
۵۵	تخمک> ۵ mm	**C** ۳۱/۴± ۳۴/۷	**B** ۷۳/۱± ۱۶/۲	**AB** ۶۳/۷ ± ۲۲/۷	**B** ۱۱/۳ ± ۳/۵	**B** ۴/۸ ± ۱/۸
	تخمک < ۵ mm	**d** ۲۶/۶ ± ۳۳/۳	**A** ۷۰/۹ ± ۱۶	**A** ۷۲/۲ ± ۸/۷	**E** ۰	**e** ۰
۶۵	تخمک> ۵ mm	AB ۵۲/۲± ۳۰/۶	AB ۶۷/۶± ۱۶/۱	AB ۶۸ ± ۱۱/۱	A ۱۷/۹ ± ۵/۴	A ۶/۴ ± ۱/۸
	تخمک> ۵ mm	b ۳۸/۶ ± ۲۶/۴	B ۶۲/۰۵± ۱۶/۹	B ۵۶/۹ ± ۱۸/۳	A ۱۹/۳ ± ۴/۸	a ۲/۶ ± ۰/۸
۷۵	تخمک> ۵ mm	A ۵۸/۶± ۳۲/۹	A ۸۲/۴± ۸/۳	A ۷۳/۹ ± ۸/۹	D ۰	C ۰
	تخمک> ۵ mm	a ۳۴/۳ ± ۲۴	A ۷۲/۹ ± ۱۴/۱	A ۶۸/۱ ± ۱۷/۳	D ۳/۹ ± ۲/۱	d ۱/۵ ± ۰/۸
۸۵	تخمک> ۵ mm	BC ۴۷/۵± ۳۶/۴	B ۷۴/۳ ± ۱۴/۵	B ۶۴/۰۴± ۱۶/۲	C ۳/۸ ± ۲/۱	C ۱/۵ ± ۰/۸
	تخمک> ۵ mm	c ۳۳/۵ ± ۲۸/۳	B ۶۲ ± ۲۱/۶	B ۵۸/۱ ± ۲۱/۱	C ۹/۳ ± ۲/۷	c ۱/۱ ± ۰/۶

*با استفاده از آزمون دانکن در هر گروه تخمکی (بالای ۵ میلی‌متر و زیر ۵ میلی‌متر)، میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک باشند فاقد تفاوت معنی دار در شاخص های مورد ارزیابی هستند ($p > 0.05$). ** میانگین ± انحراف معیار . *** میانگین ± خطای معیار. حروف بزرگ مربوط به گروه تخمکی بالای ۵ میلی‌متر و حروف کوچک مربوط به پروه تخمکی زیر ۵ میلی‌متر است.

درصد القاء تتراپلوییدی در دماهای مذکور به ترتیب معادل ۰ تا ۷۵٪، ۰ تا ۳۴٪ و ۰ تا ۳۷٪ است. در حالی‌که در گروه‌های شاهد ، تتراپلوییدی وجود دارد. با توجه به شکل مشخص شد که میزان درصد تتراپلوییدی روندی منظم همراه با افزایش زمان آغاز شوک داشته و بسته به دما، زمان و دوره‌ی شوک متفاوت بود. در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد اختلاف معنی داری در بین تیمارهای مختلف هر دو گروه تخمکی مشاهده می شود ($p<0.05$). در این دما بالاترین درصد تتراپلوییدی در گروه قطر تخمک بالای ۵ میلی‌متر به ترتیب مربوط به تیمارهای($^{\circ}$C ۲۸، ۶۵ ساعت ـ درجه و ۱۰ دقیقه)(۶۷٪)،($^{\circ}$C ۲۸، ۶۵ ساعت ـ درجه و ۵ دقیقه (۶۰٪) و $^{\circ}$C ۲۸، ۵۵ ساعت ـ درجه و ۱

دقیقه (۵۱٪) بود. کمترین میزان درصد تتراپلوییدی در شوک دمایی($28^{\circ}C$، ۵۵ ساعت ـ درجه و ۵ دقیقه)معادل(٪ ۱۷/۱)به دست آمد. درگروه تخمکی زیر ۵ میلی‌متر بیشترین درصد تتراپلوییدی مربوط به تیمار $28^{\circ}C$، ۶۵ ساعت ـ درجه و ۵ دقیقه (۷۵٪) بود و کمترین میزان آن به ترتیب در تیمارهای $28^{\circ}C$، ۴۵ ساعت ـ درجه و ۱ دقیقه(٪ ۱۸/۷) و $28^{\circ}C$، ۸۵ ساعت ـ درجه و ۱۰ دقیقه(٪ ۱۷/۷) برآورد شد. در هر دو گروه بهترین درصدهای تتراپلوییدی در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و زمان ۶۵ ساعت ـ درجه پس از فعالیت تخمک بدست آمد.

در گروه قطرتخمک بالای ۵ میلی‌متر در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد هیچ یک از تیمارها منجر به القاءی تتراپلوییدی نشد، در گروه قطر تخمک زیر ۵ میلی‌متر تنها تیمارهای بالای ۵ دقیقه، ۴۵ ،۶۵ و ۸۵ ساعت ـ درجه منجر به القاء تتراپلوییدی گردید که از نظر آماری تنها تیمار $30^{\circ}C$، ۸۵ ساعت ـ درجه پس از لقاح به مدت ۱۰دقیقه دارای کمترین میزان درصد تتراپلوییدی (۳۱٪) در این دما بود. اختلاف معنی داری در بین تیمارهای این گروه حرارتی مشاهده نگردید ($p>0.05$).

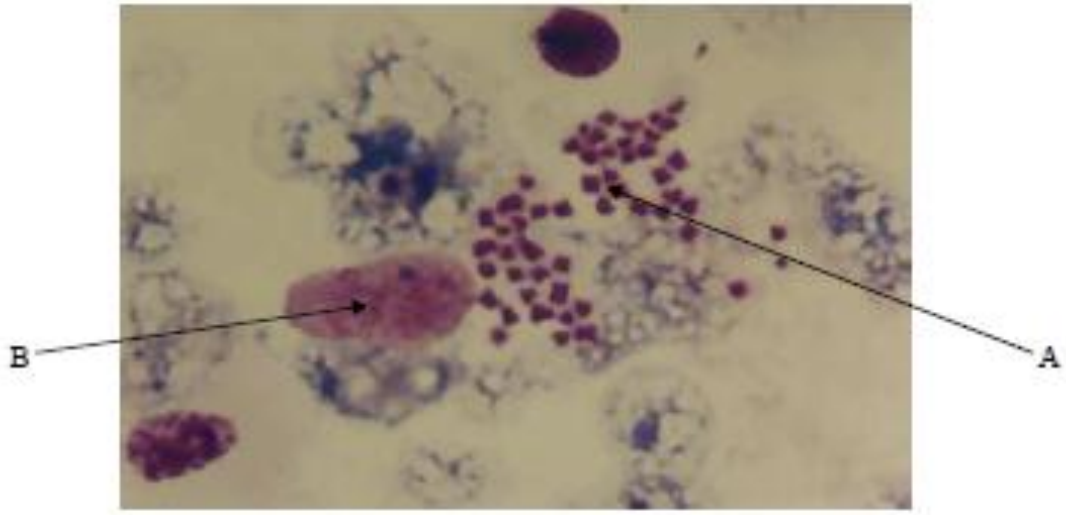
در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد تنها دو تیمار ($32^{\circ}C$، ۴۵ ساعت ـ درجه و ۱ دقیقه) و($32^{\circ}C$، ۶۵ ساعت ـ درجه و ۱ دقیقه) منجر به القاء تتراپلوییدی شدند. در بین تیمارهای تتراپلویید(دو گروه تخمکی)فقط در یک تیمار اختلاف معنی دار وجود داشت ($p<0.05$). بالاترین درصد تتراپلوییدی در هر دو گروه تخمکی مربوط به تیمار ۳۲ درجه سانتی‌گراد، ۶۵ ساعت ـ درجه پس از لقاح و دوره‌ی ۱ دقیقه معادل(٪ ۳۳/۷)برای گروه بالای ۵ میلی-متر و (٪ ۳۷/۵) برای گروه زیر ۵ میلی‌متر بود. در سایر گروه‌ها به دلیل تلفات کامل در برخی تیمارها و همچنین عدم القاء تتراپلوییدی در تیمارهای دیگر درصد تتراپلوییدی برابر صفر بود.

به طورکلی بیشترین درصد تتراپلوییدی مربوط به دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در هر دو گروه است. بالاترین درصد تتراپلویید (٪۷۵/۲) مربوط به تیمار ۲۸ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و در فاصله زمانی ۶۵ ساعت ـ درجه پس از لقاح درگروه زیر ۵ میلی‌متر وبعد از این تیمار ، شوک حرارتی ۲۸ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه و در فاصله زمانی ۶۵ ساعت ـ درجه پس از لقاح (٪۶۷/۱) مربوط به گروه بالای ۵ و در نهایت شوک حرارتی ۲۸ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و در فاصله زمانی ۶۵ ساعت ـ درجه پس از لقاح (٪۶۷/۲) در گروه بالای ۵ بود.

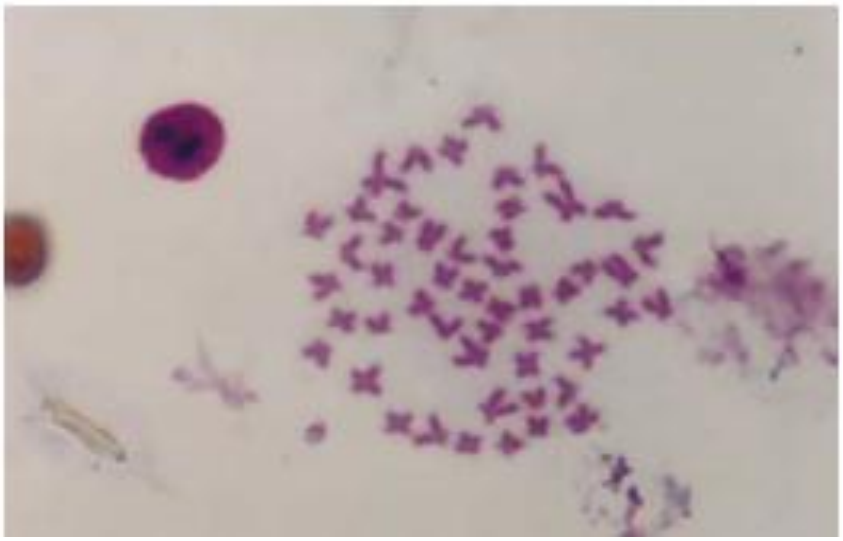
کمترین میزان درصد تتراپلوییدی (۱۷٪) در ۲۸ درجه سانتی‌گراد، زمان ۵۵ ساعت ـ درجه و دوره ۵ دقیقه در گروه بالای ۵ میلی‌متر و در گروه زیر ۵ به ترتیب در تیمار ۲۸ درجه سانتی‌گراد، زمان ۴۵ ساعت ـ درجه و دوره ۱دقیقه معادل ۱۸/۷٪ و تیمار ۲۸ درجه سانتی‌گراد، زمان ۸۵ ساعت ـ درجه و دوره ۱۰ دقیقه (٪۱۷/۶) اندازه-گیری شد.

۲-۳- مشاهده کروموزوم ها

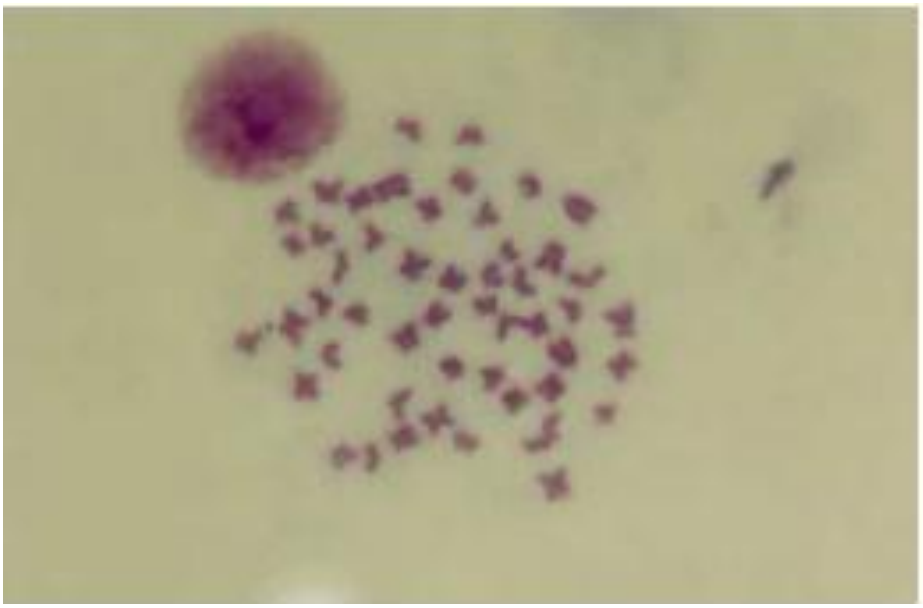
پس از انجام مراحل آزمایشگاهی مشاهده کروموزوم ها با روش سیتوژنتیکی مشخص گردید . سلولهای بافت کلیه و آبشش ماهیان قزل آلای رنگین کمان از تیمارهای مختلف نشان دادکه نمونه ها دارای سلولهای دیپلوئید یا (2n) کروموزوومی هستند و در بین نمونه ها ماهیان تتراپلوئید مشخص نگردید. در شکل های زیر گسترش کروموزومی تهیه شده از بافتهای آبشش و کلیه ماهیان قزل آلای رنگین کمان به کمک رنگ آمیزی گیمسا آورده شده است. همچنین متافاز پلیت های با کمک میکروسکوپ نوری (Tokyo, Japan) Olympus با عدسی بزرگنمایی ۱۰۰۰ و به کمک روغن ایمرسیون مورد بررسی و سپس عکسبرداری شدند.



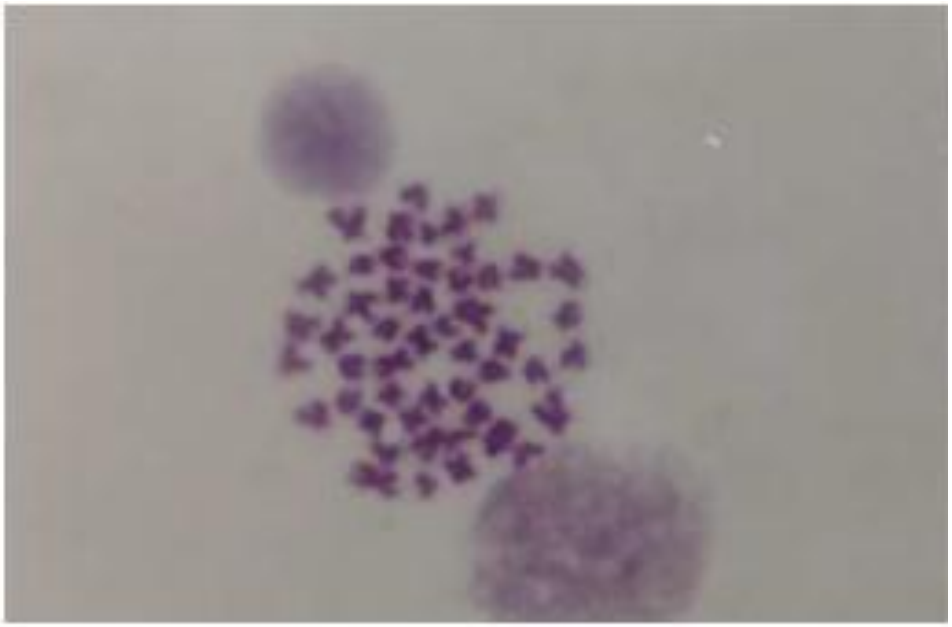
شکل (۹): کروموزوم ها (A) و سلول های متورم (B) با رنگ آمیزی گیمسا



شکل(۱۰):گسترش کروموزومی از قزل آلای رنگین کمان با رنگ آمیزی گیمسا

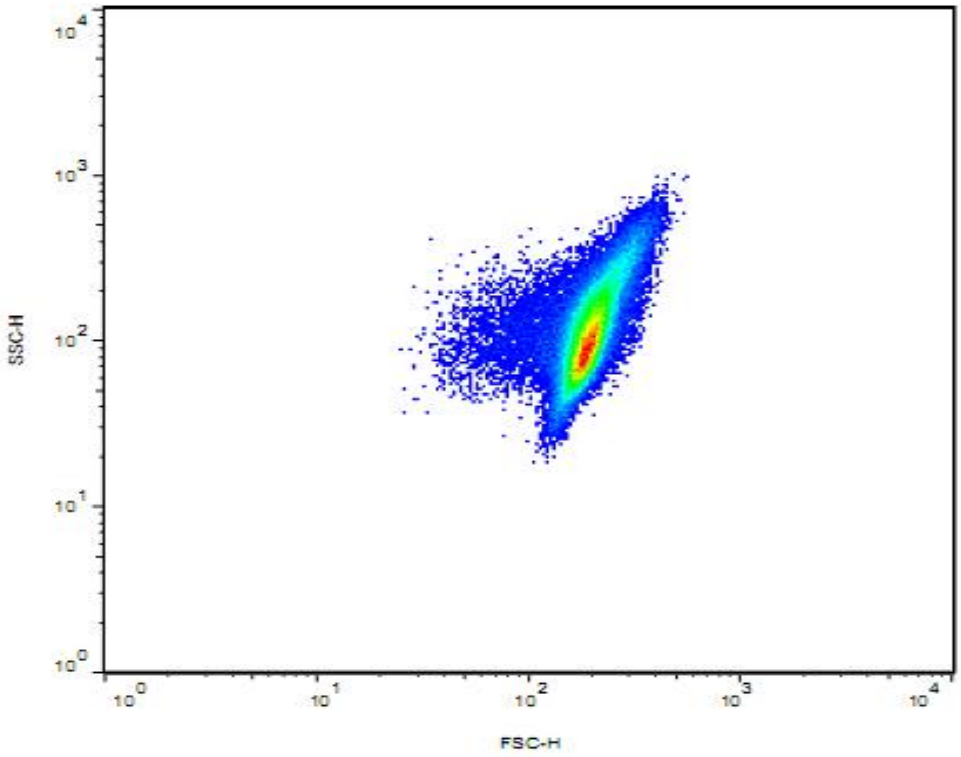


شکل (۱۱):گسترش کروموزومی از قزل آلای رنگین کمان با رنگ آمیزی گیمسا



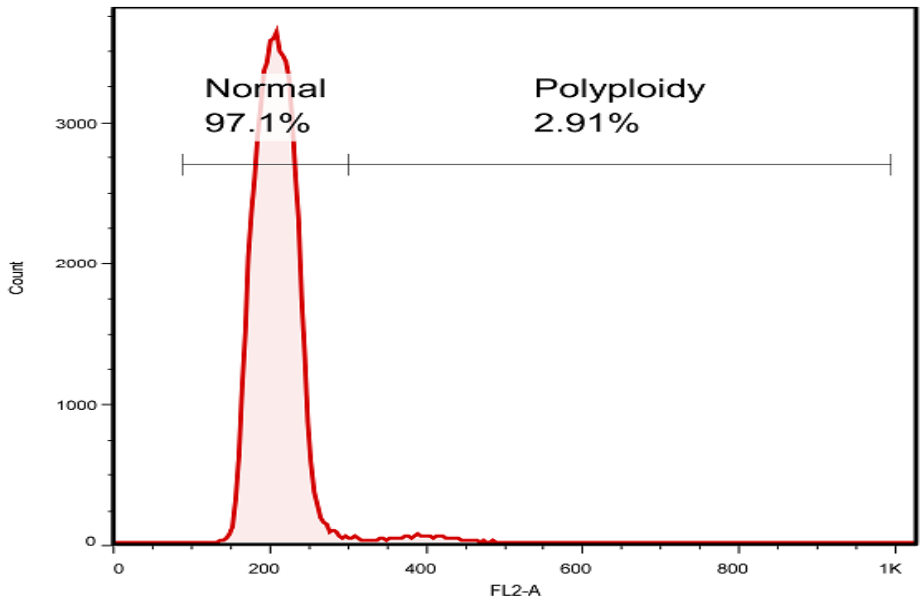
شکل (۱۲):گسترش کروموزومی از قزل آلای رنگین کمان با رنگ آمیزی گیمسا

۳-۳- نتایج فلوسیتومتری

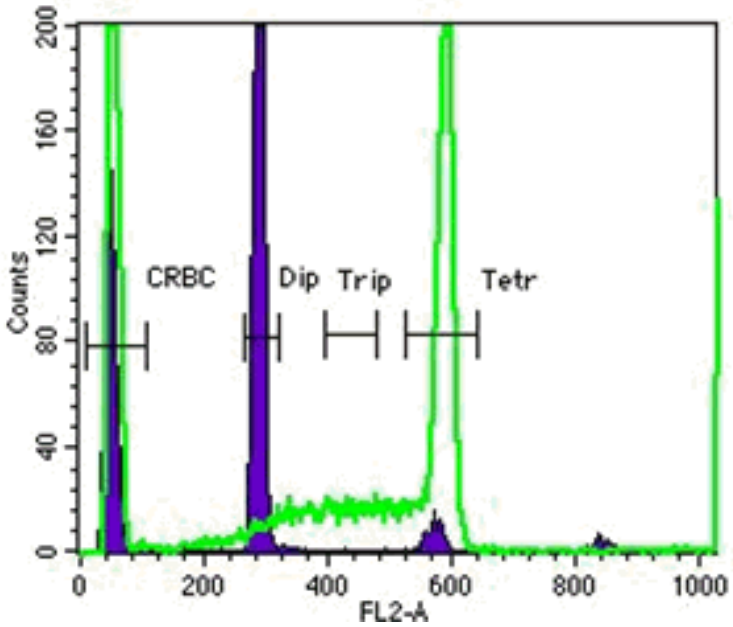


شکل(۱۳): دیاگرام سنجش پلوئیدی بر اساس حجم هسته گلبول قرمز با استفاده از روش فلوسیتومتری

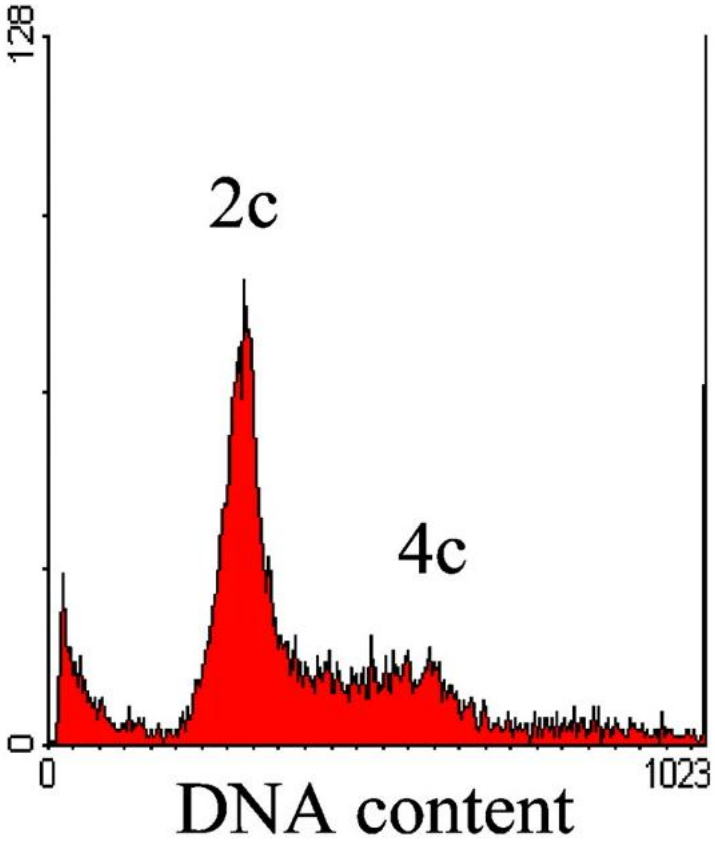
کلیه این عکس ها و گراف ها نیاز به توضیح مفصل دارند... علاوه بر شماره گذاری آنها نسبت به توضیح و شرح هر عکس و گراف و تفسیر آن اقدام شود... ارائه به این صورت به هیچ وجه قابل قبول نیست....



شکل(۱۴): دیاگرام سنجش پلوئیدی بر اساس حجم ژنوم با استفاده از روش فلوسیتومتری



شکل(۱۵): دیاگرام سنجش پلوئیدی بر اساس حجم ژنوم و مقایسه با نمونه های مختلف دیپلوئید، تری پلوئید و ترا پلوئید با استفاده از روش فلوسیتومتری



شکل (۱۶): دیاگرام سنجش پلوئیدی بر اساس حجم DNA قزل آلا با استفاده از روش فلوسیتومتری

۴- بحث و نتیجه‌گیری

۴-۱- میزان بازماندگی گروه‌های مختلف تیمار تا مرحله چشم زدگی

در تحقیق حاضر، کاهش بازماندگی لاروها در انواع تیمارهای تحت شوک در مقایسه با گروه‌های شاهد دیده شد. این حالت در سایر تحقیقات در مورد قزل‌آلای‌رنگین‌کمان نیز گزارش شده است. محققین دلایلی را برای میزان کاهش بقاء در تتراپلوییدها اظهار می‌دارند که می‌توان به پدیده‌ی موزاییک شدن،آنیوپلوییدی[۱]، افزایش نامتناسب سطح سلول نسبت به حجم آن و وقوع اشتباهات سلولی اشاره کرد. در تحقیق حاضر به دلیل وجود اختلاف معنی دار در میزان بازماندگی تا مرحله چشم زدگی بین دو گروه شاهد و تیمارهای آزمایشی می‌توان علت پایین بودن بقاء تا این مرحله در بین تیمارها، اعمال تغییرات فیزیکی (جابه‌جایی) دانست ($p<0.05$). علت میزان کاهش بازماندگی در اثر القاء شوک این است که شوک‌های مکانیکی یا فیزیکی در ماهی قزل‌آلای-رنگین‌کمان می‌تواند به وسیله انعقاد زرده به تخم‌ها آسیب برساند. به طور مثال در ۴ ساعت اولیه پس از لقاح حساسیت تخم‌ها دو برابر ساعت اول پس از لقاح است ، از این‌رو دستکاری تخم‌ها تا ۶ ساعت پس از لقاح ممکن است بقاء لاروی را تحت تأثیر قرار دهد.

در شوک دهی با دماهای ۲۸ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد میزان بازماندگی تابع دوره و زمان آغاز شوک بود، به طوری که با افزایش دوره از میزان بازماندگی در هردو دما کاسته شده است. میزان بقاء در مرحله چشم زدگی در دو دمای فوق الذکر تا حد زیادی با زمان آغاز شوک ارتباط داشت. علت این امر می‌تواند حساسیت بالای تخم‌ها در مراحل اولیه جنینی باشد. در نمودارهای مربوط به بازماندگی تا مرحله چشم زدگی در دو دمای ۲۸ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد مشخص شد. مقادیر بیشینه‌ی بقاء اول، مربوط به شوک زودهنگام در اولین تقسیم جنینی ومقادیر بیشینه‌ی بقاء دوم، مربوط شوک دیرهنگام است. در آزادماهیان تیمارهای زمانی منطبق با کاریوکینز[۲] دارای بقاء بالاتری هستند. در مقادیر بیشینه حساسیت تخم‌ها کم و لذا بازماندگی تا مرحله چشم زدگی در آن‌ها بالاتر از دیگر تیمارها است. در زمان‌های ۵۵ و ۶۵ ساعت ـ درجه پس از لقاح به دلیل حساسیت زیاد تخم‌ها میزان بقاء خیلی پایین است. شاروت در سال ۱۹۸۲ زمان‌های ۶/۵ تا ۷ ساعت و ۸ تا ۸/۵ ساعت پس از لقاح در دمای آب ۹/۴ درجه سانتی‌گراد را برای بقاء تخم‌ها تا مرحله چشم زدگی دارای کمترین میزان حساسیت و بالاترین میزان بقاء گزارش کرد. همچنین وی زمان ۵/۵ تا ۶ ساعت پس ازلقاح را زمان حساسیت بالای تخم‌ها و پایین بودن میزان بقاء تعریف نمود. در مای ۳۲ درجه سانتی‌گراد میزان بازماندگی بیشتر تحت تأثیر شدت شوک (دمای شوک و مدت زمان شوک دهی) قرار دارد به طوری که در دوره‌های بالا میزان تلفات زیاد و یا حتی صد درصد است. به طور کلی شوک دهی در دماهای بالا منجر به افزایش میزان تلفات در تخمک های شوک داده می گردد علت این است که دماهای بالا برای القاء تتراپلوییدی سبب بوجود آمدن پدیده موزاییک و در نتیجه

---

[۱] اضافه شدن یک کروموزوم به مجموعه کروموزوم های یک موجود

[۲] تقسیم سیتوپلاسم

بالا رفتن میزان مرگ و میر در میان تتراپلوییدها است. همچنین ممکن است به دلیل کاهش تعداد سلول‌ها، حجم سلول افزایش و متعاقب آن نسبت سطح به حجم سلول کاهش می‌یابد و باعث به هم خوردن تعادل نسبت سطح به حجم سلول گردد. این عدم تعادل می‌تواند علاوه بر محدود کردن متابولیسم سلولی از آن نیز جلوگیری نماید و باعث بالا رفتن میزان مرگ و میر ناشی از افزایش دما شود. استفاده از شوک‌هایی با شدت بالا می‌تواند نرخ پایین بقاء را توجیه کند. گزارش‌هایی از نرخ پایین بقاء تتراپلوییدهای قزل‌آلای‌رنگین‌کمان توسط تورگارد (۱۹۸۱) و (۱۹۸۲) و در ماهی تیلاپیا توسط میرس (۱۹۸۵) وجود دارد. لازم به ذکر است که در این ماهیان نیز توسط شوک حرارتی القاءتتراپلوییدی صورت گرفته است.

از طرف دیگر مشخص شده است که علت مرگ و میر بالا خصوصاً در مراحل قبل از چشم زدگی تولید انبوه بچه ماهیان آنیوپلویید در اثر شوک است . به طور کلی شوک‌های غیر بهینه تأثیرات زیادی بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده دارند. احتمالاً تخریب رشته‌های دوک که نتیجه آن جدایی جزیی کروموزوم‌ها است، سبب بوجود آمدن حالت آنیوپلوییدی در ارگانیسم‌ها و درنتیجه بالا رفتن میزان مرگ ومیر در بین تیمارهای مختلف حرارتی خواهد شد. اخیراً موارد دیگری از جمله بیان برخی پروتئین‌های خاص مرتبط با استرس و یا خروج اسپرم از تخمک در اثر اعمال شوک و در نتیجه تولید جنین‌های ناقص نیز در این خصوص مورد توجه قرار گرفته‌اند (Phillips et al ., 1986).

در این تحقیق در مجموع میزان بقاء در گروه تخمک های بالاتر از ۵ میلی‌متر بیشتر از گروه تخمک‌های زیر ۵ میلی‌متر بود که این امر می‌تواند به علت ذخیره زرده بیشتر و مقاومت بالاتر به استرس‌های محیطی و فیزیکی باشد. میزان بقاء در لاروهای حاصل از تخم‌های بزرگتر، نسبت به لاروهای حاصل از تخم‌های کوچکتر بیشتر است. علت آن است که ذخیره انرژی زیادتر می‌تواند حساسیت به استرس را در تخم‌های بزرگتر کاهش دهد. در نتیجه گروه‌هایی از ماهیان نورس بزرگ که از تخم‌های بزرگ بوجود آمده‌اند احتمالاً بهتر قابلیت تحمل استرس‌ها را نسبت به ماهیان نورس کوچکتر دارا هستند.

به طور کلی در بین تیمارهایی که منجر به القاء تتراپلوییدی شده‌اند بالاترین میزان بازماندگی تا مرحله‌ی چشم زدگی در تخم‌های بالای ۵ میلی‌متر ۸۵ درصد و در تخم‌های زیر ۵ میلی‌متر ۷۵ درصد که این میزان در مورد گروه بالای ۵ میلی‌متر با اندک اختلافی با نتایج برخی محققین نظیر شاروت ۱۹۸۴(۸۲٪)، شاروت و فویسیل ۱۹۹۲ (۸۸٪) و دایتر و همکاران ۱۹۹۲ (۸۵٪) مطابقت دارد ولی در تخم‌های زیر ۵ میلی‌متر به دلیل حساسیت بیشتر نسبت به شوک حرارتی و همچنین کیفیت پایین تخم این میزان به طور معنی داری از تخم‌های بالای ۵ میلی‌متر کمتر بود ($p<0.05$).

۲-۴- میزان بازماندگی گروه‌های مختلف تیمار از مرحله چشم زدگی تا مرحله تفریخ

بازماندگی تیمارهای مختلف از مرحله‌ی چشم زدگی تا تفریخ متفاوت و تغییر پذیر بود، اما به طور کلی از میزان بقاء گروه شاهد پایین تر است. تفاوت در کیفیت تخم مورد استفاده در آزمایشات گوناگون می‌تواند نتایج حاصل از عدم هماهنگی میزان بقاء را توجیه نماید. به نظر می‌رسد که افزیش تلفات تنها تا مرحله چشم زدگی با افزایش دما، زمان و دوره شوک دهی رابطه تقریباً مستقیمی دارد و در مابقی مراحل این تاثیر قابل اغماض است. بالاترین میزان بازماندگی از مرحله چشم زدگی تا تفریخ در بین گروه‌هایی که منجر به القاء تتراپلوییدی شده‌اند در گروه بالای ۵ میلی‌متر ۸۵٪ و درگروه زیر ۵ میلی‌متر ۸۰٪ بود. سایر محققین مقادیر مختلف بقاء را تا مرحله تفریخ گزارش کرده‌اند به عنوان مثال مقادیر ۶۸٪، ۶۶٪ و ۳۵٪ به ترتیب توسط شاروووت ۱۹۸۴، شاروووت و همکاران ۱۹۸۶ و بلانک و همکاران ۱۹۸۷ گزارش شده است . دلایل مختلفی برای این تفاوت‌ها وجود دارد که از آن جمله می‌توان به کیفیت تخم، نژاد یا سویه ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان و همچنین روابط یا روش‌های محاسبه میزان بقاء تا مرحله‌ی تفریخ اشاره کرد.

۳-۴- میزان بازماندگی گروه‌های مختلف تیمار از مرحله تفریخ تا شنای فعال

الگوی نرخ بقاء تا مرحله شنای فعال همانند مراحل قبل است. در مرحله‌ی شنای فعال میزان بازماندگی در گروه بالای ۵ میلی‌متر از آهنگ منظمی پیروی می‌نماید اما در گروه زیر ۵ میلی‌متر میزان بازماندگی دارای تغییراتی است. اگرچه بخشی از تغییراتی که معمولاً در میزان بازماندگی جنین‌ها وجودارد می‌تواند بستگی به شدت شوک داشته باشد. به طور کلی با افزایش مدت زمان شوک دهی میزان بازماندگی کاهش می یابد. حساسیت بالای تخم ها نسبت به شوک حرارتی خصوصاً هنگامی که مدت زمان طولانی درمعرض شوک قرار بگیرند، یکی از علت های کاهش میزان بازماندگی آنها است. با توجه به اندازه تخمک نسبتاً بزرگ در آزادماهیان، عموماً شوک حرارتی ۱۰ دقیقه برای القای موفقیت‌آمیز پلوییدی مناسب است، دوره‌های کمتر و یا بیشتر از آن عمدتاً به دلیل نسبت پایین‌تر القاءی پلوییدی و یا افرایش تلفات چندان مناسب نیستند .

در سال ۱۹۸۱ تورگارد[1] و همکاران شرایط بهینه برای القاء تتراپلوییدی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان را مدت زمان ۵ ساعت پس از لقاح و به مدت ۱ دقیقه در دمای ۳۶ درجه سانتی‌گراد به دست آوردند. میزان درصد تتراپلوییدی به دست آمده تقریباً معادل ۲۵٪ بود. شاروووت در سال ۱۹۸۲ شوک حرارتی ۲۸ درجه سانتی‌گراد را در مدت زمان ۸/۵ ساعت پس از لقاح را به مدت ۱۴ دقیقه مؤثر میداند. در این مطالعه کاربرد شوک قبل از ۵ ساعت و نیم از شروع فعالیت جنینی تخم‌ها هیچ جنین تتراپلوییدی را بوجود نمی‌آورد. همچنین بالاترین میزان بازده تتراپلوییدی ۱۰٪ به دست آمد. درسال ۱۹۸۴ پوردام و همکاران با استفاده از شوک حرارتی ۲۸ درجه سانتی‌گراد و در فاصله زمانی ۷/۵ ساعت پس از لقاح و دوره ۱۰ دقیقه بهترین میزان تتراپلوییدی را به دست آورد. در سال

[1] Thorgaard

۱۳۸۲ کلباسی و همکاران مناسب‌ترین تیمار را جهت القاء تتراپلوییدی در ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان ۲۸ درجه سانتی‌گراد در زمان ۷۴ ساعت ـ درجه پس از لقاح و در مدت زمان شوک دهی ۱۲ دقیقه پیشنهاد نموده‌اند که در این تیمار بازده تتراپلوییدی ۸/۴ درصد بوده است.

بالاترین بازده تتراپلوییدی در این تحقیق برای گروه زیر ۵ میلی‌متر تقریباً معادل ۷ درصد و برای گروه بالای ۵ میلی‌متر تقریباً معادل ۱۲ درصد بود که با نتایج بعضی محققین نظیر، شاروت (۱۹۸۲)، میرس (۱۹۸۶)، کوئیلت (۱۹۸۸) همخوانی دارد. با این وجود، بروز برخی تفاوت‌ها در درصد و بازده تتراپلوییدی همواره محتمل است چرا که برخی تفاوت‌ها در نوع شوک و یا کیفیت گامت‌ها وجود دارد. همچنین اختلاف بین مولدین می‌تواند بازده تتراپلوییدی را به طور مشخص تغییر دهد. از این‌رو زمان بهینه شوک حرارتی در بین ماده‌های مختلف ممکن است با هم تفاوت داشته باشد. بهینه سازی برای هر مولد ماده بسیار دشوار و در عمل دارای محدودیت-های بسیاری است.

یافته‌های اخیر که بر اساس مطالعات بافت شناسی است به روشنی مشخص کرده‌اند که شوک حرارتی اغلب وقتی که کمی قبل از پرومتافاز میتوزی استفاده شود مؤثرتر از زمانی هستند که در جریان متافاز استفاده گردند. پوردام و همکاران (۱۹۸۴) اظهار میدارند که اختلافاتی که در زمینه انتخاب تیمار بهینه گزارش می‌شود ممکن است به کیفیت تخم‌ها، میزان رسیدگی مولدین و یا حساسیت آن‌ها در مناطق مختلف و ساختار ژنتیکی مولدین مربوط باشد. همچنین اظهار میدارند که حساسیت تخم‌های لقاح یافته پس از اعمال شوک دهی نسبت به دستکاری‌ها و عوامل محیطی بیشتر است، بررسی حاضر نشان داد که اعمال شوک حرارتی برای حذف اولین تسهیم جنینی و در نتیجه القاء تتراپلوییدی مناسب است. چراکه این شوک توانایی اعمال بر تعداد زیادی تخم را دارد و با توجه به بقاء نسبتاً پایین تتراپلوییدی باعث می‌شود که بتوان برای تولید گله تتراپلوییدی و تولید مولدین از آن براحتی استفاده نمود.

به طور کلی در تخم‌های بالای ۵ میلی‌متر میزان بازده تتراپلوییدی بیشتر از گروه زیر ۵ میلی‌متر بود در حالی‌که میزان درصد تتراپلوییدی گروه زیر ۵ میلی‌متر از گروه بالای ۵ میلی‌متر بیشتر بود. به نظر می‌رسد که تخم‌های کوچکتر به دلیل فضای کوچکتر زرده بیشتر تحت تأثیر شوک قرار بگیرند چرا که فاصله‌ی هسته تخم با دیواره سلول کمتر است لذا شوک حرارتی بیشترین تأثیر را بر روی این نوع تخم‌ها می‌گذارد.

۵- نتیجه‌گیری

گرچه امروز استفاده اقتصادی از شوک‌های گرمایی به دلیل تکنیک ساده و ارزان آن برای القاءی پلی پلوییدی بسیار معمول شده است، ولی آزمایشات نشان داده است که شوک حرارتی در مقایسه با شوک فشار افزایش ناهنجاری و بدشکلی و کاهش درصد بقاء را به همراه دارد، ولی نسبت به شوک شیمیایی دارای مضرات کمتری است. کلید به دست آوردن تتراپلوییدهای قابل زیست و با قابلیت تولیدمثل در به دست آوردن شرایط بهینه برای القاء تتراپلوییدی است. زمان‌های آغاز شوک به دو مرحله‌ی حساس و غیر حساس قابل تقسیم است.

به طور کلی قابلیت بازماندگی تیمارهای مختلف در این تحقیق در مقایسه با گروه شاهد کمتر بود. به نظر می‌رسد که ماهیان تتراپلوییدبه دلیل بروز تغییرات خاص فیزیولوژیکی از بازماندگی کمتری برخوردار باشند. همچنین گروه زیر ۵ میلی‌متر به دلیل مقاومت کمتر نسبت به گروه بالای ۵ میلی‌متر در مواجهه با شرایط استرس‌زا دارای تلفات بیشتری هستند. به طور کلی در هر دو گروه با افزایش دما، دوره و زمان آغاز شوک میزان بازماندگی تیمارها کاهش یافت.

در یک جمع بندی کلی می‌توان بیان نمود که جهت القاءی تتراپلوییدی در ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان در دمای آب انکوباسیون(۱۱ °C) دمای مناسب جهت القاءی شوک حرارتی، ۲۸ °C و زمان مناسب آغاز شوک دهی در هر دو گروه، ۶۵ ساعت ـ درجه پس از لقاح است. این زمان آغاز تقریباً معادل با شروع تقسیمات جنینی در این دما است. در مورد دوره‌ی شوک بسته به اندازه تخمک (بالای ۵ میلی‌متر و زیر ۵ میلی‌متر) به ترتیب ۱۰ و ۵دقیقه جهت القاء مناسب هستند.

پیشنهادها

- تعیین شوک بهینه حرارتی برای نژادهای مختلف موجود در کشور و مقایسه آن‌ها با یکدیگر
- بررسی برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک بر بازده تتراپلوییدی نظیر اندازه تخمک‌ها و درجه رسیدگی آن‌ها.
- تعیین شوک بهینه حرارتی جهت القاء تتراپلوییدی در بین گونه‌های تجاری مختلف موجود در کشور نظیر ماهی آزاد دریای خزر و کپور معمولی.
- مقایسه کارایی شوک حرارتی با شوک فشار.

منابع

۱-درافشان، س. ۱۳۸۵. دستکاری های کروموزومی ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* و قزل آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* و مقایسه رشد در نسل F_1، رساله دکتری شیلات، دانشکده منابع طبیعی علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۴۰ صفحه.

۲-درافشان، س.و کلباسی،م. ر.و سلطان کریمی، س. رحیمی، خ، ۱۳۸۸. مطالعه برخی شاخص های خون شناسی ماهیان دیپلوییید و تریپلوییید قزل آلای‌رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* ، *فصلنامه پزشکی یاخته*، سال یازدهم، شماره ۴، ص ص ۴۴۷-۴۴۲.

۳-کلباسی،م. ر،۱۳۷۲. القا تریپلوییدی در ماهی قزل آلای رنگین کمان، پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۰ صفحه.

۴-کلباسی،م. ر.و باقری، م. پورکاظمی، م.و عبدالحی، ح. ۱۳۸۲، بررسی ایجاد ماهیان تتراپلوییید قزل آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* به وسیله شوک گرمایی"، *مجله علمی شیلات ایران*، سال دوازدهم، شماره۴، ص ص ۱۴۳-۱۵۲.

5-Abdel-Rahman, A., Kennetheb, E., Jilla, D., Tows, L., 1999, Induction of Triploidy and Tetraploidy in Nile Tilapia,*Oreochromis niloticus*, *Journal of the World Aquaculture Society*,Vol. 30, pp.28-34.

6-Aldridge, F. J., Marston, R.Q., Shireman, J.V., 1990, Induced triploids and tetraploids in bighead carp, *Hypophthalmichthys nobilis*, verified by multi-embryo cytofluorometric analysis", *Aquaculture*, Vol. 87 (2), pp. 121-131.

7-Arai, K., Matsubara, K., Suzuki, R., 1991, Karyotype and erythrocyte size of spontaneous tetraploidy and triploidy in the loach *Misgurnus anguillicoudatus*", *Nippon Suisan Gakkaishi*, Vol. 57(12), pp. 2167-2172.

8-Arai, K., 2001, Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan, *Aquaculture*, Vol. 197, pp. 205–228.

9-Babiak, I., Dobosz, S., Goryczko, K., Kuzminski, H., Woznicki, P., 1998, Androgenesis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, using gamma irradiation and heat shock, *Aquaculture* , Vol. 98, pp.7-10.

10-Beaumont, A.R., and Hoar, K., 2003, *Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture* . Blackwel Science LTD, pp.157.

11-Beck,M.L., Biggers, C.J., 1983, Erythrocyte measurmente of diploid and triploid *Ctenopharyngodon idella* & *Hypophtalmichtihys nobilis* hybrids, *Journal of Fish Biology*, Vol. 22, pp. 497-502.

12-Benfey, T.J., 1999, The physiology and behavior of triploid fishes, *Reviews in Fisheries Science*, Vol. 7, pp. 39–67.

13-Benfey, T.J., Sutterlin, A.M., 1984, Growth and gonadal development in triploidlandlocked Atlantic salmon *Salmo salar*, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*,Vol. 41, pp. 1387–1392.

14-Blanc, J.M., Chourrout, D., Krieg, F., 1987, Evaluation of juvenile rainbow trout surviva and growth in half-sib families from diploid and tetraploid sires, *Aquaculture*, Vol. 65, pp. 215–220.

15-Blanc, J.M., Poisson, H., Escaffre, A.M., Aguirre, P., Vallée, F., 1993, Inheritance of fertilizing ability in male tetraploid rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, *Aquaculture*, Vol. 110, pp. 61–70.

16-Blanc, J. M. 2002, Effects of egg size differences on juvenile weight between and within lots in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, *Journal of the World Aquaculture Society*, Vol. 33(3), pp. 278–286.

17-Calta, M.,2001, The effect of egg size on yolk utilization and growth of rainbow trout alevins *Oncorhynchus mykiss*, *Acta Biologica Hungarica*, Vol. 52 (1), pp. 117-123.

18-Cassani, J.R., Maloney, D.R., Allaire, H.P., Kerby, J.H., 1990, Problems associated with tetraploid induction and survival in grass carp, *Ctenopharyngodon idella Aquaculture*, Vol. 88, pp.273–284.

19-Chourrout, D., 1982, Tetraploidy induced by heat shocks in rainbow trout *Salmo gairdneri* R, *Reproduction Nutririon Development*, Vol. 22, pp. 569–574.

20-Chourrout, D., 1984, Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout, production of all-triploids, all-tetraploids and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics, *Aquaculture*, Vol. 36, pp. 111–126.

21-Chourrout, D., Chevassus, B., Krieg, F., Happe, A., Burger, G., Renard, P.,1986, Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females—potential of tetraploid fish, *Theoritcal and Applied Genetic*, Vol. 72,pp. 193–206.
22-Chourrout, D., Nakayama, I., 1987, Chromosome studies of progenies of tetraploid female rainbow trout, *Theoretical and Applied Genetic*, Vol. 74, pp. 687– 692.
23-Chourrout, D., 1988, Induction of gynogenesis, triploidy and tetraploidy in fish, ISI Atlas of Science, *Animal and Plant Science*, pp. 65–70.
24-Chourrout, D., Foisil, L., 1992, Chromosome dubling by pressure treatments for tetraploidy and mitotic gynogenesis in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* : re-examination and improvement, *Aquaculture and Fisheries Management*, Vol. 23, pp. 567-575.
25-Diaz, N.F., Iturra, P., Veloso, A., Estay, F., Colihueque, N., 1993, Physiological factors affecting triploid production in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Aquaculture*, Vol. 114, pp. 33–40.
26-Diter, A., Guyomard, R., Chourrout, D., 1988, Gene segregation in induced tetraploid rainbow trout, Genetic evidence of preferential pairing of homologous chromosomes, *Genome*, Vol. 30, pp. 547–553.
27-Diter, D., Quillet, E. and Chourrout, D., 1993, Suppression of first egg mitosis induced by heat shocks in the rainbow trout, *Journal of Fish Biology*, Vol. 42, pp. 777-786.
28-Dunhum, R.A., 2004, Aquqculture Fisheries Biotecnology, *Genetic Approaches*.CABI Publishing, pp. 372.
29-Einum, S.,Fleming, I. A., 1995, Maternal effects of egg size in brown trout *Salmo trutta*; norms of reaction to enviromental quality, *The Royal Society*, Vol. 266, pp. 2095-2100.
30-Einum, S., Hendry, A. P. and Fleming, I. A. 2002, Egg-size evolution in aquatic environments,does oxygen availability constrain size?, *The Royal Society*, Vol. 269, pp. 2325–2330.
31-Fauconneau,B. Kaushik,S.J. and Blanc, J.M., 1989, Uptake and metabolization of dissolved compounds in rainbow trout fry, *Comparative Biochemistry and Physiology*, Vol. 93, pp. 839-843.
32-Felip, A., Zanuy, S., Carrillo, M., Piferrer, F., 2001, Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species, *Genetica*, Vol. 111, pp. 175–195.
33-Fleming, I. A. and Gross, M., 1990, Latitudinal clines: a trade off between egg number and size in pacific salmon, *Ecology*, Vol. 71, pp. 1-11.
34-Flajshans, M., Rab, P., Dobosz. S., 1992, Frequency analyses of active NORs in nuclei of artificially induced triploid fishes, *Theoretical and Applied Genetics*, Vol. 85, pp. 68-72.
35-Gjrdrem,T., 2000, Genetic improvement of cold-water fish species, *Aquacuture Reserch*, Vol. 31, pp. 25-33.
36-Gomelsky, B., 2003, Chromosome set manipulation and sex control in common carp, a review, *Aquatic Living Resource*, Vol. 16, pp. 408–415.
37-Hershbeger, W.K and Hostuttler, M.A, 2005, Variation in time first cleavage in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* embryos A major factor in induction of tetraploids, *Journal of the World Aquaculture Society*, Vol. 36, pp. 96-102.
38-Hoar, W. S., Randall, D.J., 1988, *The Physiology of developing fish, eggs and larvae*, XI, Academic Press INC.
39-Hong, Y., 1990, Tetraploidy induced by heat shock in bighead carp, *Aristichthys nobilis*, *Acta Zoology*, Vol. 36, pp. 70–75.
40-Horstgen-Schwark, G., 1993, Initiation of tetraploid breeding line development in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Aquaculture and Fisheries Management*, Vol. 24, pp. 641-652.
41-Howell, W. M. and Black, D. A., 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1 -step method, *Experienlia*, vol. 36, pp. 10-1 4.
42-Hutchings, J.A.,1991, Fitness consequences of variation in egg size and food abundance in brook trout *Salvelinus fontinalis*, *Evolution*, Vol. 45(5), pp. 1162-1168.
43-Jankun, M., Kuzminski, H., Furgala-Selezniow, G, 2007, Cytologic ploidy determination in fish – an example of two salmonid species, *Enviromental Biotechnology*, Vol. 3, pp. 52-56.
44-Jensen, J.O.T., and Alderdice, D.F., 1983, Changes in mechanical shock sensitivity of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* eggs during incubation, *Aquaculture*, Vol. 32, pp. 303-312.
45-Knight, A. E., 1963, The embryonic development of the rainbow trout, *Transactions of the American Fisheries Society*, Vol. 99, pp. 179-181.
46-Kucharczyk, D., Jankun, M., Luczynski, M., 1997, Ploidy level determination in genetically manipulated bream, *Abramis brama* L., based on the number of active nucleoli per cell, *Journal of Applied Aquaculture*, Vol. 7, pp. 13-21.
47-Mair, G.C., 1993, Chromosome set manipulation in Tilapia — techniques, problems and prospects, *Aquaculture*, Vol. 111, pp. 227–244.
48-Malison, J.A., Kayes, T.B., Held, J.A., Barry, T.P., Amundson, C.H., 1993, Manipulation of ploidy in yellow perch *Perca flavescens* by heat shock, hydrostatic pressure shock and spermatozoa inactivation, *Aquaculture*, Vol. 110, pp. 229–242.

49-McCombie, H., Lapègue, S., Cornette, F., Ledu, C., Boudry, P., 2005, Chromosome loss in bi-parental progenies of tetraploid Pacific oyster *Crassostrea gigas*, *Aquaculture*, Vol. 247, pp. 97–105.
50-Myers, J.M., 1986, Tetraploid induction in Oreochromis spp, *Aquaculture*, Vol. 57, pp. 281– 287.
51-Myers, J.M., Hershberger, W.K., 1991, Early growth and survival of heat-shocked and tetraploid-derived triploid rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, *Aquaculture*, Vol. 96, pp. 97–107.
52Myers, J.M; Powell, S.F and McAndrew, B.J, 1995, Induction of tetraploidy in brown trout *salmo troutta* using hydrostatic pressure, *Aquaculture Research*, Vol. 26, pp. 229-232.
53-Nam, Y.K., Choi, G.C., Kim, D.S., Park, D.J., 2001, Survival and growth of induced tetraploid mud loach, *Aquaculture International*, Vol. 9, pp. 61–71.
54-Nam Y. K., Kim, D. S., 2004, Ploidy status of progeny from the crosses between tetraploid males and diploid females in mud loach *Misgurnus mizolepis*, *Aquaculture*, Vol. 236, pp. 575–582.
55-Onozato, H. 1985, Diplodization of gynogeniticaly activated salmonid eggs using hydrostatic pressure, *Aquaculture*, Vol. 43, pp. 91-98.
56-Palti, y., Li, j.j., Thorgaard. G.H., 1997, Improved efficiency of heat and pressure shocks for producing gynogenetic rainbow trout, *The Progressive Fish-Culturist*, Vol. 59, pp. 1-13.
57-Pandian, T.J.and Koteeswaran, R., 1998, Ploidy induction and sex control in fish, *Hydrobiologia*, Vol. 384, pp. 167–243.
58-Phillips, R.B., Zajicek, K.D., Ihssen, P.E., Johnson, O., 1986, Application of silver staining to the identification of triploid fish cells, *Aquaculture*, Vol. 54, pp. 313-319.
59-Purdom, C.E., Thompson, D., and Lou, D. Y., 1984, Genetic engineering in rainbow trout, *Salmo gairdnerii*, by the suppression of meiotic and mitotic metaphase, *Fish Biology*,Vol. 25, pp. 345-351.
60- ssus, B. and Devaux, A., 1988, Timing and duration of hatching in gynogenetic, triploid, tetraploid and hybrid progenies in rainbow trout,*Genetic Selection Evolution* , Vol. 17, pp. 1-17.

61-Quillet, E., 1994, Survival, growth and reproductive traits of mitotic gynogenetic rainbow trout females, *Aquaculture*, Vol. 123, pp. 223-236.
62-Refstie, T., 1981, Tetraploid rainbow trout produced by cytochalasin B, *Aquaculture*, Vol. 25, pp. 51–58.
63-Rideout, R. M., Trippell, E. A., and Litvak, M. K., 2005, Effects of egg size, food supply and spawning time on early life history success of haddock *melanogrammus aeglefinus*, *Marine Ecology-Progress Series*, Vol. 285, pp. 169-180.
64-Sakao, S., Fujimoto, T., Tanaka, M., Yamaha, E., Arai, K., 2006, Drastic mortality in tetraploid induction results from the elevation of ploidy in masu salmon *Oncorhynchus masou*, *Aquaculture*, Vol. 252, pp. 147-160.
65-Springate, J.R.C., and Bromage, N.R., 1985, Effects of egg size on early growth and survival in rainbow trout, *Aquaculture*, Vol. 47(2-3), pp. 163-172.
66-Teskeredzic, E., Teskeredzic, Z., Donaldson, E.M., Mclean, E., and I.I. Solar, 1993, Triplodization of coho salmon following application of heat and electric shocks, *Aquaculture*, Vol. 116, pp. 287-294.
67-Thorgaard, G.H., Jazwin, M.E., Steir, A.R., 1981, Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout, *Transactions of the American Fisheries Society*, Vol.110, pp. 546–550.
68-Thorgaard, G.H., 1986, Ploidy manipulation and performance, *Aquaculture*, Vol. 57, pp. 57–64.
69-Thorgaard, G.H., 1992, Application of genetic to rainbow trout, *The Rainbow trout*, Vol. 100, pp. 85-97.
70-Wallace, J. C., Aasjord, D., 1984, An investigation of the consequences of egg size for the culture of Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, *Journal of Fish Biology*, Vol. 24(4), pp. 427–435.
71-Winckler-Sosinski, L., Schwarzbold, A. and Schulz, U.H., 2005, Survival of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* (Salmoniformes - Salmonidae) Eggs in an Altitude Stream in Southern Brazil, *Acta Limnology Brasil*.,Vol. 17(4), pp. 465-472.
72-Wolters, W.R., 1981, Erythrocyte nuclear measurement of diploid and triploid channel catfish, *Journal of Fish Biology*, Vol. 20, pp. 253-258.
73-Woznicki, P., Kuzminski, H., 2002, Chromosome number and erythrocyte nuclei length in triploid brook trout *Salvelinus fontinalis*, *Caryologia*, Vol. 55, pp. 295-298.
74-Yanik, T., Aras S., and Blükbasi, H. C. 2002, Early development and growth of arictc charr *Salvelinus alpines* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* at a low water temperature, *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*, Vol. 54, pp. 73-78.
75-Zhang, S.M., Zhang, X.Z., Zeng, Y., 1993, Induced tetraploidy in grass carp *Ctenopharyngodon idella* Val by heat shock, *Asian Fisheries Science*, Vol. 6, pp. 213–217.
76-Zou, S., Li, S., Cai, W., Zhao, J., Yang, H., 2004, Establishment of fertile tetraploid population of blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*, *Aquaculture*, Vol. 238, pp. 155–164.

پیوست

خواباندن تخم های تحقیقاتی در سالن انکوباسیون

تخم های تحقیقاتی چشم زده

تخم های چشم زده تحقیقاتی

صید ماهیان جهت عملیات زیست سنجی

وسایل زیست سنجی (ترازو دیجیتال – تخته مدرج)

عملیات زیست سنجی و ثبت داده ها

بچه ماهیان تحقیقاتی

Abstract
Induced polyploidy is a suitable tool for producing sterile fish which made commercial benefits in the aquaculture industry. This study carried out in order to produce triploid-interploid population via mating tetraploid female with diploid male rainbow trout. Heat shock was used for making tetraploid population and the best temperature and induction time were examined. Result showed that highest mortality from 1 day after fertilization to emerging were in groups 6 of embryos (40.1%) and the lowest were in groups 3 (33 %). Flowcytometry results showed that some fish were polyploidy. Comparative analyze of genome levels in tetraploid fish to control fish (diploid) and hen as standard indicator, confirmed tetraploid fishes in this study. In conclusion we can state that heat shock induction for 7 minutes at 65 hour –degree after fertilization in 28 ºC is optimum temperature for inducting tetraploid rainbow trout.

Keywords: Sexual development, triploid-interploid, Tetraploid, heat shock, Flow cytometry, rainbow trout

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute – Shahid Motahary Cold water Fishes Genetic and breeding Research Center- Yasoj

---

Project Title : Induction of population triploid-interploid in rainbow trout (oncorhynchus mikiss) using by indirect
Approved Number: 2-12-12-90002
Author: Habiballah Gandomkar
Project Researcher : Habiballah Gandomkar
Collaborator(s) : S.A. Hossaeini, S.H. Moradian, J. Mahdavii, E. Falahat, A.H. Rasteyannasab, M. Mohamadpor, H.A. Abdolhay, S. Rezvani, E. Gorjipor
Advisor(s): -
Supervisor:-
Location of execution : Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad Province
Date of Beginning : 2012
Period of execution : 2 Years & 5 Months
Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute
Date of publishing : 2018

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 - Shahid Motahary Cold water Fishes Genetic and breeding Research Center- Yasoj

Project Title :

Induction of population triploid-interploid in rainbow trout (O*ncorhynchus mikiss*) using by indirect

Project Researcher :

Habiballah Gandomkar

Register NO.
52453