روشهای القاء پلی پلوئیدی وکاربردآن درآزاد ماهیان

رقیه محمودی*[۱] ، سید حسین مرادیان[۲]، اسماعیل کاظمی[۳]

۱، ۲ و ۳- مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج،مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج ، ایران

roghaye.mahmodi@gmail.com

چکیده

تولید ماهیان پلی پلوئید عقیم به دلیل حذف رسیدگی جنسی و بلوغ در طول پرورش در صنعت آبزی پروری با هدف تولید ماهیان گوشتی یک برتری محسوب می‌شود. پلی پلوئیدی دارا بودن بیش از دو سری کروموزوم در هر سلول است که در طبیعت به ندرت در ماهیان دیده می‌شود ولی در شرایط کنترل شده از طریق انواعی از روش‌های القاء کردن می‌تواند رخ دهد. تولید آزاد ماهیان تریپلوئید حاصل روش‌هایی است که با دخالت و جلوگیری از خروج دومین گویچه قطبی در مرحله متافاز میوز II عمل می‌کنند. به کارگیری مواد شیمیایی (سیتوکارازین ب، کلشی سین ، اکسید نیتروژن)، دمای بالا (دمای ۲۹-۲۶ درجه سانتی گراد)، فشار هیدرواستاتیک (۷۰۰-۶۵۰ کیلوگرم بر سانتیمتر مکعب) و همچنین استفاده از اسپرم‌های متصل به-هم برای لقاح از جمله روش‌های مذکور می‌باشد. تتراپلوئیدی، نوع دیگری از پلی پلوئیدی در ماهیان است که هر سلول دارای چهار سری کروموزوم بوده و همانند ماهیان تریپلوئید با کمک شوک‌های فیزیکی یا شیمیایی تولید می‌شود با این تفاوت که شوک در آنها باید بعد از جدایی دومین گویچه قطبی و قبل از اولین تقسیم سلول تخم رخ دهد. همچنین می توان از تلاقی یک ماهی تتراپلوئید با یک ماهی دیپلوئید جمعیت صد درصد تریپلوئید و عقیم تولید نمود. القاء پلی پلوئیدی در آزاد ماهیان به منظور تولید ماهیان عقیم و افزایش رشد آنها در سنین بلوغ و انجام برنامه بازسازی ذخایر ،معرفی ماهی در منابع آبی به منظور صید ورزشی و همچنین تولید ماهیان ترانس ژنیک در آبزی پروری اهمیت دارد.

واژه‌های کلیدی: پلی پلوئیدی، تریپلوئیدی، تتراپلوئیدی، آزادماهیان.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

مقدمه

واژه "پلوئیدی" یا "سطح پلوئیدی" به تعداد مجموعه‌های کروموزومی یک موجود زنده اشاره دارد. موجودات زنده اعم از جانوران و گیاهان اغلب دارای دو سری از هر کروموزوم در درون هسته خود هستند و لذا دیپلوئید نامیده می‌شوند. سطوح بالاتر از دیپلوئیدی را پلی پلوئیدی گویند. پلی پلوئیدی حالتی است که در آن یک یا چند کروموزوم اضافی، بیشتر از شرایط طبیعی (معمولا دیپلوئید)، در تمام هسته های یک موجود زنده یافت می‌شوند (Nell, 2002). غالبا موجودات زنده پلی پلوئید موجود از نظر جنسی عقیم می باشند. پلی پلوئیدی تقریبا یکی از ویژگی‌های گیاهان و جانوران بوده و این اتفاق در سیر تکامل ماهیان بخصوص در گروههای ابتدایی تر ماهیان به وفور رخ می دهد (Piferrer *et al*., 2009). امکان القاء پلی پلوئیدی در برخی رده مهره داران، از جمله در ماهیان نیز وجود دارد (Otto and Whitton, 2000). منشا پلی پلوئیدی، وقوع تغییراتی در فرایند میتوز و میوز می باشد که با افزایش مجموعه کروموزومی درون یک گونه، سبب اختلال در گامت‌زایی (Cherfas *et al*., 1995) و اختلال در فرایند لقاح (Grunina *et al*., 2006) می‌گردد. القاء پلی پلوئیدی در ماهیان خانواده آزاد ماهیان به دلایلی از جمله علاقه پرورش دهندگان به پرورش آزاد ماهیان، امکان تعیین جنسیت ژنتیکی و لقاح خارجی در این ماهیان، از سابقه طولانی برخوردار می‌باشد. آزمایش‌ها و تحقیقات اولیه برای ایجاد پلی پلوئیدی در آزادماهیان با به‌کارگیری شوک سرمایی (Lemoine and Smith,1980) یا مواد شیمیایی (Smith and Lemoine, 1979) در تخم های تازه بارور شده با موفقیت کمی همراه بوده به طوری که تعداد ماهی های پلی پلوئیدی تولید شده در آنها کم و نتایج متناقضی حاصل شد. در ابتدا تولید آزاد ماهیان پلی پلوئیدی با اهداف پژوهشی از جمله افزایش رشد و کنترل رسیدگی جنسی صورت می‌گرفت. دومین دلیل استفاده از پلی پلوئیدی، تحقیقات جهت درک پیامدهای بیولوژیکی تغییرات کروموزومی (Krisfalusi *et al*.,2000) و اثرات تعداد کروموزوم[1] (Johnson, 2007) در آزاد ماهیان بود. اولین روشی که به طور گسترده در آزادماهیان مورد استفاده قرار گرفت توسط Chourrout (۱۹۸۰)، اجرا گردید. در این روش برای تولید ماهیان تریپلوئید، بلافاصله بعد از لقاح، شوک دمایی بالا بر روی تخم‌های ماهی قزل‌آلای رنگین کمان اعمال شد. در ادامه Onozato (۱۹۸۱)، با استفاده از روش اعمال فشار هیدروستاتیک بر روی تخم های تازه بارور شده، موفق به تولید ماهیان تریپلوئید قزل آلای رنگین کمان شد. ماهیان قزل آلای رنگین کمان تتراپلوئید، اولین بار به صورت آزمایشگاهی با به کارگیری مواد شیمیایی (Refstie, 1981) یا فشار هیدرواستاتیک قبل از اولین تقسیم میتوزی سلول تخم، ایجاد شدند (Chourrout, 1984).

[1] - chromosome dosage effects

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

تولید آزاد ماهیان تریپلوئید، مزایا و محدودیت‌ها

بررسی‌ها نشان داده‌اند که گنادها در ماهیان تریپلوئید تکامل نمی یابند (Benfey *et al*.,1989). لذا تولید آزاد ماهیان عقیم تریپلوئید در آبزی پروری بسیار مورد توجه قرار گرفته‌است. به طور کلی سلول‌های جنسی تخمدان ماده های تریپلوئید وارد مرحله میوزی نمی‌شود و صفات ثانویه جنسی در این ماهیان ظاهر نمی‌شوند. در ماهیان نر تریپلوئید، بیضه‌ها معمولاً رشد کرده اما فاقد مجرای اسپرم بر هستند و در نتیجه مانع رهاسازی گامت‌های بالغ می‌شود. در موارد نادری نیز که خروج اسپرم گزارش شده، این اسپرم بسیار رقیق بوده (Benfey *et al*., 1989) و میزان بالایی از اسپرم های غیر طبیعی[۲] (Benfey *et al*., 1986) و فاقدقابلیت بارورسازی تخمک را ندارند. دو مکانیسم برای تولید ماهیان تریپلوئید در آزاد ماهیان وجود دارد. روش‌هایی که با دخالت و جلوگیری از خروج دومین گویچه قطبی در مرحله متافاز میوز II عمل می‌کنند (از جمله به‌کارگیری مواد شیمیایی، دمای بالا و فشار هیدرواستاتیک) و روش دیگر استفاده از اسپرم های متصل بهم[۳] برای لقاح است (Ueda *et al*.,1986). در عمل، کارایی و پذیرش این روش ها برای تولید ماهیان تریپلوئید در بین پرورش دهندگان آزاد ماهیان متفاوت است. از جمله مواد شیمیایی مورد استفاده می توان به سیتوکالازین ب[۴] (Refstie *et al*.,1977)، کلشی سین (Smith and Lemoine, 1979) و اکسید نیتروژن[۵] (Shelton *et al*., 1986) اشاره نمود که بلافاصله بعد از لقاح به‌کار می‌روند. استفاده از مواد شیمیایی علیرغم تبلیغات گسترده، مورد پذیرش واقع نگردید و در حال حاضر استفاده نمی‌شوند. دلیل این عدم استقبال، توسعه سایر روشهایی است که کارایی بیشتری در ایجاد تریپلوئیدی دارند و نیازی به استفاده از ماده شیمیایی ندارد.

در تحقیقات اولیه جهت ایجاد تریپلوئیدی در آزادماهیان از شوک سرمایی استفاده می گردید، اما بررسی‌ها موفقیت و کارایی بالاتراستفاده از شوک های گرمایی را نشان داد (Thorgaard *et al*., 1981). استفاده از شوک گرمایی (جدول ۱) در مدت کوتاهی بعد از لقاح، منجر به تولید درصد بالایی از تریپلوئیدی می‌شود. با توجه به عدم نیاز به تجهیزات تخصصی این روش با استقبال بالایی در آبزی پروری مواجه شد (Quillet *et al*.,1991). این روش در عمل منجر به تولید صد درصدی ماهیان تریپلوئید نمی‌گردد. زیرا اعمال تیمار دمایی یکنواخت برای تمامی تخم ها مشکل است (Benfey, 2009). بنابراین اگر هدف تولید ماهیان تماماً عقیم باشد، در استفاده از این روشِ القاء تریپلوئیدی محدودیت‌هایی وجود دارد. استفاده از شوک فشار هیدرواستاتیک بر روی تخم های تازه لقاح یافته آزادماهیان، روشی موثر در تولید ماهیان تریپلوئید محسوب می شود (جدول ۱). از آنجایی که شوک فشار هیدرواستاتیک بطور یکنواخت بر تمامی تخم ها اعمال می‌شود، صد درصد تخمهای تولید شده

---

[۲] - sperm aneuploidy

[۳] - Fused sperm

[۴] - Cytochalasin B

[۵] - Nitrous oxide

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

تریپلوئید بوده و در نتیجه به طور وسیعی مورد پذیرش واقع شد (Benfey, 2009). تنها عیب این روش سرمایه‌گذاری اولیه بالایی است که برای دستگاه‌های اختصاصی از جمله محفظه فشار صورت می‌گیرد. از دیگر روش‌های تولید ماهیان تریپلوئید در آزاد ماهیان، روش لقاح دو اسپرمی[۶] است که در ابتدا دو اسپرم به هم متصل شده و سپس جهت لقاح یک تخم استفاده می-شوند (Ueda *et al*.,1986). به دلیل دشواری اتصال اسپرم ها به هم و نیز کارایی پایین در ایجاد ماهیان تریپلوئید، این روش نیز در آزادماهیان و آبزی پروری مورد استقبال قرار نگرفت.

جدول ۱- روش های القاء تریپلوئیدی در آزادماهیان (ماهی آزاد – قزل الای رنگین کمان)

روش های القاء تریپلوئیدی در آزاد ماهیان	
مواد شیمیایی	سیتوکارازین ب[۷] (۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر محلول در دی متیل سولفوکساید ۰/۱) به تخم های لقاح یافته ماهی آزاد اطلس*، ۷۰-۴۵ درجه ساعت بعد از لقاح و ماهی قزل آلای رنگین کمان نیز ۵۰-۳۵ درجه ساعت بعد از لقاح (در دمای ۸°C) اضافه می شود (Refstie *et al*., 1977). ساعت درجه معادل دمای انکوباسیون × ساعت پس از لقاح می باشد.
	کلشی سین (محلول ۰/۰۱ درصد) بلافاصله بعد از اولین تقسیم سلولی میتوزی (۱۰۵ درجه ساعت)، به تخم های لقاح یافته قزل آلای جویباری در دمای ۱۰°C اضافه می گردد. در مورد اکسید نیتروژن، تخم قزل آلای رنگین کمان تازه لقاح یافته به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۹ °C، تحت تیمار افزایش فشار (۱۱ اتمسفر) و گاز اکسید نیتروژن خالص صورت می گیرد (Shelton *et al*., 1986). در تمام موارد، تخم ها بعد از طی دوره تیماردهی، برای گذراندن بقیه مراحل انکوباسیون وارد آب تمیز می شوند.
دما	تخم های ماهی قزل آلای رنگین کمان نگهداری شده در دمای ۱۰°C، تقریباً به مدت ۱۰ دقیقه بعد از لقاح در معرض شوک گرمایی ۳۷ °C-۳۴ قرار می گیرند و سپس به آب تازه با دمای ۱۰ °C منتقل می کنند (Thorgaard *et al*., 1981).
فشار هیدرواستاتیک	تخم ماهی قزل آلای رنگین کمان ۱۰-۵ دقیقه بعد از لقاح، به مدت ۷-۶ دقیقه تحت شوک فشار هیدرو استاتیک ۷۰۰-۶۵۰ کیلوگرم در سانتیمتر مکعب قرار می گیرد. دمای آب ۱۰ ° C بود (Onozato ,1981).

از کاربردهای پرورش آزاد ماهیان تریپلوئید می توان به تمایل پرورش دهندگان برای پرورش ماهیان ماده اشاره نمود. از آنجایی که ماهیان تریپلوئید عمدتاً از نظر جنسی عقیم هستند (Benfey,1999) و تخمدان در ماهیان ماده تریپلوئید توسعه پیدا نمی‌کند، در نتیجه از لحاظ تئوری تصور بر این است که این ماهیان باید تمام انرژی دریافتی را صرف رشد کرده و در نتیجه تولید گوشت و افزایش وزن سریعتر رخ دهد ، ولی با توجه به اینکه وقوع بلوغ جنسی کمی قبل از رسیدن ماهیان به اندازه بازاری (اندازه تجاری) خواهد بود ، افزایش رشد تنها در این دوره حداکثر خواهد بود و در مراحل قبل از مرحله بازاری رشد ماهیان تریپلوئید و دیپلوئید یکسان گزارش شده است(Nell, 2002). هیبریدهای تریپلوئید درون گونه ای[۸] و درون جنسی[۹]

[۶] - Dispermic fertilization

[۷] - Cytochalasin B

[۸] - interspecific

[۹] - intergeneric

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

آزادماهیان، گاهاً صفاتی از جمله بقاء، رشد، مقاومت در برابر شوری، مقاومت در برابر بیماری ها را نشان داده اند که می‌تواند در آبزی پروری مفید باشند (Parsons, *et al*., 1986). در حال حاضر مهم‌ترین کاربرد آزاد ماهیان تریپلوئید با توجه به عقیم بودن آنها و عدم احتمال تولید مثل و یا تولید هیبرید با گونه‌های خویشاوند و تولید جمعیت جدید، برنامه بازسازی ذخایر و رها سازی در آب شیرین است (Johnson *et al*. 2007). این کار به منظور افزایش امکان صید ورزشی آزادماهیان در مناطق بومی و غیر بومی انجام می‌گیرد (Kozfkay *et al*., 2006). برای این هدف لازم است از روشهای تولید ماهیان صددرصد تریپلوئید، مانند القاء به وسیله فشار هیدرواستاتیک و تلاقی‌های درون گونه‌ای و درون جنسی استفاده نمود (US Food & Drug Administration, 2015). کاربرد جدید ماهیان تریپلوئید، تولید ماهیان تراریخته یا ترانس ژنیک می باشد. آزاد ماهی اطلس، مثالی از یک ماهی تراریخته است که ژن هورمون رشد ماهی آزاد چینوک به آن اضافه شد و به شرط اینکه تریپلوئید باشد در بازار ایالت متحده آمریکا قابل خرید و فروش است (Galbreath and Thorgaard, 1995). نگرانی که در مورد این ماهیان تراریخته وجود دارد امکان فرار این ماهیان به محیط زیست بوده که ممکن است با ماهیان وحشی تولید مثل کنند. استفاده از ماهیان تریپلوئید، حتی وقتی به صورت تصادفی به محیط زیست وارد شوند، به طور چشمگیری از وقوع تولیدمثل جلوگیری خواهد کرد.

تولید آزاد ماهیان تتراپلوئید

تمایل به تولید آزاد ماهیان تتراپلوئید، بعد از پی بردن به ارزش ماهیان تریپلوئیدی نمایان شد. با تلاقی یک ماهی تتراپلوئید با یک ماهی دیپلوئید، جمعیت ۱۰۰ درصد تریپلوئید بدست می آید (Chourrout *et al*., 1984). انتظار می رفت مشکلاتی که در القاء تریپلوئیدی با روشهای شیمیایی و یا فیزیکی رخ می داد، با این روش مرتفع گردند. ایجاد آزاد ماهیان تتراپلوئید، اولین بار با استفاده از دو روش شوک شیمیایی (Refstie, 1981) و شوک گرمایی (Thorgaard *et al*., 1981) بر روی جنین های در حال رشد ماهی قزل آلای رنگین کمان، قبل از اولین تقسیم میتوزی صورت گرفت (جدول۲). با سرکوب اولین تقسیم میتوزی، تعداد کروموزوم دو برابر و منجر به ایجاد یک فرد تتراپلوئید شد. بررسی های مختلف نشان می دهند استفاده از شوک فشار هیدرواستاتیک برای ایجاد تتراپلوئیدی در ماهی قزل آلای رنگین کمان (Hershberger and Hostuttler, 2007)، ماهی قزل آلای قهوه ای (Myers *et al*., 1995) و هیبرید های درون گونه‌ای و درون جنسی آزادماهیان (Myers *et al*., 1986) موثر است (جدول ۲). تاکنون تلاش های بسیار زیادی برای تولید ماهیان تتراپلوئیدی انجام شده است و گزارشاتی مبنی بر بازماندگی پایین در مرحله جنینی، رشد غیر طبیعی و یا رشد موزاییکی ارائه شده است (Sakao *et al*. 2006; Weber *et al*. 2015). تنها گونه ای که تولید ماهیان تتراپلوئید آن تا حدودی برای اهداف آبزی پروری موفقیت‌آمیز بوده-است، ماهی قزل آلای رنگین کمان است (Arai, 2001; Weber and Hostuttler , 2012). دلیل این برتری ماهی قزل آلای رنگین کمان واضح نیست اما ممکن است تنها به دلیل دسترسی آسان بیشتر محققان و جامعه تحقیقاتی به این ماهی باشد.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

جدول ۲- روشهای القاء تتراپلوئیدی در آزاد ماهیان

روش های القاء تتراپلوئیدی در آزاد ماهیان	
مواد شیمیایی	سیتوکارازین ب (۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر محلول در دی متیل سولفوکساید ۰/۱) به تخم های لقاح یافته ماهی قزل آلای رنگین کمان* اضافه شود. مدت زمان اضافه نمودن از ۴۰-۳۰ درجه ساعت بعد از لقاح (در دمای ۱۰°C) تا مرحله جنین چهارسلولی می باشد (Refstie *et al*., 1977). ساعت درجه معادل دمای انکوباسیون × ساعت پس از لقاح می باشد. سپس تخم ها بعد از طی دوره تیماردهی، برای گذراندن بقیه مراحل انکوباسیون وارد آب تمیز می شوند.
دما	تخم های ماهی قزل آلای رنگین کمان نگهدار شده در دمای ۱۰°C، تقریباً پنج ساعت بعد از لقاح به مدت یک دقیقه در معرض شوک گرمایی ۳۷-۳۴ °C قرار می گیرند و سپس به آب تازه با دمای ۱۰ °C منتقل می کنند (Thorgaard *et al*., 1981).
فشار هیدرواستاتیک	در فواصل زمانی که ۶۵-۶۲ درصد از تخم های ماهی قزل آلای رنگین کمان وارد مراحل اولین تقسیم سلولی شدند (یعنی نسبتی که تخم ها اولین تقسیم سلولی را گذراندند)، به مدت ۸ دقیقه درون محفظه فشار تحت فشار ۶۳۳ کیلوگرم در سانتیمتر مربع قرار می گیرند (Hershberger and Hostuttler, 2007).

* استفاده از این دستورالعمل در سایر آزادماهیان مستلزم آزمایشات تجربی برای دستیابی به شرایط بهینه است

القای پلی پلوئیدی به عنوان یکی از روشهای بهبود و افزایش تولید در آبزیان دارای سابقه طولانی در آزادماهیان است (Maxime, 2008). ماهیان دیپلوئید و پلی پلوئیدی از جنبه های مختلف بررسی و نتایج بسیار متفاوتی از رشد، بازماندگی، کیفیت لاشه و سیستم ایمنی آنها گزارش شده است. Quillet و همکاران (۱۹۸۸) کاهش نسبی طول دوره انکوباسیون در قزل آلای رنگین کمان تریپلوئید در مقایسه با انواع دیپلوئید را گزارش دادند با این وجود Gray و همکاران (۱۹۹۳) سرعت مراحل تکاملی جنین های ماهی آزاد و قزل آلای رنگین کمان تریپلوئید و دیپلوئید را یکسان گزارش نمودند. مقایسه شاخص-های رشد ماهیان تریپلوئید با ماهیان دیپلوئید در تحقیقات متفاوت با نتایج رشد برابر (Bonnet *et al*., 1999)، رشد کمتر (Malison *et al*.,1993) و یا رشد بیشتر (Kim *et al*.,1988) گزارش گردیده است. Dunham (۲۰۰۴) گزارش داد که آزاد ماهیان تریپلوئید از رشد کمتری در دوران قبل از بلوغ نسبت به ماهیان دیپلوئید برخوردار هستند. در مقابل با فرارسیدن بلوغ جنسی، به لحاظ عدم صرف انرژی جهت توسعه گنادی در ماهیان تریپلوئید، این ماهیان از رشد بهتر و همچنین تلفات کمتری در مقایسه با انواع دیپلوئید برخوردار هستند(Schafhauser-Smith and Benfey, 2001). طبق بررسی ها، سطوح مختلف پلوئیدی بر بازماندگی لاروها در مراحل مختلف تاثیر گذار است. بازماندگی لاروها به دلیل استفاده از شوک های مختلف پایین آمده و باعث افزایش مرگ و میر در طی مراحل اولیه لاروی می‌شود. Salimian و همکاران (۲۰۱۶) با تولید ماهیان تریپلوئید با استفاده از شوک دمایی گزارش دادند که تریپلوئیدی بر سیستم ایمنی ماهی آسیبی وارد نکرده و از نظر ایمنی سبب وجود اختلاف بین ماهی تریپلوئید و ماهی دیپلوئید نمی‌گردد. طبق گزارش سوری نژاد و کلباسی(۱۳۹۰) میزان رشد در ماهیان تریپلوئید به طور معنی داری از ماهیان دیپلوئید بیشتر است. Lefever و همکاران (۲۰۱۵) در مورد کیفیت فیله ماهیان تریپلوئید و مقایسه آن با ماهیان دیپلوئید گزارش دادند که فیله پخته شده قزل آلای تریپلوئید نرم‌تر با مقاومت مکانیکی کمتر و میزان رطوبت بیشتر است. Arai (۲۰۰۱) رشد تتراپلوئیدها را در برخی گونه ها کمتر و در مواردی بیشتر از

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

دیپلوئیدها گزارش دادند. Thorgaard و همکاران (۱۹۸۱) بازده و میزان تولید تتراپلوئیدی در آزاد ماهیان را به عواملی از جمله نوع شوک، شرایط محیطی انجام کار، سن مولد و نژاد آنها نسبت دادند و عنوان کردند میزان تولید تتراپلوئیدی در مناطق مختلف می تواند تفاوت های زیادی با هم داشته باشد. آنچه مسلم است موفقیت القای پلی پلوئیدی در آبزیان تابع شرایط محیطی منطقه و ویژگی‌های والدین است و به دلیل اختلاف حساسیت در تخم‌های بین نژاد و گونه‌های نزدیک، شوک-های مختلفی برای نتایج بهینه مورد استفاده قرار می‌گیرند. از این رو نتایج متفاوتی حتی برای یک گونه ارائه شده است(Thorgaard, 1986). زمان آغاز شوک دهی، دوره شوک دهی و دمای شوک از مهمترین عوامل در موفقیت شوک جهت القای پلوئیدی محسوب می‌گردند (Dunhum,2004). همچنین عوامل دیگری نظیر ویژگی‌های خاص هر گونه (سرعت تکامل جنینی و تقسیمات سلولی) و دمای آب انکوباسیون قبل از اعمال شوک (Pandian and Koteeswaran,1998)، اختلاف دمای آب نگهداری مولدین مورد استفاده برای عملیات تکثیر، دمای شوک (Phiillips *et al.*, 1986) و کیفیت گامت های مورد استفاده خصوصاً اندازه و درجه رسیدگی تخمک‌ها (Diaz *et al.*,1993) در بازده شوک موثر خواهد بود. از این رو موفقیت القاء پلی پلوئیدی در یک گونه تابع شرایط خاصی است.

یافته ترویجی

القاء تریپلوئیدی به منظور تولید ماهیان عقیم و افزایش رشد آنها در سنین بلوغ ماهیان بویژه ماهیان سردابی در آبزی پروری از اهمیت خاصی برخوردار است. امکان القاء پلی پلوئیدی در آبزیان با استفاده از انواع شوک های الکتریکی، شیمیایی و فشار هیدرواستاتیک وجود دارد. استفاده از شوک فشار هیدرواستاتیک کارایی بالایی داشته ولی نیاز به سرمایه اولیه بالایی جهت خرید دستگاه فشار می‌باشد. استفاده از شوک های دمایی بویژه شوک گرمایی برای آزاد ماهیان بویژه قزل آلای رنگین کمان بنا به دلایلی نظیر سهولت کاربرد، عدم نیاز به تجهیزات و مهارت خاص و قابلیت اعمال بر حجم بالایی از تخم‌ها، مرسوم ترین روش محسوب می‌گردد.

منابع

Arai, K., 2001. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. Aquaculture, 197 (1–4): 205–228.

Benfey, T.J., 2009. Producing sterile and single-sex populations of fish for Aquaculture. In: Burnell, G. and Allan, G. (eds). New Technologies in Aquaculture. CRC Press, Cambridge, UK, pp 143–164.

Benfey, T.J., Bosa, P.G. and Richardson, N.L., 1988 . Effectiveness of a commercial- scale pressure shocking device for producing triploid salmonids. Aquacultural Engineering, 7 (3): 147–154.

Benfey, T.J., Dye, H.M. and Solar, I.I., 1989. The growth and reproductive endocrinology of adult triploid Pacific salmonids. Fish Physiology and Biochemistry, 6 (2): 113–120.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

Benfey, T.J., Solar, I.I. and De Jong, G., 1986. Flow-cytometric confirmation of aneuploidy in sperm from triploid rainbow trout. Transactions of the American Fisheries Society, 115 (6): 838–840.

Benfey, T.J., 2001. Use of sterile triploid Atlantic salmon (*Salmo salar L.)* for aquaculture in New Brunswick, Canada. ICES Journal of Marine Science, 58 (2):525–529.

Bonnet, S., Haffray, P., Blanc, J. M., Valee, F., Vauchez, C., Foure, A. and Fauconneau, B., 1999. Genetic variation in growth parameters in diploid and triploid freshwater rainbow trout and seawater brown trout. Aquaculture, 173:359-375.

Cherfas, N. B., Gomelsky, B., Ben-Dom, N. and Hulata, G., 1995. Evidence for the heritable nature of spontaneous diploidization in common carp *Cyprinus carpio* L. eggs . Aquaculture Research, 26: 289–292.

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, 36 (1–2):111–126.

Chourrout, D., Chevassus, B. and Krieg, F., 1984 . Production of second generation triploids and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid female: Potential of tetraploid fish. Theoretical and Applied Genetics, 72 (2):193–206.

Dunham, R. A., 2004. Aquaculture Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches. CABI Publishing, Massachusetts, 372 p.

Galbreath, P.F. and Thorgaard, G.H., 1995. Sexual maturation and fertility of diploid and triploid *Atlantic salmon* X *brown trout* hybrids. Aquaculture, 137 (1–4): 299–311.

Gray, A. K., Evans, M. A. and Thorgaard, G. H., 1993. Viability and development of diploid and triploid salmonid hybrids. Aquaculture, 112:125-142.

Grunina, A. S., Recoubratsky, A.V., Tsvetkova, L. I. and Barmintsev, V.A., 2006. Investigations on dispermic androgenesis in sturgeon fish. The first successful production of androgenetic sturgeons with cryopreserved sperm. International Journal of Refrigeration, 29: 379–386.

Hershberger, W.K. and Hostuttler, M.A., 2007. Protocols for the more effective induction of tetraploid rainbow trout. North American Journal of Aquaculture, 69 (4): 367–372.

Johnson, R.M., Shrimpton, J.M. and Cho, G.K., 2007. Dosage effects on heritability and maternal effects in diploid and triploid Chinook salmon *(Oncorhynchus tshawytscha).* Heredity, 98 (5): 303–310.

Kim, D. S., Kim, I. B. and Baik, Y. G., 1988. Early growth and gonadal development of triploid rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Journal of Aquaculture, 1:41-51.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

Krisfalusi, M., Wheeler, P.A. and Thorgaard, G.H., 2000. Gonadal morphology of female diploid gynogenetic and triploid rainbow trout. Journal of Experimental Zoology, 286:505–512.

Kozfkay, J.R., Dillon, J.C., and Schill, D.J., 2006. Routine use of sterile fish in salmonid sport fisheries. Fisheries, 31 (8): 392–401.

Lefevre, F., Cardinal, M., Bugeon, J., Labbe, L., Medale, F. O. and Quillet, E., 2015. Selection for muscle fat content and triploidy affect flesh quality in pan-size rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture, 448: 569-577.

Lemoine, H.L. and Smith, L.T., 1980. Polyploidy induced in brook trout by cold shock. Transactions of the American Fisheries Society, 109 (6):626–631.

Malison, J. A., Pracarione, L. S., Held, J. A., Kayes, T. B. and Amundson, C. H., 1993. The influence of triploidy and heat and hydrostatistic pressure shocks on the growth and reproductive development of juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). Aquaculture, 116:121-133.

Maxime, V., 2008. The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish. Fish and Fisheries, 9:67–78.

Myers, J.M., Powell, S.F., and McAndrew, B.J., 1995. Induction of tetraploidy in brown trout, *Salmo trutta L*. using hydrostatic pressure. Aquaculture Research, 26 (3): 229–232.

Nell, J. A., 2002. Farming triploid oysters. Aquaculture, 210: 69–88.

Onozato, H., 1981. Gynogenesis in fishes.Fish Genetics and Breeding Science, 6: 11–18.

Otto, S.P. and Whitton, J., 2000. Polyploid incidence and evolution. Annual Reviews in Genetics, 34: 401–437.

Pandian, T. J. and Koteeswaran, R., 1998. Ploidy induction and sex control in fish. Hydrobiologia, 384:167-243.

Parsons, J.E., Busch, R.A. and Thorgaard, G.H., 1986. Increased resistance of triploid rainbow trout x *coho salmon* hybrids to infectious hemopoietic necrosis virus. Aquaculture, 57 (1–4): 337–343.

Phillips, R. B., Zajicek, K. D., Ihssen, P. E. and Johnson, O., 1986. Application of silver staining to the identification of triploid fish cells. Aquaculture, 54: 313-319.

Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J. C., Flajshans, M., Haffray, P. and Colombo, L., 2009. Polyploid fish and shellfish: production, biologyand applications to aquaculture for performance improvement andgenetic containment. Aquaculture, 293: 125–156.

Quillet, E., Foisil, L. and Chevassus, B., 1991. Production of all-triploid and all- female brown trout for aquaculture. Aquatic Living Resources 4 (1): 27–32.

Quillet, E., Chevassus, B. and Devaux, A., 1988. Timing and duration of hatching in gynogenetic, triploid, tetraploid, and hybrid progenies in rainbow trout. Genetique selection evolution, 20(2): 1-11.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

Refstie, T., 1981. Tetraploid rainbow trout produced by cytochalasin B. Aquaculture, 25 (1): 51–58.

Sakao, S., Fujimoto, T. and Kimura, S., 2006. Drastic mortality in tetraploid induction results from the elevation of ploidy in *masu salmon * Oncorhynchus masou*. Aquaculture, 252 (2–4): 147–160.

Salimian, S., Keyvanshokooh, S., Salati, A. P., Pasha-Zanoosi, H. and Babaheydari, S. B., 2015. Effects of triploidy induction on physiological and immunological characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at early developmental stages (fertilized eggs, eyed eggs and fry). Animal reproduction science, 165: 31-37.

Schafhauser-Smith, D. and Benfey, T. J., 2001. The reproductive physiology of three age classes of adult female diploid and triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Fish Physiology and Biochemistry, 25:319-333.

Shelton, C.J., Macdonald, A.G. and Johnstone, R., 1986. Induction of triploidy in rainbow trout using nitrous oxide. Aquaculture, 58 (1–2):155–159.

Smith, L.T. and Lemoine, H.L., 1979. Colchicine-induced polyploidy in brook trout. Progressive Fish Culturist, 41 (2): 86–88.

Thorgaard, G.H., Jazwin, M.E.. and Stier, A.R., 1981. Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout. Transactions of the American Fisheries Society, 110 (4):546–550.

Thorgaard, G. H., 1986. Ploidy manipulation and performance. Aquaculture, 57: 57–64.

Ueda, T., Kobayashi, M. and Sato, R., 1986. Triploid rainbow trout induced by polyethylene glycol. Proceedings of the Japan Academy, 62 (5): 161–164.

US Food & Drug Administration (www.fda. gov/AnimalVeterinary/Development Approval Process/GeneticEngineering/ Gentically Engineered Animals/ucm473237)

Withler, R.E., Beacham, T.D. and Solar, I.I., 1995. Freshwater growth, smolting, and marine survival and growth of diploid and triploid coho salmon (*Oncorhynchus kisutch).* Aquaculture, 136 (1–2): 91–107.

Weber, G.M. and Hostuttler, M.A., 2012. Factors affecting the first cleavage interval and the effects of parental generation on tetraploid production in rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)*. Aquaculture, 344–349: 231–238.

Weber, G.M., Hostuttler, M.A. and Semmens, K.J., 2015. Induction and viability of tetraploids in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences ,72 (10): 1443–1449.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

Polyploidy production methods and its applications in salmonids

Roghayeh Mahmoudi[1] *, Seyed Hossein Moradian[2] , Esmaeil Kazemi[3]

1,2,3- Fishes Genetic and Breeding Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization(AREEO), 75914.358, Yasouj, Iran

*roghaye.mahmodi@gmail.com

Abstract:

In the aquaculture industry the production of sterile polyploid fish is an advantage due to the elimination of sexual maturity during rearing to produce fish meat. Polyploidy having more than two complete sets of chromosomes in each cell which is rarely seen in nature in the fish, but can occur in controlled conditions through induction. The production of triploids in salmonids have emerged with methods such as chemical (Cytochalasin B, Colchicine and nitrous oxide), high temperature (26-29 ^{0}C), and hydro static pressure (650– 700 kg/cm2 of hydrostatic pressure) that interfere with and prevent the release of the second polar body during metaphase II of meiosis and the use of fused sperm for fertilization. By crossing a tetraploid fish with a diploid mate, 100% triploids would result. *Salmonidae* tetraploid containing two additional chromosome sets induce by chemical or hydrostatic pressure treatments of eggs before the first mitotic division of the zygote. In practice, there have been varying degrees of efficiency and acceptance of these methods for producing triploid salmonids for aquaculture. Polyploidy induction is important for the production of sterilized fish, increasing of growth rate in maturity age, introducing fish in water resources for sport fishing and the production of transgenic fish in aquaculture.

Keywords: polyploidy, triploidy, tetraploidy, salmonids.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)