(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129910

کارایی و بهینه‌سازی استفاده از شوک گرمایی در تولید جمعیت ماهی ترا پلوئید ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

- **حبیب‌اله گندمکار***: مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردابی شهید مطهری یاسوج، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج، ایران
- **ابوالحسن راستیان‌نسب**: مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردابی شهید مطهری یاسوج، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج، ایران
- سجاد نظری: مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردابی شهید مطهری یاسوج، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج، ایران
- اسماعیل کاظمی: مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردابی شهید مطهری یاسوج، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج، ایران
- **جواد مهدوی‌جهان‌آباد**: مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردابی شهید مطهری یاسوج، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج، ایران

تاریخ دریافت: آذر ١٣٩٨ تاریخ پذیرش: اسفند ١٣٩٨

چکیده

ایجاد جمعیت ماهی تریپلوئید–اینترپلوئید قزل‌آلای رنگین‌کمان از طریق آمیزش ماهیان تتراپلوئید ماده و دیپلوئید نر روشی مناسب و اقتصادی برای عقیم‌سازی ماهیان می‌باشد. برای ایجاد ماهیان تتراپلوییید از طریق شوک گرمایی، مناسب‌ترین دما و هم‌چنین زمان شوک‌دهی مورد بررسی قرار گرفت. ٦ تیمار با سه تکرار شامل گروه شاهد (تخمک‌های بدون شوک گرمایی) و تخمک با قطر بیش‌تر از ٥ میلی‌متر و نیز تخمک‌های با قطر کم‌تر از ٥ میلی‌متر با مدت زمان شوک‌دهی‌های ١، ٥ و ١٠ دقیقه بعد از زمان لقاح به‌ترتیب در دماهای ٢٨، ٣٠ و ٣٢ درجه سانتی‌گراد بررسی شدند. بررسی میزان تتراپلوئیدی از طریق مقایسه مقدار DNA هسته سلول‌های گلبول‌های قرمز خون ماهیان در تیمارهای مختلف با استفاده از روش فلوسایتومتری انجام گردید. در گروه‌های تخمکی با قطر بالای ٥ میلی‌متر و زیر ٥ میلی‌متر بالاترین میزان تتراپلوئیدی در دمای ٢٨ درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب ١٩/٨ و ١١/٩ درصد ثبت شده و فاقد تفاوت معنی‌داری بودند ($p>0/05$). براساس نتایج، دماهای ٢٨، ٣٠ و ٣٢ درجه سانتی‌گراد، در گروه‌های تخمکی زیر ٥ میلی‌متر منجر به القاء تتراپلوئیدی شده و در تخمک‌های بالای ٥ میلی‌متر تنها دماهای ٢٨ و ٣٢ درجه سانتی‌گراد القاء تتراپلوئیدی را در پی دارد. جهت القاءی تتراپلوئیدی در ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان دمای ٢٨ درجه سانتی‌گراد و زمان مناسب آغاز شوک‌دهی ٦٥ درجه ـ ساعت پس از لقاح به‌مدت ٧ دقیقه است.

کلمات کلیدی: تتراپلوئید، تریپلوئید اینترپلوئید، شوک گرمایی، فلوسیتومتری DNA، قزل‌آلای رنگین‌کمان

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: gandomkar.habib@gmail.com

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129910

مقدمه

پدیده بلوغ جنسی یکی از مهم‌ترین مشکلات پرورش‌دهندگان آبزیان خصوصاً ماهیان سردآبی است که منجر به کاهش رشد، کاهش مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا، کاهش کیفیت لاشه و رنگدانه‌های موجود در بافت‌ها می‌شود(Thorpe، ۲۰۰۴).زیست‌فن‌آوری‌های جدید نظیر دستکاری کروموزومی و القاءی پلوئیدی به‌عنوان یکی از عوامل موثر در زمینه تولید آبزیان پرورشی در اواخر دهه ۱۹۸۰ و اوایل دهه ۱۹۹۰ به‌طور کامل مورد پذیرش و کاربرد قرار گرفت (Gjrdrem، ۲۰۰۰). هم‌اکنون بخشی از تولید تجاری این گونه در سطح جهانی متعلق به تولید ماهیان دستکاری شده کروموزومی که شامل انواع تریپلوئید، تریپلوئید تمام ماده و آمیخته‌های بین گونه‌ای آن با سایر آزادماهیان است (درفشان، ۱۳۸۵). ایجاد تری‌پلوئیدی در ماهیان به دو روش القایی و غیرالقایی امکان‌پذیر می‌باشد. در این روش نخست به‌تولیدمولدین تتراپلوئید پرداخته و سپس با آمیزش ماهیان تتراپلوئید ماده و دیپلوئیدنر افراد تریپلوئید ایجاد می‌نمایند (کلباسی و همکاران، ۱۳۸۲). امکان القای پلوئیدی با استفاده از انواع شوک‌های شیمیایی، الکتریکی و فشار هیدرواستاتیک وجود دارد (Pifferrer و همکاران، ۲۰۰۹). اما استفاده از شوک‌های دمایی خصوصاً شوک گرمایی برای آزادماهیان بنا به‌دلایلی نظیر سهولت کاربرد و قابلیت اعمال بر حجم بالایی از تخم‌ها، مرسوم‌ترین و مطلوب‌ترین روش محسوب می‌شود (کلباسی، ۱۳۷۲). تتراپلوئیدی یک راه ممکن برای دستکاری ژنوم در ماهیان است. تلاش برای تولید ماهیان عقیم به دو طریق هورمونی و ژنتیکی امکان‌پذیر است. نگرانی‌های‌جامعه درمصرف ماهیانی که مورد تیمار هورمون‌های استروئیدی که موجب به تأخیر افتادن یا تغییر دادن تکامل جنسی در تولیدمثل ماهیان می‌شود، استفاده از آن‌ها را محدودکرده است (Foresti، ۲۰۰۰).به‌علاوه تیمارهای‌هورمونی ممکن است اثرات زیان‌آوری بر روی رشد و رفتارهای تولیدمثلی داشته باشد، از این‌رو روش‌های‌ژنتیکی مؤثرتر از روش‌های هورمونی هستند (Lutz، ۲۰۰۱). تتراپلوئیدی برای اولین‌بار به‌صورت آزمایشی در گیاهان، دوزیستان و پستانداران با استفاده از مواد شیمیایی (کلشی‌سین یا سیتوکالاسین B) القاءشد(Rideout و همکاران، ۲۰۰۵).القاء مصنوعی تتراپلوئیدی در گونه‌های مختلف ماهیان به‌وسیله شوک دیر هنگام صورت می‌گیرد. این شوک‌ها پس از جدایی‌دومین گویچه قطبی و قبل از اولین تقسیم و یا در حین اولین تقسیم میتوزی سلول به‌کار برده می‌شوند. تتراپلوییدهای خودبه‌خودی در ماهی لوچ گزارش شده است (Omoto و همکاران، ۲۰۰۵). تتراپلوییدی می‌تواند از هیبریدگیری (به‌طور مثال در کپور) نیز به‌وجود بیاید (Thomas، ۲۰۰۳). از آن‌جا که القای تتراپلوئیدی توسط شوک گرمایی سهل‌الوصول‌تر از دیگر شوک‌های فیزیکی است، لذا معمول‌ترین روش جهت دستکاری کروموزومی در ماهیان محسوب می‌شود (Abdel-Rahman، ۱۹۹۹). جهت شناسایی ماهیان دستکاری شده می‌توان از روش‌های مختلفی استفاده کرد که به‌طورکلی شامل روش‌های مستقیم (نظیر کاریوتایپ) و روش‌های غیرمستقیم نظیرگسترش خونی (درافشان و همکاران، ۱۳۸۸)، آنالیز NORs (Nucleolar organizer regions)، استفاده از مارکرهای‌ژنتیکی و فلوسایتومتری است (جوهری و همکاران، ۱۳۸۲). روش‌های غیرمستقیم معمولاً برای شناسایی و بررسی صحت پلوئیدی استفاده می‌گردد.در این میان روش‌های‌گسترش‌خونی و آنالیز NORs به‌دلیل سادگی و سرعت مناسب، بیش‌ترین کاربرد را دارند. مطالعات بر روی‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مشخص‌نموده‌اند که تریپلوئیدهای حاصل‌از تلاقی‌تتراپلوئیدودیپلوئیدمزایای‌برتری‌نسبت‌به تریپلوئیدهای میوزی و گروه شاهد دارند (Nam و همکاران، ۲۰۰۴). در این تحقیق، ضمن تعیین شوک بهینه حرارتی جهت القاء تتراپلوییدی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، اثر اندازه متفاوت تخمک بر روی القاء و بازده تتراپلوئیدی و برخی شاخص‌های زیستی گله تتراپلوئید با دیپلوئید تا آغاز تغذیه خارجی باهم مقایسه شدند.

مواد و روش‌ها

این پژوهش با هدف تولید جمعیت ماهیان تتراپلوییید در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با استفاده از شوک حرارتی در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی یاسوج در سال ۱۳۹۶ انجام پذیرفت. در این تحقیق ازتخمک ماهیان مولد ماده (تخمک با قطر بیش‌تر از ۵ میلی‌متر و تخمک با قطر کم‌تر از ۵ میلی‌متر) با میانگین سنی ۴-۳ سال و اسپرم مولدین نر ۳-۲ سال به نسبت ۱:۲ برای لقاح استفاده شد. پس از استحصال تخمک و مخلوط کردن تخمک و اسپرم به‌منظور حذف اسپرم اضافی تخم‌ها با آب تمیز شسته شده و به‌منظور سپری کردن زمان مناسب موقتاً در تراف نگه‌داری شدند. برای اعمال شوک‌گرمایی از آکواریوم‌شیشه‌ای،دوعددبخاری آکواریوم با ترموستات حرارتی‌و پمپ‌هوا، سنگ هوا و یک عدد دماسنج الکلی استفاده گردید. پس از لقاح و طی شدن زمان مورد نیاز برای ورود اسپرم و شروع اولین تقسیم تخم (Hershbeger و Hostuttler، ۲۰۰۵) برای هر تیمار ۳۰۰۰ تخم لقاح یافته (براساس میانگین تعداد در گرم و توزین‌نمودن به‌وسیله ترازوی‌دیجیتال بادقت ۰/۱ گرم)رابه‌سبدهای‌داخل‌سینی‌های انکوباسیون منتقل و شوک‌دهی طبق ۶ تیمار ذکر شده در جدول ۱ انجام‌پذیرفت.پس از اتمام‌شوک‌دهی‌تخم‌های‌شوک‌داده‌شده به‌صورت مجزا به سینی‌های انکوباسیون منتقل شده تا ادامه مراحل جنسی را در آن‌جا سپری کنند. دمای آب در طول دوره انکوباسیون ۱±۹ درجه سانتی‌گراد بود. تیمارهای فوق در ۳ تکرار انجام و گروه‌های تخم در

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129910

جدول ۱: ویژگی شوک‌های فیزیکی مورد استفاده جهت القاء تتراپلوییدی در قزل‌آلای رنگین‌کمان

تیمارهای مورد آزمایش	قطر تخمک	درجه حرارت شوک (°C)	دوره شوک (دقیقه)	زمان شوک پس از لقاح (ساعت-درجه)	نوع شوک
۱		۲۸	۱	۴۵-۸۵	گرمایی
۲	تخمک با قطر از بیش‌تر از ۵ میلی‌متر	۳۰	۵	۴۵-۸۵	گرمایی
۳		۳۲	۱۰	۴۵-۸۵	گرمایی
۴	تخمک با قطر کم‌تر از ۵ میلی‌متر	۲۸	۱	۴۵-۸۵	گرمایی

اندازه‌های مورد آزمایش بدون اعمال شوک‌دهی به‌عنوان گروه شاهد درنظر گرفته شد. برای جلوگیری از تابش نور مستقیم به تخم‌های خوابانده شده در سینی و تراف‌ها از صفحات یونولیتی استفاده گردید. تلفات تخم و بچه‌ماهیان تیمارهای مختلف پس از یک شبانه‌روز پس از لقاح تا شروع تغذیه فعال به‌طور روزانه جمع‌آوری، شمارش و ثبت می‌شدند. به‌منظور محاسبه درصد تتراپلویید، با رابطه زیر و از طریق مقایسه مقدار DNA هسته سلول‌های گلبول‌های قرمز خون ماهیان قزل‌آلا از گروه‌های مختلف آزمایشی مطابق روش توصیف شده توسط Fenerich و همکاران (۲۰۰۴) و به‌منظور بهینه‌سازی از روش فلوسایتومتری استفاده گردید.

=تعداد ماهیان تتراپلوئید

درصدالقاء تتراپلوئیدی تعداد ماهیان تتراپلوئید+تعداد ماهیان دیپلوئید

برای نتیجه نهایی آزمایشات و تعیین تیماری که حداکثر بازده تتراپلوئیدی را داشته باشد از رابطه زیر استفاده شد (Benfey، ۱۹۹۹).

= بازده تتراپلوییدی

میزان بازماندگی لاروها تا مرحله شنای عمودی × درصد پلوئیدی ۱۰۰

پس از آن لاروها به‌داخل تراف‌های مستطیل شکل و سپس به استخر پرورشی منتقل شدند.

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های حاصل از این تحقیق براساس میانگین داده‌ها (انحراف معیار±میانگین) با استفاده از نرم‌افزار Excel ۲۰۱۳ مرتب و نمودارهای آن رسم گردید. هم‌چنین جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها و مشخص کردن سطوح معنی‌داری از نرم‌افزارهای آمای SPSS ۲۳ و آنالیز واریانس یک‌طرفه(One – Way ANOVA) و آزمون دانکن با درصد اطمینان ۹۵ استفاده شد.

نتایج

اثرات دما، زمان و دوره شوک‌دهی در القاء تتراپلوئیدی قزل‌آلای رنگین‌کمان: اثر عوامل مختلف شامل دما، زمان شوک‌دهی و قطر بر روی بازماندگی تا مرحله چشم‌زدگی، از مرحله چشم‌زدگی تا مرحله تفریخ، از تفریخ تا مرحله شنای فعال، درصد تتراپلوئیدی و بازده تتراپلوئیدی بررسی شد. نتایج نشان داد که عوامل اصلی شوک حرارتی شامل دمای شوک، زمان آغاز شوک‌دهی و دوره شوک دارای تأثیر معنی‌داری مستقیم در میزان بازماندگی تخم‌های لقاح یافته، درصد القاء تتراپلوئیدی و بازده تتراپلوئیدی هستند($P<0/05$) و اثرات معنی‌دار آن‌ها به‌صورت منفرد و یا به‌صورت تلفیقی از دو عامل و یا هر سه عامل دما، زمان شوک‌دهی و قطر قابل شناسایی است.

اثر دمای شوک بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در بین تیمارهای مختلف: در مقایسه میانگین‌ها مشخص گردید که در هر دو گروه تخمکی (بیش‌تر از ۵ میلی‌متر و کم‌تر از ۵ میلی‌متر) به‌طور کلی با افزایش دما، بازماندگی تخمک‌ها تا مرحله چشم‌زدگی کاهش یافت. در مرحله تفریخ و شنای فعال میزان بازماندگی با افزایش دمای شوک‌دهی تقریباً بدون تغییر باقی ماند. بالاترین درصد تتراپلوئیدی در گروه تخمکی بالای ۵ میلی‌متر در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد (۱۹/۸) و پایین‌ترین آن در گروه تخمکی بالای ۵ میلی‌متر در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد (صفر) به‌دست آمد (جدول ۲).

اثر دوره(زمان) شوک‌دهی بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در بین تیمارهای مختلف: براساس جدول۳ میزان بازماندگی تخم‌ها در مرحله چشم‌زدگی در گروه تخمکی زیر ۵ میلی‌متر کم‌تر از گروه تخمکی بالای ۵ میلی‌متر است. درصد تتراپلوئیدی و بازده تتراپلوئیدی در هر دو گروه تخمک با افزایش دوره شوک‌دهی افزایش می‌یابد. بالاترین درصد تتراپلوئیدی و بازده تتراپلوئیدی در گروه تخمکی بالای ۵ میلی‌متر مربوط به دوره ۱۰ دقیقه است (به‌ترتیب معادل ۱۰/۹٪ و ۴/۱٪) که اختلاف معنی‌داری با دیگر گروه‌ها داشت ($P<0/05$)، در حالی‌که بالاترین درصد و بازده تتراپلوئیدی در گروه تخمکی زیر ۵ میلی‌متر در دوره ۵ دقیقه (به‌ترتیب شامل ۱۱/۶٪ و ۲/۸٪) مشاهده شد (جدول۳).

اثر زمان(درجه-ساعت) آغاز شوک بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در بین تیمارهای مختلف: بیش‌ترین بازده تتراپلوئیدی در گروه تخمکی بالای ۵ میلی‌متر به‌ترتیب مربوط به ۵۰ و ۵۵ درجه- ساعت (۶/۴٪ و ۴/۸٪) و کم‌ترین آن مربوط به ۷۵ درجه- ساعت است. در

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129910

بین این گروه اختلاف معنی‌داری در زمان آغاز شوک متفاوت وجود دارد (P<۰/۰۵). در گروه تخمکی زیر ۵ میلی‌متر نیز بیش‌ترین درصد تتراپلوئیدی به‌ترتیب در زمان‌های ۶۵ و ۴۵ درجه- ساعت (۱۹٪ و ۱۳٪) و کم‌ترین آن در زمان ۵۵ درجه- ساعت پس از لقاح بود (صفر). درحالی‌که بازده تتراپلوئیدی بیش‌ترین مقادیر را به‌ترتیب‌در زمان‌های ۴۵ و ۶۵ درج - ساعت و کم‌ترین مقدار را در زمان ۵۵ درجه- ساعت دارا بود. دراین گروه نیز اختلاف‌معنی‌داری(P<۰/۰۵)در بین‌زمان‌های مختلف پس از لقاح وجود داشت (جدول ۴). براساس نتایج، بیش‌ترین درصدتتراپلوئیدی مربوط به‌دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در هر دو گروه است. بالاترین درصد تتراپلوئید (۷۵/۲٪) مربوط به تیمار ۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه و در فاصله زمانی ۶۵ درجهـ ساعت پس از لقاح درگروه زیر ۵ میلی‌متر وبعد از این تیمار، شوک حرارتی ۲۸ درجه‌سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه و درفاصله زمانی ۶۵ درجه- ساعت پس از لقاح (۶۷/۱٪) مربوط به‌گروه بالای ۵ و در نهایت شوک حرارتی ۲۸درجه‌سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه ودرفاصله‌زمانی ۶۵درجه- ساعت پس از لقاح (۶۷/۲٪) در گروه بالای ۵ بود. کم‌ترین میزان درصد تتراپلوئیدی (۱۷٪) در ۲۸ درجه سانتی‌گراد، زمان ۵۵ درجه- ساعت و دوره ۵ دقیقه در گروه بالای ۵ میلی‌متر و در گروه زیر ۵ به‌ترتیب در تیمار ۲۸ درجه سانتی‌گراد، زمان ۴۵ درجه- ساعت و دوره ۱دقیقه معادل ۱۸/۷٪ و تیمار ۲۸ درجه سانتی‌گراد، زمان ۸۵ درجه- ساعت و دوره ۱۰ دقیقه (۱۷/۶٪) اندازه‌گیری شد.

جدول۲: اثر دمای شوک بر شاخص‌های قطر تخمک قزل‌آلای رنگین‌کمان

دما (درجه سانتی‌گراد)	۲۸		۳۰		۳۲	
شاخص‌های اندازه‌گیری شده**	۵> تخمک میلی‌متر	۵< تخمک میلی‌متر	۵ > تخمک میلی‌متر	۵< تخمک میلی‌متر	۵ > تخمک میلی‌متر	۵> تخمک میلی‌متر
درصد بازماندگی تا چشم‌زدگی	۶۹ ± ۱۷/۶^{A}	۴۶/۵۴ ± ۲۸/۱ ^{a}	۵۶/۴۵ ± ۲۹ ^{B}	۴۷/۴۸ ±۲۱/۵^{a}	۲۵/ ۳ ± ۳۶ ^{C}	۲۸/۵۸ ± ۳۲/۷^{b}
درصد بازماندگی از چشم‌زدگی تا تفریخ	۷۳/۵ ± ۱۸/۵ ^{A}	۶۷/۵۳± ۱۸/۵ ^{ab}	۷۳/۴۵ ±۱۶/۱^{A}	۶۶/۲۷ ±۱۶/۴ ^{b}	۶۹/۸ ± ۱۹/۵^{A}	۷۲/۱۶± ۱۶/۱^{a}
در صد بازماندگی از تفریخ تا شنای فعال	۶۷/۷ ±۱۸/۳^{A}	۶۴/۵ ± ۱۸/۵ ^{ab}	۶۷/۰۱ ±۱۶/۱^{A}	۶۰/۳۶ ± ۱۸/۶ ^{b}	۷۲/۴۸±۱۶/۶^{A}	۶۸/۲ ± ۱۶/۲^{a}
درصد تتراپلوئیدی***	۱۹/۸ ± ۳/۷^{A}	۱۱/۹ ± ۳/۱^{a}	۰	۱۱/۱۶ ± ۲/۴^{a}	۲/۲۵ ± ۱/۳^{B}	۴/۲± ۱/۶^{b}
بازده تتراپلوئیدی***	۷/۵ ± ۱/۵^{A}	۲/۱± ۰/۶۲^{a}	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 (قطر بالای ۵ میلی‌متر و قطر زیر ۵ میلی‌متر)، میانگین‌هایی که در هر ردیف دارای حداقل یک حرف مشترک باشند فاقد تفاوت معنی‌دار در شاخص‌های مورد ارزیابی هستند (P>۰/۰۵). ** انحراف معیار±میانگین. *** حروف بزرگ مربوط به گروه‌تخمکی بالای ۵ میلی‌متر وحروف کوچک‌مربوط به گروه‌تخمکی زیر ۵ میلی‌متر است.

جدول۳: اثر دوره شوک بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده صرف نظر از زمان، دمای شوک و قطر تخمک قزل‌آلای رنگین‌کمان

دوره (دقیقه)	۱		۵		۱۰	
شاخص‌های اندازه‌گیری شده**	۵> تخمک میلی‌متر	۵< تخمک میلی‌متر	۵ > تخمک میلی‌متر	۵< تخمک میلی‌متر	۵ > تخمک میلی‌متر	۵> تخمک میلی‌متر
درصد بازماندگی تا چشم‌زدگی	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}
درصد بازماندگی از چشم‌زدگی تا 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}
در صد 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}	(۶۴/۲ ± ۱۶/۸^{B}	۴۸/۳ ± ۲۵/۳^{c}
درصد تتراپلوئیدی***	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 تتراپلوئیدی***	۳/۲ ± ۱/۲^{B}	۱/۵ ± 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 (قطر بالای ۵ میلی‌متر و قطر زیر ۵ میلی‌متر)، میانگین‌هایی که در هر ردیف دارای حداقل یک حرف مشترک باشند فاقد تفاوت معنی‌دار در شاخص‌های مورد ارزیابی هستند(p>۰/۰۵).** انحراف معیار±میانگین. *** حروف بزرگ مربوط به‌گروه تخمکی‌قطر بالای ۵ میلی‌متر وحروف کوچک‌مربوط به‌گروه‌تخمکی‌قطر زیر ۵ میلی‌متر است.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129910

جدول(۴): اثر زمان آغاز شوک بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده صرف نظر از دما، دوره‌ی شوک و قطر تخمک قزل‌آلای‌رنگین‌کمان

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

*با استفاده از آزمون دانکن در هر گروه تخمکی (قطر بالای ۵ میلی‌متر و قطر زیر ۵ میلی‌متر)، میانگین‌هایی که در هر ردیف دارای حداقل یک حرف مشترک باشند فاقد تفاوت معنی‌دار در شاخص‌های مورد ارزیابی هستند (p>۰/۰۵). ** انحراف معیار ± میانگین. *** حروف بزرگ مربوط به گروه تخمکی بالای ۵ میلی‌متر و حروف کوچک مربوط به پروه تخمکی زیر ۵ میلی‌متر است.

بحث

القای تتراپلوییدی و تولید ماهیان تریپلوئید یکی از روش‌های موثر برای تولید ماهیان عقیم و روشی اقتصادی برای عقیم‌سازی در مقیاس تجاری است (Nam. و Kim، ۲۰۰۴). گرچه امروز استفاده اقتصادی از شوک‌های گرمایی به‌دلیل تکنیک ساده و ارزان آن برای القاء پلی‌پلوئیدی 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 به‌همراه دارد، ولی نسبت به شوک شیمیایی دارای مضرات کم‌تری است (Beaumont و Hoar، ۲۰۰۳). کلید به‌دست آوردن تتراپلوئیدهای قابل زیست و با قابلیت تولیدمثل در به‌دست آوردن شرایط بهینه برای القاء تتراپلوئیدی و در ادامه، تولید جمعیت‌ماهیان تریپلویید می‌باشد.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 قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز گزارش شده است. محققین دلایلی را برای میزان کاهش بقاء در تتراپلوئیدها اظهار می‌دارند که می‌توان به پدیده موزاییک شدن، آنیوپلوئیدی (اضافه شدن یک کروموزوم به مجموعه کروموزوم‌های یک موجود)، افزایش نامتناسب سطح سلول نسبت به حجم آن و وقوع اشتباهات سلولی اشاره کرد. در تحقیق حاضر به‌دلیل وجود اختلاف معنی‌دار 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<۰/۰۵). علت میزان کاهش بازماندگی در اثر القاء شوک این است که شوک‌های مکانیکی یا فیزیکی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌تواند به‌وسیله انعقاد زرده به تخم‌ها آسیب برساند. به‌طور 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.

درشوک‌دهی‌با دماهای۲۸و۳۰درجه‌سانتی‌گرادمیزان‌بازماندگی تابع دوره و زمان آغاز شوک بود، به‌طوری‌که با افزایش دوره از میزان بازماندگی در هردو دما کاسته شده است. میزان بقاء در مرحله چشم زدگی در دو دمای فوق‌الذکر 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 و۳۰ درجه سانتی‌گراد مشخص شد. مقادیر بیشینه بقاء اول، مربوط به شوک زودهنگام در اولین تقسیم جنینی و مقادیر بیشینه‌بقاء‌دوم، مربوط شوک دیرهنگام است. در آزادماهیان تیمارهای زمانی منطبق با کاریوکینز (تقسیم سیتوپلاسم) دارای بقاء بالاتری هستند. در مقادیر بیشینه حساسیت تخم‌ها کم و لذا بازماندگی تا مرحله چشم‌زدگی در آن‌ها بالاتر از دیگر تیمارها است. در زمان‌های ۵۵ و ۶۵ ساعت ـ درجه پس از لقاح به‌دلیل 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 چشم‌زدگی دارای کم‌ترین میزان حساسیت و بالاترین میزان بقاء گزارش کرد. هم‌چنین وی زمان

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129910

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 شوک‌دهی) قرار دارد به‌طوری‌که در دوره‌های بالا میزان تلفات زیاد و یا حتی صد درصد است. به‌طورکلی شوک‌دهی در دماهای بالا منجر به افزایش میزان تلفات در تخمک‌های شوک داده می‌گردد علت این است که دماهای بالا برای القاء تتراپلوئیدی سبب به‌وجود آمدن پدیده موزاییک و در نتیجه بالا رفتن میزان مرگ و میر در میان تتراپلوئیدها است. هم‌چنین ممکن است به‌دلیل کاهش تعداد سلول‌ها، حجم سلول افزایش و متعاقب آن نسبت سطح به حجم سلول کاهش می‌یابد و باعث به‌هم 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 تتراپلوئیدهای قزل‌آلای رنگین‌کمان ذکر شده که با استفاده از شوک حرارتی القاءتتراپلوئیدی صورت گرفته است (Zhang و همکاران، ۲۰۰۷).

از طرف‌دیگر مشخص شده است‌که علت مرگ و میر بالا خصوصاً در مراحل قبل از چشم‌زدگی تولید انبوه بچه‌ماهیان آنیوپلوئید در اثر شوک است.به‌طورکلی شوک‌های غیربهینه تأثیرات زیادی بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده دارند. احتمالاً تخریب رشته‌های دوک که نتیجه آن جدایی‌جزیی کروموزوم‌ها است،سبب به‌وجودآمدن حالت آنیوپلوئیدی در ارگانیسم‌ها و درنتیجه بالارفتن میزان مرگ و میر در بین تیمارهای مختلف حرارتی می‌گردد (Strunjak و همکاران، ۲۰۰۳). اخیراً موارد دیگری ازجمله بیان برخی پروتئین‌های خاص مرتبط با استرس و یا خروج اسپرم از تخمک در اثر اعمال شوک و درنتیجه تولید جنین‌های ناقص نیز در این‌خصوص مورد توجه قرار گرفته‌اند (Teuscher و همکاران، ۲۰۰۳).

در این تحقیق در مجموع میزان بقاء در گروه تخمک‌های بالاتر از ۵ میلی‌متر بیش‌تر از گروه تخمک‌های زیر ۵ میلی‌متر بود که این امر می‌تواند به‌علت 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 تخم‌های‌بزرگ‌تر کاهش دهد (Tiwary و Kirubagaran، ۲۰۰۴). گروه‌هایی از ماهیان نورس بزرگ که از تخم‌های بزرگ به‌وجود آمده‌اند احتمالاً بهتر قابلیت تحمل استرس‌ها را نسبت به ماهیان نورس کوچک‌تر دارا هستند (Hulata، ۲۰۰۱). به‌طورکلی در بین تیمارهایی که‌منجر به القاء تتراپلوئیدی شده‌اند بالاترین‌میزان بازماندگی‌تا مرحله چشم‌زدگی در تخم‌های بالای ۵ میلی‌متر ۸۵ درصد و در تخم‌های زیر ۵ میلی‌متر ۷۵ درصدکه این میزان در مورد گروه بالای ۵ میلی‌متر با اندک اختلافی با نتایج تحقیقات Weber (۲۰۱۴)به‌میزان ۸۲ درصد، Wagner (۲۰۰۶) به‌میزان ۸۸ درصد و Dunham (۲۰۰۴) به‌میزان ۸۵ درصدمطابقت‌داردولی‌در تخم‌های‌زیر۵میلی‌متربه‌دلیل حساسیت بیش‌تر نسبت به شوک حرارتی (Blanc، ۲۰۰۲) و هم‌چنین کیفیت پایین تخم این میزان به‌طور معنی‌داری از تخم‌های بالای ۵ میلی‌متر کم‌تر بود (P<۰/۰۵).

بالاترین میزان بازماندگی از مرحله چشم‌زدگی تا تفریخ در بین گروه‌هایی‌که منجربه القاء تتراپلوئیدی شده‌اند‌در گروه بالای۵میلی‌متر ۸۵٪ و درگروه زیر ۵ میلی‌متر ۸۰٪ بود. سایر محققین مقادیر مختلف بقاء را تا مرحله‌تفریخ‌گزارش‌کرده‌اند به‌عنوان مثال مقادیر ۶۸٪، ۶۶٪ و ۳۵٪توسط Wagner (۲۰۰۶) و Alonso و همکاران (۲۰۰۰) گزارش شده‌است. دلایل مختلفی برای این تفاوت‌ها وجود دارد که از آن جمله می‌توان به کیفیت تخم، نژاد یا سویه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و هم‌چنین روابط یا روش‌های محاسبه میزان بقاء تا مرحله تفریخ اشاره کرد (Sakao و همکاران، ۲۰۰۶).

بالاترین بازده تتراپلوییدی در این تحقیق برای گروه زیر ۵ میلی‌متر تقریباً معادل ۷ درصد و برای گروه بالای ۵ میلی‌متر تقریباً معادل ۱۲ درصدبودکه با نتایج بعضی محققین نظیر Wagner (۲۰۰۶) و Dunham (۲۰۰۴) 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 (Krisfalusi، ۲۰۰۰). هم‌چنین اختلاف بین مولدین می‌تواند بازده تتراپلوئیدی را به‌طور مشخص تغییر دهد (Nam و همکاران، ۲۰۰۱). از این‌رو زمان بهینه شوک حرارتی در بین ماده‌های مختلف ممکن است با هم تفاوت داشته باشد. بهینه‌سازی برای هر مولد ماده بسیار دشوار و در عمل دارای‌محدودیت‌های‌بسیاری‌است(Hershberger و Hostuttler، ۲۰۰۷) و شرایط تغذیه‌ای در دوره رشد و بلوغ بر عملکرد کیفی و کمی ماهیان تاثیرگذار می‌باشد (حاجیبگلو و صفری، ۱۳۹۶).

یافته‌های اخیر که براساس مطالعات بافت‌شناسی است به‌روشنی مشخص‌کرده‌اند که شوک‌حرارتی اغلب وقتی‌که کمی قبل‌از پرومتافاز میتوزی استفاده شود مؤثرتر از زمانی هستند که در جریان متافاز استفاده گردند (Le Comber و Smith، ۲۰۰۴؛ Aegerter و Jalabert، ۲۰۰۴). این محققین 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 شوک‌دهی نسبت به

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129910

دستکاری‌ها و عوامل محیطی بیش‌تر است (Haffray و همکاران، ۲۰۰۷).

به‌طورکلی قابلیت بازماندگی تیمارهای مختلف در این تحقیق در مقایسه با گروه شاهد کم‌تر بود. به‌نظر می‌رسد که ماهیان تتراپلوئید به‌دلیل بروز تغییرات خاص فیزیولوژیکی ازبازماندگی کم‌تری برخوردار باشند (Benfey و Biron، ۲۰۰۰). هم‌چنین گروه زیر ۵ میلی‌متر به دلیل مقاومت کم‌تر نسبت به گروه بالای ۵ میلی‌متر در مواجهه با شرایط استرس‌زا دارای تلفات بیش‌تری هستند. به‌طورکلی در هر دو گروه با افزایش دما، دوره و زمان آغاز شوک میزان بازماندگی تیمارها کاهش یافت.

در یک جمع‌بندی کلی می‌توان بیان نمود که جهت القاء تتراپلوئیدی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در دمای آب انکوباسیون (۱۱ درجه سانتی‌گراد) دمای مناسب جهت القاء شوک حرارتی، ۲۸ درجه سانتی‌گراد و زمان مناسب آغاز شوک‌دهی در هر دو گروه، ۶۵ درجه - ساعت پس از لقاح است. این زمان آغاز، تقریباً معادل با شروع تقسیمات جنینی در این دما است. در مورد دوره شوک بسته به اندازه تخمک (قطر بالای ۵ میلی‌متر و زیر ۵ میلی‌متر) به‌ترتیب ۱۰ و ۵ دقیقه جهت القاء مناسب هستند.

تشکر و قدر دانی

بدین‌وسیله از پرسنل محترم مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهیدمطهری یاسوج به‌ویژه کارشناسان محترم آن مرکز به‌خاطر همکاری در انجام این پژوهش قدردانی می‌شود.

منابع

۱. **جوهری، س.ع.؛ کلباسی، م.ر.؛ ویلکی، ا.س. و طلا، م.، ۱۳۸۲.** مقایسه خصوصیات و قابلیت لقاح اسپرم در ماهیان نر تغییر جنسیت یافته و مولدان معمولی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علوم دریایی ایران. دوره ۲، شماره ۴، صفحات ۲۷ تا ۳۷.

۲. **حاجیبگلو، ع. و صفری، ر.، ۱۳۹۶.** بررسی نیاز پروتئینی بچه ماهیان تمام ماده تریپلوئید قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) شرکت آکوآلند فرانسه. فصلنامه محیط زیست جانوری. دوره ۹، شماره ۴، صفحات ۱۹۳ تا ۱۹۸.

۳. **درافشان، س.، ۱۳۸۵.** دستکاری‌های کروموزومی ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* و قزل‌آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss* و مقایسه رشد در نسل F_1. رساله دکتری شیلات، دانشکده منابع طبیعی علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس. ۱۴۰ صفحه.

۴. **درافشان، س.؛ کلباسی، م.ر.؛ سلطان‌کریمی، س. و رحیمی، خ.، ۱۳۸۸.** مطالعه برخی شاخص‌های خون‌شناسی ماهیان دیپلوئید و تریپلوئید قزل‌آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss*. فصلنامه پزشکی یاخته. سال ۱۱، شماره ۴، صفحات ۴۴۲ تا ۴۴۷.

۵. **کلباسی،م.ر.، ۱۳۷۲.** القا تریپلوئیدی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس. ۱۳۰ صفحه.

۶. **کلباسی، م.ر.؛ باقری، م.؛ پورکاظمی، م. و عبدالحی، ح.، ۱۳۸۲.** بررسی ایجاد ماهیان تتراپلوئید قزل‌آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss* به‌وسیله شوک گرمایی. مجله علمی شیلات ایران. سال ۱۲، شماره۴، صفحات ۱۴۳ تا ۱۵۲.

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

۸. **Aegerter, S. and Jalabert, B., 2004.** Effects of post-ovulatory oocyte ageing and temperature on egg quality and on the occurrence of triploid fry in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture. Vol. 231, pp: 59-71.

۹. **Alonso, M.; Tabata, Y.A.; Rigolino, M.G. and Tsukamoto, R.Y., 2000.** Effect of Induced Triploidy on Fin Regeneration of Juvenile Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. Experimental Zoology. Vol. 287, pp: 493-502.

۱۰. **Beaumont, A.R. and Hoar, K., 2003**. Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture Blackwel Science LTD. 157 p.

۱۱. **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, No. 3, pp: 278-286.

۱۲. **Benfey, T.J., 1999.** The Physiology and Behavior of Triploid Fishes. Reviews in Fisheries Science. Vol. 7, pp: 39-67.

۱۳. **Benfey, T.J. and Biron, M., 2000.** Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Aquaculture. Vol. 184, pp: 167-176.

۱۴. **Dunham, R.A., 2004.** Aquaculture Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches. CABI Publishing. Vol. 372, pp: 22-53.

۱۵. **Fenerich, P.C.; Foresti, F. and Oliveira, C., 2004.** Nuclear DNA content in 20 species of Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi) from the Neotropical region. Genet. Mol. Biol. Vol. 27, pp: 350-354.

۱۶. **Foresti, F., 2000.** Biotechnology and fish culture. Hydrobiologia. Vol. 420, pp: 45-47.

۱۷. **Gjrdrem, T., 2000.** Genetic improvement of cold-water fish species. Aquacuture Reserch. Vol. 31, pp: 25-33.

۱۸. **Haffray, P.; Aubin, J.; Houis, V.; Labbe, L. and Jalabert, B., 2007.** Comparison of pressure or thermal treatments on triploid yields and malformations up to swim up stage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. Vol. 272, pp: S265.

۱۹. **Hershberger, W.K. and Hostuttler, M.A., 2007**. Protocols for more effective induction of tetraploid rainbow trout. North Am. J. Aquaculture. Vol. 69, pp: 367-372.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129910

۲۰. **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.

۲۱. **Hulata, G., 2001.** Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. Genetica. Vol. 111, pp: 155-173.

۲۲. **Krisfalusi, M.; Wheeler, P.A.; Thorgaard, G.H. and Cloud, JG., 2000.** Gonadal morphology of female diploid gynogenetic and triploid rainbow trout. J. Exp. Zool. Vol. 286, pp: 505-512.

۲۳. **Le Comber, S.C. and Smith, C., 2004.** Polyploidy in fishes: patterns and processes. Biol. J. Lin. Soc. Vol. 82, pp: 431-442.

۲۴. **Lutz, C.G., 2001.** Practical genetics for aquaculture. Fishing News Books. 235 p.

۲۵. **Nam, Y.K. and 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.

۲۶. **Nam, Y.K.; Choi, G.C.; Kim, D.S. and Park, D.J., 2001.** Survival and growth of induced tetraploid mud loach. Aquaculture International. Vol. 9, pp. 61-71.

۲۷. **Omoto, N.; Maebayashi, M.; Adachi, SH.; Arai, K. and Yamauchi, K., 2005.** Sex ratios of triploids and gynogenetic diploids induced in the hybrid sturgeon, the bester (*Huso huso* female × *Acipenser ruthenus* male). Aquaculture. Vol. 245, pp: 39-47.

۲۸. **Piferrer, F.; Beaumont, A.; Falguiere, J.; Flajshans, M.; Haffray, P. and Colombo, L., 2009**. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. Aquaculture. Vol. 29, No. 3-4, pp: 125-156.

۲۹. **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.

۳۰. **Sakao, S.; Fujimoto, T.; Tanaka, M.; Yamaha, E. and 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.

۳۱. **Strunjak, I.; Rakovak, R. and Topic, N., 2003.** Micronucleus occurrence in diploid and triploid rainbow trout. Vet. Med. Czech. Vol. 48, pp: 215-219.

۳۲. **Teuscher, D.M.; Schill, D.J.; Megargle, D.J. and Dillon, J.C., 2003.** Relative survival and growth of triploid and diploid rainbow trout in two Idaho reservoirs. N. Am. Journal. Fish. Managment. Vol. 23, pp: 983-988.

۳۳. **Thomas, P.C.; Rath, S.C. and Mohapatra, D.K., 2003.** Breeding and seed production of Fin fish and Sellfish. Daya puplishing house. 234 p.

۳۴. **Thorpe, J.E., 2004.** Life history responses of fishes to culture. J. Fish Biology. Vol. 65, Suppl. A, pp: 263-285.

۳۵. **Tiwary, B.K.; Kirubagaran, R. and Ray, A.K., 2004.** The biology of triploid Fish. Review. Fish. Biology. Fish. Vol. 14, pp: 391-402.

۳۶. **Wagner, E.J.; Arndt, R.E.; Routledge, M.D.; Latremouille, D. and Mellenthin, R.F., 2006.** Comparison of hatchery performance, agonistic behaviour, and poststocking survival between diploid and triploid rainbow trout of three different Utah strains. N. Am. Journal of Aquaculture. Vol. 68, pp: 63-73.

۳۷. **Weber, G.M.; Hostuttler, M.A.; Cleveland, B.M. and Leeds, T.D., 2014.** Growth performance comparison of intercross-triploid, induced triploid, and diploid rainbow trout. Aquaculture. Vol. 433, pp: 85-93.

۳۸. **Zhang, X.; Asami, T. and Onozato, H., 2007.** Polypolar spindle formation during first cell cycle in rainbow trout Oncorhynchus mykiss embryos after heat-shock treatment. Fisheries Science. Vol. 73, pp: 1325-1331.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129910

Efficiency and optimization of heat shock in production of rainbow trout tetraploid

- **Habib Allah Gandomkar*:** Shahid Motahary Coldwater Fishes Genetic and breeding Research Center-Yasoj, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research Education and Extension (AREEO), Yasoj, Iran
- **Abolhassan Rastiannasab:** Shahid Motahary Coldwater Fishes Genetic and breeding Research Center-Yasoj, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research Education and Extension (AREEO), Yasoj, Iran
- **Sajad Nazari:** Shahid Motahary Coldwater Fishes Genetic and breeding Research Center-Yasoj, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research Education and Extension (AREEO), Yasoj, Iran
- **Esmaeil Kazemi:** Shahid Motahary Coldwater Fishes Genetic and breeding Research Center-Yasoj, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research Education and Extension (AREEO), Yasoj, Iran
- **Javad Mahdavi Jahanabad:** Shahid Motahary Coldwater Fishes Genetic and breeding Research Center-Yasoj, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research Education and Extension (AREEO), Yasoj, Iran

Received: December 2019 Accepted: March 2020

Key words: Tetraploid, Triploid-interploid, Heat Shock, Flow cytometry DNA, Rainbow trout

Abstract

Interploid triploid rainbow trout were produced by mating of female tetraploid and male diploid fish and this method is suitable and economical for sterilization of fish. In order to produce tetraploid fish by heat shock, the most appropriate temperature and shock time were investigated. 6 treatments with three replications including control group (fertilized eggs without heat shock) and fertilized eggs greater than 5 mm in diameter and also those less than 5 mm in diameter with shocks of 1, 5 and 10 minutes after Fertilization was investigated at temperatures 28, 30 and 32 °C, respectively. Determination of tetraploidy was done by comparing the DNA content of red blood cell nuclei in different treatments using flow cytometry. The highest tetraploid levels were observed in temperature of 28 ° C in eggs above 5 mm in diameter and below 5 mm ($p>0.05$) 19.8% and 11.9%, respectively. Based on the results, temperatures of 28, 30 and 32 ° C were induced tetraploidy in the eggs below 5 mm dimeter, and in those above 5 mm, only 28 and 32 °C induced tetraploidy. The favorite temperature for Induction of tetraploidy in trout is 28 ° C and the appropriate time to initiate shock is 65 hour-degree after fertilization for 7 minutes shocking.

* Corresponding Author's email: gandomkar.habib@gmail.com