Archive of SID

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
جلد سیزدهم، شماره چهارم، مهر – آبان ۱۳۸۵
www.magiran.com/jasnr

القاء ماده‌زایی میوزی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* با تأکید بر تعیین زمان خروج گویچه قطبی دوم

امیرحسین اسماعیلی[۱]، *محمدرضا کلباسی[۱] و ایرج پوستی[۲]

[۱]به‌ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد و استادیار گروه شیلات دانشگاه تربیت مدرس، [۳]استاد دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات **تهران**

تاریخ دریافت: ۸۳/۸/۱۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۸٤/۱۱/۵

چکیده

به منظور ایجاد ماده‌زایی میوزی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss*، ژنوم اسپرم با استفاده از تابش ماوراء بنفش (۱۰۰۵۰ میلی‌وات بر مترمربع) تخریب و پس از لقاح این اسپرم با تخمک‌های سالم، با استفاده از شوک حرارتی (۰/۵±۲۸ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۱۵ دقیقه، حالت دیپلوییدی به تخم‌های لقاح یافته هاپلویید برگردانده شد. در ماده‌زایی میوزی از شوک زود هنگام در زمان‌های ۵،۱۰،۱۵،۲۰، ۲۵،۳۰، ۳۵،٤۰، ٤۵ و ۵۰ دقیقه بعد از لقاح استفاده گردید. پرتو ماوراء بنفش از یکدستگاه لامپ ۱۵UV وات با حداکثر شدت در طول موج ۲۵٤ نانومتر تأمین گردید. اسپرم قبل از پرتودهی در محلول رقیق‌کننده قرار گرفت و پرتودهی به مدت ۱۰ دقیقه برروی همزن مغناطیسی انجام گرفت. در این تحقیق از ویژگی زالی ماهیان, به‌عنوان نشانگر فنوتیپی تشخیص ماهیان ماده‌زاد استفاده شد. همچنین گسترش‌های کروموزومی تهیه شده از ماده‌زادها، دیپلوییدبودن آنها را تأیید کرد. نتایج نهایی موید آن است که بهترین عملکرد از نظر بازده ماده‌زایی, از تیمارهای حاصل از شوک گرمایی ۵۰ و ۳۵ دقیقه بعد از لقاح حاصل گردیده است.

واژه‌های کلیدی: ماده‌زایی میوزی، زمان خروج گویچه قطبی، پرتو ماوراء بنفش، قزل آلای رنگین کمان

مقدمه

مهندسی ژنتیک و تکنیک‌های دستکاری کروموزومی روش‌های کارآمد و مناسبی در جهت بهبود وضعیت ژنتیکی ماهیان و تولید جمعیت‌های تک جنس و عقیم هستند (تاکامی و همکاران،۱۳۸۰؛ کمانگر، ۱۳۷۹). در برخی موارد که یکی از جنس‌ها جهت پرورش مناسبتر از جنس دیگر است، تولید ماهیان تک جنس حائز اهمیت می‌باشد (گرگولتز، ۲۰۰۱؛ پردام، ۱۹۹۳). یکی از روش‌های تولید ماهیان تک جنس ماده, ایجاد ماده‌زایی با استفاده از پرتودهی بر مواد تناسلی جنس نر است که در این روش ساختار ژنتیکی جنس نر تخریب گردیده و مواد وراثتی کاملاً از جنس ماده به ارث رسیده و تمامی ماهیان ماده می‌شوند (پردام، ۱۹۹۳).

ماده‌زایی در ماهیان و سایر آبزیان مانند صدف‌ها، روش سریعی برای ایجاد همخونی و دودمان‌های خالص یا لاین‌های هموزیگوت است و از طرفی روش مناسبی برای حفظ لاین‌های بوجود آمده در فرآیند اصلاح نژاد می‌باشد (پالتی و همکاران، ۱۹۹۷).

* – مسئول مکاتبه: kalbassi_m@modares.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

در این روش فعالیت و تقسیم تخمک، توسط اسپرمی که از نظر ژنتیکی غیرفعال بوده و تنها واجد حرکات فیزیکی است، القا می‌شود و کاربردی‌ترین تکنیک برای این منظور اشعه UV می‌باشد, اگرچه استفاده از اشعه گاما نیز موفقیت آمیز بوده است. در این وضعیت تخمک‌های تحریک شده توسط اسپرم اشعه دیده تخم‌های هاپلوئیدی تولید می‌کنند که در ادامه مراحل تکاملی از بین می‌رود، در این راستا دیپلوئید کردن تخم‌های حاصل جهت تکوین نهایی لاروها ضروری و به دو روش امکان‌پذیر است:

۱-احتباس گویچه قطبی دوم با استفاده از شوک‌های زودهنگام که منجر به تولید ماهیان ماده‌زاد هموزیگوت (میوزی) می‌گردد.

۲-سرکوب اولین تقسیم جنینی با استفاده از شوک‌های دیرهنگام که منجر به تولید ماهیان ماده زاد هتروزیگوت (میتوزی) می‌گردد.

در موارد مذکور دیپلوئید نمودن تخم‌ها با استفاده از یکی از انواع شوک‌های فشار، دما و یا شیمیایی انجام می‌پذیرد.

از آنجا که مسلما شرایط اقلیمی و وضعیت نژادهای ماهیان بر بهینه‌سازی شرایط ایجاد ماهیان ماده‌زاد مؤثر است, در این تحقیق تلاش گردید شرایط مذکور با تأکید بر تعیین مناسب‌ترین زمان خروج گویچه قطبی (در القا ماده‌زایی میوزی) با استفاده از تیمارهای متفاوت و کاربرد شوک‌های دمایی, بهینه سازی گردد.

مواد و روش‌ها

مولدین وشاخص تشخیص ماده‌زادها: با توجه به انتخاب نشانگر رنگ جهت تشخیص ماهیان ماده‌زاد در این تحقیق از ۷ مولد ماده زال با میانگین سن ٤-۳ سال، متوسط طول استاندارد ۵۰ سانتی‌متر و میانگین وزن ۲/۵۰۰ کیلوگرم استفاده شد. مولدین نر ۳-۲ ساله نیز به تعداد ٦ عدد از بین مولدین رنگ طبیعی کارگاه تکثیر و پرورش آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت بررسی و انتخاب گردیدند.

پرتودهی و رقیق‌سازی اسپرم و لقاح با تخمک: در این آزمایش از دو نوع محلول رقیق‌کننده و تقویت‌کننده با ترکیبات زیر استفاده گردید:

محلول رقیق‌کننده: ۰/۲٪ KCl، ۰/۵۵۲٪ NaCl، ۰/۲٤۲٪ Tris و ۰/۳۷۵٪ Glycin (شاروت و کوئیلت۱۹۸۲)

محلول تقویت‌کننده اسپرم (لقاح): ۰/۹٪NaCl ، M ۰/۰۱ Tris و M ۰/۰۱ Glycin (بیلارد و همکاران، ۱۹۷٤)

اسپرم مولدین به‌صورت کاملاً خشک در ظروف تیره، جمع‌آوری گردید و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد (یخچال) قرار داده شد و پس از مطالعه میکروسکوپی کیفیت (تراکم، میزان و مدت تحرک اسپرم)، با محلول رقیق‌کننده به نسبت ۱:۹ ترکیب و در معرض اشعه قرار داده شد. در این خصوص از یک دستگاه لامپ ۱۵UV وات میکروب‌کش استفاده گردید و جهت تعیین حداکثر تابش و شدت پرتو در طول موج مورد نظر، به مرکز امور حفاظت در برابر اشعه کشور بخش پرتوهای غیریون‌ساز سازمان انرژی اتمی ایران مراجعه و سنجش‌های لازم انجام پذیرفت. براساس گزارش این مرکز، در فاصله ٤۵ سانتی‌متری از لامپ مورد نظر، شدت پرتو ماوراءبنفش در محدوده طول موج ۲۰۰ تا ٤۰۰ نانومتر معادل ۲۰۲۷ میلی‌وات برمترمربع و در محدوده‌ی طول موج ۲۰۰ تا ۲۸۰ نانومتر معادل ۱۹۵۹ میلی‌وات بر مترمربع تعیین گردید. مقادیر شدت پرتو در طول موج ۲۵٤ نانومتر در فواصل مورد اندازه‌گیری به شرح جدول ۱ می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- شدت پرتو ماوراء بنفش لامپ UV ۱۵ وات مورد استفاده در تحقیق در فواصل مختلف (بر اساس سنجش مرکـز امـور حفاظـت در برابر اشعه سازمان انرژی اتمی ایران- بخش پرتوهای غیریونساز).

فاصله از لامپ (سانتی‌متر)	۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵	۴۰	۴۵	۵۰	۱۰۰
شدت پرتو (میلی‌وات بر مترمربع)	۱۰۰۵۰	۵۷۲۰	۳۹۵۶/۵	۲۹۶۵	۲۲۶۰	۱۰۷۶	۸۱۵	۷۰۷/۵	۱۷۴/۷

با توجه به دامنه نسبتاً وسیع شدت پرتوهایی که توسط محققین مختلف به منظور تخریب ژنوم اسپرم قزل‌آلای رنگین کمان مورد استفاده قرار گرفته (پالتی و همکاران، ۱۹۹۷؛ کاستروپ و هرلیک، ۱۹۸۷) و با توجه به توانایی لامپ تهیه شده، شدت پرتو انتخاب شده در این تحقیق ۱۰۰۵۰ میلی وات بر مترمربع در کف پتری‌دیش حاوی اسپرم در نظر گرفته شد که این شدت با توجه به جدول مذکور در فاصله‌ی ۵ سانتی‌متری از این لامپ ایجاد می‌گردد. غلظت اسپرم در هنگام تیمار اشعه‌دهی ۱۰ درصد در نظر گرفته شد. به منظور غیرفعال‌سازی ژنتیکی، اسپرم رقیق شده برروی همزن مغناطیسی و در زیر لامپ UV به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. اسپرم با ضخامت ۰/۶۵ میلی‌متر در معرض اشعه قرار داده شد و از آنجا که استفاده از پرتو UV منجر به ایجاد حرارت می‌گردید، به منظور همگن‌سازی دما در طول آزمایش برروی همزن، سینی حاوی قطعات خرد شده یخ قرار گرفت.

لقاح و اعمال شوک حرارتی: لقاح تخمک و اسپرم مولدین براساس روش معمول در کارگاه تکثیر (روش نیمه خشک) انجام پذیرفت. در این خصوص پس از لقاح گامتها بجای استفاده از آب جهت افزایش مدت زمان تحرک اسپرم‌ها از محلول تقویت کننده اسپرم (بیلارد و همکاران، ۱۹۷۴) استفاده گردید. پس از لقاح و به منظور بازگرداندن حالت دیپلوئیدی به تخم‌های لقاح یافته از شوک گرمایی استفاده شد. در این خصوص ابتدا تخم‌های تیمارهای مختلف به سبدهای پلاستیکی دسته‌دار منتقل و شوک‌های زود هنگام براساس جدول ۲ بر روی آنها اعمال شد. در طول مدت شوک‌دهی جریان هوا به منظور گردش آب درون آکواریوم برقرار بود. دمای شوک‌دهی در این آزمایش ۲۸ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان شوک‌دهی ۱۵ دقیقه در نظر گرفته شد. (کلباسی، ۱۳۷۲؛ باقری و همکاران، ۱۳۸۰؛ کوئیلت و همکاران، ۱۹۸۸). برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شده بود. در مجموع کلیه تیمارهای مختلف در این آزمایش در جدول ۳ ارائه گردیده است. پس از طی مراحل مذکور تخم‌های تیمار یافته برای گذراندن مراحل تکامل جنینی به‌صورت تصادفی به انکوباتورهایی که از پیش تقسیم‌بندی شده بود، انتقال داده شدند.

تهیه گسترش کروموزومی: به منظور تایید تشخیص بازگشت حالت دیپلوئیدی به تخم‌ها پس از اعمال شوک دهی، در هفته آخر پرورش از ۱۰ عدد از بچه ماهیان هر تیمار به‌صورت تصادفی نمونه‌برداری و در آزمایشگاه شیلات دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور نسبت به تهیه گسترش کروموزومی اقدام گردید (کلباسی، ۱۳۸۰). در این خصوص لاروها در محلول کلشی سین ۰/۰۵ درصد به مدت ۱۴ ساعت غوطه‌ور شدند. سپس از لاروهای مذکور گسترش تهیه و تعداد کروموزوم در هر گسترش تعیین گردید. در این خصوص برروی هر لام حداقل ۱۰ توده کروموزومی مورد شمارش و بررسی قرار گرفت.

روش پردازش آماری داده‌ها: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزارهای EXCEL و SPSS و از آنالیز واریانس یک طرفه[1] (one way Anova) استفاده گردید. مقایسه میانگین تیمارها به کمک آزمون Tukey صورت گرفت و وجود یا عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد ($P = 0.05$) تعیین گردید.

1- One way anova

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- خصوصیات تیمارها و شاهدهای مختلف در القا مادهزایی در قزلآلای رنگین کمان و نتاج (نسل F1) حاصل.

♂ نر طبیعی / ماده زال♀	اسپرم اشعه دیده	اسپرم نرمال
تخمک معمولی (تیمار نشده)	شاهد اول (هاپلوئید)	شاهد دوم (دیپلوئید و ابرش)
تخمک به همراه شوک زودهنگام	ماده زاد میوزی (دیپلوئید و زال)	شاهد سوم (تریپلوئید)

جدول ۲- خصوصیات تیمارهای شوک حرارتی زودهنگام (میوزی) به منظور بازگرداندن حالت دیپلوئیدی به تخمهای لقاح یافته.

شماره تیمار	زمان شوک دهی پس از لقاح		مدت زمان شوکدهی (دقیقه)	دمای شوکدهی (درجهسانتیگراد)
	دقیقه	درجه – دقیقه		
۱	۵	٤۰	۱۵	۲۸±۰/۵
۲	۱۰	۸۰	۱۵	۲۸±۰/۵
۳	۱۵	۱۲۰	۱۵	۲۸±۰/۵
٤	۲۰	۱٦۰	۱۵	۲۸±۰/۵
۵	۲۵	۲۰۰	۱۵	۲۸±۰/۵
٦	۳۰	۲٤۰	۱۵	۲۸±۰/۵
۷	۳۵	۲۸۰	۱۵	۲۸±۰/۵
۸	٤۰	۳۲۰	۱۵	۲۸±۰/۵
۹	٤۵	۳٦۰	۱۵	۲۸±۰/۵
۱۰	۵۰	٤۰۰	۱۵	۲۸±۰/۵

نتایج

بررسی میزان بازماندگی و بازده مادهزایی و درصد بدشکلی لاروها در القاء مادهزایی میوزی: میزان بازماندگی لاروها در مرحله شنای عمودی، در گروههای مختلف تحت تیمارهای شوکدهی زود هنگام[1] و مقایسه آنها با گروههای شاهد هاپلویید، تریپلویید و فیزیکی (گروه شاهدی که فقط دستکاریهای فیزیکی تحقیق برروی آنها اعمال شد)، در نمودار ۱ ارائه گردید.

در این گونه تحقیقات، انتخاب تیمار بهینه از نظر دارا بودن درصد بازماندگی لاروی توام با درصد بالای مادهزایی، براساس عاملی بنام بازده مادهزایی صورت میپذیرد. در شکل۲ بازده مادهزایی در تیمارهای مختلف نشان داده شده است.

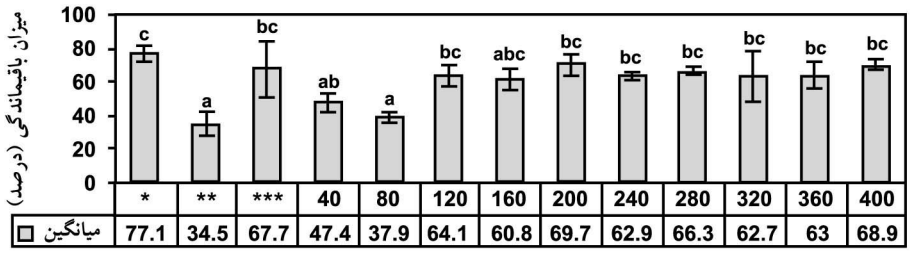
یکی از موارد شایان توجه پس از تفریخ تخمهای لقاح یافته، مشاهده انواع بدشکلیها در میان تیمارهای مختلف مورد مطالعه بود که نتایج مربوط به آنها در مقایسه با گروههای شاهد در شکل ۳ ارائه گردیده است.

نتایج کاریولوژی (سیتوژنتیک) بچه ماهیان: نتایج شمارش تعداد کروموزوم در هر گسترش (۲n= ٦۰) از ماهیان مادهزاد (زال)، در شکل ٤ آمده است.

1- Early heat shock

www.SID.ir

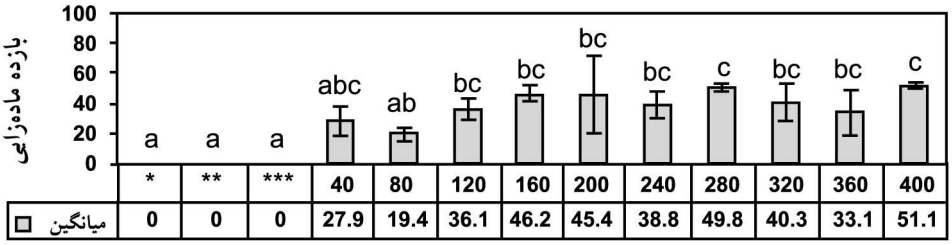
Archive of SID



تیمارهای مختلف (درجه ـ دقیقه)

✱: شاهد تریپلوئید ✱✱ : شاهد هاپلوئید ✱✱✱ : شاهد فیزیکی

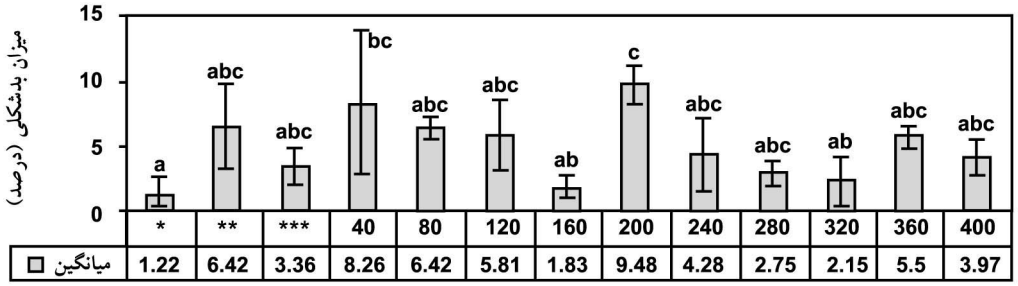
شکل ۱- میانگین درصد بازماندگی قزل‌آلای رنگین کمان از لقاح تا شنای عمودی در تیمارهای مختلف نسبت به گروه‌های شاهد.



تیمارهای مختلف (درجه ـ دقیقه)

✱: شاهد تریپلوئید ✱✱ : شاهد هاپلوئید ✱✱✱ : شاهد فیزیکی

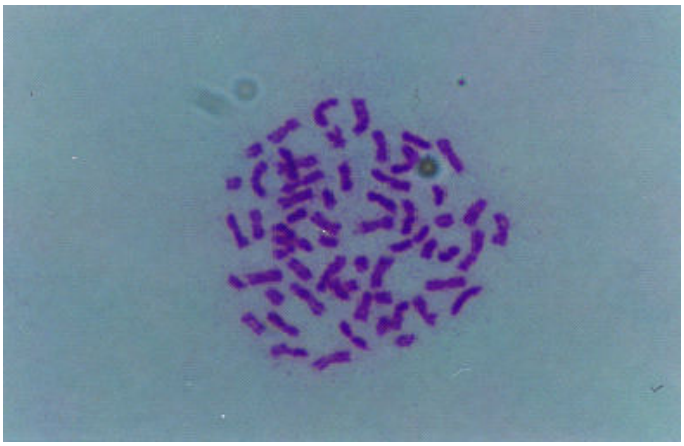
شکل ۲- میانگین بازده ماده‌زایی قزل آلای رنگین کمان در تیمارهای مختلف مورد تحقیق.



تیمارهای مختلف (درجه ـ دقیقه)

✱: شاهد تریپلوئید ✱✱ : شاهد هاپلوئید ✱ ✱✱ : شاهد فیزیکی

شکل۳- میانگین درصد بدشکلی لاروهای قزل‌آلای رنگین کمان در تیمارهای مختلف نسبت به گروه‌های شاهد.



شکل ٤- تصویر گسترش کروموزومی لارو قزل‌آلای رنگین کمان ماده‌زاد بعد از اعمال شوک‌دهی و باز گرداندن حالت دیپلوئیدی (٢n= ٦٠).

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه‌گیری

مجموع نتایج حاصل از تیمارهای مختلف نشان داد که با توجه به توارث فنوتیپ رنگ، بقاء در گروه هاپلوئید و گسترش‌های کروموزومی، طیفی از ماده‌زایی ایجاد شده است. از لقاح تا شنای عمودی بین تیمارها از نظر میزان بازماندگی تفاوت معنی‌دار وجود داشته است. بیشترین مقدار مربوط به تیمارهای ۲۰۰ و۴۰۰ درجه- دقیقه و کمترین آن مربوط به تیمارهای ۸۰ و ۴۰ درجه-دقیقه بوده است. در این مرحله بیشترین بقاء در بین گروه‌های شاهد و همچنین در مقایسه با کل تیمارها، مربوط به تیمار تریپلوئید و کمترین آن مربوط به هاپلوئید می‌باشد. با توجه به توضیحات مذکور از نظر میزان بازماندگی در مراحل مختلف بیشترین میزان بقاء در تیمارهای ۲۰۰ و ۴۰۰ درجه – دقیقه مشاهده شده است.

از نظر میزان بازده ماده‌زایی بیشترین میزان مربوط به تیمار ۴۰۰ و۲۸۰ درجه – دقیقه پس از لقاح بوده است و کمترین آن مربوط به تیمار ۸۰ درجه – دقیقه پس از لقاح بوده است که با تیمارهای ۴۰۰ و۲۸۰ درجه- دقیقه تفاوت معنی‌داری دارد. از نظر میزان بدشکلی بیشترین میزان مربوط به تیمار۲۰۰ و ۴۰ و تیمار ۱۶۰ درجه- دقیقه از این نظر دارای بهترین وضعیت بوده است. در مجموع متوسط درصد بدشکلی در میان گروه شاهد فیزیکی ۳/۶ درصد و در میان گروه‌های تحت تیمار ۵/۰۴ بوده است. در مجموع در القاء ماده‌زایی میوزی، هم از نظر بازماندگی در مراحل مختلف، بازده ماده‌زایی و همچنین بدشکلی، تیمار ۴۰۰ و ۲۸۰ درجه – دقیقه بهترین وضعیت را بین کل تیمارها داشتند.

برگرداندن حالت دیپلوئیدی با استفاده از شوک‌های زودهنگام در دو مرحله امکان‌پذیر است: یکی تخریب دوک تقسیم در متافاز تقسیم میوز دو و دیگری جذب مجدد گویچه قطبی دوم پس از تشکیل می‌باشد. به علت تدریجی بودن این مراحل استنباط می‌شود که اعمال شوک در یک دامنه زمانی امکان‌پذیر است (کمانگر، ۱۳۷۷). پس با توجه به موارد مذکور بقای پایین تیمارهای اولیه یعنی ۴۰ و ۸۰ درجه – دقیقه بعد از لقاح می‌تواند شاهد این مدعا باشد که تخم‌ها به مرحله متافاز نرسیده‌اند و یا ادامه تقسیم میوز دوم را شروع نکرده‌اند و در مراحل ابتدایی یعنی پروفازدوم می‌باشند. تیمارهای مطلوب نیز ۲۸۰ و ۴۰۰ درجه – دقیقه بعد از لقاح بوده‌اند که ناشی از همزمانی شوک‌دهی با متافاز میوز دوم و زمان خروج گویچه قطبی دوم می‌باشد که این موارد با نتایج اکثر محققین همخوانی دارد به‌طوری که شاروت (۱۹۸۲) دامنه زمانی ۳۰-۲۰ دقیقه پس از لقاح را برای اعمال شوک حرارتی در ماهی‌قزل‌آلای رنگین کمان مناسب تشخیص داده است. پالتی و همکاران نیز (۱۹۹۷) دامنه مؤثر در ماده‌زایی و بقاء را ۵۰۸-۹۵ درجه دقیقه بیان نموده‌اند. کمانگر(۱۳۷۷) نیز زمان مناسب برای شوک‌دهی را۴۰-۳۰ دقیقه پس از لقاح معرفی کرده است. البته شاروت(۱۹۸۰) در دمای شوک دهی ۲۸ درجه سانتی‌گراد ۳۵ دقیقه بعد از لقاح را زمان مناسب برای اعمال شوک معرفی کرد که با قسمتی از نتایج ما کاملاً همخوانی دارد. در عین حال گزارش‌هایی نیز از دامنه زمانی کمتر نسبت به آنچه که ذکر شد وجود دارد (شاروت، ۱۹۸۰؛ هیپ و همکاران، ۱۹۸۸؛ کاستروپ و همکاران، ۱۹۸۷) که می‌تواند به علت عوامل مختلفی مثل مدت زمان اعمال شوک حرارتی، دمای شوک دهی و کیفیت گامت‌ها باشد که در میزان موفقیت برای احتباس گویچه قطبی دوم و زمان مناسب شوک‌دهی نقش دارند (کمانگر، ۱۳۷۹). شاروت(۱۹۸۰) این‌طور بیان نموده است که با افزایش دمای شوک‌دهی از۲۳ به ۲۹ درجه سانتی‌گراد زمان مطلوب شوک‌دهی پس از لقاح کاهش می‌یابد. همچنین پالتی و همکاران(۱۹۹۷) اظهار نموده‌اند که بین بازده ماده‌زایی و کیفیت گامت همبستگی مثبت وجود دارد. در بین تیمارهای ماده‌زاد لاروهایی با رنگ طبیعی نیز مشاهده شد که می‌توان دلیل آن را در اثر ناخالصی ژنتیکی احتمالی در مولدین زال کارگاه دانست که تجربیات کارشناسان کارگاه هم فرضیه ما را تأیید می‌کند (لاروهای طبیعی حاصل از تلاقی دو مولد زال). مشاهدات محققینی از جمله تورگارد(۱۹۹۵) نیز این نتیجه را تأیید می‌کند.

همانطور که ذکر گردید در تیمار هاپلوئید برخلاف انتظار درصدی بقاء مشاهده گردید که این پدیده را می‌توان به کم بودن شدت اشعه نسبت به غلظت اسپرمی که در این تحقیق بکاربرده شده (با توجه به نفوذ کم اشعه UV) مربوط دانست که این نتیجه یعنی بقا در تیمار هاپلوئید در گزارش‌های تعدادی از محققین نیز دیده شده است (کمانگر، ۱۳۷۷؛ گوریزکو و همکاران، ۱۹۹۱).

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

۱.آذری تاکامی، ق.، فرحمند، ح.، و بهرامی کمانگر. ب. ۱۳۸۰ ایجاد ماده زایی در ماهی قزل آلای رنگین کمان توسط پرتو فرابنفش.مجله منابع طبیعی(٥٤):۳۸۱-۳٦۹

۲.باقری، ع. ۱۳۸۰. تولید ماهیان قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تتراپلوئید به وسیله شوک گرمایی، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم دریایی و منابع طبیعی دانشگاه تربیت مدرس، ۷۲ ص

۳.بهرامی کمانگر، ب. ۱۳۷۷. ایجاد ماده زایی در ماهی قزل آلای رنگین کمان. پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات ، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران . ۱٦۳ص

٤.بهرامی کمانگر، ب.، آذری تاکامی، ق.، فرحمند، ح.، و کرمی، م. ۱۳۷۹. بررسی اثر دستکاری کروموزومی در رشد اولیه ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، پژوهش و سازندگی (٤٦): ۱۱۳-۱۱۰

۵.کلباسی، م.، خضاب، ر.، و محمود. ۱۳۸۱. تهیه کاریوتایپ کروموزومی از مراحل مختلف تکامل جنینی ماهی قزل آلای رنگین کمان ، طرح پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس ، ٦۵ ص

٦.کلباسی، م. ر. ۱۳۷۲. القاء تریپلوئیدی در ماهی قزل آلای رنگین کمان به وسیله شوکهای گرمایی، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۰ ص

7.Billard, R., Petit, J., Jalabert, B., and Szoilosi, D. 1974. Artificial insemination in trout using a serum diluents. J . H . S . Blaxter , editor , early life history of fish . Spriner – verlag , . Pages 715 -723

8.Chourrout, D. 1980. Thermal induction of diploid gynogenesis and triploidy in the eggs of the rainbow trout . Reproduction , Nutrition , Development 20 , 727-733

9.Chourrout, D., and Quillet, E. 1982. Induced gynogenesis in rainbow trout:Sex and survival of progenies production of all triploid population . Theor . Appl . Genet 63, 201-205

10.Chourrout, D. 1984. Pressure induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout, Production of all triploid, all tetraploids, heterozygous and homozygous diploid gynogenesis . Aquaculture 36, 111-126.

11. Diter, A., Quillet, E., and Chourrout, D. 1993. Suppression of first egg mitosis induced by heat shocks in the rainbow trout . J. Fish Biol . 42 , 777-786

12.Felip, A., and Coauthors, T. 1999. The relationship between the effects of UV light and thermal shock on gamets and the viability of early development stages in sea bass. Heredity 83, 387-397.

13.Foisil, L., and Chourrout, D. 1999. Chromosome doubling by pressure treatments for tetraploidy and mitotic gynogenesis in rainbow trout. Aquaculture and Fisheries Management 23, 567- 575

14.Goryczko, K., Dobosz, S., Makinen, T., and Tomasik, L. 1991. UV irradiation of rainbow trout sperm as a practical method for induced gynogenesis. J .Appl. Ichthyol . 7, 136-146

15.Greglutz, C. 2001. Practical genetics for aquaculture. Black Well Science, pp. 120-124

16.Happe, A., Chourrout, D., and Chevasus, B. 1988. Early life history of triploid rainbow trout. Aquaculture 71, 107-118.

17.Kaastrupe, P., and Horlyck, V. 1987. Development of a simple method to optimize the conditions for producing gynogenetic offspring , using Albino Rainbow Trout ,*Salmo gairdneri Richardson* ,females as an indicator for gynogenesis. J. Fish Biology 31(supplement A): 29-33

18.Palti, Y., J.J.Li, and Thorgaad, G.H. 1997. Improved efficiency of heat and pressure shocks for producing gynogenetic rainbow trout. The Progressive Fish-Culturist 59:1-13

19.Purdom, C.E. 1993. Genetics and fish breeding. Chapman & Hall , pp. 204-212.

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

21.Thogaard, G.H., and Coauthors, S. 1995. Incidence of albinos as a monitor for induced triploidy in rainbow trout. Aquaculture. 137, 121-130.

www.SID.ir

Archive of SID

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 13(4), Oct -Nov 2006
www.magiran.com/jasnr

Induction of meiotic gynogenesis in rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)* with emphasis on time determination of second polar body extrusion

A.H. Esmaily[1], M.R. Kalbassi[1] and I. Poosti[2]
[1]Former M.Sc. student of Dept. Fisheries and Assist. Prof. of college of Natural Resources and Marine biology, Tarbiat Moddarres Univ., Respectively, [2]Prof. of Islamic Azad Univ. Tehran Research and Science section, Tehran

Abstract

In order to induced meiotic gynogenesis in rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)*, spermatozoa genome was destroyed by UV irradiation (10050 mw/m^2) and after fertilization with intact ovum, diploidy was returned by thermal shock (28±0.5 ºC) in 15 minutes. Thermal shocks were applied in 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 and 50 minutes after fertilization. UV irradiation was supplied from a germicidal lamp (15 w) with maximum intensity at 254 nm. Before irradiation, sperm was diluted with two kinds of solution and then irradiation, was done at 10 minutes on magnet stirrer. Albinisms were used as a phenotypic marker for monitoring of gynogenetic rainbow trout offspring. Furthermore, determination of diploidy was confirmed by preparation of chromosome slides from larval stages of fishes. Results show that, best gynogenetic yield was achieved in treatment which using shock on 35 and 50 minutes after fertilization.

***Keyword*:** Meiotic gynogenesis; Polar body extrusion; UV irradiation; *Oncorhynchus mykiss*

www.SID.ir