Archive of SID

بررسی ایجاد ماهیان تتراپلوئید قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به وسیله شوک گرمایی

محمدرضا کلباسی[۱]، علی باقری[۲]، محمد پورکاظمی[۳] و حسین عبدالحی[۴]

Kalbas_m@modares.ac.ir

۱ و ۲ ـ گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، نور صندوق پستی: ۳۵۶-۴۶۴۱۴

۳ ـ انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، رشت صندوق پستی: ۳۴۶۴-۴۱۶۳۵

۴ ـ معاونت تکثیر و پرورش شرکت سهامی شیلات ایران، تهران خیابان فاطمی غربی، پلاک ۲۵۰

تاریخ دریافت : خرداد ۱۳۸۱ تاریخ پذیرش : مهر ۱۳۸۲

چکیده

در این تحقیق مناسب‌ترین دما و مدت شوک‌دهی (شوک گرمایی) و زمان پس از لقاح جهت القاء تتراپلوئیدی در ماهی قزل آلای رنگین کمان مورد بررسی قرار گرفت. این امر با استفاده از شوک گرمایی ۲۸ درجه سانتیگراد در زمان‌های متفاوت پس از لقاح (۴۹/۵، ۵۴، ۵۸/۵، ۶۳، ۶۷/۵، ۷۲، ۷۶/۵ و ۸۱ درجه - ساعت) و مدت زمان‌های متفاوت شوک‌دهی (۸، ۱۰ و ۱۲ دقیقه) اعمال گردید. تجزیه و تحلیل گسترشهای خونی به روش اندازه‌گیری مساحت و حجم هسته‌ای و سلولی گلبولهای قرمز خون مشخص نمود که در تیمارهای مختلف، تتراپلوئیدی به میزان صفر تا ۷۵ درصد القاء گردیده است. لیکن بالاترین بازده تتراپلوئیدی در شوک گرمایی ۲۸ درجه سانتیگراد در زمان ۷۴ درجه - ساعت پس از لقاح و در مدت زمان شوک دهی ۱۲ دقیقه حاصل گردید که در این تیمار بازده تتراپلوئیدی ۸/۴ درصد بوده است. تشخیص تتراپلوئیدی در ماهیان، به روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره و تعیین حداکثر تعداد هستک‌ها در سلول نیز تأیید گردید. تعداد هستک‌ها در سلول‌های دیپلوئید (۲n) ۱ تا ۲ عدد و در سلول‌های تتراپلوئید (۴n) ۳ تا ۴ عدد بود.

لغات کلیدی: قزل‌آلای رنگین کمان، *Oncorhynchus mykiss*، شوک گرمایی، تتراپلوئید،

[Downloaded from isfj.ir on 2025-05-26]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1382.12.4.11.6]

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

یکی از روش‌های کاربردی ژنتیک و اصلاح نژاد در آبزیان القاء پلی‌پلوئیدی است که امروزه، در صنعت آبزی‌پروری جنبه اقتصادی پیدا نموده است (Gjedrem, 2000 ; Thorgaard, 1992). ماهیان تریپلوئید به دلیل افزایش یک سری کروموزومی در تعداد کروموزومهای خود، 3n کروموزومی محسوب می‌گردند و این ماهیان به دلیل اختلال در تقسیم میوز به هنگام گامتوژنز عقیم تلقی شده و از رشد بیشتری برخوردار می‌گردند (Myers *et al.*, 1995 ؛ کلباسی، ۱۳۷۲). ایجاد تریپلوئیدی در ماهیان به دو روش مستقیم (القایی) و یا غیرمستقیم (غیر القایی) امکان‌پذیر می‌باشد. مبنای روش مستقیم، احتباس دومین گویچه قطبی پس از لقاح با استفاده از شوک‌های محیطی می‌باشد. در روش غیر القایی ابتدا مولدین تتراپلوئید بر مبنای حذف اولین تقسیم جنینی پس از لقاح، توسط شوک‌های محیطی تولید می‌گردند و سپس با آمیزش ماهیان تتراپلوئید ماده و دیپلوئید نر ماهیان تریپلوئید حاصل می‌شود. تمامی ماهی‌های حاصل از لقاح ماهیان تتراپلوئید با ماهیان دیپلوئید، تریپلوئید می‌باشند (Myers *et al.*, 1995). از مهمترین مزایای ماهیان تریپلوئید می‌توان به افزایش رشد، کاهش ضریب تبدیل غذایی، بهبود کیفیت گوشت و افزایش درصد باقیماندگی اشاره نمود (Chourrout & Nakamaya, 1987). تجربه جهانی القا پلی‌پلوئیدی در ماهیان قدمتی بیش از پنجاه سال دارد (کلباسی، ۱۳۷۲) ولی از آنجا که القاء تتراپلوئیدی تابع شرایط محیطی و ویژگیهای مولدین محل انجام تحقیق می‌باشد، نتایج متفاوتی در این خصوص ارائه گردیده است (Chourrot & Chevassus, ؛ Refstie, 1981 ؛ Thorgaard *et al.*, 1981 ؛ 1986 Beck & Biggers, 1983). لذا با توجه به نتایج متفاوت فوق و عدم انجام این تحقیق در ایران، به منظور بهینه‌سازی پارامترها و شرایط ایجاد ماهی قزل‌آلای تتراپلوئید این بررسی انجام پذیرفت.

مواد و روش کار

در این تحقیق که در کارگاه تکثیر و پرورش ماهی شهید باهنر کلاردشت انجام پذیرفت از مخلوط تخمک ۳ ماهی مولد ماده با میانگین سن ۲ تا ۳ سال، متوسط طول کل ۴۸ سانتی‌متر و میانگین وزن ۲/۵۰۰ کیلوگرم استفاده شد. لقاح به روش خشک و با استفاده از مخلوط اسپرم ۳ ماهی مولد نر ۱ تا ۲ ساله انجام شد. شوک گرمایی در آکواریوم شیشه‌ای مجهز به دو عدد بخاری آکواریوم فرانسوی رنا با ترموستات

www.SID.ir

[Downloaded from isfj.ir on 2025-05-26]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1382.12.4.11.6]

Archive of SID

حرارتی قابل کنترل، توأم با هوادهی انجام پذیرفت. در این خصوص شوک گرمایی ۲۸ درجه سانتیگراد (کلباسی، ۱۳۷۲) در زمان‌های متفاوت پس از لقاح (۴۹/۵، ۵۴، ۵۸/۵، ۶۳، ۶۷/۵، ۷۲، ۷۶/۵ و ۸۱ درجه - ساعت) و مدت زمان‌های متفاوت شوک‌دهی (۸، ۱۰ و ۱۲ دقیقه) در نظر گرفته شد. برای هر تیمار از ۵۰۰ تخم لقاح یافته استفاده گردید و در گروه شاهد نیز از تخمهای مذکور بدون تیمار شوک‌دهی استفاده شد. پس از شوک‌دهی و انتقال تخم‌ها به صورت تصادفی در انکوباسیونهای تقسیم شده، مراحل تکاملی لاروها مورد مطالعه قرار گرفت. در این خصوص ضمن ثبت روزانه تغییرات دمای آب، درجه - روز مراحل مختلف تکاملی، میزان باقیماندگی لاروها در تیمارهای مختلف محاسبه گردید. تشخیص تتراپلوئیدی به روش اندازه‌گیری حجم و مساحت هسته‌ای و سلولی گلبولهای قرمز صورت پذیرفت. در این خصوص از هر تیمار ۱۰ نمونه بطور تصادفی انتخاب و از آنها گسترش خونی تهیه و پس از رنگ‌آمیزی با گیمسای ۹ درصد، طول و عرض هسته و سلول گلبول قرمز توسط میکرومتر اندازه‌گیری شد و با استفاده از رابطه ۱، حجم و مساحت هسته و سلول گلبولهای قرمز محاسبه گردید (Wolters, 1981).

حجم هسته یا سلول گلبول قرمز = $(۴/۳) \times \pi \times a \times b^2$ (رابطه ۱)

a = نصف محور بزرگ b = نصف محور کوچک

مساحت هسته یا سلول گلبول قرمز = $a \times b \times \pi/4$

a = محور بزرگ b = محور کوچک

همچنین به منظور تأیید روش مذکور تعداد هستک‌های حداقل ۱۰۰ سلول در نمونه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید به روش Gold شمارش و مقایسه گردید. این روش شامل رنگ‌آمیزی سلولهای آبشش پس از هیپوتونیزاسیون و با استفاده از رنگ اختصاصی نیترات نقره بود که در نتیجه حداکثر تعداد هستک‌ها در سلول تعیین گردید. رنگ‌آمیزی نیترات نقره در واقع برای شناسایی مناطق فعال NORs در سری کروموزومها به کار می‌رود (Gold,1990). درصد تتراپلوئیدی تیمارهای مختلف با استفاده از رابطه ۲ و بازده تتراپلوئیدی با استفاده از رابطه ۳ محاسبه گردید.

درصد القاء تتراپلوئیدی : (رابطه ۲) $= \frac{\text{تعداد ماهیان تتراپلوئید}}{\text{تعداد ماهیان تتراپلوئید+ تعداد ماهیان دیپلوئید}} \times ۱۰۰$

بازده تتراپلوئیدی : (رابطه ۳) $= \frac{\text{میزان باقیماندگی لاروها تا مرحله شنای عمودی} \times \text{درصد تتراپلوئیدی}}{۱۰۰}$

www.SID.ir

[Downloaded from isfj.ir on 2025-05-26]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1382.12.4.11.6]

Archive of SID

پس از تأیید نرمالیتی داده‌های آماری مربوط به نتایج درصد باقیماندگی، درصد القا و بازده تتراپلوئیدی با آزمون کولموگوروف - اسمیرنوف، با استفاده از آنالیز واریانس در قالب طرح فاکتوریل داده‌ها مورد پردازش قرار گرفت و برای مقایسه تک تک تیمارها با یکدیگر از آزمون LSD با سطح اعتماد ۹۹ درصد استفاده شد. برای مقایسه پارامترهای مربوط به سنجش سلولهای خونی از آزمون غیر پارامتریک Mann-whitney در دو گروه ماهیان دیپلوئید و تتراپلوئید با سطح اعتماد آزمون ۹۹ درصد استفاده گردید.

نتایج

متوسط دمای آب کارگاه در طول مدت آزمایش ۱ ± ۸/۵ درجه سانتیگراد بود. در این آزمایشات، مدت مرحله لقاح تا چشم‌زدگی بطور متوسط ۱۷۱ درجه - روز، لقاح تا آغاز تفریخ ۳۳۳ درجه - روز و لقاح تا شروع تغذیه فعال ۵۱۳ درجه - روز محاسبه گردید. همچنین درصد باقیماندگی لاروها از لقاح تا شنای عمودی برای گروه شاهد و تیمارهای مختلف تعیین شد (نمودار ۱). نتایج اندازه‌گیری طول و عرض هسته‌ای و سلولی گلبول قرمز، که بر روی ۵۰۰ گسترش خونی بعمل آمد، نشان می‌دهد که بین اندازه هسته و سلول گلبول قرمز تتراپلوئید نسبت به ماهیان دیپلوئید اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($P>0.01$) و در مجموع نسبت ارقام دیپلوئید به تتراپلوئید در مورد طول هسته ۱:۱/۶۵، عرض هسته ۱/۵۶: ۱، سطح هسته ۲/۵۷: ۱، حجم هسته ۳/۹۸: ۱ و در مورد طول سلول ۱/۵۸: ۱، عرض سلول ۱:۱/۵، سطح سلول ۱:۲/۳۹ و حجم سلول ۱:۳/۶ بدست آمد (شکل ۱).

نتایج حاصل از بررسی تعداد هستک‌ها در سلول به منظور تأیید القا تتراپلوئیدی، مشخص نمود که سلولهای تتراپلوئید حاوی ۳ تا ۴ عدد هستک می‌باشند در حالی که سلولهای دیپلوئید حاوی ۱ تا ۲ عدد هستک در هر سلول بودند. همچنین هستک‌های تتراپلوئید از نظر سطح، کمی بزرگتر از هستکهای دیپلوئید به نظر می‌رسند (شکل ۲).

نتایج نهایی مبین آن است که تتراپلوئیدی به میزان صفر تا ۷۵ درصد در تیمارهای مختلف القاء گردیده است لیکن در گروه شاهد هیچ نمونه تتراپلوئید مشاهده نگردید (نمودار ۲). میزان باقیماندگی لاروها در تیمارهای مختلف ۱/۳ تا ۱۸ درصد و در گروه شاهد حداکثر باقیماندگی ۶۷ درصد ثبت گردید.

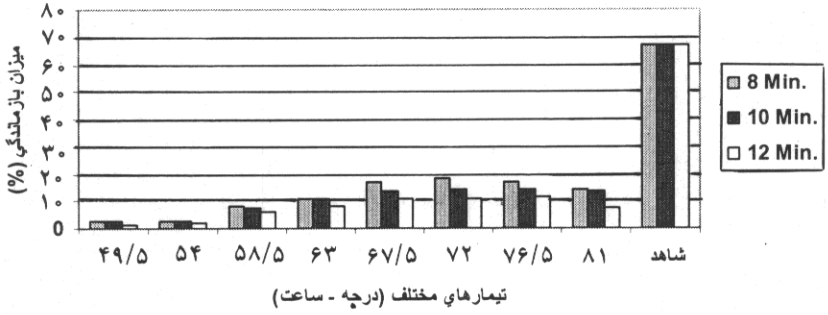
www.SID.ir

[Downloaded from isfj.ir on 2025-05-26]

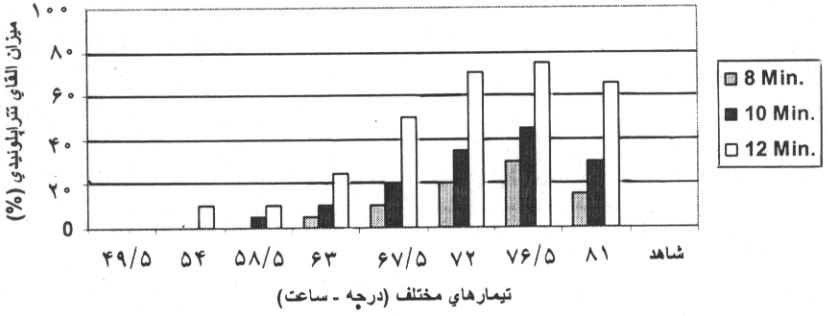
[DOR: 20.1001.1.10261354.1382.12.4.11.6]

Archive of SID

براساس رابطه ۳ بیشترین بازده تتراپلوئیدی در شوک گرمایی ۲۸ درجه سانتیگراد به مدت ۱۲ دقیقه و در زمان ۷۲ تا ۷۶/۵ درجه - ساعت پس از لقاح حاصل گردیده و متوسط درصد تتراپلوئیدی در این تیمار ۸/۴ درصد بوده است ($P>0.01$) (نمودار ۳).



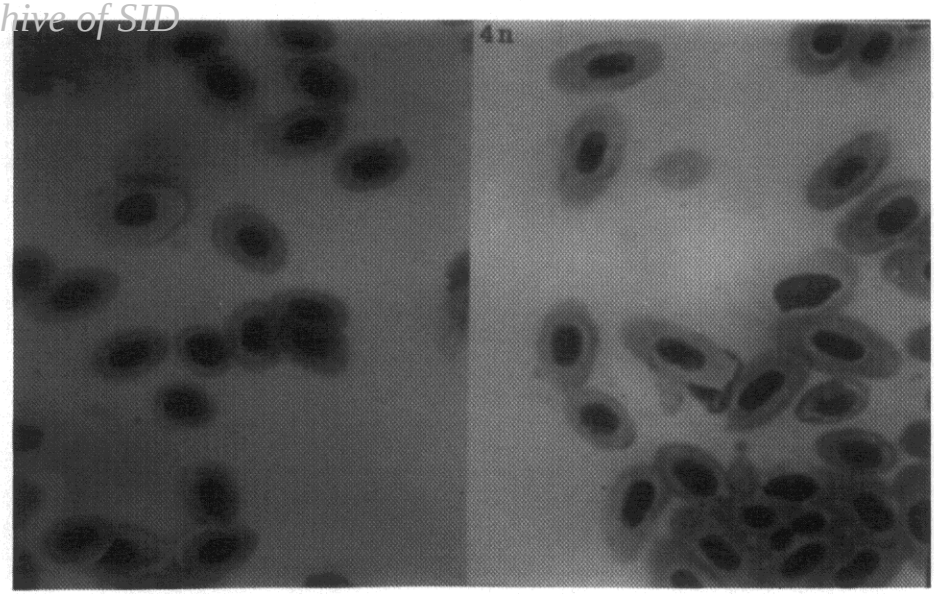
نمودار ۱: میانگین درصد باقیماندگی از لقاح تا شنای فعال در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان



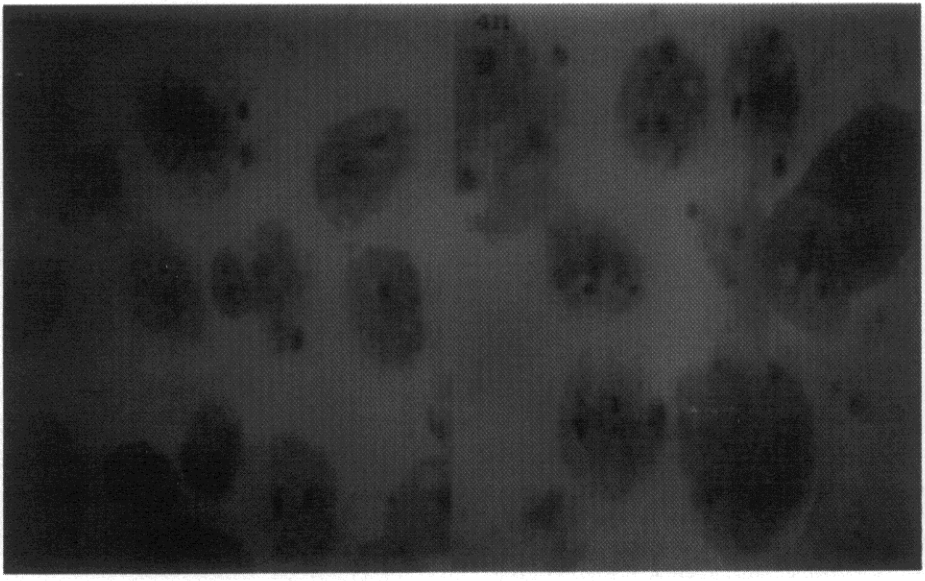
نمودار ۲: میانگین درصد القاء تتراپلوئیدی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

[Downloaded from isfj.ir on 2025-05-26]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1382.12.4.11.6]
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱: مقایسه گلبول قرمز دیپلوئید (۲n) و گلبول قرمز تتراپلوئید (۴n) ماهی قزل آلای رنگین کمان (بزرگنمایی ۱۰۰×)

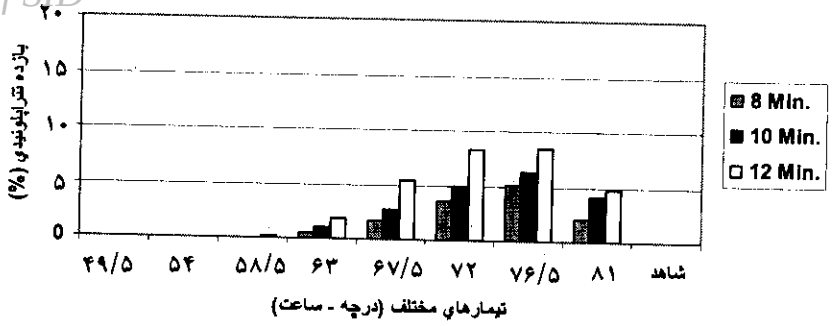


شکل ۲: تعداد هسته‌ها در سلول دیپلوئید (۲n) و سلول تتراپلوئید ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (۴n) (بزرگنمایی ۱۰۰×)

www.SID.ir

[Downloaded from isfj.ir on 2025-05-26]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1382.12.4.11.6]

Archive of SID



نمودار ۳: میانگین بازده تتراپلوئیدی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

بحث

در القاء تتراپلوئیدی بوسیله شوک گرمایی، با افزایش دما درصد القاء تتراپلوئیدی بالا می‌رود ولی این امر منجر به کاهش درصد باقیماندگی لاروهای تحت تیمار می‌شود (Quillet *et al.*, 1988). این پدیده در تیمارهای مختلف این تحقیق نیز تأیید گردید. بنابراین بهینه‌سازی فاکتور بازده تتراپلوئیدی ضروری است. از آنجا که هدف از این گونه مطالعات تولید انبوه ماهیان پرواری نمی‌باشد لذا دستیابی به بیوتکنیک تولید مولدین تتراپلوئید بعنوان منبع تأمین تخم ۲n کروموزومی جهت تولید انبوه ماهیان تریپلوئید به روش غیرالقایی بسیار حائز اهمیت است. Thorgaard و همکاران در سال ۱۹۸۱ شرایط بهینه برای القاء تتراپلوئیدی قزل‌آلای رنگین کمان را مدت زمان ۵ ساعت پس از لقاح و به مدت یک دقیقه در دمای ۳۶ درجه سانتی‌گراد ذکر نموده‌اند. Refstie و همکاران در سال ۱۹۸۱ با استفاده از شوک شیمیایی سیتوکالازین B روی تخم‌های لقاح یافته قزل‌آلا بهترین نتیجه را در غلظت ۱۰μg/ml و در زمان ۴۵ تا ۷۰ درجه - ساعت پس از لقاح گزارش نموده‌اند. Chourrot در سال ۱۹۸۲ شوک حرارتی ۲۸ درجه سانتی‌گراد را در مدت زمان ۸:۳۰ ساعت پس از لقاح و به مدت ۱۴ دقیقه مؤثر می‌داند. Beck Biggers & در سال ۱۹۸۳ بهترین نتایج را از شوک فشار هیدرواستاتیک در مدت زمان ۴۸۰ دقیقه پس از لقاح و در فشار ۸۰۰۰ psi به مدت ۱۰ دقیقه بدست آورده‌اند. بررسی حاضر نشان داد که اعمال شوک گرمایی روشی مناسب برای حذف اولین تقسیم جنینی و در نتیجه القاء تتراپلوئیدی می‌باشد. نتایج بدست آمده با نتایج بعضی از محققین همخوانی دارد (Chourrout, 1982 ;Myers *et al.*, 1986 ;Quillet *et al.*, 1988)

www.SID.ir

[Downloaded from isfj.ir on 2025-05-26]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1382.12.4.11.6]

Archive of SID

ولی در مورد درصد بقا و میزان القاء تتراپلوئیدی نتایج متفاوت بدست آمده است. میزان درصد القا تتراپلوئیدی در تیمار بهینه ۸۰ تا ۱۰۰ درصد، گزارش شده است و این درحالی است که حداکثر درصد القاء در این تحقیق، ۷۵ درصد بوده است. Lou & Purdom, 1984 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 و حساسیت تخم‌های لقاح یافته پس از اعمال شوک‌دهی نسبت به دستکاری‌ها و عوامل محیطی بیشتر می‌شود. در بررسی حاضر از عواملی که باعث کاهش درصد باقیماندگی در تیمارهای مختلف گردید می‌توان به شرایط نامطلوب آب کارگاه در زمان اجرای تحقیق و گل‌آلودگی بیش از حد آب، ناشی از سیلابی شدن آب ورودی به کارگاه اشاره نمود. بنحویکه در گروه شاهد نیز تلفاتی در حدود ۳۳ درصد را ایجاد نمود و این امر می‌تواند روی باقیماندگی تیمارها اثر منفی داشته باشد. به هر حال تکرار این آزمایشات در شرایط مطلوبتر می‌تواند در جهت اخذ نتایج دقیق‌تر مؤثر واقع گردد. گرچه امروزه استفاده اقتصادی از شوکهای گرمایی به دلیل تکنیک ساده و ارزان آن برای القا پلی‌پلوئیدی بسیار معمول شده است، ولی آزمایشات نشان داده است که استفاده از شوک گرمایی در مقایسه با شوک فشار باعث افزایش ناهنجاری و بد شکلی و کاهش درصد بقاء می‌شود. ولی نسبت به کاربرد شوک شیمیایی دارای مضرات کمتری است (Quillet *et al.*, 1988). از آنجا که این تحقیق در کارگاه تکثیر و پرورش آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت انجام پذیرفته است عواملی از قبیل کیفیت آب، کیفیت تغذیه و نژاد مولدین بر کیفیت مواد تناسلی آنها مؤثر بوده و نتایج حاصل کاملاً تحت تأثیر عوامل فوق بوده‌اند. بنابراین بهتر است به منظور بررسی اینگونه عوامل، آزمایشات مشابهی در سایر کارگاه‌های تکثیر و پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بعمل آمده و نتایج نهایی مورد ارزیابی قرار گیرد.

منابع

کلباسی، م.ر. ، ۱۳۷۲. القاء تریپلوئیدی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۰ صفحه.

Beck, M.L. ; Biggers, C.J. , 1983. Erythrocyte measurments of diploid and triploid *Ctenopharyngodon idella* & *Hypophtalmichthys nobilis* hybrids. J. Fish. Biol. Vol.

www.SID.ir

[Downloaded from isfj.ir on 2025-05-26]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1382.12.4.11.6]

Archive of SID

22, pp.497-502.

Chourrout, D. , 1982. Tetraploidy induced by heat shock in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.) Nutr. Develp., Vol. 22, No. 3, pp.569-574.

Chourrout, D. and Chevassus, B. , 1986. Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females-potential of tetraploid fish. Theoretical and applied genetics. Vol. 72, pp.193-206.

Chourrout, D. and Nakamaya, 1987. Chromosome studies of progenies of tetraploid female rainbow trout. Theoretical and applied genetics. Vol. 74, pp.687-692.

Gjedrem, T. , 2000. Genetic improvement of cold-water fish species. Aquaculture Research. Vol. 31, pp.25-33.

Gold, J.R. , 1990. Improved method for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. J. Fish. Biol. Vol. 37, pp.563-575.

Lou, Y.D. and Purdom, C.E. , 1984. Polyploidy indicate by hydrostatic pressure in rainbow trout. J. Fish. Biol. Vol. 25, pp.345-351.

Myers, J.M ; Powell, S.F. and McAndrew, B.J. , 1995. Induction of tetraploidy in brown trout (*Salmo trutta*) using hydrostatic pressure. Aquaculture Research. Vol. 26, pp.229-232.

Myers, J. ; Iwamoto, R.N. and Hershberger, W.K. , 1986. The introduction of tetraploidy in salmonids. Journal of the World Aquaculture Society, Vol. 17, pp.1-17.

Quillet, E. ; Chevassus, B. and Devaux, A. , 1988. Timing and duration of hatching in gynogenetic, triploid, tetraploid and hybrid progenies in rainbow trout. Genet. Sel. Evol., Vol. 20, pp.199-210.

Refstie, J. , 1981. Tetraploid rainbow trout produced by cytochalasin B. Aquaclture.

www.SID.ir

[Downloaded from isfj.ir on 2025-05-26]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1382.12.4.11.6]

Archive of SID

Vol. 10, pp.64-65.

Thorgaard, G.H., 1992. Application of genetic technologies to rainbow trout. The Rainbow Trout. Vol. 100, No. 1-3, pp.85-97.

Thorgaard, G.H. ; Jazwin, M.E. and Stir, A.R., 1981. Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout: high interference over long map distance. Genetics. Vol. 103, pp.771-783.

Wolters, W.R., 1981. Erythrocyte nuclear measurment of diploid and triploid channel catfish. J. Fish. Biol. Vol. 20, pp.253-258.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-05-26]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1382.12.4.11.6]

www.SID.ir