Archive of SID

بررسی امکان تهیه گسترش کروموزومی میگوی آب شیرین *Caridina fossarum* Heller 1862

مجتبی نادری[۱]*؛ امیر هوشنگ بحری[۲]؛ پرویز زارع[۲]؛ ادریس آزور[۱]

Naderi_m_2008@yahoo.com

۱- باشگاه پژوهشگران جوان،دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بندرعباس. صندوق پستی: ۱۳۱۱-۷۹۱۵۹.

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بندرعباس. صندوق پستی: ۱۳۱۱-۷۹۱۵۹.

تاریخ دریافت : آبان ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش :اسفند ۱۳۸۹

چکیده

این تحقیق جهت تهیه گسترش کروموزومی میگوی آب شیرین(*Caridina fossarum*) از تخم و لارو آن انجام شد. به علت اندازه کوچک این میگوی به جای تزریق از روش غوطه وری استفاده گردید. این مطالعه تا مرحله ی مشاهده ی سلول ها و ترکیده شدن سلول ها و در نهایت کروماتیدها پیش برده شد. در مورد کار با سلول های تخم، سلولی مشاهده نشد که علت این امر را می توان به غشاء سخت کتینی اطراف تخم، مرگ و میر احتمالی سلول های تخم در مرحله غوطه وری اشاره نمود.

کلمات کلیدی:*Caridina fossarum* ، تخم، کروماتید، گسترش کروموزومی، لارو.

*نویسنده مسئول

www.SID.com

Archive of SID

۱.مقدمه

میگوی *C. fossarum* یک گونه بومی ایران است که در آب های سطحی، زیرزمینی، اکوسیستم های کوهستانی(۱۶۰۰-۳۰۰ متر بالاتر از سطح دریا) و در مکان هایی با پوشش گیاهی انبوه زیست می کند(۲۲). تاکنون مطالعاتی در زمینه ی پراکنش و مورفولوژی(۲۲) و خصوصیات تولید مثلی این میگو (۴۴) در ایران صورت گرفته است.

از جمله کاربردهای مختلف علم ژنتیک در تحقیقات شیلاتی، مطالعات کروموزومی ماهیان است که در جهان زمینه تحقیقات گسترده ای داشته و در بررسی های تاکسونومیک، ژنتیک، سیتوتوکسیکولوژیک، اصلاح نژاد و فناوری زیستی کاربرد فراوانی دارد(۶). مطالعات کاریولوژی به عنوان یک ابزار و وسیله ساده تلقی می شوند که مجموعه اطلاعاتی در مورد تعداد، اندازه و ریخت شناسی کروموزوم های مهره داران و بی مهرگان بدست می دهد(۲۴، ۳۳، ۳۴ و ۳۷) که این اطلاعات پیش نیازهای اساسی برای به کارگیری تکنیک هایی در بحث دستکاری های کروموزومی(۸، ۱۰، ۱۴، ۲۱ و ۴۵). تجزیه و تحلیل کروموزومی از دیدگاه کنترل ژنتیک، تولید سریع لاین های خالص، رده بندی سلولی و مطالعات نکاملی حائز اهمیت است(۲۵). مطالعات کاریولوژی ممکن است برای بررسی تنوع تکامل و سوالات ژنتیک در مورد حیوانات مفید باشد(۲۷) و آن ممکن است اجازه برای پیش بینی تغییراتی که تعدیل کننده کاریوتایپ های اجدادی هستند را بدهد به طوری که به لاین های جدیدی تکامل می یابند (۴۱).

در بسیاری از موارد از کاریوتایپ برای تعیین تنوع کروموزومی (۳۸ و ۴۶)، مشخص نمودن جمعیت های دیپلوئیدی از تریپلوئیدی (۲۹ و ۴۰) استفاده می شود (۱۳، ۳۵ و ۴۲). در سخت پوستان داده های کاریوتایپ مربوط به بعضی از خانواده ها جمع آوری شده است (۱۲، ۳۰ و ۳۱) و این در حالی است که این داده ها برای دیگر محققان غیر قابل دسترس می باشد که این گفته خصوصاً در مورد میگوهای آب شیرین صحت دارد.

www.SID.com

فقدان اطلاعات در مورد این گونه ها می تواند گویای این باشد که آنها از لحاظ تجاری ارزش چندانی نداشته باشند. ولی این در حالی است که آنها به عنوان یک منبع غذایی اولیه برای برخی از ماهیان گوشت خوار مطرح هستند(۱۶ و ۲۸) که این همچنین می تواند برای میگوهای آکواریومی پیشنهاد شود(۱۷).

در ایران مطالعات کاریولوژیک در سخت پوستان به گستردگی ماهیان نیست. به طور کل، مطالعات مهم کاریولوژیکی انجام گرفته بر روی سخت پوستان در ایران شامل: آرتمیا ی دریاچه های ارومیه، مهارلو و اینچه برون(۴۳)، میگوی سفید هندی *Penaeus indicus* و میگوی موزی *Penaeus merguiensis* است(۱،۵). هدف از این مطالعه تهیه گسترش کروموزومی میگوی آب شیرین (*Caridina fossarum*) بود.

۲. مواد و روش ها

نمونه ها از چشمه قمپ آتشکده واقع در شهرستان فسا تهیه گردید. این چشمه حدود ۲۰ الی ۲۳ کیلو متری شمال شهرستان فسا در وسط کوه تودج و خرمن کوه واقع شده است(شکل ۱). آب این چشمه از ذوب برفهای این قلل تأمین می گردد. مقدار آب موجود در این چشمه بستگی به میزان برف موجود در کوه های فوق الذکر داشته بطوریکه خروجی آب بین ۴ الی ۸۰ اینچ در نوسان می باشد. آب این مکان به علت عبور از لایه های آهکی و گچی از غلظت و سختی بالایی برخوردار می باشد(۳).

شکل ۱: موقعیت جغرافیایی چشمه ی قمپ آتشکده بر روی نقشه

Archive of SID

برای این بررسی، ۳۰ عدد میگوی مولد ماده که حاوی تخم های لقاح یافته در زیر شکم بودند بوسیله ی تور ساچوک با چشمه ۱ میلیمتر مربع صید و با کمترین استرس، مولدین به آزمایشگاه منتقل و داخل آکواریم رها سازی شدند. در این مطالعه به منظور تهیه گسترش کروموزومی هم از مراحل لاروی(مرحله ناپلی، Yarmohammadi و Pourkazemi در مطالعه خود اذعان داشتند که مناسب ترین مرحله لاروی جهت تهیه گسترش کروموزومی در مرحله متافاز، همین مرحله است) و هم از تخم های بارور شده (جنین) استفاده شد. در مطالعات کاریولوژیک جهت دستیابی به تعداد زیادی از گسترش کروموزومی نیاز به بافت های در حال رشد سریع است(۳۲). جهت بهینه سازی روش تهیه گسترش کروموزومی در میگوی *C. fossarum* ۳۹ آزمایش بر روی جنین و مراحل لاروی انجام گرفت.

جهت دستیابی به کروموزوم ها و تهیه گسترش کروموزومی مهمترین عمل، نگه داشتن کروموزوم ها در مرحله متافاز تقسیم سلولی است(۶) که برای این کار از محلول کلشی سین استفاده می کنند. کلشی سین با فرمول شیمیایی ($C_{22}H_{25}N0_6$) برای اولین بار از ریشه ی گیاه *Colchicium autumal* بدست آمد که قابل استفاده برای تمام موجودات اعم از گیاهان و جانوران بوده که می توان در درجه حرارت ۳۷-۴ درجه سانتی گراد با آن کار کرد (۶). یک روش برای بدست آوردن کروموزوم ها در مرحله متافازی، تماس تخم های بارور شده با محلول کلشی سین است. هرچند که در مورد میزان تراکم کروموزوم با استفاده از غلظت های کلشی سین بین ۰/۰۰۶ تا ۰/۱ درصد اختلافی وجود ندارد، در صورتی که مدت زمان حمام بیشتر از ۹۰ دقیقه باشد میزان تراکم کروموزوم بیشتری مشاهده می شود (۱۴). به منظور متوقف کردن تقسیمات سلولی در مرحله متافاز، تیمارهای مربوط به مراحل جنینی و لاروی به روش حمام در محلول کلشی سین با غلظت های ۰/۰۰۶۵، ۰/۰۱، ۰/۰۱۵ و ۰/۰۳ (۷، ۱۱، ۲۶ و ۳۶) درصد در آب مقطر مدت زمان های بین ۱ تا ۱۰ ساعت صورت گرفت. تیمارهای کلشی سین در دمای محیط و همراه با هوادهی انجام شد. سپس برای هیپوتونیزاسیون به منظور متورم شدن و ترکیدن یاخته ها از محلول هیپوتنیک کلرید پتاسیم ۰/۰۷۵ و ۰/۱ (۱، ۷، ۱۵ و ۳۷) مولار با آب مقطر در مدت زمان های بین ۳۰ دقیقه تا ۲ ساعت استفاده گردید. این محلول ها، محلول هایی هستند که غلظتشان از غلظت سلول هایی که در آن قرار می گیرند، کمتر و سلول با جذب آب به حالت متورم در می آیند. مدت زمانی که سلول ها در محلول هیپوتنیک قرار می گیرند با توجه به تجارب محققان، متفاوت و نیاز به تکرار تیمارها دارد(۶). برای تثبیت بافت ها از محلول کارنوی تازه و سرد با دمای ۴ درجه سانتی گراد(۱ قسمت اسید استیک و ۳ قسمت متانول) به مدت ۴۵ دقیقه با سه بار تعویض استفاده شد(۱، ۷، ۱۵ و ۳۷). در هر بار استفاده از محلول کارنوی، به منظور استفاده ی مجدد به صورت سرد به یخچال برگردانده می شد. از نظر تئوری الکل باعث سخت شدن، انقباض و چروک بافت می شود و در مقابل اسید استیک با تاثیر بر روی بافت های چروک خورده باعث باز شدن چروک بافت می شود که این عمل توام الکل و اسید باعث مرگ سلول های نمونه ضمن حفظ ساختار آنها می شود(۶).

برای تهیه گسترش کروموزومی از جنین یا لارو میگو از دو روش سرد و گرم استفاده شد. بدین صورت که تعدادی تخم یا لارو فیکس شده را در شیشه ساعت قرار داده و با استفاده از یک لوله پلاستیکی سر کج به خوبی له می شدند. سپس سوسپانسون سلولی حاصل را چند بار پیپت کرده تا تعلیق یکنواختی بدست آید. سپس به وسیله میکروپیپت چند قطره از تعلیق سلولی بر روی لام های سرد و گرم از قبل آماده شده از ارتفاع ۵۰ سانتیمتری، ۱ و ۲ متری پرتاپ می گردید. لام های تهیه شده از هر دو روش، در مجاورت هوا و دمای اتاق نگهداری می شدند تا خشک شوند. کلیه لام ها بعد از خشک شدن با رنگ گیمسای ۱۰ درصد رقیق شده با بافر سورنسون (pH = ۶/۸) به مدت ۳۰ دقیقه رنگ آمیزی شدند. لام ها بعد از شستشو با آب مقطر در معرض هوا و در دمای اتاق خشک می شدند.

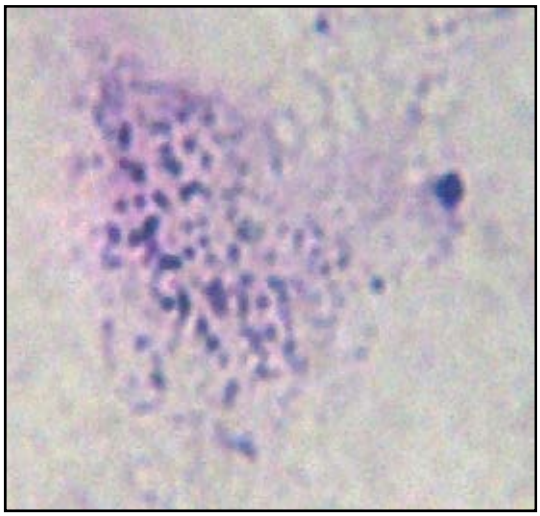
www.SID.com

Archive of SID

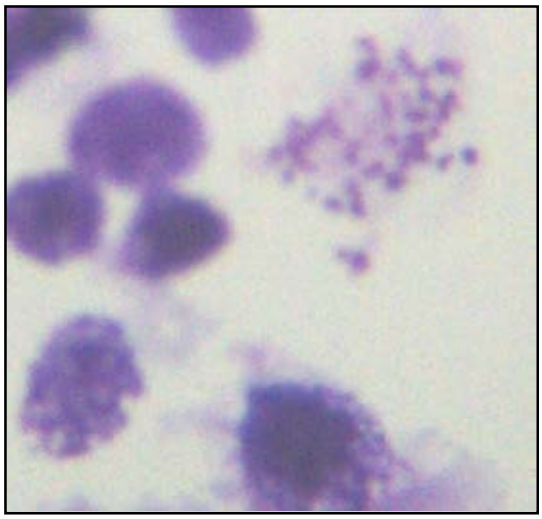
مشاهده ی لام ها با میکروسکوپ نوری مدل (Nikon UFX-DX) در ابتدا با بزرگ نمایی ۴۰ صورت گرفت و در ادامه در صورت نیاز به بزرگ نمایی ۱۰۰ در ابتدا یک قطره روغن ایمرسیون جهت شفاف سازی نمونه ها بر روی آنها چکانده شد و در ادامه به مشاهدات سلولی پرداخته شد.

۳. نتایج

به طور کلی در مقایسه با گونه های مختلف ماهیان گسترش های کروموزومی قابل آنالیز از میگوی آب شیرین (*Caridina fossarum*) مشکل بود. در هیچ یک از مراحل جنینی هیچ گونه تک سلولی و پلیت متافازی مشاهده نشد که علت آن را می توان به به غشاء سخت کیتینی اطراف تخم که امکان له کردن بافت کاهش یافته و عملا" در تهیه سوسپانسون سلولی نیز این پوسته ها مزاحم بوده و باعث می شد که سلول ها به خوبی نترکند و پلیت های متافازی مناسبی بدست نیایند، وجود کیسه زرده و چرب بودن آن، مرگ و میر احتمالی سلول های تخم در مرحله ی غوطه وری و... اشاره نمود. بهترین گسترش های کروموزومی بدست آمده مربوط به مراحل لاروی بود. در تیمار کلشی سین ۱۰ ساعت پلیت متافازی و تک سلولی های بسیاری بدست آمدند، اما به دلیل مدت طولانی اثر کلشی سین کروموزوم ها به شدت به هم فشرده بوده و از کیفیت خوبی برخوردار نبودند (شکل ۲ و ۵). در تیمار کلشی سین ۵ ساعت نیز پلیت متافازی بدست آمد که نسبت به تیمار ۱۰ ساعت کروموزوم ها از کیفیت مطلوب تری برخوردار بودند (شکل ۳ و ۴). در بقیه تیمار های کلشی سین هیچ گونه پلیت متافازی مشاهده نشد ولی گسترش کروموزومی تا مرحله مشاهدهٔ تک سلولی پیش رفت(شکل ۶ و ۷). بهترین تیمار هیپوتنیک جهت تهیه گسترش کروموزومی از مراحل لاروی در تیمار کلشی سین ۱۰ و ۵ ساعت به ترتیب مربوط به هیپوتنیک به مدت ۴۵ دقیقه و ۲ ساعت بود.



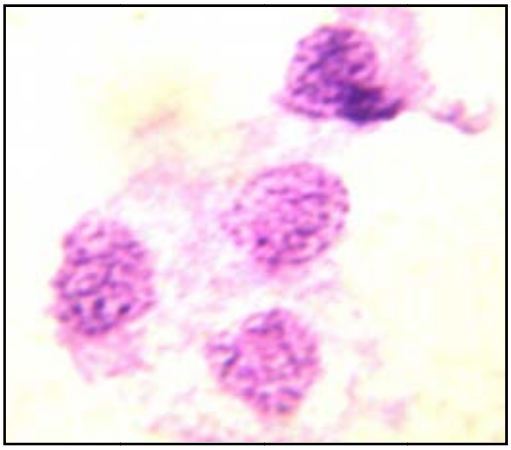
شکل ۲: سلول ترکیده شده، تیمار کلشی سین به مدت ۱۰ ساعت (بزرگ نمایی X ۱۰۰۰)



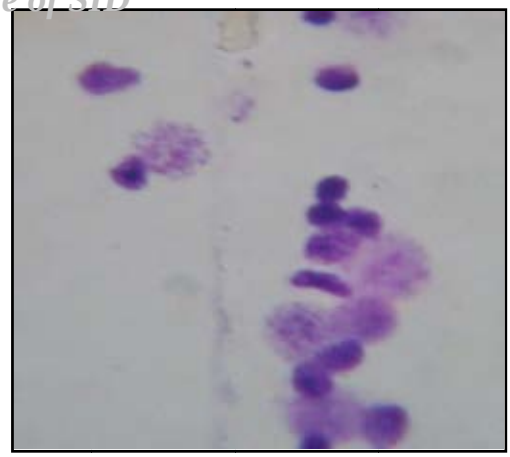
شکل ۳: سلول ترکیده شده، تیمار کلشی سین به مدت ۵ ساعت (بزرگ نمایی X ٤٠٠)

www.SID.com

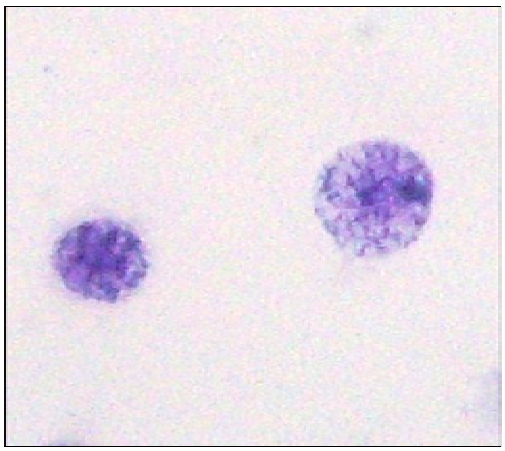
Archive of SID



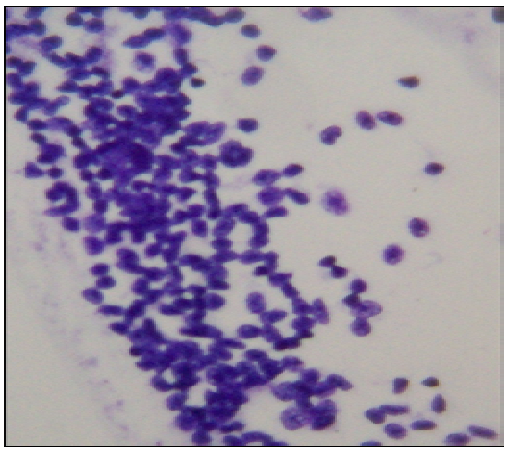
شکل ٤:تک سلولی های مشاهده شده تیمار کلشی سین به مدت ۵ ساعت (بزرگ نمایی X ٤٠٠)



شکل ٥: تک سلولی های مشاهده شده تیمار کلشی سین به مدت ۱۰ ساعت (بزرگ نمایی X ٤٠٠)



شکل ٦: تک سلولی ها (بزرگ نمایی X ٤٠٠)



شکل ۷: تک سلولی ها (بزرگ نمایی X ۱۰۰)

٤. بحث

مطالعات کروموزومی ماهیان به گستردگی و موفقیت آمیز بودن مهره داران دیگر نیست. به طوری که کاریوتایپ استاندارد برای کمتر از ۱۰ درصد بیش از ۲۰۰۰۰ گونه ماهی موجود گزارش شده است(۲۳).

کروموزوم های سخت پوستان از طریق برش یا له کردن غدد جنسی برای اولین بار توسط آقای Murofushi و Deguchi در سال ۱۹۹۰ مشاهده شد. جهت دستیابی به کروموزوم ها و تهیه گسترش کروموزومی مهمترین عمل، نگه داشتن کروموزوم ها در مرحله متافاز تقسیم سلولی است(۶).

هر یک از مراحل آماده سازی بافت برای تهیه یک گسترش کروموزومی از مرحله متافاز و مطالعه سیتوژنتیک، مهم است. اولین مرحله برای این منظور استفاده از کلشی سین به میزان و مدت زمان کافی است تا بتواند تقسیم سلولی را در مرحله ی متافاز متوقف کند(۲۶). بهترین مدت زمان نگهداری نمونه ها در محلول کلشی سین که منجر به حصول بهترین نتایج در این مطالعه شد، مدت زمان ۵ ساعت بود. همچنان که Anastasiadou و Leonardos در مطالعه خود مطلوب ترین مدت زمان نگهداری نمونه ها در محلول کلشی سین را ۴ ساعت اعلام کردند. به هر حال مدت زمان نگهداری سخت پوستان مختلف در محلول کلشی سین رنج بین ۴ تا ۶ ساعت اعلام کرده اند(۱۹ و ۳۱). در

www.SID.com

Archive of SID

مطالعات کروموزومی هدف از قرار دادن سوسپانسیون سلولی در محیط های هیپوتنیک، متورم شدن سلول ها و در نهایت ترکیدن آنها است. به طور کل این محلول ها باید دارای فشار اسمزی پایین و قدرت یونی قوی باشند(۹).

رقت ۰/۰۷۵، مطلوب ترین رقت در این مطالعه بود، همچنان که Hayashi و Fujiwara در سال ۱۹۸۸ از محلول کلرید پتاسیم با رقت ۰/۰۷۵ مولار در کار خود برای تهیه گسترش گروموزومی میگوی *Penaeus japonicas* استفاده کردند. مرحله فیکس کردن نیز همانند مرحله اول و دوم در دستیابی به گسترش کروموزومی سلول ها در مرحله متافاز مهم است(۲۶). هدف از محلول تثبیت کننده، حفظ نمودن کروموزوم ها با کمترین تغییر شکل در ساختار و ترکیب آنها است. این محلول باید به صورت تازه و سرد استفاده شود زیرا محلول کهنه دارای مقادیر زیادی متیل استات است که برای تثبیت مناسب نیست (۶).

وجود کروموزوم های نقطه ای شکل از ویژگی های ده پایان است. درجه فشردگی کروموزوم ها می تواند بر حسب نوع سلول ها، مراحل مختلف تقسیمات و نوع تیمار متفاوت باشد (۱). با وجود این که به نظر می رسد که مراحل اولیه تکاملی میگو به دلیل داشتن تقسیمات سلولی فراوان منابع مناسبی برای تهیه گسترش کروموزومی باشند، اما در مطالعه حاضر علی رغم تلاش فراوان برای بهینه سازی تیمار کلشی سین، محلول هیپوتنیک، محلول فیکساتیو و رنگ آمیزی، گسترش مناسبی از این مراحل زندگی میگو بدست نیامد. به طوری که امینی و منصوری در مطالعه خود به این نکته به خوبی اشاره کرده اند. در این مطالعه به دلیل اندازه کوچک این میگو (کمتر از ۱۵ میلیمتر) امکان استفاده از روش تزریق و جداسازی بافت بیضه و تخمدان وجود نداشت.

به طور کل بررسی کروموزومی در میگوها به خاطر تعداد زیاد کروموزوم ها و کوچک بودن اندازه آنها مشکل و سخت است(۴، ۱۴، ۳۰ و ۳۴). همچنین در سخت پوستان کروموزوم های متاسنتریک، ساب متاسنتریک و آکروسنتریک به شدت تغییرپذیر هستند(۳۷) که یک این چنین تمایزهایی در مقایسه با کروموزوم های حشرات و برخی از گونه های مهره داران، انجام عمل کاریوتایپ را با مشکل مواجه می کند(۴۱). همچنین رجائی و همکاران در مطالعه خود تحت عنوان بررسی ساختار کروموزومی گونه ی حرا *Avicennia marina* در جنگل های مانگرو منطقه ی بندر خمیر موفق به تهیه گسترش کروموزومی نشدند که دلایل خود را فصل، عدم دسترسی به ارگان مناسب، مسافت طولانی جهت حمل نمونه ها، درجه حرارت و ... اذعان داشتند.

منابع

۱- امینی، ف و س. م. منصوری. ۱۳۸۹. مطالعه کاریولوژیک میگوی موزی خلیج فارس *Penaeus (Fenneropenaeus) merguiensis*. مجله تحقیقات دامپزشکی. ۶۵ (۱): ص ۳۷ تا ۴۱.

۲- رجایی، م. ح. فرهمند، ف. فتاحی و ن. قوتی. ۱۳۸۹. بررسی ساختار کروموزومی گونه حرا *Avicennia marina* در جنگل های مانگرو منطقه ای بندر خمیر. شانزدهمین کنفران سراسری و چهارمین کنفرانس بین المللی زیست شناسی ایران، مشهد. ۱ ص.

۳- رضازاده گراشی، ج. ۱۳۸۱. از پسا تا فسا انتشارات فاضل. ۱۱۵ صفحه.

۴- حسینی، س، ج. ۱۳۷۵. تعداد کروموزوم های میگوی ببری سبز خلیج فارس *P.smisulcatus*. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشکده علوم دانشگاه تهران.

۵- خلیل آبادی، ف. ۱۳۸۶. مطالعه کاریولوژی میگوی سفید هندی *P. indicus*. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندرعباس. ۶۵ صفحه.

۶- نهاوندی، ر، ف. امینی و س. رضوانی. ۱۳۸۰. بررسی سیتوژنتیک ماهی سیم (*Abramis brama*) حوزه جنوبی دریای خزر. مجله علمی پژوهشی شیلات. ۳ (۱۰): ص ۸۹ تا ۱۰۰.

۷- یارمحمدی، م. م. پورکاظمی و ا. کمالی. ۱۳۸۱. بررسی سیتوژنتیک آرتمیای دریاچه ارومیه. مجله علمی شیلات، ۱ (۱۱): ص ۱ تا ۱۶.

www.SID.com

Archive of SID

8. Allen, J. R., S. L. Downing and K. K. Chew. 1989. Hatchery manual for producing triploid oyster. University of Washington, Seattle, U.S.A.

9. Anastasiadou, C., and I. Leonardos. 2010. Karyological analysis on freshwater shrimp *Atyaephyra desmarestii*. Journal of Crustacean Biology 30(2):332-335.

10. Arai, K. 2001. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. Aquaculture 197: 205-228.

11. Abatzopoulos, T. h., C. D. Kastritsis and C. D. Triantaphyllidis. 1986. A study of karyotypes and heterochromatic associations in *Artemia*, with special reference to two N. Greek populations. Dr W. Junk Publishers, 7t: 3-10.

12. Chavez Justo, C., M. Murofushi, K. Aid, and I. Hanyu. 1991. Karyological studies 143 on the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture 97: 327- 334.

13. Cherfas, N. 1968. Seminar/Study Tour in the USSR on Genetic Selection and Hybridization of Cultivated Fishes. 19 April –29 May 1968. Lectures. Rep.FAO/UNDP(TA), (2926) In: FAO, 1971, pp.360.

14. Dumas, S. and R. Campos-Ramos. 1999. Triploidy induction in the pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). Aquacult. Res. 30: 621-624.

15. Hamid Reza Esmaeili, M. Ebrahimi., T. H. Ansari ., A. Teimory and G. Gholamhosseini. 2008. Karyotype analysis of Persian stone lapper, *Garra persica* Berg, 1913 (Actinopterygii: Cyprinidae) from Iran. Curr. Sci, 88: 879–885.

16. Garcia- Berthou, E. and R. Moreno-Amich. 2000. Food of introduced pumpkinseed sunfish: ontogenetic diet shift and seasonal variation. Journal of Fish Biology 57: 29-40.

17. Fidalgo, M. L., and A. Gerhardt. 2003. Distribution of the freshwater shrimp, *Atyaephyra desmarestii* (MILLET, 1831) in Portugal (Decapoda, Natantia). Crustaceana 75 (11): 1375-1385.

18. Gorgin, S. 1996. The first record of two species of freshwater shrimps (decapoda, caridea, atyidae) from Iran. Crustacean 69(5): 662-668.

19. Hasegawa, M. 1981. Simple and rapid technique for a chromosome study of Crustacea. Research Crustacea 11: 111–113.

20. Hayashi, K and Y. Fujiwara. 1988. A new method for obtaining metphase chromosomes from the regeneration blastema of *Penaeus japonicas*. Nippon suisan gakkaishi 54(9): 1963-1965.

21. Hulata, G. 2001. Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. Genetica 111: 155-73.

22. Karami, M and S. Gorgin. 2000. A preliminary study of freshwater shrimps distribution in Iran and indicating the research necessity. Pajouhesh and Sazandegi. No. 49: 116-119.

23. Kalbassi, M. R., S. V. Hosseini and R. Tahergorabi. 2008. Karyotype Analysis in Schizothorax zarudnyi from Hamoon Lake, Iran. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 8: 335-340.

24. Khan, T. A., M. P.Bhise and W. S. Lakra. 2000. Chromosome manipulation in 163 fish a review. Indian Journal of Animal Science 70: 213-221

25. Kirpichnikov, V. S. 1981. Genetic Bases of Fish Selection. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 342.

26. Lakra, W. S., P. Kumar., M. Das and U. Goswami. 1997. Improved techniques of chromosome preparation from shrimp and prawn. Asian Fisheries Science 10:117-121.

27. Macgregor, U. C. 1993. Chromosome preparation and analysis. Chapter, 6: 177-186.

28. Meurisse-Genin, M., A. Reydams-Detollenaere., O. Donatti and J. C. Micha. 1985. Caracteristiques biologiques de la crevette d' eau douce *Atyaephyra desmaresti* Millet dans la Meuse. Annales de Limnologie 21: 127-140.

29. Mezhzherin, S and I. Lisetskii. 2004. Genetic structure of crucian carp (Cypriniformes, Cyprinidae, *Carassius* L.1758) populations of middle-Dnieper basin. Tsitologiia I Genetika 38(5): 35-44.

30. Mittal, O.P and U. Dhall. 1971. Chr 175 omosome studies in three species of freshwater 176 decapods (Crustacea). Cytologia 36: 633-638.

31. Murofushi, M and Y. Deguchi. 1990. Karyotype evolution in Decapoda , Crustacea. In: R. Hirano and I. Hanyu (Editors),

www.SID.com

Archive of SID
Procceding of the Second Asian Fisheries Forum. Asian Fisheries Society. Tokyo, Japan, pp.549-553.
32. Nagamine, C., A.W. Knight., A. Maggenti and G. Paxman. 1980. Effects of androgenic ablation on male primary and secondary sexual characteristics in the Malaysian prawn, Macrobrachium rosenbergii (de Man) (Decapoda, Palaemonidae), with first evidence of induced feminisation in a nonhermaphroditic decapod. Gen. Comp. Endocrinol. 41, 423 – 441.
33. Nakamura, H. K., A. Machii., T. Wada., M. Awaji and S. J. Townsley. 1988. A check list of decapods chromosomes (Crustacea). Bulletin of the National Research Institute of Aquaculture 13: 1 – 9.
34. Niiyama, H. 1934. The chromosomes of crayfish *Cambarus japonicus* (de Haan). 187 Journal of Faculty of Science, Hokkaido University 3: 41– 53.
35. Norris, B. N., F. E. Coman., M. J. Sellars and N. P. Preston. 2005. Triploid induction in *Penaeus japonicus* (Bate) with 6-dimethylaminopurine. Aquaculture Research 36: 202–206.
36. Petrovic, A. 1991. The karyotype of the parthenogenetic Artemia (Crustacea) from SeEovlje, Yugoslavia. Kluwer academic publishers. 83: 289-291.
37. Tan, X., G. Q. Jian., B. Chenb., L. Chenc and X. Li. 2004. Karyological analyses on redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). 206 Aquaculture 234: 65–76.
38. Thiriot-Quiévreux, C., A. Leit?o and J. Cusin-Roudy. 1998. Chromosome diversity in Mediterranean and Antarctic Euphausiid species (EUPHAUSIACEA). Journal of Crustacean Biology 18: 290-297.
39. Thorgaard, G. H and J. E. Disney. 1993. Chromosome preparation and analysis. Chapter, 6: 171-186.
40. Toth, B., E. Varkonyi., A. Hidas., E. Meleg and L. Varadi. 2005. Genetic analysis of offspring from intra-and interspecificcrosses of *Carassius auratus gibelio* by chromosome and RAPD analysis. Journal of Fish Biology 66: 784-797.
41. Winkler, F. M., D. Garcia-Melys and C. Palma-Rojas. 2004. Karyotypes of three South East Pacific flound erspecies of the family Paralichthyidae. Aquaculture Research, 35: 1295-1298.
42. Xiang, J. H., R. Y. Liu and L. H. Zhou. 1994. Chromosomes of marine shrimps with special reference to different techniques. Aquaculture 111: 321.
43. Yarmohammadi, M and M. Pourkazemi. 2004. Cytogenetic study of artemia from urmiah, maharloo and incheborun lakes, Hedrobiologia 529: pp 99-104.
44. Zare, P., M. Naderi,, H. R. Eshghi and C. Anastasiadou. 2011. Reproductive traits of the freshwater shrimp *Caridina fossarum* Heller, 1862 (Decapoda, Caridea,Atyidae) intheGhomp-Atashkedehspring(Iran), Jouanal Limnologica, no. of Pages 5
45. Zhang, X., L. Fuhua and J. Xiang. 2003. Chromosome behavior of heat shock induced triploid in *Fenneropenaeus chinensis*. Chin. J. Ocean. Lim. 3: 22-228.
46. Zhou, L and J. Gui. 2002. Karyotypic 223 diversity in polyploidy gibel carp, *Carassius* 224 *auratus gibelio* Bloch. Genetica 115: 223-232.
www.SID.com