

## تتراپلوییدی در آبزیان، دلایل، روش‌های القا، شناسایی و اثرات فیزیولوژیک

سالار درافشان<sup>۱\*</sup>، هاجر سادات طباطبایی پزوه<sup>۱</sup>، فاطمه پیکان حیرتی<sup>۱</sup>، مجید طالبی<sup>۲</sup><sup>۱</sup>گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ۸۳۱۱۱-۸۴۱۵۶، اصفهان، ایران.<sup>۲</sup>گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ۸۳۱۱۱-۸۴۱۵۶، ایران.

\*نویسنده مسئول: sdorafshan@cc.iut.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۲/۲۵

تاریخ دریافت: ۹۹/۴/۲۱

## چکیده

امروزه، دستکاری کروموزومی گونه‌های مختلف آبزیان یک روش مفید در بهبود ویژگی‌های ژنتیکی آن‌ها محسوب می‌شود. تتراپلویید به موجودی گفته می‌شود که دارای چهار سری کروموزوم در هر سلول هستند. القای تتراپلوییدی یکی از روش‌های موثر برای تولید آبزیان مولد جهت استفاده برای تولید جمعیت‌های نرژاد، ماده زاد و روشی اقتصادی برای تولید نتاج تریپلوئید به روش غیرالقایی است. آبزیان تتراپلوئید با استفاده از شوک‌های فیزیکی یا شیمیایی به صورت دیرنگام و در فاصله بعد از لقاح و قبل از تکمیل اولین تقسیم میتوزی سلول تخم تولید می‌شوند. این آبزیان قادر به تولید گامت‌های دیپلوئید هستند که با استفاده از آن می‌توان به سطوح پلوئیدی بالاتر دست یافت. میزان بقا، رشد و سایر پارامترهای فیزیولوژیک در آبزیان تتراپلوئید در مقایسه با افراد دیپلوئید متغیر است. درصد القای تتراپلوئیدی نیز در افراد مختلف و متاثر از شرایط محیطی و شرایط القای شوک و ژنتیک موجود متفاوت است. در این مقاله، به مروری بر مکانیسم القای تتراپلوئیدی، روش‌های تولید، کاربرد، تعیین سطح پلوئیدی و عملکرد تتراپلوئیدها خواهیم پرداخت.

واژگان کلیدی: تتراپلوئید، شوک دیرنگام، تقسیم میتوز، اثرات فیزیولوژی.

## مقدمه

تأثیر پلوئیدی و توارث تک والدی در حیوانات توسط دانشمندان در کشورهای مختلفی نظیر انگلستان، آمریکا، نروژ و ژاپن انجام شده است (Arai and Fujimoto, 2018).

از دهه ۱۹۸۰ مطالعات مرتبط با آبی‌پروری به منظور بهبود عملکرد جمعیت‌های پرورشی با دستکاری کروموزوم آغاز شد. این روش‌ها در گونه‌های مختلف از ماهیان و بی‌مهرگان آبی به طور گسترده‌ای گسترش یافته است. در ایران نیز تحقیقاتی جهت تولید آبزیان پلی‌پلوئیدی، نر زاد و ماده زاد برای ترویج استفاده از دستکاری کروموزومی در گونه‌های آبی صورت گرفته است (Bahrami Babaheydari et al., 2016b; Sourinezhad et al., 2007).

مطالعات انجام شده در جهت دستیابی به پلوئیدی، جمعیت‌های تمام ماده و جمعیت‌های تمام نر بوده است. شرایط بهینه‌سازی تیمارها با توجه به

دستکاری کروموزومی روشی برای کنترل تعداد و ترکیب یک مجموعه هاپلوئید کروموزومی است. این روش در ابتدای قرن بیستم از دیدگاه زیست‌شناسی در دوزیستان مورد بررسی قرار گرفت. تحقیقات دستکاری کروموزومی در ماهی نسبت به محصولات زراعی و دیگر حیوانات تاریخچه کوتاهی دارد. از سال ۱۹۴۳ اولین اقدامات آغاز شده و تاکنون انواع تکنیک‌های مختلفی برای تداخل در عملکرد طبیعی مرحله متافاز در طی چرخه سلولی با استفاده از عوامل فیزیکی و یا شیمیایی ایجاد شده است، که در نتیجه آن افراد با وضعیت ژنومی متفاوت، یعنی پلی‌پلوئیدها (تریپلوئیدها و تتراپلوئیدها)، ماده‌زادها (میوزی و میتوزی) و افراد نرژاد تولید می‌شود (Hussain, 1998). از دهه ۱۹۵۰ تا ۱۹۷۰، چندین مطالعه در انواع گونه‌های مختلف ماهی برای بررسی

کامل مطالعه شده است. در پلی‌پلوئیدی، افراد دارای دسته‌های کروموزومی بیشتر از حالت طبیعی هستند. افراد دارای تعداد طبیعی دسته‌های کروموزومی را دیپلوئید می‌گویند. تریپلوئیدی به افرادی اطلاق می‌شود که سه دسته کروموزومی دارند و افراد تتراپلوئید، دارای چهار دسته کروموزومی هستند. پلی‌پلوئیدی در پستانداران و پرندگان کشنده است (Chourrout *et al.*, 1986)، اما ماهیان تریپلوئید دارای قابلیت بقا بوده (Thorgaard *et al.*, 1981) و معمولاً به علت عدم تشکیل و توسعه غدد جنسی عقیم هستند (Cassani and Caton, 1986). پلی‌پلوئیدها را می‌توان با توجه به منشأ دو برابر شدن کروموزوم‌ها به اتوپلی‌پلوئیدها (کروموزوم‌های یک گونه) و آلوپلی‌پلوئیدها (کروموزوم‌های دو یا چند گونه) تقسیم کرد (Hu *et al.*, 2019).

**تریپلوئیدی:** تریپلوئیدی به واسطه انجام لقاح طبیعی و سپس حفظ جسم قطبی دوم در سلول تخم القا می‌شود (Chourrout, 1980). جسم قطبی دوم با استفاده از شوک فشار هیدروستاتیک، شوک‌های دمایی (گرما یا سرما) و یا شوک‌های شیمیایی و مواد بیهوشی در زمان کوتاهی پس از لقاح، در سلول نگه داشته می‌شود (Thorgaard *et al.*, 1981). فشار هیدرواستاتیک در مقایسه با شوک‌های دمایی و دیگر شوک‌ها، نتایج قابل اطمینان، بقای تخم بیشتر و درصد تریپلوئیدی بالاتری را ایجاد می‌کند (Cassani and Caton, 1986). مطالعات نشان داده است که موفقیت در شوک‌های حرارتی و فشار در مهار تقسیم سلولی بالاتر از تیمارهای شیمیایی است که باعث می‌شود تیمارهای شیمیایی در مقیاس تجاری مورد استفاده قرار نگیرند (Thorgaard, 1983).

القای تریپلوئیدی با این مکانیسم در ماهیان عموماً منجر به بروز تغییراتی در میزان بازماندگی، سرعت تکامل جنینی، رشد، ویژگی‌های هماتولوژی و روند تکامل گنادی می‌گردد (Bahrami Babaheydari *et al.*, 2016). کاهش بازماندگی خصوصاً در طی دوره انکوباسیون در ماهیان تریپلوئید

گونه هدف و ارزیابی دقیق عملکردهای گونه مانند بقا، رشد، بلوغ، مقاومت به بیماری و سایر صفات دارای اهمیت در آبی‌پروری مشخص می‌شود. با توجه به پیشینه تحقیق در مورد دستکاری‌های کروموزومی، این تکنیک‌ها از روش‌های کلاسیک به شمار می‌روند اما با توجه به اینکه در صورت استفاده از این روش‌ها از جمله تراریخته‌ها، فناوری سلول‌های زایشی، نشانگرهای متغیر DNA همراه با سایر روش‌های ژنتیکی، می‌توان پیشرفت بیشتری در آبی‌پروری ایجاد نمود، این روش‌ها منسوخ نشده علاوه بر این دستکاری‌های کروموزومی روشی برای به حداقل رساندن خطر آلودگی زیستی توسط گونه‌های غیربومی در محیط‌های طبیعی است و همچنان کارایی دارد (Nascimento *et al.*, 2020).

در بسیاری از گونه‌های مهم تجاری آبزیان، تریپلوئیدها و دیپلوئیدهای ماده‌زاد که با جلوگیری از خروج دومین گوچه قطبی با استفاده از فشار هیدروستاتیک یا شوک دمایی بعد از لقاح با اسپرم نرمال یا اسپرم اشعه دیده انجام می‌شود، از اهمیت بالایی برخوردارند. افراد تریپلوئید به دلیل اختلال در تقسیم میوز در مرحله گامتوزنیز و عدم وجود هورمون‌های استروئیدی ضروری برای رشد غدد جنسی، از نظر عملکردی عقیم هستند و این عقیمی در ماهیان تریپلوئید برای کنترل تولید مثل استفاده می‌شود. همچنین تولید آبزیان تتراپلوئید با استفاده از اعمال شوک‌های حرارتی یا هیدرواستاتیک و جلوگیری از رخداد اولین تقسیم سلولی، جهت تولید زایگوت‌های دیپلوئید با امید به تولید ماهیان تریپلوئید عقیم و به روش غیرمستقیم در مقیاس بزرگ مورد توجه است. در این مقاله به مرور اصول و روش‌های شناخته شده برای تولید افراد تتراپلوئید به عنوان منبع مهمی برای تولید گامت‌های دیپلوئید در آبزیان خواهیم پرداخت.

### پلی‌پلوئیدی

پلی‌پلوئیدی در ماهیان و بی‌مهرگان آبی به طور

وجود دارد (Wang et al., 2020).

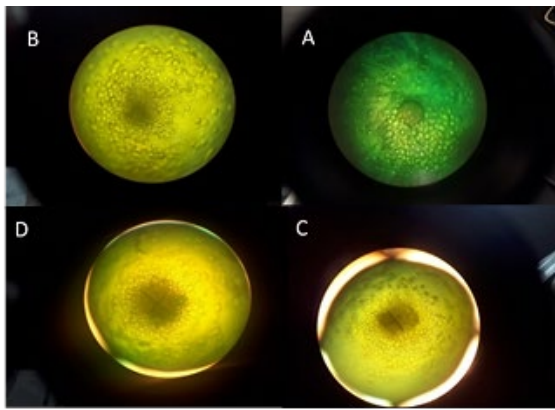
اعتقاد بر این است که تتراپلوئیدها توسط اندومیتوز کل ژنوم (تکثیر کروموزوم بدون سیتوکینز)، از طریق مهار چرخه سلولی میتوز (سرکوب اولین شیار تسهیم) القا شده‌اند. با این حال، در چنین دستکاری، به دست آوردن تعداد قابل قبولی از افراد تتراپلوئید بالغ زنده و بارور کاری بسیار دشوار است. تقریباً در همه موارد افراد تتراپلوئید در گروه‌های تیمار مورد تایید قرار گرفته‌اند، اما بیشتر نتاج در مرحله لاروی، انگشت قدی تلف شده و تعداد کمی از افراد تا مرحله بلوغ باقی می‌مانند. در برخی مطالعات نیز تلاقی تتراپلوئیدی منجر به تولید افراد تتراپلوئید نشده و نتاج حاصل، تریپلوئید، آنیوپلوئید و موزاییک خواهند بود (Alvarenga et al., 2020).

#### القای تتراپلوئیدی

تلاش‌های زیادی برای تعیین شرایط بهینه برای القای تتراپلوئیدی انجام شده است، موفقیت القای تتراپلوئیدی در آبزیان، تابع شرایط محیطی منطقه و ویژگی‌های والدین است و به دلیل اختلاف حساسیت در تخم‌ها، در بین نژادها و گونه‌های نزدیک، شوک‌های مختلفی اعمال می‌شود و نتایج مختلفی حتی برای یک گونه تاکنون ارائه شده است (Thorgaard, 1986). عواملی از جمله دما در شوک‌های سرمایی و گرمایی، قدرت در فشار هیدرواستاتیک، غلظت مواد شیمیایی، مدت زمان شوک دهی و زمان شروع و متوقف کردن عملیات شوک‌دهی نیز در القای تتراپلوئیدی مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین عوامل دیگری نظیر ویژگی‌های خاص هرگونه (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 و دمای شوک (Phillips et al., 1986) کیفیت گامت‌های مورد استفاده خصوصاً اندازه و درجه رسیدگی تخم‌ها و حساسیت‌های

در مقایسه با گروه شاهد توسط محققین مختلف بر گونه‌های مختلف آزادماهیان نظیر قزل‌آلای رنگین-کمان (Happe et al., 1988) گزارش شده است. به نظر می‌رسد که کاهش بازماندگی در گروه‌های تحت تیمار، عمدتاً به دلیل اثر دستکاری‌ها و اعمال شوک بر روی تخم‌های لقاح‌یافته بروز می‌کند و حالت تریپلوئیدی به خودی خود عامل مرگ‌آوری در ماهیان نیست (Dunham, 2011). جهت رفع این مشکل و دستیابی به افراد تریپلوئید، می‌توان از روش غیر مستقیم برای تولید ماهیان عقیم تریپلوئید استفاده کرد.

**تتراپلوئیدی:** تتراپلوئیدی (دارا بودن چهار سری کروموزوم در هر سلول) نوعی از پلی‌پلوئیدی در ماهیان است که روش تولید آن همانند تریپلوئیدی با استفاده از شوک‌های فیزیکی یا شیمیایی است. با این تفاوت که شوک دیر هنگام و در فاصله بعد از لقاح و قبل از تکمیل اولین تقسیم میتوزی سلول و تبدیل شدن به دو سلول است (Hershberger and Hostuttler, 2007). در تتراپلوئیدی نیز اعمال شوک فشار برای تولید افراد تتراپلوئید بهتر از سایر شوک‌ها است (Bury, 1989). در تولید افراد تتراپلوئید گاهی افراد موزاییک دارای سلول‌های 3N، 4N و 5N تولید شده است. این گامت‌ها کاربری و اهمیت ویژه‌ای دارند زیرا برنامه‌های مختلفی را برای دستکاری پلوئیدی ایجاد می‌کنند. به عنوان مثال از لقاح افراد تتراپلوئید و دیپلوئید افراد تریپلوئیدی ایجاد می‌شوند که عقیم هستند و این روش برای تولید انبوه آبزیان تریپلوئید با بازماندگی و درصد تریپلوئیدی مطلوب می‌توان استفاده کرد، به بیان دیگر تتراپلوئیدی می‌تواند یک منبع مهم در تولید ماهیان تریپلوئید کاملاً عقیم محسوب شود (Pandian and Koteeswaran, 1998). ماده‌زاده‌های دیپلوئید می‌توانند از تخم دیپلوئید و اسپرم اشعه دیده شده ایجاد گردند. همچنین از لقاح یک ماهی آلتوتتراپلوئید از یک گونه و ماهی دیپلوئید گونه دیگر امکان تولید هیبریدهای تریپلوئید عقیم



شکل ۱ - مراحل اولیه تقسیم سلول. A - لقاح انجام نشده، B - مرحله تک سلولی، C - تشکیل اولین تقسیم سلولی و تبدیل شدن به دوسلول و D تشکیل دومین تقسیم سلولی و تبدیل شدن به ۴ سلول. بزرگنمایی ۴X.

آن‌ها مشاهده می‌شود. در مرحله بعد تخم‌هایی که در حال انجام اولین تقسیم سلول بوده و شیار تسهیم در آن‌ها دیده می‌شود و سلول در حال تقسیم به دو قسمت مساوی است، قابل مشاهده هستند، این زمان برای بهینه‌سازی شوک از اهمیت بالایی برخوردار است. پس از آن تخم‌هایی که تقسیم سلولی اول را گذرانده وارد تقسیم سلولی دوم شده در حال تقسیم شدن به چهار سلول قابل مشاهده هستند.

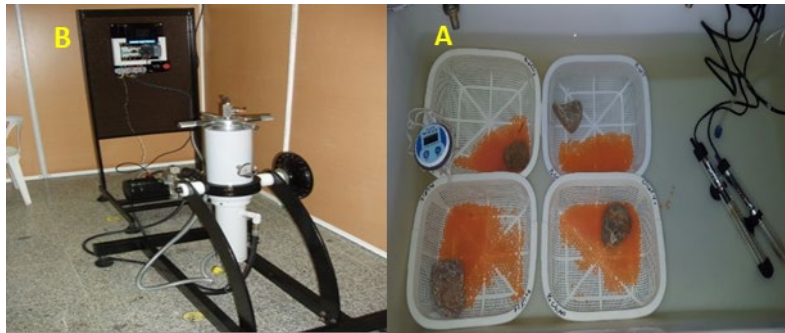
در تحقیقات متفاوت زمان اعمال شوک در قزل‌آلای رنگین‌کمان در دامنه ۵۵، ۶۰، ۶۵، ۶۷/۵، ۷۰ و ۷۵ درصد زمان FCI گزارش شده است که نتایج متفاوتی را در درصد القا پلوپیدی و بقا فراهم کرده است (Weber and Hostuttler, 2012). و همکاران برای القای تتراپلوپیدی در گونه‌های آزادماهی کوهو (*Oncorhynchus kisutch*) و آزاد ماهی اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) دو بازه زمانی ۷۵-۵۵ درصد FCI و ۱۱۰-۱۱۵ درصد FCI را پیشنهاد کردند (Myers et al., 1986). در تیلاپیای نیل اولین تقسیم سلولی در حدود ۹۰ دقیقه پس از لقاح در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد رخ می‌دهد و القای تتراپلوپیدی در دامنه ۶۲-۶۵ درصد FCI بررسی شده است (Alvarenga et al., 2020).

تولید افراد تتراپلوپید مستلزم سرکوب اولین تقسیم سلول است که با استفاده از شوک‌های فیزیکی

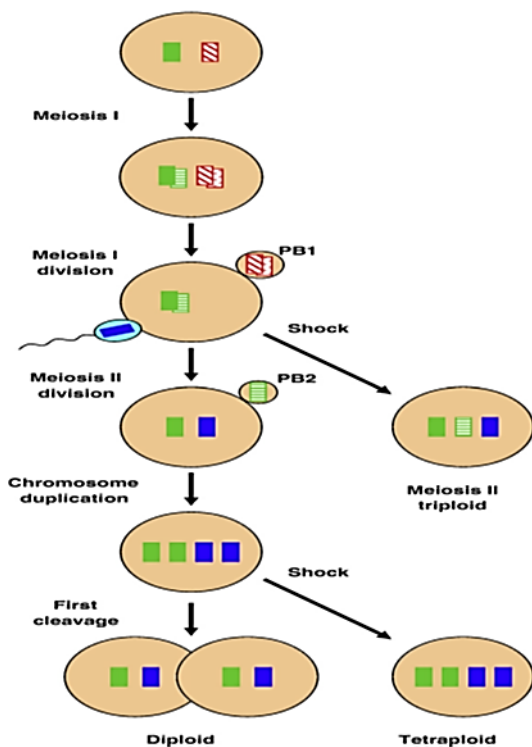
خاص هر نژاد یا جمعیت نسبت به شوک در بازه شوک موثر است. بهینه‌سازی شوک یک عملیات همراه با آزمون و خطا است و با توجه به تنوع فردی، در هر فرد دارای تفاوت است. علاوه بر این در یک جمعیت گامت یک فرد نیز همه افراد در مراحل تقسیم سلولی همزمان نیستند. بهینه‌سازی باعث تولید بیشترین افراد زنده با شماره کروموزومی مورد نظر می‌گردد. برای بهبود میزان موفقیت در تتراپلوپیدها، زمان آغاز تیمار شوک‌دهی اهمیت دارد و از شاخص FCI (فاصله زمانی تا تشکیل اولین تقسیم سلولی = First cleavage internal) استفاده می‌شود (Gomelsky, 2003; Hershberger and Hostuttler, 2007b).

**محاسبه زمان FCI:** در القای تتراپلوپیدی، زمان القای تیمار از اهمیت برخوردار است و این زمان براساس زمان اولین تقسیم میتوزی استوار است. زمان اعمال شوک در درصدی از فاصله زمانی اولین تقسیم سلولی در دمای مشخص انجام می‌شود. کاربرد شوک کمی پیش از اولین تقسیم میتوزی، که دلیل آن شکسته شدن رشته‌های اکتین و جلوگیری از تشکیل شیار تسهیم است، سیتوکینز نام دارد. کاربرد شوک در طول متافاز یا پیش از متافاز باعث جلوگیری از جداشدن کروموزوم‌های خواهری می‌شود که به آن کاریوکینز می‌گویند. این زمان در نژادهای مختلف، شرایط پرورشی متفاوت و در سال‌های مختلف در یک نژاد متفاوت است (Hershberger and Hostuttler 2007). به‌همین دلیل نتایج القای تتراپلوپیدی در گونه‌ها و نژادهای مختلف متفاوت است. جهت بررسی و آگاهی از زمان رخ داد اولین تقسیم سلولی، پس از لقاح تخم‌ها را مورد بررسی قرار داده و با گذشت زمان می‌توان تخم‌ها را در چهار مرحله تکاملی مشاهده کرد (شکل ۱).

تخم‌های لقاح نیافته که معمولاً قطرات چربی در آن‌ها دیده می‌شود و ژرمینال دیسک در آن‌ها تشکیل نشده است، در صورت انجام لقاح در مرحله اول تخم‌ها قبل از تقسیم میتوز بوده و ژرمینال دیسک در



شکل ۲ - مراحل اولیه تقسیم سلول. A - القای شوک حرارتی در قزل‌آلای رنگین‌کمان و B - دستگاه شوک هیدرواستاتیک.

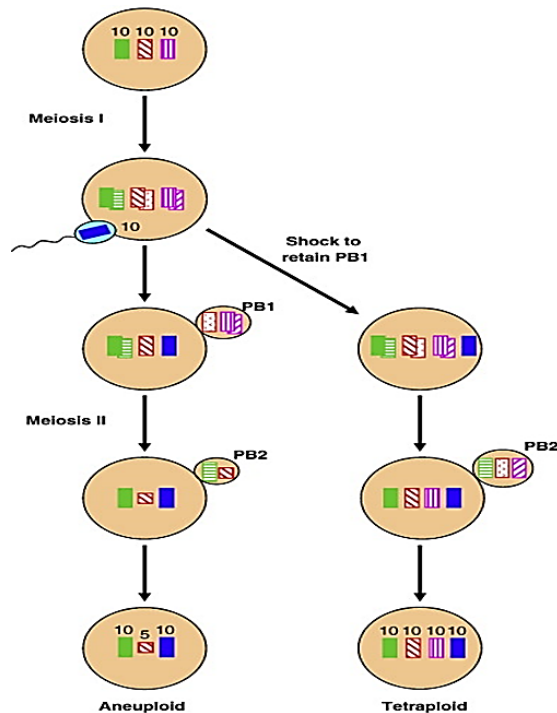


شکل ۳ - القای تریپلوئیدی و تتراپلوئیدی در ماهیان تخمک در مرحله متافاز میوز II رها شده، پس از لقاح با اسپرم، شوک‌های فیزیکی یا شیمیایی اعمال می‌شود. اگر شوک در مرحله میوز II باشد، منجر به تریپلوئیدی و اگر شوک در مرحله اولین تقسیم میتوز باشد، منجر به وقوع تتراپلوئیدی می‌شود (Piferrer *et al.*, 2009).

تغییر اندازه تخم، میزان بقا در گروه‌های آزمایش تغییر می‌کند و درصد القای تتراپلوئیدی در گروه تخمکی بالای ۵ میلی‌متر در محدوده ۱۸ تا ۶۹ درصد و در گروه تخمکی زیر ۵ میلی‌متر در گستره ۱۸ الی ۷۶ درصد گزارش شده است (درافشان و همکاران، ۱۳۹۳). در گونه *Danio rerio* نیز شوک گرمایی در بازه‌های زمانی متفاوت آزمایش شده و نتایج نشان داده است که در این گونه با اعمال ۲ دقیقه شوک

یا شیمیایی کوتاه‌مدت انجام می‌شود. بازده شوک‌های فیزیکی و شیمیایی به ندرت ۱۰۰ درصد بوده و نسبت تخم‌هایی که به این شوک پاسخ مثبت می‌دهند به عوامل مختلفی از جمله شدت شوک و مدت زمان اعمال شوک بستگی دارد. در میان شوک‌های فیزیکی، اجرای شوک‌های گرمایی و سرمایی آسان‌تر است که با افزایش یا کاهش ناگهانی دما در حدود ۵-۱۰ درجه‌سانتی‌گراد نسبت به دمای انکوباسیون اجرا می‌شود. از جمله شوک‌های فیزیکی دیگر که کاربرد گسترده‌ای دارد شوک فشار است (شکل ۲). در این روش تخم‌ها درون محفظه‌ای قرار گرفته و در معرض فشار تا حداکثر ۹۰۰۰ پوند بر اینچ مربع قرار می‌گیرند (کیوان شکوه و درافشان، ۱۳۹۶). استفاده از شوک فیزیکی در قزل‌آلای رنگین‌کمان (بهرامی باباحیدری و همکاران ۱۳۹۵)، *Apostichopus japonicas* (Ding *et al.*, 2007) و *Astyanax altiparanae* (Nascimento *et al.*, 2020) استفاده شده است. روش استاندارد استفاده از شوک‌های شیمیایی مانند سینتوکلازین (ب) در نرم‌تان (Stanley *et al.*, 1981) و ماهی‌ها (Hershberger and Hostuttler, 2007) به‌کاربرده شده است. این ماده مانع تشکیل میکروفلامنت‌ها و توسعه تقسیم سلولی می‌شود. ماده شیمیایی ۶- دی متیل آمینوپورین با خطرات کمتری نسبت به سینتوکلازین جهت القای پلوئیدی استفاده می‌شود (کیوان شکوه و درافشان، ۱۳۹۶).

شدت اعمال شوک در گونه‌های مختلف و حتی در یک گونه در نژادهای مختلف و در افراد مختلف متفاوت است. در قزل‌آلای رنگین‌کمان اندازه تخم با



شکل ۴ - القای تتراپلویدی در بی‌مهرگان آبزی. خروج هر دو گویچه قطبی در زمانهای مختلف بعد از لقاح سلول تخمک رخ خواهد داد (Piferrer et al., 2009).

تریپلوئید هم در تیمارهای آزمایش ایجاد شوند (Weber and Hostuttler, 2012). در این حالت باید با استفاده از روش مستقیم مشخص گردد که جنین‌های تولیدی قطعاً تتراپلوئید هستند.

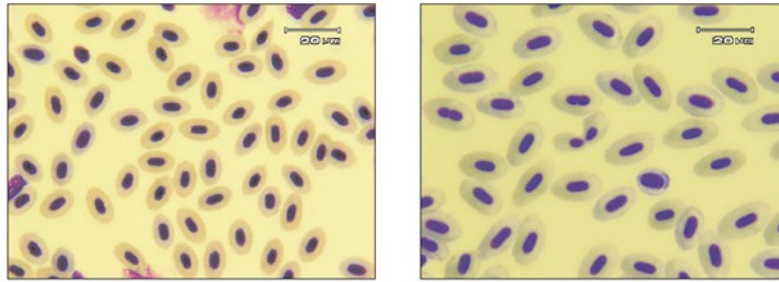
**سنجش ابعاد هسته و سلول:** اندازه‌گیری ابعاد سلول و هسته گلبول‌ها به عنوان شاخصی قابل استناد برای شناسایی ماهیان پلی‌پلوئید مورد استفاده قرار می‌گیرد و قادر به جداسازی افراد دیپلوئید، تریپلوئید و تتراپلوئید است. سلول‌های ماهیان پلی‌پلوئید به دلیل دارا بودن مقادیر بالاتر از مواد وراثتی در هسته خود، ابعاد بزرگتری نسبت به سلول‌های دیپلوئید دارند که این اندازه بسته به بافت و سن ماهی می‌تواند متغیر باشد (Pandian and Koteeswaran, 1998). اندازه‌گیری حجم و مساحت سلول‌ها و هسته سلول‌های خونی و یا سایر بافت‌ها روشی غیر مستقیم، ارزان، سریع و کاربردی است ولی در برخی موارد منجر به ازدست دادن نمونه می‌شود (شکل ۵). تاکنون اندازه‌گیری ابعاد گلبول‌های قرمز

گرمایی ۴۱ درجه سانتی‌گراد، امکان تولید افراد تتراپلوئید وجود دارد اما در مدت زمان ۵ دقیقه وجود ندارد (Herbst, 2002) (شکل ۳، القای تریپلوئیدی و تتراپلوئیدی در آبزیان).

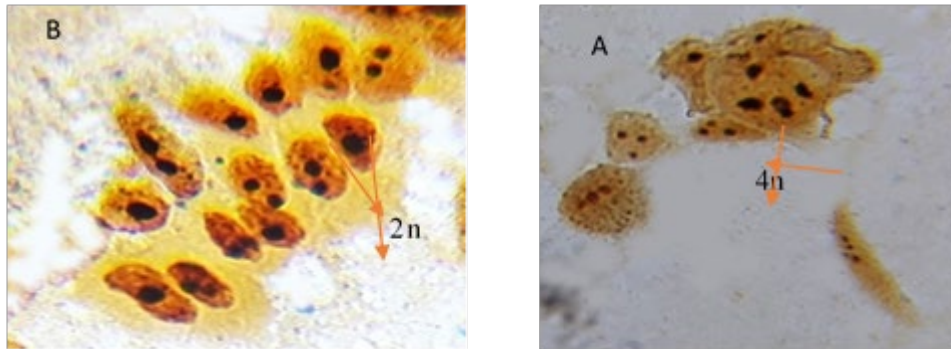
**تتراپلوئیدی در بی‌مهرگان آبزی:** برخلاف تتراپلوئیدی در ماهیان، القای تتراپلوئیدی در صدف با مهار اولین تقسیم میوز در تخم لقاح یافته افراد تریپلوئید موفقیت آمیز بوده است (Guo and Allen Jr, 1994). اویسترهای تریپلوئید تولید شده از لقاح بین تتراپلوئیدها و دیپلوئیدها در آبزی‌پروری به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند (Piferrer et al., 2009). تولید تتراپلوئیدها با استفاده از القای تخم‌های تریپلوئید همراه با مهار میوز I می‌تواند در مورد سایر گونه‌های نرم‌تنان نیز اجرا شود، اما استفاده عملی در مزارع تاکنون به اویستر محدود بوده است. روش‌های دیگری برای تولید صدف تتراپلوئید با مهار میوز I و II تا به حال بررسی شده است اما کاربردهای صنعتی نداشته‌اند. چگونگی القای تتراپلوئیدی در بی‌مهرگان آبزی در شکل ۴ به صورت شماتیک نشان داده شده است.

### بررسی صحت پلوئیدی

بازده تولید افراد پلی‌پلوئید با استفاده از شوک‌های فیزیکی یا شیمیایی به ندرت به صد در صد می‌رسد و در مورد القای تتریپلوئیدی این بازده کمتر است (کیوان شکوه و درافشان، ۱۳۹۶). روش‌های مختلفی برای تشخیص عدد پلوئیدی در آبزیان وجود دارد این روش‌ها به دو بخش اصلی تقسیم می‌شوند: روش‌های مستقیم (کاریولوژی، اندازه‌گیری حجم DNA، ریزماهورها و نقاط سازمان‌دهنده هستکی) و روش‌های غیر مستقیم (سنجش ابعاد هسته و سلول). در تولید افراد تتراپلوئید امکان تولید افراد موزاییک نیز وجود دارد، موزاییکی شدن بدین معناست میزان پلوئیدی در بافت‌های مختلف، متفاوت است، همچنین ممکن است القا شوک، صد در صد منجر به تولید افراد تتراپلوئید نشود و افراد دیپلوئید و



شکل ۵ - گلبول‌های قرمز در ماهیان دیپلوئید (A) و تتراپلوئید (B) قزل‌آلای رنگین کمان. ابعاد بزرگتر گلبول‌های قرمز در انواع تتراپلوئید در مقایسه با دیپلوئید بارز است (درافشان و همکاران ۱۳۹۳).



شکل ۶ - (A) نقاط سازمان‌دهنده هستکی در فرد تتراپلوئید، با حداکثر چهار نقطه، (B) نقاط سازمان‌دهنده هستکی در فرد دیپلوئید با یک و دو نقطه در قزل‌آلای رنگین کمان.

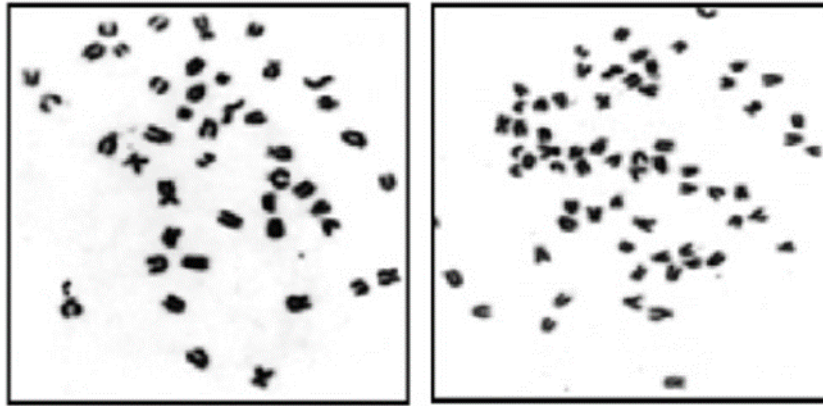
کروموزومی و شمارش مستقیم کروموزوم‌ها نیز از دقیق‌ترین روش سطح پلوئیدی است (شکل ۷). این روش پرزحمت و کند بوده و با استفاده از آن امکان ارزیابی تعداد زیاد نمونه وجود ندارد (Dunham, 2011). علاوه بر آن در این روش امکان شناسایی افراد موزاییک بسیار کم است.

**سنجش محتوای DNA:** سنجش محتوای DNA با استفاده از روش فلوسایتومتری یکی از مطمئن‌ترین روش‌ها برای سنجش صحت پلوئیدی است. از سویی سریع‌ترین روش استفاده از دستگاه فلوسایتومتر است. در این روش DNA سلول‌ها با استفاده از رنگ فلورسنت رنگ‌آمیزی می‌شود (Jr, 1983). میزان رنگ مربوط به DNA که توسط هسته سلول‌های یک نمونه جذب شده‌است، محاسبه می‌شود. نمایش هیستوگرام (شکل ۸)، توسط دستگاه امکان محاسبه نسبت افراد دیپلوئید به تریپلوئید یا با سطوح پلوئیدی دیگر را میسر می‌کند (کیوان شکوه و درافشان، ۱۳۹۶). این روش پرهزینه بوده و تهیه دستگاه فلوسایتومتر و هزینه‌های جانبی آماده‌سازی

برای تشخیص پلی‌پلوئیدی در مطالعات مختلفی گزارش شده است (درافشان و همکاران، ۱۳۹۳). علاوه بر ابعاد گلبول قرمز، در برخی از افراد تتراپلوئید شکل هسته گلبول تغییر کرده و به شکل، قطره‌ای، گرد و دمبلی شکل هستند (Hu et al., 2020).

**شمارش نقاط سازمان‌دهنده هستکی:** شمارش نقاط سازمان‌دهنده هستکی نوعی جایگزین ساده و ارزان برای سایر روش‌های تعیین صحت پلوئیدی است، که برای انواع مختلف ماهی کاربرد دارد (شکل ۶). در بسیاری از گونه‌ها با افزایش سطح پلوئیدی، تعداد هستک‌ها افزایش می‌یابد (Phillips et al., 1986). این روش شامل رنگ‌آمیزی سلول‌ها با استفاده از نیترات نقره و تعیین حداکثر تعداد هسته در سلول است. در این روش هر نوع بافتی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (Kim et al., 2017). از این روش برای شناسایی آمیخته‌های تریپلوئید کپور معمولی و کاراس (Crucian carp) نیز استفاده شده است (Cherfas and Ilyasova, 1980).

**شمارش تعداد کروموزوم‌ها:** تهیه گسترش

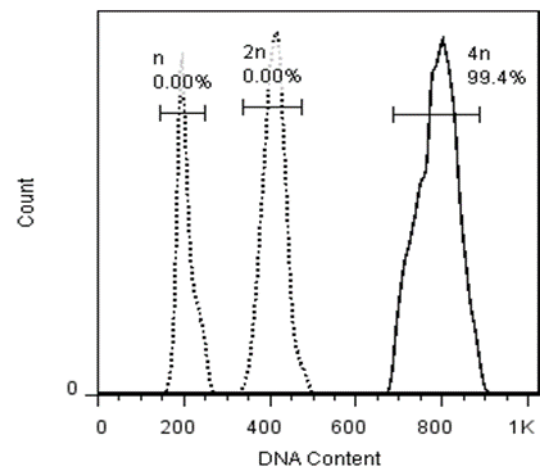


شکل ۷ - مقایسه تعداد کروموزوم در فرد دیپلوئید (A) و تتراپلوئید (B) (Piferrer et al., 2009).

قزل‌آلای قهوه‌ای (Sanz et al., 2020) مورد استفاده قرار گرفته است. نشانگرهای ریزماهواره با نمایش تعداد باندهای متفاوت در افراد دیپلوئید و پلی‌پلوئید منجر به شناسایی افراد از یکدیگر می‌شوند (شکل ۹).

#### عملکرد تتراپلوئیدها

**بازماندگی:** سطوح مختلف پلوئیدی بر بازماندگی لاروها در مراحل مختلف تاثیرگذار است به طوری که بازماندگی لاروها به دلیل استفاده از شوک‌های مختلف پایین آمده و باعث افزایش مرگ و میر در طی مراحل تکامل می‌شود. بقا در مرحله چشم‌زدگی در ماهیانی که تحت شوک‌دهی قرار می‌گیرند کمتر از تیمارهای شاهد است (Bahrami Babaheydari et al., 2016). هرچند القای تتراپلوئید در گونه‌های مختلفی از ماهی‌ها انجام شده ولی بازماندگی آن‌ها معمولاً اندک است. این مشکل عمدتاً در اثر عدم رعایت دوره زمانی صحیح روش‌های القاء پلوئیدی رخ می‌دهد (Zhang et al., 2005)، ضمن آن‌که مشکلات فیزیولوژیک تتراپلوئیدها نیز در این رابطه بسیار موثر هستند (Sakao et al., 2006). به نظر می‌رسد نرخ پایین بقا که در اثر دستکاری‌های تتراپلوئیدی رخ می‌دهد، احتمالاً ناشی از تقسیم سلول بدون تقسیم هسته، آنیوپلوئیدی یا موزاییکی شدن سلول‌ها باشد (Fujimoto et al., 2007). موفقیت القا پلی‌پلوئیدی در آبزیان، تابع شرایط

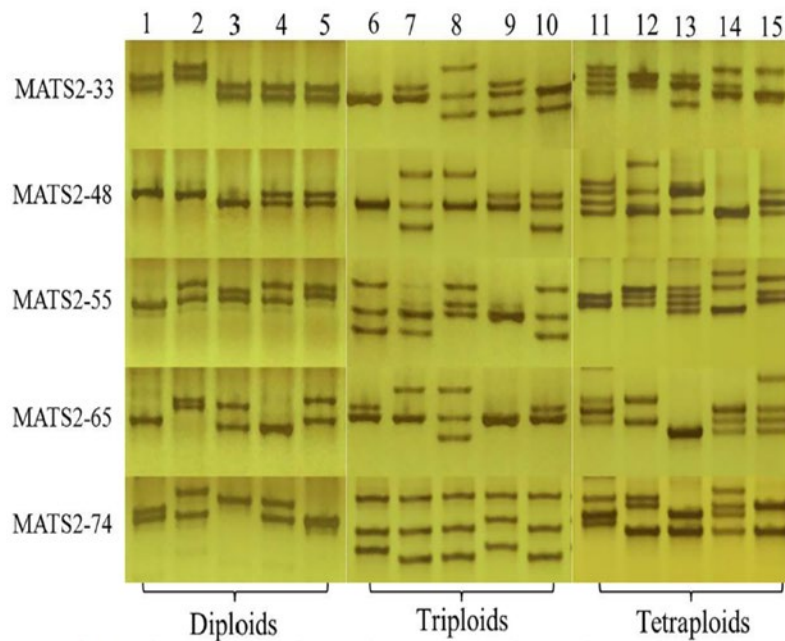


شکل ۸ - مقایسه حجم DNA در سلول هاپلوئید (اسپریم)، دیپلوئید و تتراپلوئید با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر.

نمونه استفاده از این روش را در بسیاری از مطالعات غیر امکان نموده است.

**نشانگرهای مولکولی:** استفاده از نشانگر ریزماهواره می‌تواند یکی از روش‌های شناسایی افراد پس از دستکاری کروموزومی باشد (Glover et al., 2016). این روش با تحلیل تعداد کروموزوم‌ها در بررسی سطح پلوئیدی در ماهیان خاوباری استفاده شده است (Fopp-Bayat and Woznicki, 2006). نشانگر ریزماهواره همچنین برای بررسی سطح پلوئیدی در گونه‌هایی مانند مولی (*Poecilia formosa*) (Lampert et al., 2006)، گلدفیش (*Carassius auratus*)، ماهی پهن (*Scophthalmus maximus*) (Tsumura et al., 1991) و ماهی آزاد اطلس (*Salmo salar*) (Glover et al., 2016) استفاده شده است.





شکل ۹ - نمایش باندهای حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در افراد دیپلوئید دارای یک یا دو باند، تریپلوئید دارای یک، دو یا سه باند و تتراپلوئید با حداقل ۱ و حداکثر ۴ باند در گونه *Misgurnus anguillicaudatus* (Feng et al., 2018).

پلی‌پلوئید مشاهده شود. زمان رخداد مراحل مختلف جنینی مانند یک سلولی و چند سلولی بلاستودرم در مرحله تسهیم؛ حلقه زاینده، کیل عصبی، تشکیل جوانه جنینی در مرحله گاسترولا و تشکیل چشم و باله در مرحله اندام‌زایی و مراحل مهم جنینی (نخستین تقسیم، بسته شدن بلاستوپور، چشم‌زدگی، تفریخ) در افراد دیپلوئید و تتراپلوئید و سایر گروه‌هایی که تحت تاثیر دستکاری کروموزومی قرار می‌گیرند، متفاوت است (Najafpour et al., 2019)، به‌طور معمول مدت زمان تکامل جنینی گروه‌های پلی‌پلوئید کوتاه‌تر از مابقی گروه‌ها است. گروه‌های تتراپلوئید قبل از گروه‌های تریپلوئید و دیپلوئید تفریخ می‌شوند (Myers et al., 1995). با افزایش سطح پلی‌پلوئیدی زمان نمو جنینی نیز سریع‌تر می‌شود، با این وجود، تنوع و تغییرات زمان تفریخ نیز در مورد ماهیان پلی‌پلوئید در مقایسه با نمونه‌های دیپلوئید، بیشتر است. در ماهیان دورگه تریپلوئید نمو جنینی سریع‌تر ماهیان دورگ دیپلوئید است، اما زمان تفریخ آن‌ها در مقایسه با ماهیان دورگ دیپلوئید یکنواخت‌تر است (Dunham, 2011). مطالعات اندکی در رابطه با نمو جنینی در گروه‌های تتراپلوئید

محیطی و ویژگی‌های والدین است و به دلیل اختلاف حساسیت در تخم‌ها، بین نژادها و گونه‌های نزدیک، شوک‌های مختلفی برای نتایج بهینه مورد استفاده قرار می‌گیرند. از این‌رو نتایج متفاوتی در این خصوص حتی برای یک گونه ارائه شده است (Weber and Hostuttler, 2012). زمان آغاز شوک‌دهی (زمان پس از لقاح)، دوره شوک‌دهی و دمای شوک از مهم‌ترین عوامل مؤثر در موفقیت شوک در جهت القای پلی‌پلوئیدی محسوب می‌گردند (Dunham, 2011). همچنین عوامل دیگری نظیر ویژگی‌های خاص هرگونه (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 و دمای شوک (Phillips et al., 1986)، کیفیت گامت‌های مورد استفاده خصوصاً اندازه تخمک (درفشان و همکاران، ۱۳۹۳)، و حساسیت‌های خاص هر نژاد یا جمعیت نسبت به شوک در بازده شوک مؤثر خواهند بود.

نمو جنینی: در اثر القای پلی‌پلوئیدی ممکن است برخی تفاوت‌ها در نمو جنینی در افراد دیپلوئید و

گنادهای بارور با قابلیت تولید اسپرم هاپلوئید هستند، گروه سوم افرادی که داری گنادهای بارور با قابلیت تولید اسپرم موزایک هستند و گروه چهارم افرادی که دارای قابلیت تولید اسپرم دیپلوئید هستند ( Nam and Kim, 2004). بررسی تکامل گناد در افراد نر و ماده در طی دوره پرورش می‌تواند اطلاعات مفیدی در مورد زمان بلوغ در ماهیان نر و ماده تتراپلوئید و اختلاف آن‌ها با گروه دیپلوئید و مراحل تکامل گناد در اختیار ما قرار دهد (Chourrout et al., 1986). مطالعات اندکی در ارتباط با تکامل گنای در افراد تتراپلوئید انجام شده‌است و یکی از چالش‌های فراروی تولید افراد تتراپلوئید محسوب می‌شود.

#### کاربرد تتراپلوئیدی

**نرزیایی بوسیله اسپرم دیپلوئید و لقاح *dispermic*:** القای تتراپلوئیدی با دستکاری کروموزوم‌ها بسیار دشوار است. با این حال، هنگامی که افراد تتراپلوئید خالص با موفقیت تولید می‌شوند، می‌توان از گامت‌های دیپلوئید برای دستکاری‌های پلوئیدی آینده استفاده کرد. هنگامی که اسپرم دیپلوئید با تخم قزل‌آلای رنگین کمان که در معرض اشعه گاما قرار گرفتند، تلقیح شوند، قابلیت تولید فرزندان دیپلوئید آندروژنیک را دارند. در گونه *M. anguillicaudatus* لقاح دیپلوئیدهای نر زاد به وسیله اسپرم‌های دیپلوئید از نرهای طبیعی و نرهای نئوتتراپلوئید ایجاد می‌شود (Fujimoto et al., 2010). نرهای نئوتتراپلوئید بوسیله مهار خروج دومین گویچه قطبی بعد از لقاح بین ماده دیپلوئید وحشی و نر تتراپلوئید طبیعی تولید می‌شوند. نرزادها با استفاده از اسپرم دیپلوئید بقای بهتری نسبت به هاپلوئیدهای مضاعف دارند. تیمارهای مضاعف کردن کروموزوم به طور عمده باعث کاهش بقا در هاپلوئیدهای مضاعف نر زاد می‌شود. بهترین بقا برای نتاج نر زاد و همچنین کاهش اثر مخرب هموزایگوسیتی برای بقا و رشد استفاده از اسپرم

صورت گرفته است، ولی به نظر می‌رسد با القای تتراپلوئیدی و به دلیل افزایش هموزایگوسیتی در ماهیان تتراپلوئید نسبت به ماهیان دیپلوئید، زمان تفریح در ماهیان تتراپلوئید نیز یکنواخت‌تر است. **رشد:** مطالعات متفاوتی در ارتباط با رشد در بین گروه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید صورت گرفته است، در ماهی لوچ (*Misgurnus mizolepis*) میزان رشد در گروه تتراپلوئید به طور قابل ملاحظه‌ای (۲۳ درصد) کمتر از گروه دیپلوئید است (Nam et al., 2001). کاهش رشد در گروه تتراپلوئید در مقابل گروه دیپلوئید قزل‌آلای رنگین کمان را نیز گزارش شده است (Chourrout et al., 1986). از سوی دیگر رشد مشابه در بین گروه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید قزل‌آلای رنگین کمان نیز گزارش شده و بیان گردیده که رشد در تتراپلوئیدها متأثر از خصوصیات ژنتیکی و کیفیت تخم است.

حتی در موفق‌ترین موارد میزان رشد ماهیان تتراپلوئید بسیار پایین‌تر از ماهیان دیپلوئید گروه شاهد بوده‌اند (تقریباً ۴۰ درصد گروه شاهد). چنین رشد کاهشی ممکن است مربوط به اثرات مضر وضعیت پلوئیدی بالاتر باشد. در ماهی لوچ که تتراپلوئیدی خود به خودی وجود دارد، در ماهی دیپلوئید و تتراپلوئید که از نظر ژنتیکی یکسان بودند، تتراپلوئیدها به طور قابل توجهی کوچکتر از دیپلوئیدها بودند. در ماهیانی که تتراپلوئیدی به طور موفقیت آمیز رخ داده است، مشکلات نه تنها در بقا و رشد بلکه در ظرفیت تولیدمثلی نیز رخ داده است.

**تولیدمثلی:** در قزل‌آلای رنگین کمان نرهای تتراپلوئید از نظر جنسی بالغ شده و تولید اسپرم می‌کنند. در *M. mizolepis* از میان ۴۸ فرد نر تتراپلوئید، تنها سه فرد قادر به تولید اسپرم دیپلوئید بوده و این سه فرد در تولید جمعیت تریپلوئید غیرالقایی استفاده شده است. براساس این مطالعه ماهیان نر تتراپلوئید از نظر تکامل گنای می‌توانند در چهار دسته قرار گیرند، دسته اول افرادی که دارای گنادهای کوچک و غیرکارآمد هستند، گروه دوم افرادی که دارای

مطالعات دیگر نشان داده است که تریپلوئیدهای غیرالقایی عملکرد بهتر در رشد و احتمالاً مقاومت در برابر بیماری را در مقایسه با تریپلوئیدهای القا شده دارند (Weber and Hostuttler, 2012; Weber *et al.*, 2015).

### جمع بندی

القای تریپلوئیدی، برای تولید افراد عقیم و کنترل بیولوژیکی و جلوگیری از انتشار گونه‌های غیربومی و افزایش رشد، قابلیت اجرا دارد. تولید افراد تریپلوئید به دو روش مستقیم و غیر مستقیم نیازمند امکان پذیر است، که در روش غیرمستقیم نیازمند جمعیت مولد تریپلوئید هستیم. تولید ماهیان تریپلوئید به منظور استفاده از آنها در ایجاد گله‌های تریپلوئید عقیم به روش غیر القایی جهت معرفی آنها به سامانه‌های پرورشی دارای اهمیت است. بقای پایین نتاج تریپلوئید از مشکلات این تولیدات محسوب می‌شود، ولی چون برای ایجاد جمعیت مولد نیاز به تعداد زیاد افراد تریپلوئید نیست، با بقا پایین نیز می‌توان جمعیت مورد نیاز را تولید نمود. با توجه به مطالعات صورت گرفته به نظر می‌رسد که آبزبان تریپلوئید در رشد و صفات فیزیولوژیک رفتار متفاوتی را نسبت به افراد دیپلوئید نشان دهند، با این حال مطالعات جامعی در ارتباط با تکامل گنادی و تولید مثل تریپلوئیدها و پارامترهای خون‌شناسی انجام نشده است و این موضوع از چالش‌های فراروی القای تریپلوئیدی است. در آبزبان با توجه به سیستم تعیین جنسیت از تلاقی افراد نر و ماده دیپلوئید و تریپلوئید، نتاج با نسبت‌های جنسی مختلف ایجاد خواهد شد و با توجه به اینکه در بسیاری از گونه‌ها از جمله آزادماهیان و کپورماهیان رشد در جنس ماده بیشتر از جنس نر است استفاده از سایر مکانیسم‌ها از جمله به‌کارگیری تغییرجنسیت هورمونی همراه با القای تریپلوئیدی می‌تواند به دستیابی جمعیت‌های تک جنس منجر شود که برای پرورش از اهمیت زیادی برخوردار است.

دیپلوئید است (Arai and Fujimoto, 2018).  
**تولید جمعیت‌های تریپلوئید عقیم:** با وجود بازماندگی اندک در ماهیان تریپلوئید، افرادی قادر به حفظ بقا هستند به بلوغ جنسی می‌رسند، قادر به تولید گامت‌های زایا هستند. استفاده از ماهیان تریپلوئید ماده نسبت به ماهی تریپلوئید نر جهت تلاقی با ماهیان دیپلوئید و تولید ماهیان اینترپلوئید (تریپلوئید غیرالقایی)، معایبی دارد که می‌توان به تولید اندک تعداد سلول‌های جنسی ماده (تخمک) نسبت به تعداد سلول‌های جنسی نر (اسپرم) اشاره کرد، به‌علاوه نرهای تریپلوئید قزل‌آلای رنگین‌کمان گامت‌هایی تماماً دیپلوئید تولید می‌کنند در حالی که ماده‌های تریپلوئید اصولاً اوسیت‌های دیپلوئید با تعدادی اوسیت‌های تریپلوئید و تریپلوئید تولید می‌نمایند و ناهنجازی بیشتری را نشان می‌دهند (Chourrout and Nakayama, 1987).

درصد افراد تریپلوئید که از روش آمیزش بین افراد تریپلوئید و دیپلوئید ایجاد شده‌اند تا ۹۷ درصد گزارش شده است (Chourrout *et al.*, 1986). ماهیان تولید شده به روش غیر مستقیم، در معرض شوک‌دهی در القاء تریپلوئیدی قرار نمی‌گیرند و تریپلوئید مشتق شده از تریپلوئیدها مزایایی نسبت به القای تریپلوئیدی مستقیم دارد. تولیدات حاصل از آمیزش والدین دیپلوئید و تریپلوئید صددرصد تریپلوئید هستند (Devlin *et al.*, 2010) درحالی‌که وقوع تریپلوئیدی در روش القایی صددرصد نیست، علاوه بر این تریپلوئید حاصل شده از تریپلوئیدها دارای درجه هتروزیگوسیتی بالاتری نسبت به تریپلوئید ایجاد شده به وسیله شوک است. تریپلوئیدهای حاصل از تلاقی تریپلوئید و دیپلوئید مزایای برتری نسبت به تریپلوئیدهای میوزی و گروه شاهد در قزل‌آلای رنگین‌کمان داشتند (Myers *et al.*, 1995; Chourrout *et al.*, 1986). مولدین دیپلوئید و تریپلوئید مورد استفاده جهت تولید افراد تریپلوئید می‌تواند از بین ماهیان با صفات برتر انتخاب شوند (Hershberger and Hostuttler, 2007).

- Richardson). *Reproduction Nutrition Developpement* 20(3 A), 727-733.
- Chourrout D., Chevassus B., Krieg F., Happe A., Burger G., Renard P. 1986. Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females - potential of tetraploid fish. *Theoretical and Applied Genetics* 72(2), 193-206.
- Chourrout D., Nakayama I. 1987. Chromosome studies of progenies of tetraploid female rainbow trout. *Theoretical and Applied Genetics* 74(6), 687-692.
- Devlin R.H., Dionne S., Carlo A.B., Ki W.E. 2010. Occurrence of incomplete paternal-chromosome retention in gh-transgenic coho salmon being assessed for reproductive containment by pressure-shock-induced triploidy. *Aquaculture* 304(1-4), 66-78.
- Ding J., Yaqing C., Zichen W., Jian S. 2007. Polyploidy Induction by hydrostatic pressure shock and embryo development of sea cucumber *Apostichopus Japonicus*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 25(2), 184-90.
- Dunham R.A. 2011. *Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches: Second Edition Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches: Second Edition*. Cabi.
- Fopp-Bayat D., Pawel W. 2006. Verification of Ploidy Level in Sturgeon Larvae. *Aquaculture Research* 37(16), 1671-75.
- Fujimoto T., Yasui G.S., Hayakawa M., Sakao S., Yamaha E., Arai K. 2010. Reproductive capacity of neo-tetraploid loaches produced using diploid spermatozoa from a natural tetraploid male. *Aquaculture* 308, S133-S139.
- Fujimoto T., Sakao S., Yamaha E., Arai K. 2007. Evaluation of different doses of UV irradiation to loach eggs for genetic inactivation of the maternal genome. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 307(8), 449-462.
- Glover K.A., Bos J.B., Urdal K., Madhun A.S., Sørvik A.G.E., Unneland L., Seliussen B.B., Skaala O., Skilbrei O.T., Tang Y., Wennevik V. 2016. Genetic screening of farmed Atlantic salmon escapees demonstrates that triploid fish display reduced migration to freshwater. *Biological Invasions* 18(5), 1287-1294.
- منابع  
بهرامی باباحیدری ص.، کیوان شکوه س.، درافشان س.، جوهری الف. ۱۳۹۵. تاثیر القای تتراپلوئیدی بر تخم گشایی، بازماندگی، شاخص‌های رشد و ترکیب بیوشیمیایی لاشه قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). دامپزشکی ایران، ۱۷: ۲۳۱-۲۴۰.
- درافشان س.، وفایی سعدی ا.، نکویی فرد ع. ۱۳۹۳. بهترین شرایط شوک حرارتی برای القای تتراپلوئیدی در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، ۶۹ (۴): ۴۱۱-۴۲۱.
- کیوان شکوه س.، درافشان س. ۱۳۸۹. زیست‌فناوری و ژنتیک در شیلات و آبزی‌پروری، دانشگاه صنعتی اصفهان. ۱۹۱ص.
- Ara. K., Takafumi F. 2018. Chromosome manipulation techniques and applications to Aquaculture. *Sex Control in Aquaculture I*, 137-62.
- Bahrami Babaheydari S., Keyvanshokoo S., Dorafshan S., Johari S.A. 2016a. Effects of Tetraploidy induction on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) Proteome at Early Stages of Development. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics* 20, 57-64
- Bahrami Babaheydari S., Keyvanshokoo S., Dorafshan S., Johari S.A. 2016b. Proteome changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fertilized eggs as an effect of triploidization heat-shock treatment. *Animal Reproduction Science* 166(2015), 116-121.
- Bury D. 1989. Induction of polyploidy in percichthyid basses and ictalurid catfishes with hydrostatic pressure shocks.
- Cassani J.R., Caton W.E. 1986. Efficient production of triploid grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) utilizing hydrostatic pressure. *Aquaculture* 55(1), 43-50.
- Cherfas N.B., Ilyasova V.A. 1980. Induced Gynogenesis in Silver Crucian Carp and Carp Hybrids. *Genetika* 16(7): 1260-69.
- Chourrout D. 1980. Thermal induction of diploid gynogenesis and triploidy in the eggs of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*

- Myers J.M., Powell S.F., McAndrew B.J. 1995. Induction of tetraploidy in brown trout, *Salmo trutta* L., using hydrostatic pressure. *Aquaculture Research* 26(3), 229-232.
- Myers J.M., Hershberger W.K., Iwamoto R.N. 1986. The induction of tetraploidy in salmonids. *Journal of the World Aquaculture Society* 17(1-4), 1-7.
- Najafpour B., Dorafshan S., Paykan Heyrati F., Power D.M. 2019. Embryonic Development of the Endangered Caspian Brown Trout, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877). *Journal of Applied Ichthyology* 35(2), 473-79.
- Nam Y.K., Cho H.J., Cho Y.S., Noh J.K., Kim C.G., Kim D.S. 2001. Accelerated growth, gigantism and likely sterility in autotransgenic triploid mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Journal of the World Aquaculture Society* 32(4), 353-363.
- Nam Y.K., Kim D.S. 2004. Ploidy status of progeny from the crosses between tetraploid males and diploid females in mud loach (*Misgurnus mizolepis*). *Aquaculture* 236(1-4), 575-582.
- Nascimento N.F., Pereira-Santos M., Levy-Pereira N., Monzani P.S., Niedzielski D., Fujimoto T., Senhorini J.A., Nakaghi. L.S.O., Yasui G.S. 2020. High percentages of larval tetraploids in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* induced by heat-shock: The first case in *Neotropical characins*. *Aquaculture* 734938.
- Pandian T.J., Koteeswaran R. 1998. Ploidy Induction and Sex Control in Fish. *Hydrobiologia* 384(1-3), 167-243.
- Phillips R.B., Zajicek K.D., Ihssen P.E., Johnson O. 1986. Application of silver staining to the identification of triploid fish cells. *Aquaculture* 54(4), 313-319
- Piferrer F., Beaumont A., Falguière J.C., Flajshans M., Haffray P., Colombo L. 2009. Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture* 293(3-4), 125-156.
- Sakao S., Fujimoto T., Kimura S., Yamaha E., Arai K. 2006. Drastic mortality in tetraploid induction results from the elevation of ploidy in masu salmon *Oncorhynchus masou*. *Aquaculture* 252(2-4), 147-160.
- Sanz. N.; Nebot, A.; & Araguas, R.M. 2020. Gomelsky B. 2003. Chromosome set manipulation and sex control in common carp: A review. *Aquatic Living Resources* 16(5), 408-415.
- Guo X., Allen Jr S.K. 1994. Viable tetraploids in the pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body 1 in eggs. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(1), 42-50.
- Happe A., Edwige Q., Chevassus B. 1988. Early life history of triploid rainbow. *Aquaculture* 71(1-2), 107-118.
- Herbst, E.C., 2002. Induction of Tetraploidy in Zebrafish *Danio rerio* and Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. (August): 127.
- Hershberger W.K., Hostuttler M.A. 2007a. Protocols for More Effective Induction of Tetraploid Rainbow Trout. *North American Journal of Aquaculture* 69(4), 367-72.
- Hershberger W.K., Hostuttler M.A. 2007b. Variation in time to first cleavage in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* embryos: A major factor in induction of tetraploids. *Journal of the World Aquaculture Society* 36(1), 96-102.
- Hu F., Fan J., Qin Q., Huo Y., Wang Y., Wu C., Liu Q., Li W., Chen X., Liu C. 2019. The sterility of allotriploid fish and fertility of female autotriploid fish. *Frontiers in Genetics* 10, 1-10.
- Hussain M.G. 1998. Manipulation of Chromosomes in Fish: Review of Various Techniques and Their Implications in Aquaculture. *Bangladesh Journal of Fisheries Research* 2(1), 99-108.
- Standish K., Allen JR. 1983. Flow cytometry: and shellfish assaying experimental polyploid fish the procedure must be non-lethal and preferably rapid. Our laboratory to the animal and success in identifying ploidy has been flow cytometry. Fluorescent Dye Followed by the Quantifi 33, 317-28.
- Kim H.S., Ki H.Ch., Jung H.S. 2017. Comparison of Different Ploidy Detection Methods in *Oncorhynchus mykiss*, the Rainbow Trout. *Fisheries and Aquatic Sciences* 20(1), 1-7.
- Lampert K.P., Lamatsch D.K., Schories S., Hopf A., De Leon F.J.G., Scharlt M. 2006. Microsatellites for the gynogenetic Amazon molly, *Poecilia formosa*: useful tools for detection of mutation rate, ploidy determination and overall genetic diversity. *Journal of Genetics* 85(1), 67-71

embryos treated with heat or hydrostatic pressure shock during the first cell cycle. *Fisheries Science* 71(1), 239-241.

Microsatellites as a good approach for detecting triploidy in brown trout hatchery stocks. *Aquaculture* 523, 735218.

- Sourinezhad I., Kalbassi M., Soltan Karimi S. 2007. Effect of triploidy induction on some hematological indices changes in all-female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in winter. *Modern Genetics Journal* 2(2), 51-58.
- Stanley J.G., Standish K., Allen Jr., Hidu H. 1981. Polyploidy Induced in the American Oyster, *Crassostrea virginica*, with Cytochalasin B. *Aquaculture* 23(1-4), 1-10.
- Thorgaard G.H. 1983. Chromosome Set Manipulation and Sex Control in Fish. *Fish Physiology* 9, 405-434.
- Thorgaard G.H. 1986. Ploidy Manipulation and Performance. *Aquaculture* 57(1-4): 57-64.
- Thorgaard G.H., Jazwin M.E., Stier A.R. 1981. Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout. *Transactions of the American Fisheries Society* 110(4), 546-550.
- Tsumura K., Blann V.E., Lamont C.A. 1991. Progeny test of masculinized female rainbow trout having functional gonoducts. *The Progressive Fish-Culturist* 53(1), 45-47.
- Wang Y., Zhang M., Tao S., Xie X., Tan, H., Cao L., Wang J., Qin Q., Zhang C., Tao M., Ma M., Chen B., Liu S. 2020. Unreduced diploid sperm from diploid hybrids and formation of a new type of tetraploid hybrid. *Aquaculture* 515, 734584.
- Weber G.M., Hostuttler M.A. 2012. Factors affecting the first cleavage interval and effects of parental generation on tetraploid production in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 344, 231-238.
- Weber G.M., Hostuttler M.A., Semmens K.J., Beers B.A. 2015. Induction and viability of tetraploids in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 72(10), 1443-1449.
- Yasui G.S., Fujimoto T., Arai K. 2010. Restoration of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, from cryopreserved diploid sperm and induced androgenesis. *Aquaculture* 308, S140-S144.
- Zhang X., Mutsukawa K., Onozato H. 2005. Correlation between delay in the earlier cleavage stage and the tetraploidization rate in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*

## Review Article

### **Tetraploidy in aquatics; reasons, induction and identification methods and physiological effects**

**Salar Dorafshan<sup>\*1</sup>, Hajar Sadat Tabatabai Pozveh<sup>1</sup>, Fatemeh Paykan Heyrati<sup>1</sup>, Majid Talebi<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, 84156-83111, Iran.

<sup>2</sup>Department of Biotechnology, Collage of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, 84156-83111, Iran.

\*Corresponding author: sdorafshan@cc.iut.ac.ir

Received: 2020/7/11

Accepted: 2021/3/15

#### **Abstract**

Nowadays, chromosome manipulation of different aquatics is a useful method in improving their genetic characteristics. Tetraploids have four sets of chromosomes in each cell. Tetraploids are one of the most effective methods for producing broodstocks which can be used in androgenesis, gynogenesis as well as is an economical way to produce non-induced triploid populations. Induction of tetraploidy in aquatics are usually done by late physical or chemical shocks, after fertilization and before the first mitotic division of the egg, cleavage. These aquatics are able to produce diploid gametes that can be used to achieve higher levels of ploidy. Survival, growth, and other physiological parameters in tetraploid are different from diploid ones. The percentage of tetraploid induction varies in different individuals and is affected by environmental and shock conditions as well as genetic characteristics. In this article, we will review the mechanism of tetraploid induction, methods of production, application, detection of ploidy levels and performance of tetraploids.

**Keywords:** Tetraploid, Late shock, Mitosis division, Physiological effects.