Downloaded from jcpp.iut.ac.ir at 22:10 IRST on Wednesday December 13th 2017

بررسی امکان تولید جمعیت تمام ماده تریپلوئید قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

محمد رضا کلباسی* و سید علی جوهری[۱]

(تاریخ دریافت: ۸۴/۸/۱۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۶/۳/۱۳)

چکیده

به‌منظور کاهش آثار نامطلوب بلوغ جنسی بر رشد و بازماندگی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، در این مطالعه امکان تولید جمعیت تمام ماده تریپلوئید، با استفاده از شوک گرمایی زود هنگام بر تخمک‌های لقاح یافته با اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته، مورد بررسی قرار گرفت. میزان القای تریپلوئیدی به‌وسیله سنجش ابعاد گلبول‌های قرمز تعیین گردید و جهت تایید تشخیص از روش‌های شمارش تعداد هستک‌ها (NORs) در سلول‌های آبشش و تهیه گسترش‌های کروموزومی استفاده شد. هم‌چنین به‌منظور بررسی نسبت‌های جنسی و تکامل گنادها در ماهیان تولید شده مطالعات بافت‌شناسی صورت گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که نتاج حاصل از لقاح اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته با تخمک ماده‌های معمولی ۱۰۰ ٪ ماده بودند. هم‌چنین شوک گرمای ۲۶/۵°C به مدت ۲۰ دقیقه روی تخم‌ها، پس از گذشت ۲۰ دقیقه از لقاح، باعث القای تریپلوئیدی به میزان ۸۰ ٪ گردید. ماهیان تمام ماده تریپلوئید، تمام ماده دیپلوئید و مخلوط نر و ماده دیپلوئید از لحاظ مراحل مختلف انکوباسیون (میزان چشم زدگی، میزان تفریخ تخم‌های چشم زده و میزان بازماندگی از تفریخ تا شروع تغذیه فعال) تفاوت معنی‌داری نشان ندادند (P>۰/۰۵)، ولی میزان چشم زدگی و تفریخ در تیمار مخلوط نر و ماده تریپلوئید نسبت به سایر تیمارها به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود (P>۰/۰۵). در سن ۸ ماهگی تکامل بیضه‌ها در ماهیان نر دیپلوئید و نر تریپلوئید به یک میزان و در مراحل اولیه اسپرماتوژنز بود. هم‌چنین تخمدان در ماده‌های دیپلوئید حاوی اووسیت‌هایی در مرحله پیش زرده‌سازی یا پیش هسته‌سازی بود، درحالی که تخمدان ماده‌های تریپلوئید با وجود داشتن ساختار تیغه‌ای مشخص، فاقد اووسیت بود.

واژه‌های کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، تمام ماده، تریپلوئید، نر تغییر جنسیت یافته، شوک گرمایی

مقدمه

دستکاری کروموزومی گونه‌های مختلف آبزیان امروزه در دنیا به‌عنوان یک روش مفید در بهبود ویژگی‌های ژنتیکی ماهیان، بسیار رایج می‌باشد(۲۱). یکی از مشکلات موجود در صنعت پرورش آبزیان، ظهور زودهنگام بلوغ جنسی است. پدیده بلوغ جنسی در بسیاری از ماهیان از جمله قزل‌آلای رنگین‌کمان باعث کاهش رشد بدن می‌شود زیرا انرژی که باید صرف تولید گوشت گردد، به مصرف توسعه گنادها و بروز صفات ثانویه جنسی و رفتارهای تولید مثلی می‌رسد(۲۴). از سوی دیگر بلوغ جنسی باعث کاهش کیفیت گوشت می‌گردد، زیرا چربی و پروتئین ماهیچه تخلیه شده و جای آن را آب می‌گیرد و نیز رنگدانه‌های ماهیچه‌ها خارج شده

۱. به ترتیب استادیار و دانش آموخته کارشناسی ارشد(در حال حاضر دانشجوی دکتری) شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:Kalbassi_m@modares.ac.ir

Downloaded from jcpp.iut.ac.ir at 22:10 IRST on Wednesday December 13th 2017

و وارد تخمک‌ها می‌شود(۸). هم‌چنین رشد غدد جنسی تغییراتی را در دستگاه گوارش ماهیان به‌وجود آورده که رغبت ماهی به تغذیه و بازده تبدیل غذا در لوله گوارش را کاهش می‌دهد و ماهی لاغر می‌شود(۱۱). با رشد دستگاه تناسلی تغییرات عدیده‌ای در شکل ظاهری ماهی قزل‌آلا پدید می‌آید که شامل سیاه شدن رنگ ماهی، انحنای فکین و افزایش ضخامت پوست می‌باشد. به‌علاوه با رشد غدد جنسی به‌خصوص در جنس نر تغییراتی در بافت پوششی پوست به‌وجود می‌آید که حساسیت پوست را به بیماری‌های عفونی مانند بیماری‌های باکتریایی و قارچی زیاد کرده و در نتیجه باعث مرگ و میر در مولدین نر در این مرحله می‌شود(۲).

برای جلوگیری از وقوع پدیده بلوغ در ماهیان می‌توان آنها را عقیم کرد. القای تریپلوئیدی یکی از روش‌های مؤثر برای تولید ماهیان عقیم و روشی اقتصادی برای عقیم‌سازی در مقیاس تجاری است(۲۰). سرکوب تکامل گنادها در بیشتر ماهیان تریپلوئید باعث می‌شود انرژی متابولیک و منابع غذایی که در حالت عادی برای توسعه خصوصیات جنسی و تولید مثل مصرف می‌شود، صرف رشد سریع‌تر بدن گردد(۲۶). در قزل‌آلای رنگین‌کمان ماده‌های تریپلوئید تقریباً هیچ‌گونه تکامل تخمدانی نشان نمی‌دهند ولی نرهای تریپلوئید از لحاظ مورفولوژیک قابل شناسایی از نرهای دیپلوئید نیستند و بیضه‌هایشان شبیه نرهای دیپلوئید تکامل می‌یابد و بزرگ می‌شود(۳۰). بنابراین نرهای تریپلوئید ظاهراً بالغ می‌شوند و از لحاظ آبزی پروری سودمند نیستند هرچند که از نظر تولید نسل عقیم می‌باشند(۸). در واقع نرهای تریپلوئید، اسپرماتوزوآی آنیوپلوئید تولید می‌کنند که قادر به تولید لارو نمی‌باشد(۲۵). لذا القای تریپلوئیدی زمانی سودمند و مؤثر خواهد بود که بر روی ماهیان ماده اعمال شود و بنابراین هدف اصلی، تولید جمعیت تمام ماده تریپلوئید می‌باشد که در آنها تکامل گنادها به شدت کاهش یافته است(۲۴). در مورد ایجاد جمعیت تمام ماده تریپلوئید دو مرحله اساسی باید طی شود. ابتدا باید ماهیان نری را تولید کرد که فقط اسپرم حاوی کروموزوم‌های X نمایند(Neomale) و در نتیجه آمیزش آنها با ماهیان ماده معمولی، تخم‌های تمام ماده با ژنوتیپ XX به‌دست آورد و در مرحله بعد با استفاده از شوک‌های زود هنگام تریپلوئیدی را روی این تخم‌ها القا نمود(۴). هدف اصلی از انجام این تحقیق بررسی امکان تولید جمعیت تمام ماده تریپلوئید قزل‌آلای رنگین‌کمان در شرایط ایران و به‌منظور جلوگیری از پدیده بلوغ جنسی بود.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در اردیبهشت سال ۱۳۸۳ در کارگاه تکثیر و پرورش آزادماهیان شهید باهنر واقع در رودبارک کلاردشت انجام گردید. تیمارهای مورد بررسی شامل چهار گروه به شرح جدول ۱ بودند که برای اطمینان از نتایج آزمایش، هر تیمار با سه تکرار بررسی گردید.

در این آزمایش از مخلوط تخمک ۸ مولد ماده ۳ و ۴ ساله و از ۸ مولد نر معمولی ۲ و ۳ ساله (جهت استحصال اسپرم حاوی کروموزوم‌های X و Y) و ۸ مولد نر تغییر جنسیت یافته ۳ ساله (جهت استحصال اسپرم حاوی کروموزوم‌های X) استفاده گردید. نرهای تغییر جنسیت یافته از میان ماهیانی که در سال ۱۳۸۰ در کارگاه کلاردشت با استفاده از تیمار هورمونی (۱۷- آلفا متیل تستوسترون) تولید (۳) و در زمان اجرای تحقیق حاضر به مولد قابل استفاده تبدیل شده بودند، انتخاب گردیدند. استحصال تخمک از ماده‌های معمولی و اسپرم از نرهای معمولی، به شیوه متداول در کارگاه‌های تکثیر صورت پذیرفت. به‌منظور از بین بردن اثرات ژنتیکی استفاده از مولدین ماده مختلف در نتایج آزمایش، تخمک‌های استحصالی (۲۰۰۰ گرم) قبل از لقاح به خوبی با هم مخلوط شدند و برای هر تیمار از مخلوط تخمک‌ها استفاده گردید(۱۹). برای استحصال اسپرم ماهیان نر تغییر جنسیت یافته که فاقد مجرای اسپرم بر بودند، ابتدا بافت بیضه از بدن خارج شد و سپس با فشار بیضه روی یک الک، اسپرم مستقیما از این بافت خارج گردید(۱). کلیه لقاح‌ها به روش نیمه خشک انجام گردید(۶). برای به حداکثر رساندن میزان لقاح از مخلوط اسپرم چند مولد نر به‌منظور بارور ساختن

Downloaded from jcpp.iut.ac.ir at 22:10 IRST on Wednesday December 13th 2017

جدول۱. ویژگی تیمارهای مورد استفاده در تحقیق حاضر

تیمار	ویژگی مولدین مورد استفاده			شوک گرمایی[1]	نتیجه مورد انتظار
	نر معمولی	ماده معمولی	نرNeomale		
۱	*	*	_	_	نرو ماده دیپلویید(گروه شاهد)
۲	_	*	*	_	تمام ماده دیپلویید
۳	*	*	_	*	نر و ماده تریپلویید
۴	_	*	*	*	تمام ماده تریپلویید

۱. شوک گرمایی $26^{\circ}C$ به مدت ۲۰ دقیقه و زمان شروع شوک‌دهی ۲۰ دقیقه پس از لقاح

تخمک‌ها استفاده گردید(برای هر تکرار به ازای ۱۵۰ گرم تخمک ۱۰۰ میلی لیتر اسپرم استفاده شد). هم‌چنین برای افزایش خاصیت لقاح اسپرم‌ها از محلول تقویت کننده اسپرم بیلارد(۱۰) استفاده شد. پس از عملیات لقاح، تخم‌ها با آب کارگاه شسته شده و پوسته‌های تخم و اسپرم‌های اضافی خارج گردید. تخم‌های لقاح یافته برای طی مراحل جنینی به سینی‌های انکوباسیون منتقل گردید. برای القاء پلوئیدی در تیمار ۳ و ۴ از شوک گرمایی $26/5^{\circ}C$ به مدت ۲۰ دقیقه و پس از گذشت ۲۰ دقیقه از عملیات لقاح استفاده گردید. تلفات انکوباسیون و تخم‌های قارچ زده به‌طور روزانه شمارش و جدا گردید. پس از چشم زدگی تخم‌ها، با توجه به یکسان بودن شرایط محیطی، درصد چشم زدگی تخم‌ها به‌عنوان معیاری برای سنجش میزان موفقیت لقاح مدنظر قرار گرفت. هم‌چنین درصد تفریخ تخم‌های چشم زده، درصد بازماندگی لاروها از زمان تفریخ تا شروع تغذیه فعال و درصد بدشکلی لاروها در طی مراحل انکوباسیون محاسبه و ثبت گردید. پس از طی دوره انکوباسیون، لاروها به مدت ۸ ماه بعد از تفریخ در استخرهای گرد نگهداری شدند. در پایان این مدت که وزن ماهیان به حدود ۲۰ گرم رسید، برای بررسی تکامل گنادها و تعیین جنسیت آنها، تعداد ۳۰ ماهی از هر تیمار نمونه‌برداری گردید. هم‌چنین برای سنجش میزان القای تریپلوئیدی از همین ماهیان استفاده گردید. برای تعیین میزان القای پلوئیدی از روش بررسی اندازه هسته گلبول‌های قرمز استفاده گردید(۲۶) و برای تأیید نتایج به دست آمده، از روش رنگ آمیزی نقاط سازمان دهنده هسته [NORs(Nucleous Organizer Regions] با نیترات نقره استفاده گردید(۲۲)، سپس درصد القای تریپلوئیدی در هر یک از تیمارها از رابطه ۱ محاسبه گردید(۱۱).

[۱] ۱۰۰ × (تعداد کل ماهیان دیپلوئید و تریپلوئید / تعداد ماهیان تریپلوئید) = میزان تریپلوئیدی(٪)

برای تعیین جنسیت ماهیان و سنجش تکامل گناد آنها، گناد ماهیانی که برای سنجش پلوئیدی استفاده گردیده بود خارج شده و مقاطع بافت‌شناسی از آن تهیه و به روش هماتوکسیلین-ائوزین(H&E) رنگ آمیزی گردید (۵). برش‌های حاصله با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی×۴۰۰ بررسی گردید.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزارهای Excel و $SPSS_{12}$ انجام شد. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف اسمیرنف سنجیده شد ونتایج نشان داد که داده با اطمینان ۹۵٪ نرمال بودند ($P>0/05$) و لذا برای تعیین معنی‌دار بودن اختلاف بین پارامترهای مورد بررسی در تیمارها ، تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده شد. در صورت مشاهده اختلاف بین داده‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن جهت تعیین معنی‌دار بودن یا نبودن اختلاف موجود در سطح ۹۵٪ استفاده گردید.

نتایج

نتایج حاصل از مرحله انکوباسیون در نمودار۱ نشان داده شده

Downloaded from jcpp.iut.ac.ir at 22:10 IRST on Wednesday December 13th 2017

است. پس از گذشت ۱۵۰ درجه روز تخم‌ها شروع به چشم زدن کردند. بررسی نتایج حاصل از مرحله چشم زدگی در تیمارهای مختلف نشان داد که به غیر از تیمار تریپلوئید مخلوط نر و ماده که میزان چشم زدگی در آن به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود (P>۰/۰۵)، در سایر تیمارها این میزان تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). بررسی نتایج حاصل از میزان تفریخ تخم‌های چشم زده نشان داد که این میزان در ماهیان دیپلوئید بیشتر از ماهیان تریپلوئید بود. در تیمار تمام ماده تریپلوئید میزان چشم زدگی تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها نداشت (P>۰/۰۵) ، در حالی‌که در تیمار تریپلوئید مخلوط نر و ماده این میزان پایینتر از سایر تیمارها بود (P>۰/۰۵). بررسی نتایج حاصل از میزان بازماندگی از زمان تفریخ تا مرحله شنای عمودی تفاوت معنی‌داری در تیمارهای مختلف نشان نداد (P>۰/۰۵) .

تعداد لاروهای بدشکل در تیمار تریپلوئید مخلوط نر و ماده برابر ۶/۵۴ ٪ بود که به‌طور معنی‌داری بالاتر از تیمار تریپلوئید تمام ماده (۰/۵ ٪) بود (P<۰/۰۵)، هم‌چنین حالات بدشکلی در هیچ یک از تیمارهای دیپلوئید مشاهده نگردید.

نتایج حاصل از بررسی ابعاد گلبول‌های قرمز ماهیان دیپلوئید و تریپلوئید نشان داد که در ماهیان تریپلوئید ابعاد سلول و هسته گلبول‌های قرمز حدود ۱/۳ تا ۱/۷ برابر افزایش یافته بود(جدول۲). بر این اساس درصد القای تریپلوئیدی در تیمار تمام ماده تریپلوئید ۸۰/۷۶ ٪ اندازه‌گیری شد که تفاوت معنی‌داری با تیمار مخلوط نر و ماده تریپلویید (۸۰/۹۵ ٪) نشان نداد (P>۰/۰۵). در این خصوص نتایج مربوط به تأیید تشخیص پلوییدی در مورد بررسی تعداد هستک سلول‌های آبشش ماهیانی که ابعاد گلبول قرمز آنها اندازه‌گیری شده بود، نشان داد که این تعداد در ماهیان دیپلوئید ۱ یا ۲ عدد ولی در ماهیان تریپلوئید ۱، ۲ و یا ۳ عدد بود (شکل ۱). هم‌چنین تفاوت معنی‌داری بین ماهیان تمام ماده و مخلوط نر و ماده از لحاظ نسبت و تعداد هستک‌ها مشاهده نگردید (P>۰/۰۵) به‌علاوه بررسی گسترش‌های کروموزومی نشان داد که هم‌زمان با افزایش ابعاد گلبول‌های قرمز و تعداد هستک‌های سلول سطح پلوییدی از 2n =۶۰ به 3n =۹۰ افزایش یافته است (شکل۲).

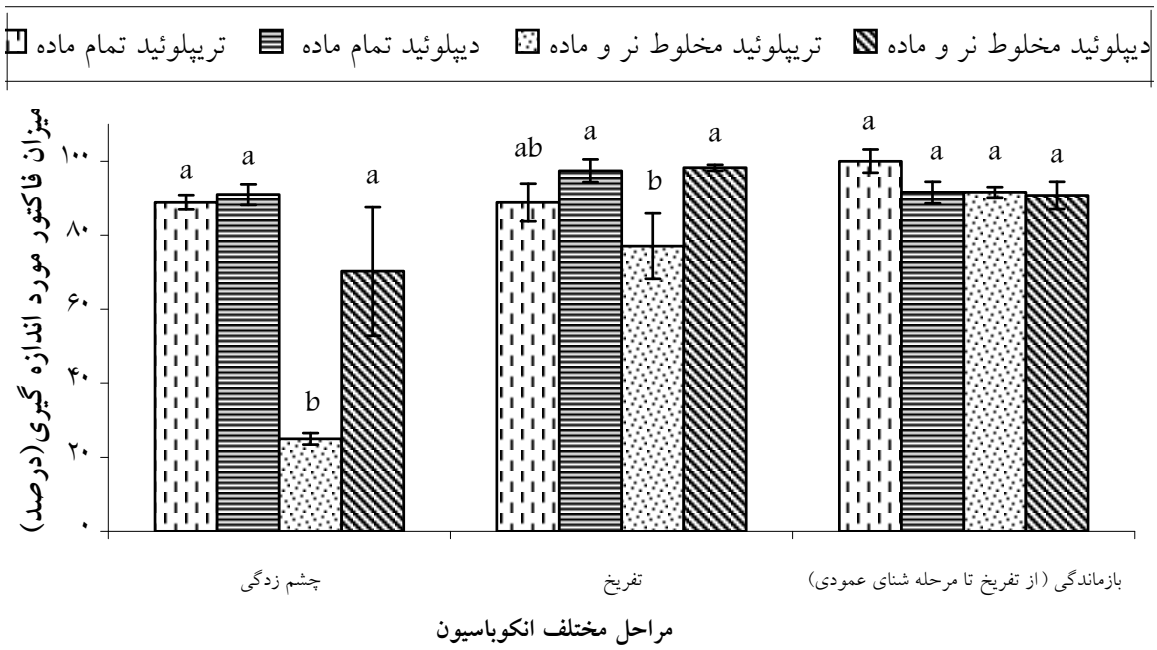
نتایج بررسی بافت‌شناسی گناد ماهیان نشان داد که نتاج حاصل از ترکیب اسپرم نرهای معمولی با تخمک ماده‌های معمولی، ۴۰٪ نر و ۶۰ ٪ ماده بودند، در حالی‌که نتاج حاصل از ترکیب اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته با تخمک ماده‌های معمولی تماما ماده بودند(۱۰۰ ٪). هم‌چنین القای تریپلوئیدی تأثیری در نسبت‌های جنسی ماهیان نداشت به‌طوری که تعداد ماهیان ماده در تیمار تریپلوئید مخلوط نر و ماده، ۶۴/۴۶ ٪ و در تیمار دیپلوئید مخلوط نر و ماده، ۱۱/ ۶۱٪ بود که تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند (P>۰/۰۵).

بیضه ماهیان دیپلوئید و تریپلوئید از لحاظ مراحل تکاملی در سن ۸ ماهگی تقریبا در یک وضعیت یعنی مراحل اولیه اسپرماتوژنز قرار داشتند (شکل ۳). تخمدان ماهیان دیپلوئید در این سن در مرحله پری‌ویتلوژنیک و یا پری‌نوکلئولوس بود؛ در حالی‌که در ماهیان تریپلوئید اگرچه ساختار تیغه‌ای تخمدان شکل گرفته بود ولی از لحاظ تکاملی در همان مراحل اولیه قرار داشت (شکل ۴).

بحث و نتیجه‌گیری

در بررسی حاضر میزان چشم زدگی تخم‌ها بین تیمارهای تمام ماده دیپلوئید، تمام ماده تریپلوئید و مخلوط نر و ماده دیپلوئید تفاوت معنی‌داری نداشت. از طرفی این میزان در ماهیان مخلوط نر و ماده تریپلوئید به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از سایر تیمارها بود که می‌تواند ناشی از پایین بودن کیفیت اسپرم نرهای معمولی استفاده شده، در مقایسه با نرهای تغییر جنسیت یافته باشد. زیرا همان‌طور که در نمودار ۱ دیده شد، در تیمار مخلوط نر و ماده دیپلوئید نسبت به تمام ماده دیپلوئید کاهش جزئی درصد چشم زدگی مشاهده می‌شود که اگرچه این تفاوت معنی‌دار نیست، ولی بیانگر پایین بودن کیفیت اسپرم نرهای معمولی در یکی از تیمارهای شاهد می‌باشد. حال وقتی این عامل منفی با

Downloaded from jcpp.iut.ac.ir at 22:10 IRST on Wednesday December 13th 2017



نمودار۱. مقایسه نتایج حاصل از مرحله انکوباسیون تولید جمعیت تمام ماده تریپلوئید قزل‌آلای رنگین‌کمان

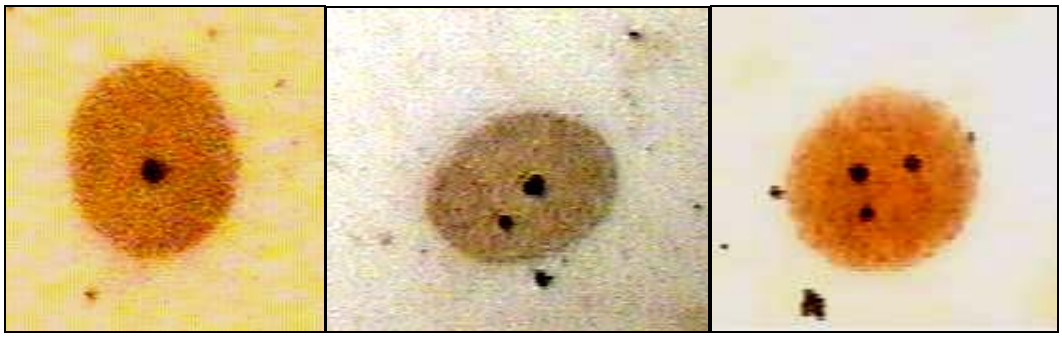
جدول۲. میانگین ونسبت ابعاد سلول و هسته گلبول‌های قرمز در ماهیان تمام ماده و مخلوط نر و ماده دیپلوئید و تریپلوئید قزل‌آلای رنگین‌کمان

	نسبت تریپلوئید به دیپلوئید	دیپلوئید مخلوط نر و ماده	تریپلوئید مخلوط نر و ماده	دیپلوئید تمام ماده	تریپلوئید تمام ماده
مساحت سلول (μm^2)	۱/۴۶	۱۳۲/۱۷	۱۷۳/۳۹	۱۰۹/۲۶	۱۸۰/۴۴
مساحت هسته (μm^2)	۱/۴۶	۱۸/۸۳	۲۷/۷۹	۱۸/۰۴	۲۶/۲۱
حجم سلول (μm^3)	۱/۶	۹۴۹/۲۳	۱۲۸۷/۲۶	۷۰۱/۸۷	۱۳۷۰/۲۶
حجم هسته (μm^3)	۱/۵۴	۴۴/۶۲	۷۰/۶۹	۴۲/۴۰	۶۳/۵۵

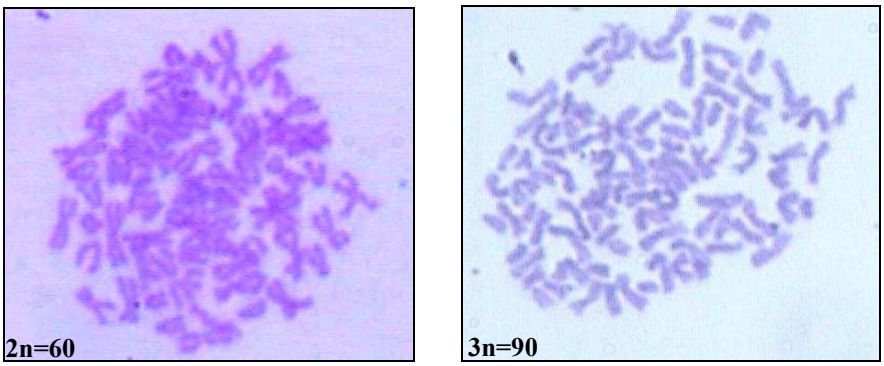
شوک گرمایی به‌عنوان عامل منفی دیگر همراه می‌شود منجر به کاهش چشمگیر در درصد چشم زدگی تخم‌های چشم زده یعنی تیمار تریپلوئید مخلوط نر و ماده می‌شود. در این رابطه در بعضی مطالعات پایین بودن درصد لقاح اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته در مقایسه با نرهای معمولی گزارش شده است(۱۴). مطالعات دیگر نشان می‌دهد که اگر برای لقاح تخمک‌ها از مخلوط اسپرم چند مولد نر تغییر جنسیت یافته و به میزان حجم کافی استفاده شود، درصد لقاح به میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش خواهد یافت؛ این میزان می‌تواند برابر و یا گاهی بیشتر از درصد لقاح اسپرم نرهای معمولی باشد(۱). در مطالعه اخیر نیز از مخلوط اسپرم چند مولد نر تغییر جنسیت یافته برای لقاح استفاده گردید و لذا میزان لقاح و به دنبال آن درصد چشم زدگی بالایی مشاهده شد.

میزان تفریخ تخم‌های چشم زده در ماهیان دیپلوئید تمام ماده و مخلوط نر و ماده بیشتر از ماهیان تریپلوئید مخلوط نر و ماده بود ولی با تیمار تریپلوئید تمام ماده تفاوت معنی‌داری نداشت.

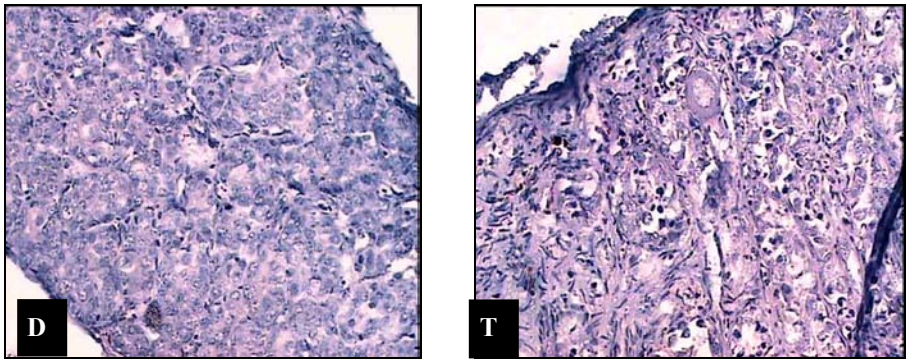
Downloaded from jcpp.iut.ac.ir at 22:10 IRST on Wednesday December 13th 2017



شکل۱. سلول‌های آبشش با ۱، ۲ و ۳ هستک (NORs) در قزل‌آلای رنگین‌کمان تریپلوئید(×۱۰۰۰)

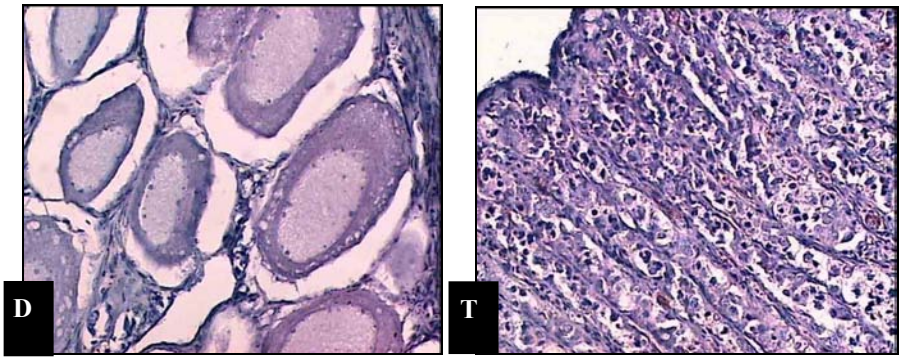


شکل۲. گسترش کروموزومی ماهی دیپلوئید(D) و تریپلوئید(T) قزل‌آلای رنگین‌کمان(×۱۰۰۰)



شکل۳. بافت بیضه در ماهیان دیپلوئید(D) و تریپلوئید(T) قزل‌آلای رنگین‌کمان

در سن ۸ ماهگی(H&E) (×۲۰۰)



شکل ۴. بافت تخمدان در ماهیان دیپلوئید(D)(×۴۰۰) و تریپلوئید(T) قزل‌آلای رنگین‌کمان

در سن ۸ ماهگی(H&E) (×۲۰۰).

Downloaded from jcpp.iut.ac.ir at 22:10 IRST on Wednesday December 13th 2017

به‌نظر می‌رسد این پدیده بیشتر با آنیوپلوئید بودن جنین‌های تریپلوئید ارتباط داشته باشد زیرا جنین‌هایی حاصل شده‌اند که توانایی تفریخ ندارند(۷). از آنجا که میزان تفریخ تخم‌های چشم زده در جمعیت تمام ماده تریپلوئید بیشتر از ماهیان مخلوط نر و ماده تریپلوئید بود، شاید بتوان عنوان کرد که احتمال آنیوپلوئید بودن جنین‌های ماده نسبت به جنین‌های نر کمتر است و البته این ادعا در صورتی صحیح می‌باشد که بتوان مطمئن شد که تخم‌های چشم زده‌ای که تفریخ نیافته‌اند آنیوپلوئید بوده‌اند.

افزایش تلفات مراحل مختلف انکوباسیون در ماهیان تریپلوئید نسبت به ماهیان دیپلوئید توسط محققین بسیاری (۱۵، ۲۸، ۳۱). گزارش شده است. این پدیده می‌تواند ناشی از اثرات نامطلوب شوک دهی در زمان القای تریپلوئیدی به‌عنوان یک عامل استرس زا باشد و یا بر اثر تولید جنین‌های آنیوپلوئید (اصولا اگر تغییر در تعداد کروموزوم‌ها مضربی از n باشد این حالت را Euploidy و اگر مضربی از n نباشد آن را Aneuploidy می‌نامند) باشد که به‌واسطه اختلالات کروموزومی ایجاد شده‌اند و توانایی بقا ندارند(۴).

در مورد میزان بازماندگی لاروها از زمان تفریخ تا مرحله تغذیه فعال تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مورد بررسی مشاهده نگردید، هرچند که در تیمار تمام ماده تریپلوئید این میزان در بالاترین حد ممکن یعنی ۹۹/۹۹ ٪ بود. تاباتا و همکاران نیز دریافتند که میزان بقای ماهیان تمام ماده تریپلوئید در دوران جنینی بیشتر از ماهیان نر و ماده دیپلوئید و در ماهیان نر و ماده دیپلوئید نیز بیشتر از ماهیان نر و ماده تریپلوئید بود(۲۹).

با بررسی تعداد لاروهای بدشکل در مرحله انکوباسیون، در هیچ یک از تیمارهای دیپلوئید حالات بدشکلی مشاهده نگردید؛ درحالی که در تیمارهای تریپلوئید تعدادی لارو بدشکل شناسایی و جدا گردید که با شمارش آنها مشخص شد این تعداد در تیمار تریپلوئید مخلوط نر و ماده به‌طور معنی‌داری بالاتر بود. طبق نظر بنفی مشخص نیست آیا ماهیان بدشکل واقعاً تریپلوئید هستند یا آنیوپلوئید(۹). بنابراین اگر فرض بر این باشد که بدشکلی‌های ایجاد شده ناشی از آنیوپلوئیدی باشند، باز هم می‌توان اظهار کرد که میزان آنیوپلوئیدی در ماهیان نر بیشتر از ماهیان ماده است. افزایش میزان بدشکلی‌ها هم‌زمان با القای پلی پلوئیدی در سایر مطالعات نیز نشان داده شده است (۴، ۲۷ و ۲۸).

در این بررسی از ترکیب اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته با تخمک ماده‌های معمولی نتاجی حاصل شد که بررسی بافت‌شناسی گناد آنها نشان داد که همگی ماده می‌باشند. این در حالی است که نتاج حاصل از ترکیب اسپرم نرهای معمولی با تخمک ماده‌های معمولی، ۴۰٪ نر و ۶۰٪ ماده بودند. نتایج مشابهی در گزارش‌های سایر محققین ذکر است که نشان می‌دهد ماهیان نر تغییر جنسیت یافته قادر به تولید اسپرمی هستند که تنها حامل کروموزوم X است و فرزندان حاصل از این ماهیان تمام ماده می‌باشند (۸، ۱۳، ۱۶ و ۲۳). نتایج این بررسی نشان داد که القای تریپلوئیدی تأثیری در نسبت‌های جنسی ماهیان ندارد که این یافته با نتایج کیم و همکاران مطابقت می‌کند(۱۷).

در مطالعه حاضر گناد ماهیان در سن ۸ ماهگی بررسی شد که نتایج نشان داد تخمدان ماهیان دیپلوئید در این سن در مرحله پیش زرده‌سازی یا پری نوکلئوس بود، در حالی‌که در ماهیان تریپلوئید تنها ساختار تیغه‌ای تخمدان شکل گرفته بود ولی از لحاظ تکاملی تخمدان‌ها در همان مراحل اولیه بود. هم‌چنین بیضه‌های ماهیان دیپلوئید و تریپلوئید در این سن در وضعیت مشابه، یعنی مراحل اولیه اسپرماتوژنز قرار داشتند. لینکولن و اسکات نیز در سال ۱۹۸۳ با بررسی بافت‌شناسی گناد ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در سن ۵ ماهگی، زمانی که ماهیان ۱/۵ تا ۳ گرم بودند، مشاهده کردند که در ماهیان ماده تریپلوئید در این سن تخمدان‌ها تکامل نیافته بودند و اگرچه ساختار تیغه‌ای مشخصی داشتند، ولی تخمک در آنها وجود نداشت، درحالی‌که در ماده‌های دیپلوئید در این سن تخمدان مملو از اووسیت‌های تکامل یافته بود(۱۸). در ماهیان نر تکامل بیضه‌ها در این سن تا مرحله اسپرماتوگونی انجام شده بود و تفاوتی بین ماهیان دیپلوئید و تریپلوئید مشاهده نگردید. هم‌چنین طبق مشاهدات کیم و همکاران در سال ۱۹۸۸، بیضه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان دیپلوئید و تریپلوئید در سن ۱۲ ماهگی از لحاظ

Downloaded from jcpp.iut.ac.ir at 22:10 IRST on Wednesday December 13th 2017

تکاملی در یک مرحله بودند، هم‌چنین تخمدان‌های دیپلوئید در این سن در مرحله پری‌ویتلوژنیک بودند، در حالی که تخمدان ماهیان تریپلوئید توسعه نیافته بود(۱۷).

در جمع‌بندی نهایی می‌توان اظهار نمود که به‌کارگیری روش‌های مورد استفاده در این تحقیق منجر به تولید جمعیت تمام ماده دیپلویید و تریپلویید قزل‌آلای رنگین کمان در شرایط مرکز تکثیر و پرورش ماهیان سردابی شهید باهنر کلاردشت گردید و نتایج نرماتیوهای مراحل مختلف تکثیر، انکوباسیون و پرورش اولیه (تا وزن ۸۰ گرم) حاکی از پتانسیل مناسب آنها برای ادامه پرورش می‌باشد .

سپاسگزاری

در پایان لازم می‌دانیم که از کلیه مسئولین و پرسنل محترم کارگاه شهید باهنر کلاردشت به‌خصوص جناب آقای مهندس پاشا زانوسی ریاست محترم وقت مرکز و آقای مهندس گلشاهی مدیر محترم بخش تکثیر که در تمام مراحل انجام این بررسی با ما همکاری داشتند نهایت قدردانی را داشته باشیم.

منابع مورد استفاده

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

۲. دهقانی. س. و س. اکبری. ۱۳۷۶. بررسی تکنیک برداشت دستگاه تناسلی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در ایران. مجله علمی شیلات ایران ۶: ۱۷ – ۲۲.

۳. طلا، م. ۱۳۸۰. بهینه سازی تیمار هورمون ۱۷ آلفا متیل تستوسترون به‌منظور ایجاد تغییر جنسیت و عقیمی در ماهی قزل‌آلا. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران، شمال.

۴. کلباسی. م. ر. ۱۳۷۲. القای تریپلوئیدی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌وسیله شوک‌های گرمایی. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۰ صفحه.

۵. مهدوی شهری. ن.، ع. فاضل، م. ژیان طبسی و ز. سعادتفر. ۱۳۸۰. *تکنیک‌های هیستولوژی و هیستوشیمی (نظری و عملی)*. انتشارات فردوسی مشهد.

6. Arabac, M., I. Dilerb and M. Sarb. 2004. Induction and synchronization of ovulation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by administration of emulsified buserelin (GnRHa) and its effects on egg quality. Aquaculture 237: 475–484.
7. Benfey, T.J. and E. M. Donaldson. 1988. Triploidy in the cultured of pacific salmon. Aquaculture international congress and exposition, Canada.
8. Benfey, T.J. 1996. Use of All-female and triploid salmonids for aquaculture in Canada. Bull. Aquacul. Assoc. Can. PP: 6-9.
9. Benfey, T.J. 1999. The physiology and behavior of triploid fishes. Rev. in Fisheries Sci. 7(1): 39- 67.
10. Billard, R., J. Petit, B. Jalabert and D. Szoilosi. 1974. Artificial insemination in trout using a sperm diluents. PP. 715- 723. *In:* J. H. S. Blaxter (Ed.), Early Life History of Fish. Springer_ Verlag Pbu., Berlin.
11. Billard, R., M. Richard and B. Breton. 1977. Stimulation of gonadotropin secretion after castration in rainbow trout. Gen. and Compar. Endocrin. 33: 163-165.
12. Brydges, K. and T.J. Benfey. 1991. Triploid brown trout (*Salmo trutta*) produced by hydrostatic pressure shock. Bull. of the Aquaculture Assoc. of Can. 3: 31-33.
13. Bye, V.J. and R.F. Lincoln. 1986. Commercial methods for the control of sexual maturation in rainbow trout. Aquaculture. 57:299-309.
14. Geffen, A.J. and J.P. Evans. 2000. Sperm traits and fertilization success of male and sex-reversed female rainbow trout. Aquaculture 182:61-72.
15. Happe, A., E. Quillet and B. Chevassus. 1988. Early life history of triploid rainbow trout. Aquaculture 71: 107-118.

16. Johnstone, R. 1996. Experience with salmonid sex reversal and triploidisation technologies in the united kingdom. Bull. Aquaculture Assoc. Can. 2: 9- 13.
17. Kim, D.S., I.B. Kim and Y.G. Baik. 1988. Early growth and gonadal development of triploid rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Aquaculture 1: 41-51.
18. Lincoln, R.F. and A.P. Scott. 1983. Production of all-female triploid Rainbow trout. Aquaculture 30: 375-380.
19. Moccia, R.D. and K.R. Munkittrick. 1986. Relationship between the fertilization of rainbow trout *(Salmo gairdeneri)* eggs and the motility of spermatozoa. Theriogenol. 27: 679-688.
20. Oflyn, F.M., S.A. McGeach, G.W. Friars, T.J. Benfey and J.K. Bailey. 1997. Comparisons of cultured triploid and diploid Atlantic salmon (*Salmo salar*). ICES J. Marine Sci. 45: 1160-1165.
21. Omoto, N., M. Maebayashi, SH. Adachi, K. Arai and K. Yamauchi. 2005. Sex ratios of triploids and gynogenetic diploids induced in the hybrid sturgeon, the bester (*Huso huso* female × *Acipenser ruthenus* male). Aquaculture 245: 39-47.
22. Phillips, R.B., K. D. Zajicek, P.E. Ihseen and O. Johnson. 1986. Application of silver staining to the identification of triploid fish cells. Aquaculture 54: 313-319.
23. Piferrer, F. 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. Aquaculture 197: 229- 281.
24. Sheehan, R.J., S.P. Shasteen, A.V. Suresh, A.R. Kapuscinski and J.E. Seeb. 1999. Better growth in All-female diploid and triploid rainbow trout. Trans. Am. Fisheries Soc. 129: 491-498.
25. Smith, D.S. and T.j. Benfey. 2001.The reproductive physiology of three age classes of adult female diploid and triploid brook trout. Fish Physiol. Biochem. 25: 319-333.
26. Strunjak, I., R. Rakovak and N. Topic. 2003. Micronucleus occurrence in diploid and triploid rainbow trout. Vet. Med. Czech. 48: 215-219.
27. Strussman, C.A., N.B. Choon, F. Takashima and T. Oshiro. 1993. Triploid induction in an atherinid fish, the Pejerry (*Odontestbes bonariensis*). Prog. Fish. Cult. 55: 83-89.
28. Sutterlin, A.M., J. Hplder and T.J. Benfey. 1987. Early survival and subsequent morphological deformities in landlocked, anadromus, and hybrid (L×A) diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture 64: 157-164.
29. Tabata, Y.A., M.G. Rigolini and M.K. Nagata. 1997. Production of all-female triploid rainbow trout. I- Embryo survival. Boletin- do- Instituto- de- Pesca- Sao- Paulo 24(1): 47-55.
30. Thorgaard, G.H. and G.A.E. Gall. 1979. Adult triploids in rainbow trout family. Genetics 93: 961-973
31. Thorgaard, G.H. and M.E. Jazwin. 1981. Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout. Trans. Am. Fisheries Soc. 110: 546-550.
32. Yamazaki, F. 1983. Sex control and manipulation in fish. Aquaculture 33: 329- 354.

Downloaded from jcpp.iut.ac.ir at 22:10 IRST on Wednesday December 13th 2017