Summer (2023) 12(45): 87-98
DOI: 10.30473/eab.2023.68141.1912
Received: 7 Jun 2023 Accepted: 4 Nov 2023

Experimental Animal Biology Open Access

ORIGINAL ARTICLE

Effects of polyploidy induction on growth performance, survival rate, and erythrocyte of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Abdoljabbar Irani

Artemia and Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran.

Correspondence
Abdoljabbar Irani
Email: a.irani@urmia.ac.ir

How to cite
Irani, A. (2023). Effects of polyploidy induction on growth performance, survival rate, and erythrocyte of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Experimental Animal Biology, 12*(45), 87-98.

ABSTRACT

In this study, rainbow trout diploid, triploid, and tetraploid were comparatively investigated regarding the growth performance, survival rate, and erythrocyte characteristics. For the triploid production, the fertilized eggs received 26.5 ℃ thermal shock under three treatments: 1. double 1-min shock after 15 and 30 min of the fertilization, 2. one 15-min shock after 15 min of the fertilization, and 3. one 12-min shock after 20 min of the fertilization. Tetraploidy was induced by application of 28 ℃ thermal shock under three treatments: 1. 10-min shock after 59 degree-hours of the fertilization, 2. 10-min shock after 66 degree-hours of the fertilization, and 3. 10-min shock after 72 degree-hours of the fertilization. The best triploidization results, 66.6% survival rate and 87% triploidization rate, achieved by application of 12-min shock after 20 min of the fertilization. The best tetraploidization results, 54.9% survival rate and 7.94% triploidization rate, achieved by application of 10-min shock after 59 degree-hours of the fertilization. There were no significant differences between the triploid and diploid fish, wheras the tetraploids showed significantly lower growth rate than the diploids. In conclusion, in this study, triploid and tetraploid production of rainbow trout were improved, and application of erythrocyte cell size as a reliable and efficient polyploidy detection method was emphasized.

KEYWORDS

Erythrocyte, Growth, Polyploidization, Rainbow trout, Survival.

© 2023, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

سال دوازدهم، شماره اول، پیاپی چهل و پنجم، تابستان ۱۴۰۲ (۹۸-۸۷)
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۱۳
DOI: 10.30473/eab.2023.68141.1912

نشریه علمی
زیست‌شناسی جانوری تجربی

«مقاله پژوهشی»

بررسی تاثیر القای پلی‌پلوئیدی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بر رشد، بقا و گلبول‌های قرمز

عبدالجبار ایرانی

پژوهشکده آرتمیا و آبزی‌پروری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

نویسنده مسئول:
عبدالجبار ایرانی
رایانامه: a.irani@urmia.ac.ir

چکیده

در این پژوهش، ماهیان دیپلوئید، تریپلوئید و تتراپلوئید قزل‌آلای رنگین‌کمان از نظر رشد، بقا و ویژگی‌های گلبول قرمز مورد مقایسه قرار گرفتند. برای تولید ماهیان تریپلوئید، تخم‌های لقاح یافته تحت شوک گرمایی ۲۶/۵ درجه سانتی‌گراد در قالب سه تیمار: ۱- دوبار شوک یک دقیقه‌ای در ۱۵ و ۳۰ دقیقه بعد از لقاح، ۲- یک‌بار شوک ۱۵ دقیقه‌ای در ۱۵ دقیقه بعد از لقاح و ۳- یک‌بار شوک ۱۲ دقیقه‌ای در ۲۰ دقیقه بعد از لقاح، قرار گرفتند. برای تولید ماهیان تتراپلوئید، تخم‌های لقاح یافته تحت شوک گرمایی ۲۸ درجه سانتی‌گراد در قالب سه تیمار: ۱- شوک ۱۰ دقیقه‌ای در ۵۹ ساعت-درجه بعد از لقاح، ۲- شوک ۱۰ دقیقه‌ای در ۶۶ ساعت-درجه بعد از لقاح و ۳- شوک ۱۰ دقیقه‌ای در ۷۲ ساعت-درجه بعد از لقاح، قرار گرفتند. در تریپلوئیدسازی، شوک گرمای ۲۶/۵ درجه سانتی‌گراد در ۲۰ دقیقه بعد از لقاح به‌مدت ۱۲ دقیقه با درصد تفریخ ۶۶/۶ درصد و نرخ تریپلوئیدسازی ۸۷ درصد بهتر از سایر گروه‌ها بود. در تتراپلوئیدسازی، شوک گرمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در ۵۹ ساعت-درجه بعد از لقاح به‌مدت ۱۰ دقیقه با درصد تفریخ ۵۴/۹ درصد و نرخ تتراپلوئیدسازی ۷/۹۴ درصد نسبت به سایر تیمارها مناسب‌تر بود. ماهیان تریپلوئید از نظر رشد با دیپلوئیدها اختلاف معنی‌داری نداشتند اما رشد ماهیان تتراپلوئید به‌طور معنی‌داری کمتر از دیپلوئیدها بود. به‌طورکلی، در این مطالعه علاوه بر بهینه‌سازی روش‌های تریپلوئید و تتراپلوئیدسازی، استفاده از طول، عرض و مساحت سلولی گلبول‌های قرمز، به‌عنوان یک روش کاربردی و کم هزینه برای تفکیک ماهیان دیپلوئید، تریپلوئید و تتراپلوئید قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد تائید قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی

پلی‌پلوئیدسازی، قزل‌آلای رنگین‌کمان، گلبول قرمز، رشد و بقا.

استناد به این مقاله:
ایرانی، عبدالجبار (۱۴۰۲). بررسی تاثیر القای پلی‌پلوئیدی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بر رشد، بقا و گلبول‌های قرمز. فصلنامه زیست‌شناسی جانوری تجربی، ۱۲(۴۵)، ۹۸-۸۷.

مقدمه

عدم وجود کنترل و مدیریت مناسب ماهیان رسیده و کاهش یا توقف رشد ناشی از فعالیت‌های تولیدمثلی به‌ویژه در ماهیان نر از عوامل مهم ممانعت‌کننده تولید در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشند (Hwang, 2012)، به‌همین دلیل، در گذشته، اندازه بازاری این ماهی حدود ۳۰۰-۲۵۰ گرم بوده است. با استفاده از تکنیک تولید ماهیان تمام ماده و حذف جنس نر از گله ماهیان پرورشی، بسیاری از این مشکلات برطرف گردید و ماهیان بدون آن‌که دچار افت رشد بشوند تا اوزان حدود ۷۰۰-۵۰۰ گرم قابل پرورش می‌باشند. اما در وزن‌های بالاتر، به‌دلیل رشدونمو تخمک‌ها، بخش زیادی از انرژی حاصل از غذا صرف فعالیت تولیدمثلی می‌گردد و به‌تبع آن در ماهیان ماده نیز کاهش شدید رشد اتفاق می‌افتد. در سال‌های اخیر، تریپلوئیدسازی به‌عنوان یک تکنیک کاربردی و مناسب برای بسیاری از گونه‌های ماهیان پرورشی مورد آزمایش قرار گرفته است (Maxime, 2008; Gjedrem *et al*., 2012; Guner *et al*., 2016). به‌کارگیری ماهیان تریپلوئید مزایایی زیادی در صنعت آبزی‌پروری دارد؛ این ماهیان به‌خاطر برخوردار بودن از سه سری کروموزوم، عقیم هستند و به‌دلیل کاهش رشدونمو اندام‌های جنسی (Cal *et al*., 2006)، انرژی دریافت‌شده از غذا به‌جای این‌که صرف رسیدگی جنسی شود، در جهت رشد بدن و تولید گوشت به‌کار می‌رود (Felip *et al*., 2001; Piferrer *et al*., 2009; Kizak *et al*., 2013). درنتیجه، رشد این ماهیان سریعتر از ماهیان دیپلوئید است. به عبارت دیگر، به خاطر عقیم بودن ماهیان تریپلوئید، کاهش اشتها، کاهش بازده غذایی، افت کیفیت گوشت و ظاهر ماهی، افزایش خصوصیت تهاجمی و افزایش مرگ‌ومیر بعد تخم‌ریزی که در ماهیان دیپلوئید اتفاق می‌افتد، در این ماهیان وجود ندارد (Kim *et al*., 2017).

تریپلوییدسازی در ماهیان می‌تواند به روش‌های مستقیم و غیرمستقیم انجام شود. در روش مستقیم، با استفاده از شوک‌های فیزیکی (گرما یا فشار) زودهنگام از خروج گویچه قطبی دوم جلوگیری می‌شود، در نتیجه، این تخم‌ها حاوی سه سری کروموزوم می‌شوند. در روش غیرمستقیم، ابتدا به‌وسیله اعمال شوک‌های فیزیکی دیرهنگام و توقف تقسیم میتوز اول، ماهیان تتراپلوییید تولید می‌گردد، سپس با مولدسازی ماهیان تتراپلوییید و آمیزش آنها با ماهیان دیپلوییید، ماهیان تریپلوییید حاصل می‌گردد. از مزایای روش غیرمستقیم موفقیت کامل در تولید ماهیان تریپلوییید و نیز بهبود نسبی بازماندگی است (Bekcan *et al*., 2016).

از آنجاکه پلوئیدسازی خیلی به‌ندرت بازده ۱۰۰٪ دارد، بنابراین برای شناسایی و تفکیک این ماهیان از دیپلوئیدها، یک روش معتبر و سریع لازم است. باوجودآن‌که ماهیان دیپلوئید، تریپلوئید و تتراپلوئید از لحاظ ریخت‌شناختی مشابه هستند، اما از نظر سیتولوژی تفاوت‌هایی بین آن‌ها وجود دارد که به وسیله آن می‌توان این ماهیان را به‌طور مستقیم یا غیر مستقیم از هم تفکیک کرد (Tiwary *et al*., 2004; Maxime, 2008). مهم‌ترین روش‌هایی که تاکنون موردبررسی قرار گرفته، عبارت است از: الکتروفورز پروتئین‌ها (Liu *et al*., 1978; Shimizu *et al*., 1993)، اندازه‌گیری قطر هسته و گلبول قرمز (Pradeep *et al*., 2011; Olele & Tiguiri 2013)، شمارش کروموزم‌ها (Thorgaard, 1983; Tiwary *et al*., 1997)، تعیین محتوی DNA به‌روش فلوسیتومتری (Lamatsch *et al*., 2000; Alcantar-Vazquez *et al*., 2008) و رنگ‌آمیزی هستک‌ها با نیترات نقره (Howell & Black 1980; Porto-Foresti *et al*., 2002). در عمل، روش اندازه‌گیری قطر و سطح هسته و سلول گلبول‌های خونی رواج بیش‌تری دارد (Kim *et al*., 2017). مهم‌ترین شاخص در این روش، افزایش اندازه سلول و هسته گلبول‌های قرمز در ماهیان تریپلوئید و تتراپلوئید است که فقط به صورت افزایش طول و عرض سلول اتفاق می‌افتد و ارتفاع سلول بدون تغییر باقی می‌ماند (Kim *et al*., 2017). حجم هسته یا سلول عمدتاً متاثر از محتوای کرموزومی آن است. بدین لحاظ هسته و سلول‌های ماهیان تریپلوئید و تتراپلوییید به دلیل دارا بودن کروموزوم بیشتر در مقایسه با انواع دیپلوییید عموماً مساحت و حجم بزرگتری دارند. به‌همین دلیل، در این پژوهش برای شناسایی ماهیان پلی‌پلوئید از روش محاسبه اندازه و سطح گلوبول‌های قرمز استفاده شد. این روش برای تشخیص پلی‌پلوئیدی در بسیاری از تحقیقات مورداستفاده قرار گرفته است (Lincoln & Scott, 1983; Johnstone, 1985; Bencsik *et al*., 2013; Kim *et al*., 2017).

در ایران نیز در سال‌های گذشته مطالعاتی در زمینه امکان تولید ماهیان تریپلوئید و تتراپلوئید انجام شده است (کلباسی و همکاران، ۱۳۸۲؛ جوهری و کلباسی، ۱۳۸۵؛ کلباسی و جوهری، ۱۳۸۷؛ سوری‌نژاد و همکاران، ۱۳۸۸؛ سوری‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۰؛ گندمکار و همکاران، ۱۳۹۹) اما در مطالعات اشاره شده، ماهیان دیپلوئید فقط با ماهیان تریپلوئید یا تتراپلوئید مقایسه شده

است و بررسی مقایسه‌ای همزمان ماهیان دیپلوئید، تریپلوئید و تتراپلوئید انجام نشده است. در هیچ‌کدام از مطالعات پیشین، بررسی مقایسه‌ای اندازه گلبول‌های قرمز ماهیان تریپلوئید و تتراپلوئید و همچنین رابطه رگرسیونی بین ابعاد سلول و هسته گلبول‌های قرمز دیپلوئید، تریپلوئید و تتراپلوئید صورت نگرفته است. بنابراین در پژوهش حاضر، ضمن بهینه‌سازی روش‌های تریپلوئیدسازی و تتراپلوئیدسازی، این سه گروه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از نظر شاخص‌های رشد، بقا و گلبول‌های قرمز خون موردبررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

ماهی و لقاح تخم‌ها

تعداد ۱۰ عدد مولد ماده دو ساله قزل‌آلای رنگین‌کمان (۵ ماهی برای تریپلوئیدسازی و ۵ ماهی برای تتراپلوئیدسازی) با میانگین وزن ۱۶۶ ± ۲۷۸۰ گرم که خصوصیات ظاهری مناسبی داشتند انتخاب شدند. تخم‌های آن‌ها با فشار دادن به ناحیه شکمی خارج و به منظور یکسان سازی شرایط فیزیکی و فیزیولوژیکی تخم‌ها برای تمامی تیمارها، باهم مخلوط شدند. سپس مقداری تخم به منظور تعیین تعداد در گرم و محاسبات بعدی، نمونه گرفته، توزین و شمارش گردید. تعداد هشت ظرف برای لقاح تخم‌ها فراهم گردید و در هر ظرف مقدار ۵۰۰ گرم تخم بعد از جداسازی مایع تخمدانی قرار داده شد. برای لقاح گروه‌های تریپلوئید از اسپرم نرهای xx به اندازه ۲۵ میلی‌لیتر اسپرم رقیق‌شده به‌ازای هر ظرف حاوی ۵۰۰ گرم تخم استفاده گردید. برای گروه‌های تتراپلوئید، اسپرم‌های حاصل از ماهیان نر نرمال باهم مخلوط و به نسبت مساوی اضافه و لقاح به روش استاندارد انجام شد. تخم‌های لقاح‌یافته با بافوداین ضدعفونی و سپس با آب نمک شستشو شدند. دمای آب در زمان تکثیر ماهیان، ۱۳/۱ درجه سانتی‌گراد بود.

تیمارهای آزمایشی

برای القای تریپلوئیدی و تتراپلوئیدی در پژوهش حاضر، به‌ترتیب شوک‌های گرمای ۲۶/۵ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. برای این منظور یک تراف انکوباسیون تخم قزل‌آلا (۲۰ × ۴۵ × ۲۲۰ سانتی‌متر) را پر از آب کرده و با سیستم ایرلیفت، جریان چرخشی در آن برقرار گردید (Irani & Agh, 2020). به‌وسیله سه عدد بخاری آبی با قابلیت تنظیم دما خودکار، دمای آب روی ۲۶/۵ یا ۲۸ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد.

در آزمایش تریپلوئیدسازی، تخم‌های لقاح‌یافته در قالب سه تیمار مشروح زیر برای جلوگیری از خروج گویچه قطبی دوم تحت شوک گرمای ۲۶/۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و یک گروه نیز به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

تیمار ۱: دوبار شوک گرما به‌مدت یک دقیقه در زمان‌های ۱۵ و ۳۰ دقیقه بعد از لقاح

تیمار ۲: یک‌بار شوک گرما به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵ دقیقه بعد از لقاح

تیمار ۳: یک‌بار شوک گرما به‌مدت ۱۲ دقیقه در ۲۰ دقیقه بعد از لقاح

شاهد: بدون شوک

در آزمایش تتراپلوئیدسازی تخم‌های لقاح‌یافته، در قالب سه تیمار مشروح زیر برای توقف تقسیم میتوز اول، به‌مدت ۱۰ دقیقه تحت شوک گرمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و یک گروه نیز به‌عنوان شاهد درنظر گرفته شد.

تیمار ۱: شوک‌دهی تخم‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان در ۵۹ ساعت–درجه بعد از لقاح

تیمار ۲: شوک‌دهی تخم‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان در ۶۶ ساعت–درجه بعد از لقاح

تیمار ۳: شوک‌دهی تخم‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان در ۷۲ ساعت–درجه بعد از لقاح

شاهد: بدون شوک

بعد از اتمام شوک‌دهی، تخم‌ها به داخل تراف‌های نگه‌داری تخم با سبدهای سوزنی (برای نگه‌داری مستقل تیمارهای مختلف) منتقل و در شرایط استاندارد نگه‌داری شدند. حدود ۱۵ روز بعد از لقاح، تخم‌های لقاح نیافته و مرده از تخم‌های سالم جداسازی شدند و به منظور تعیین درصد چشم‌زدن، تخم‌های هر گروه توزین و تعداد کل تخم‌ها محاسبه شدند. بعد از تفریخ برای تعیین درصد تخم‌گشایی، تعداد تخم‌های تفریخ‌نشده شمارش شدند، سپس از هر تیمار سه گروه ۲۵۰ عددی جدا و در مخازن ۳۰۰ لیتری به‌مدت ۶–۵ ماه نگه‌داری شدند.

شناسایی ماهیان تریپلوئید و تتراپلوئید

اندازه‌گیری ابعاد سلولی و هسته یکی از روش‌های معتبر جهت شناسایی انواع پلوییدی است (Bencsik *et al*., 2013; Kim *et al*., 2017). حدود ۶–۵ ماه بعد از تفریخ، بچه‌ماهیان حدود ۴۰–۲۰ گرمی بعد از بیهوشی در پودر گل میخک مورد زیست‌سنجی قرار گرفتند، سپس با سرنگ انسولین یک میلی‌لیتری در حد چند

قطره خونگیری شد. بلافاصله بعد از خونگیری، گسترش خونی تهیه شد. گسترش‌های خونی پس از تثبیت در اتانل، با گیمسا رنگ‌آمیزی شدند و لام‌های آماده‌سازی شده، در زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۴۰ مورد بررسی قرار گرفتند (Kim *et al*., 2017).

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

تنظیم و سازماندهی داده‌ها با برنامه اکسل (۲۰۱۶) و تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با برنامه اس‌پی‌اس‌اس (۲۲) انجام شد. برای مقایسه میانگین‌های گروه‌های چندگانه از آنالیز واریانس یک‌طرفه و برای آنالیز میانگین‌های ماهیان دیپلوئید و تریپلوئید و همچنین دیپلوئید و تتراپلوئید از تست تی استفاده شد.

نتایج

شاخص‌های کیفی تخم‌ها

در آزمایش تریپلوئیدسازی، میانگین قطر تخم‌ها ۵/۱ میلی‌متر و تعداد در گرم آنها ۱۱/۹ عدد بود. تخم‌های تمامی گروه‌های در روز پانزدهم بعد از لقاح چشم‌زده شدند. درصد چشم‌زدگی در تیمارهای ۱ تا ۳ به‌ترتیب ۷۷، ۵۶ و ۶۸ درصد و در گروه شاهد ۸۹ درصد بود. حدود ۲۶ روز بعد از لقاح، تفریخ لاروها انجام شد و درصد تفریخ در تیمارهای ۱ تا ۳ به‌ترتیب ۷۵/۴، ۵۵/۲ و ۶۶/۶ درصد و در گروه شاهد ۸۴/۸ درصد بود (جدول ۱).

جدول ۱. شاخص‌های کیفی تخم قزل‌آلای رنگین‌کمان در آزمایش تریپلوئیدسازی

تیمار	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	شاهد
وزن تخم (گرم)	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰
قطر تخمک (میلی‌متر)	۵/۱	۵/۱	۵/۱	۵/۱
تعداد در گرم	۱۱/۹	۱۱/۹	۱۱/۹	۱۱/۹
زمان چشم‌زدن (daf)	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵
درصد چشم زدن	۷۷	۵۶	۶۸	۸۹
زمان تفریخ (daf)	۲۶	۲۶	۲۶	۲۶
درصد تفریخ	۷۵/۴	۵۵/۲	۶۶/۶	۸۴/۸
زمان شروع تغذیه (dah)	۱۴	۱۴	۱۴	۱۴

در آزمایش تتراپلوئیدسازی، میانگین قطر تخم‌ها ۵/۱ میلی‌متر و تعداد در گرم آنها ۱۱/۸ عدد بود. تخم‌های تمامی گروه‌های در روز پانزدهم بعد از لقاح چشم‌زده شدند. درصد چشم‌زدگی در تیمارهای ۱ تا ۳ به‌ترتیب ۶۳، ۳۳ و ۱۲ درصد و در گروه شاهد ۶۶ درصد بود. حدود ۲۷ روز بعد از لقاح تفریخ لاروها انجام شد و درصد تفریخ در تیمارهای ۱ تا ۳ به‌ترتیب ۵۴/۹، ۲۴/۵ و ۹/۶ درصد و در گروه شاهد ۶۲/۲ درصد بود (جدول ۲).

جدول ۲. شاخص‌های کیفی تخم قزل‌آلای رنگین‌کمان در آزمایش تتراپلوئیدسازی

تیمار	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	شاهد
وزن تخم (گرم)	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰
قطر تخمک (میلی‌متر)	۵/۱	۵/۱	۵/۱	۵/۱
تعداد در گرم	۱۱/۸	۱۱/۸	۱۱/۸	۱۱/۸
زمان چشم‌زدن (daf)	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵
درصد چشم زدن	۶۳	۳۳	۱۲	۶۶
زمان تفریخ (daf)	۲۷	۲۷	۲۷	۲۷
درصد تفریخ	۵۴/۹	۲۴/۵	۹/۶	۶۲/۲
زمان شروع تغذیه (dah)	۱۳	۱۳	۱۳	۱۳

رشد ماهیان

در آزمایش تریپلوئیدسازی، بین وزن ماهیان تریپلوئید تیمارهای ۲ و ۳ (به‌ترتیب ۲۲/۶۳ و ۲۳/۰۶ گرم) و ماهیان دیپلوئید مربوط به تیمار ۱ (۲۲/۴۸ گرم) و گروه شاهد (۲۲/۳۲ گرم) اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0/05$).

در آزمایش تتراپلوئیدسازی، بررسی رشد ماهیان بدون تفکیک پلوئیدی، نشان داد که اختلاف قابل‌توجهی بین تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد وجود نداشت ($p>0/05$). اما میانگین وزن ماهیان تتراپلوئید (۳۰/۹۱ گرم) به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد (۳۷/۳۵ گرم) بود ($p<0/05$).

درصد تریپلوئیدسازی و تتراپلوئیدسازی

در آزمایش تریپلوئیدسازی، در تیمارهای ۱، ۲ و ۳ و گروه شاهد، درصد ماهیان تریپلوئید به‌ترتیب ۰، ۸۵، ۸۷ و ۰ درصد بود. درصد بازماندگی پایانی در این گروه‌ها به‌ترتیب ۶۷/۵۴، ۵۱/۲۲، ۶۰/۷۴ و ۷۱/۳۲ درصد بود. در آزمایش تتراپلوئیدسازی، در تیمارهای ۱، ۲ و ۳ و گروه شاهد، درصد ماهیان تتراپلوئید به‌ترتیب ۷/۹۴، ۴/۰۰، ۲/۵۳ و ۰ درصد بود. درصد بازماندگی پایانی در این گروه‌ها به‌ترتیب ۴۱/۸۷، ۱۵/۱۱، ۳/۷۵ و ۵۷/۸۶ درصد بود (جدول ۳).

اندازه گلبول‌های قرمز

بررسی مقایسه‌ای گلبول‌های قرمز ماهیان دیپلوئید، تریپلوئید و تتراپلوئید نشان داد که از نظر تمام شاخص‌های بررسی‌شده به‌استثنای عرض هسته، ماهیان تریپلوئید و تتراپلوئید نسبت به ماهیان دیپلوئید اختلاف معنی‌داری نشان دادند ($p<0/05$). از نظر

طول، عرض و مساحت هسته بین ماهیان تریپلوئید و تتراپلوئید اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0/05$). اما طول، عرض و مساحت سلول در ماهیان تتراپلوئید به‌طور معنی‌داری بیشتر از ماهیان تریپلوئید بود (جدول ۴).

بررسی نسبت افزایش اندازه سلول و هسته گلبول‌های قرمز در ماهیان دیپلوئید، تریپلوئید و تتراپلوئید نشان داد که نسبت‌های ۳n / ۲n، ۴n / ۲n و ۴n / ۳n از نظر افزایش طول سلول (به‌ترتیب ۱/۲۴ ± ۰/۰۴، ۱/۲۹ ± ۰/۰۵ و ۱/۰۴ ± ۰/۰۳) و مساحت سلول (به‌ترتیب ۱/۳۱ ± ۰/۱۱، ۱/۴۳ ± ۰/۱۱ و ۱/۱۰ ± ۰/۰۹) هر سه گروه نسبت به هم اختلاف معنی‌داری نشان دادند ($p<0/05$). از نظر عرض سلول، بین نسبت ۳n / ۲n و نسبت ۴n / ۳n اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0/05$). از نظر طول و مساحت هسته، نسبت ۳n / ۲n و نسبت ۴n / ۲n به‌طور معنی‌داری بیشتر از نسبت ۴n / ۳n بود (جدول ۵).

در شکل‌های ۱، ۲ و ۳ به‌ترتیب نمونه‌هایی از گلبول‌های قرمز ماهیان دیپلوئید، تریپلوئید و تتراپلوئید ارائه شده است. همانطورکه ملاحظه می‌شود، اختلاف اندازه سلول و هسته گلبول‌های قرمز در ماهیان پلی‌پلوئید نسبت به ماهیان دیپلوئید قابل تشخیص است.

جدول ۳. درصد پلوئیدسازی و بازماندگی پایانی قزل‌آلای رنگین‌کمان

آزمایش	تیمارها	درصد پلوئیدسازی	درصد بازماندگی پایانی
تریپلوئیدسازی	تیمار ۱: دوبار شوک ۱ دقیقه‌ای در mdf ۱۵ و ۳۰	۰	۶۷/۵۴
	تیمار ۲: شوک ۱۵ دقیقه‌ای در mdf ۱۵	۸۵	۵۱/۲۲
	تیمار ۳: شوک ۱۲ دقیقه‌ای در mdf ۲۰	۸۷	۶۰/۷۴
	شاهد: بدون شوک	۰	۷۱/۳۲
تتراپلوئیدسازی	تیمار ۱: شوک‌دهی در ۵۹ ساعت درجه	۷/۹۴	۴۱/۸۷
	تیمار ۲: شوک‌دهی در ۶۶ ساعت درجه	۴	۱۵/۱۱
	تیمار ۳: شوک‌دهی در ۷۲ ساعت درجه	۲/۵۳	۳/۷۵
	شاهد: بدون شوک	۰	۵۷/۸۶

جدول ٤. اندازه سلول و هسته گلبول‌های قرمز قزل‌آلای دیپلوئید (۲n)، تریپلوئید (۳n) و تتراپلوئید (۴n)

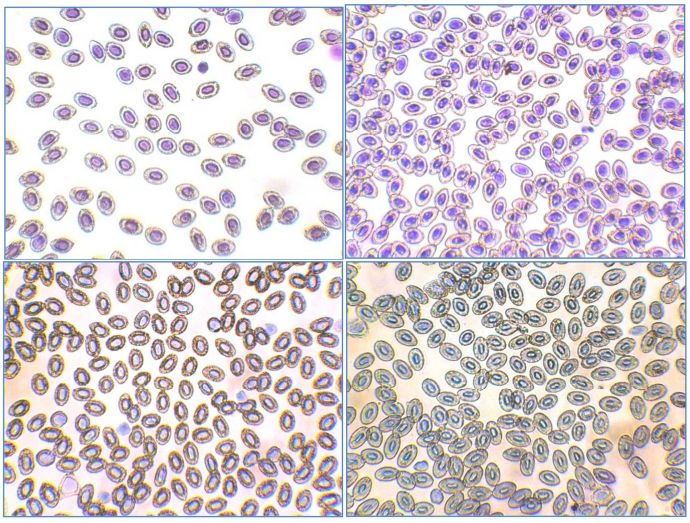
مشخصه	دیپلوئید (۲n)	تریپلوئید (۳n)	تتراپلوئید (۴n)
طول سلول (میکرومتر)	۱۵/۲۵ ± ۰/۳۳^{a}	۱۸/۹۵ ± ۰/۴۵^{b}	۱۹/۶۵ ± ۰/۵۴^{c}
عرض سلول (میکرومتر)	۹/۵۵ ± ۰/۳۱^{a}	۱۰/۰۶ ± ۰/۵۲^{b}	۱۰/۶۱ ± ۰/۵۲^{c}
مساحت سلول (میکرومترمربع)	۱۱۴/۶۵ ± ۵/۰۶^{a}	۱۴۹/۷۶ ± ۱۰/۳۲^{b}	۱۶۳/۷۹ ± ۱۱/۱۹^{c}
طول هسته (میکرومتر)	۸/۰۴ ± ۰/۳۳^{a}	۹/۹۶ ± ۰/۵۷^{b}	۱۰/۰۱ ± ۰/۵۴^{b}
عرض هسته (میکرومتر)	۴/۵۱ ± ۰/۲۱^{a}	۴/۳۷ ± ۰/۳۵^{a}	۴/۵۶ ± ۰/۳۶^{a}
مساحت هسته (میکرومترمربع)	۲۸/۳۸ ± ۰/۹۲^{a}	۳۴/۱۵ ± ۳/۵۵^{b}	۳۵/۹۶ ± ۴/۲۰^{b}

* داده‌ها براساس میانگین ± انحراف معیار هستند. حروف مختلف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($\alpha<0/05$) در هر ردیف است.

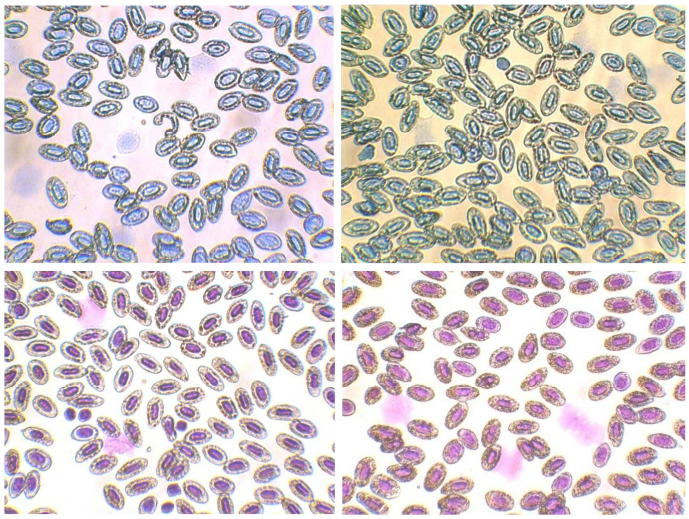
جدول ۵. نسبت اندازه سلول و هسته گلبول‌های قرمز قزل‌آلای دیپلوئید (۲n)، تریپلوئید (۳n) و تتراپلوئید (۴n)

مشخصه	۳n / ۲n	۴n / ۲n	۴n / ۳n
طول سلول	۱/۲۴ ± ۰/۰۴^{b}	۱/۲۹ ± ۰/۰۵^{c}	۱/۰۴ ± ۰/۰۳^{a}
عرض سلول	۱/۰۶ ± ۰/۰۷^{a}	۱/۱۱ ± ۰/۰۶^{b}	۱/۰۶ ± ۰/۰۷^{a}
مساحت سلول	۱/۳۱ ± ۰/۱۱^{a}	۱/۴۳ ± ۰/۱۱^{b}	۱/۱۰ ± ۰/۰۹^{c}
طول هسته	۱/۲۴ ± ۰/۱۰^{b}	۱/۲۵ ± ۰/۱۰^{b}	۱/۰۱ ± ۰/۰۸^{a}
عرض هسته	۰/۹۷ ± ۰/۰۷^{a}	۱/۰۱ ± ۰/۰۶^{ab}	۱/۰۵ ± ۰/۱۰^{b}
مساحت هسته	۱/۲۰ ± ۰/۱۳^{b}	۱/۲۷ ± ۰/۱۵^{b}	۱/۰۶ ± ۰/۱۵^{a}

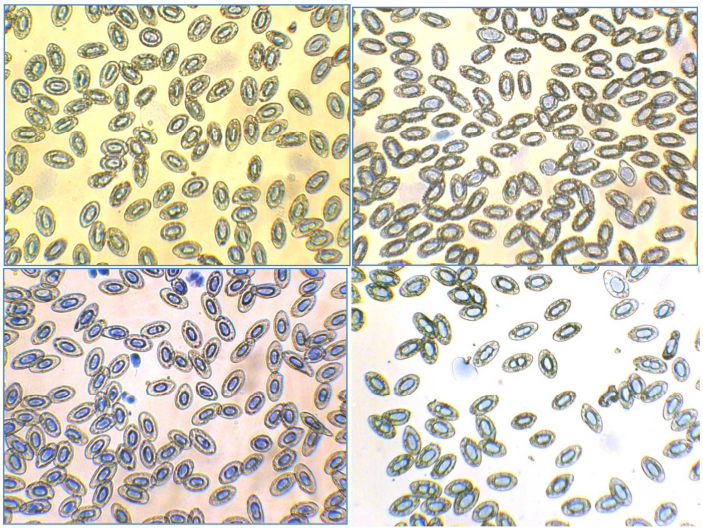
* داده‌ها براساس میانگین ± انحراف معیار هستند. حروف مختلف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($\alpha<0/05$) در هر ردیف است.



شکل ۱. گلبول‌های قرمز ماهیان دیپلوئید قزل‌آلای رنگین‌کمان



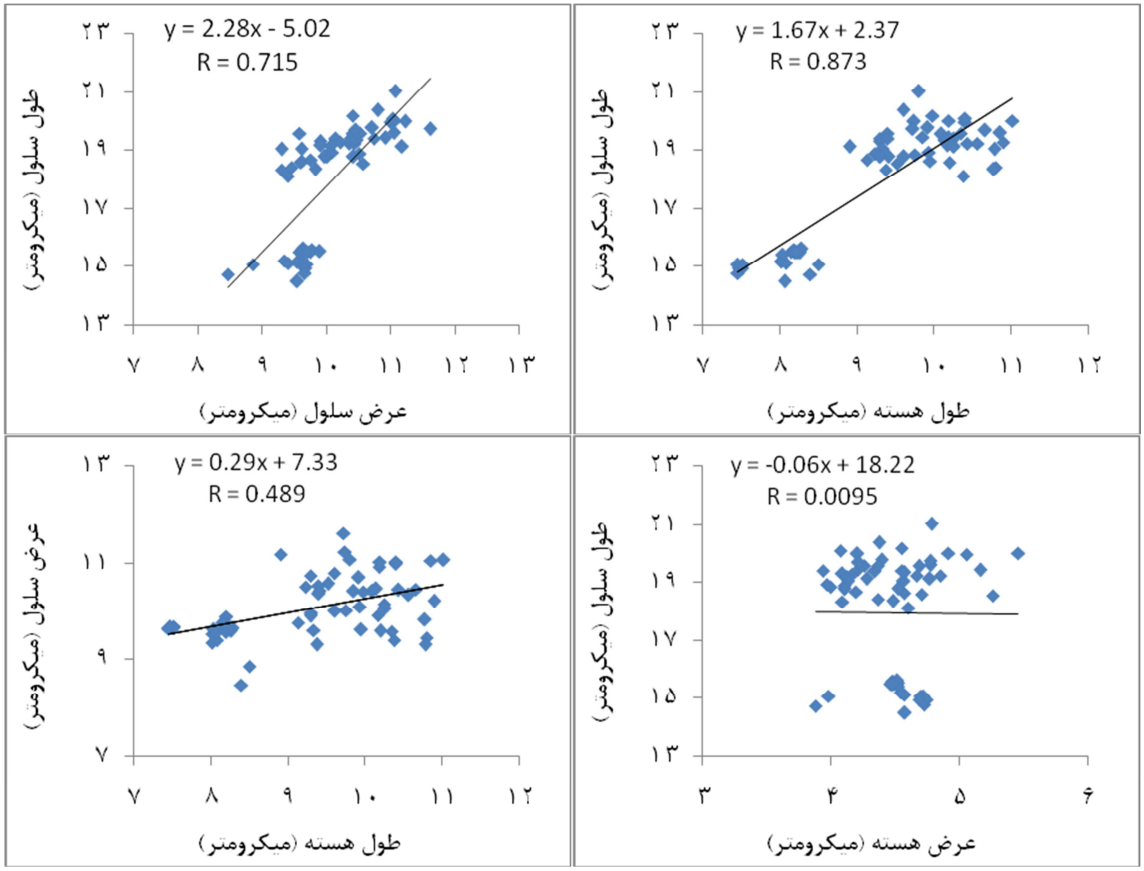
شکل ۲. گلبول‌های قرمز ماهیان تریپلوئید قزل‌آلای رنگین‌کمان



شکل ۳. گلبول‌های قرمز ماهیان تتراپلوئید قزل‌آلای رنگین‌کمان

رابطه رگرسیونی و همبستگی بین طول و عرض سلول و هسته در گلبول‌های قرمز

بررسی روابط رگرسیونی بین اندازه سلول و اندازه هسته گلبول‌های قرمز در مجموع ماهیان دیپلوئید، تریپلوئید و تتراپلوئید نشان داد بیشترین مقدار همبستگی (۸۷٪) بین طول سلول و طول هسته وجود دارد. بین طول سلول و عرض سلول نیز همبستگی نسبتا بالایی (۷۱٪) مشاهده شد. اما عرض سلول نسبت به طول هسته همبستگی نسبتا ضعیفی (۴۹٪) نشان داد. همچنین طول سلول همبستگی ناچیزی (۰/۹٪) با عرض هسته داشت (شکل ۴).



شکل ۴. رابطه رگرسیونی بین ابعاد سلول و هسته گلبول‌های قرمز دیپلوئید، تریپلوئید و تتراپلوئید قزل‌آلای رنگین‌کمان.

بحث

در این پژوهش تریپلوئیدسازی و تتراپلوئیدسازی به‌ترتیب با استفاده از شوک‌های گرمای زودهنگام برای جلوگیری از خروج گویچه قطبی دوم و دیرهنگام برای توقف تقسیم اول میتوزی انجام شد. در آزمایش تریپلوئیدسازی، اعمال شوک گرمای ۲۶/۵ درجه سانتی‌گراد در ۲۰ دقیقه بعد از لقاح به‌مدت ۱۲ دقیقه با درصد تفریخ ۶۶/۶ درصد و نرخ تریپلوئیدسازی ۸۷ درصد شرایط مناسبی را فراهم آورده است. Diaz و همکاران (۱۹۹۳) سه فاکتور فیزیولوژیک موثر بر تریپلوئیدسازی شامل زمان شروع شوک‌دهی (۱۵ و ۲۵ دقیقه بعد از لقاح)، درجه حرارت تکثیر و انکوباسیون تخم (۸-۶، ۱۰-۸/۱، ۱۲-۱۰/۱ و ۱۴-۱۲/۱ درجه سانتی‌گراد) و زمان ماندن تخم در محوطه شکمی (۲، ۶ و ۱۰ روز) را با شوک دمایی ۲۶/۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه در قزل‌آلای رنگین‌کمان موردبررسی قرار دادند. نتایج آنها نشان داده است که زمان القای شوک تاثیر معنی‌داری بر درصد تریپلوئیدسازی نداشته است (۷۳/۴ درصد در ۱۵ دقیقه و ۷۸/۶ درصد در ۲۵ دقیقه) که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. نرخ تریپلوئیدسازی در دمای پائین ۸-۶ درجه سانتی‌گراد (۸۵/۹ درصد) به‌طور معنی‌داری بیشتر از نرخ آن در دمای بالا ۱۴-۱۲/۱ درجه سانتی‌گراد (۶۳ درصد) بود. اما نرخ تریپلوئیدسازی به دست‌آمده در مطالعه حاضر در دمای تکثیر و انکوباسیون ۱۳/۱ درجه سانتی‌گراد مشابه نرخ به‌دست‌آمده در دمای پائین محققان

فوق بوده است. بنابراین احتمالا تاثیرگذاری سایر عوامل بیشتر بوده است، همانطورکه محققان فوق گزارش کردند زمان ماند تخم در محوطه شکمی به مدت ۲، ۶ و ۱۰ روز بر نرخ تریپلوئیدسازی (به‌ترتیب ۴۶/۱، ۵۴/۷ و ۷۶/۸ درصد) بسیار موثر است (Diaz *et al.,* 1993). در مطالعه دیگر، تریپلوئیدسازی قزل‌آلای رنگین‌کمان در دمای انکوباسیون ۱۱ درجه سانتی‌گراد با شوک ۲۶ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱ دقیقه و ۴۰ دقیقه بعد از لقاح باعث بازماندگی به‌ترتیب ۶۴/۹ و ۵۷/۰ درصد و نرخ تریپلوئیدسازی به‌ترتیب ۸۳ و ۹۰ درصد شده است (Solar *et al.,* 1984). تریپلوئیدسازی قزل‌آلای رنگین‌کمان با شوک دمایی ۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه در زمان ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه بعد از لقاح در دمای انکوباسیون ۱۰ درجه سانتی‌گراد نشان داد که بالاترین مقدار چشم‌زدگی (۵۱/۱۹ درصد) و تفریخ (۴۱/۰۲ درصد) در شوک ۱۵ دقیقه بعد از لقاح و بالاترین مقدار تریپلوئیدسازی (۹۰/۰ درصد) در شوک ۲۰ دقیقه بعد از لقاح مشاهده شده است (Dogankaya & Bekcan, 2014). کلباسی و جوهری (۱۳۸۷) در مطالعه خود با استفاده از شوک دمایی ۲۶/۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۲۰ دقیقه بعد از لقاح به نرخ تریپلوئیدسازی ۸۰ درصد دست یافتند که نسبت به مطالعه حاضر کمی پائین‌تر بود.

با توجه به نتایج مطالعات اشاره‌شده و مطالعه حاضر، با استفاده از شوک‌های فیزیکی زودهنگام برای جلوگیری از خروج گویچه قطبی دوم به‌سختی می‌توان به نرخ تریپلوئیدسازی ۱۰۰ درصد دست یافت و مقدار بازماندگی در تخم‌های شوک‌دیده به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه دیپلوئید معمولی است. چراکه موفقیت القای پلوییدی، تابع شرایط محیطی و ویژگی‌های والدین است. زمان آغاز شوک‌دهی (زمان پس از لقاح)، دوره شوک دهی و دمای شوک از مهم‌ترین عوامل موثر در موفقیت شوک جهت القای پلوییدی محسوب می‌گردند (Dunhum, 2004). همچنین عوامل دیگری نظیر ویژگی‌های خاص هر گونه (سرعت تکامل جنینی و تقسیمات سلولی) و دمای آب انکوباسیون قبل از اعمال شوک، اختلاف دمای آب نگهداری مولدین و دمای شوک (Pandian & Koteeswaran, 1998)، کیفیت گامت‌های مورد استفاده خصوصا اندازه و درجه رسیدگی تخمک‌ها (Diaz *et al.,* 1993) و حساسیت‌های خاص هر نژاد یا جمعیت نسبت به شوک در بازدهی شوک موثر هستند. به‌همین دلیل، بسیاری از محققان و صاحب‌نظران برای تولید ماهیان تریپلوئید، روش غیر مستقیم را ترجیح می‌دهند، بدین صورت که ابتدا با استفاده از شوک‌های دیرهنگام، ماهیان تتراپلوئید تولید می‌گردد، سپس با آمیزش این ماهیان با ماهیان دیپلوئید معمولی، ماهیان تریپلوئید تولید می‌شود (Chourrout *et al.,* 1986; Horstgen-Schwark, 1993). در آزمایش تتراپلوئیدسازی مطالعه حاضر، اعمال شوک گرمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در ۵۹ ساعت–درجه بعد از لقاح به‌مدت ۱۰ دقیقه با درصد تفریخ ۵۴/۹ درصد و نرخ تتراپلوئیدسازی ۷/۹۴ درصد نسبت به سایر تیمارها مناسب‌تر بوده است. در مطالعه کلباسی و همکاران (۱۳۸۲) با شوک ۲۸ درجه سانتی‌گراد، مناسب‌ترین زمان شوک‌دهی ۷۴ ساعت–درجه گزارش شده است که در آن، بازده تتراپلوئیدسازی ۸/۴ درصد بوده است. درافشان و همکاران (۱۳۹۳) مناسب‌ترین زمان شوک‌دهی را با توجه به قطر تخمک، ۷۵–۶۵ ساعت–درجه بعد از لقاح گزارش کرده‌اند. این تفاوت نسبتا زیاد در زمان مناسب شوک‌دهی با مطالعه حاضر، احتمالا مربوط به دمای انکوباسیون تخم‌ها بوده است. چراکه در تحقیق حاضر دمای انکوباسیون تخم‌ها ۱۳/۱ درجه سانتی‌گراد بود اما در مطالعه کلباسی و همکاران (۱۳۸۲) دمای انکوباسیون، ۸/۵ درجه سانتی‌گراد و در مطالعه درافشان و همکاران (۱۳۹۳)، ۱۱ درجه سانتی‌گراد بوده است. طبیعتا با افزایش درجه حرارت سرعت تقسیمات سلولی و تکوین جنین افزایش می‌یابد و اعمال شوک بایستی در زمان کوتاه‌تری بعد از لقاح انجام شود.

نرخ تلفات طی دوره انکوباسیون تخم‌ها در گروه‌هایی که شوک دریافت کرده بودند به‌طور قابل‌توجهی بیشتر از گروه شاهد بود. همچنین نرخ تلفات در آزمایش تتراپلوئیدسازی بسیار بیشتر از آزمایش تریپلوئیدسازی بود. نکته حائز اهمیت این است که هم در تریپلوئیدسازی و هم در تتراپلوئیدسازی، اعمال شوک در زمان مناسب، نه تنها باعث افزایش پلوئیدسازی می‌شود بلکه باعث کاهش نرخ تلفات نیز می‌گردد. پدیده‌ای که توسط سایر محققان نیز گزارش شده است (کلباسی و همکاران، ۱۳۸۲؛ بهرامی باباحیدری و همکاران، ۱۳۹۶؛ Solar *et al.,* 1984). بنابراین با توجه به اینکه نژاد ماهی و ویژگی‌های مولدین و همچنین فاکتورهای محیطی ممکن است در کارگاه‌های مختلف متفاوت باشد، برای تعیین پروتکل مناسب تریپلوئیدسازی و تتراپلوئیدسازی، روش کار برای هر کارگاه بایستی بهینه‌سازی شود.

در مطالعه حاضر بررسی رشد نشان داد که حدود پنج ماه بعد از تفریخ، رشد ماهیان تریپلوئید اختلاف معنی‌داری با ماهیان دیپلوئید نداشتند. اما میانگین وزن ماهیان تتراپلوئید حدود شش

ماه بعد از تفریخ به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد دیپلوئید بود. گزارش‌های متفاوتی در خصوص نرخ رشد تتراپلوییدها ارائه شده است. در یک مطالعه، نرخ رشد تتراپلوییدهای قزل‌آلای رنگین‌کمان حدود ۲۵ درصد پایین‌تر از ماهیان دیپلویید بوده است (Chourrout *et al.,* 1986) که با نتایج پژوهش حاضر هم‌خوانی دارد. شاید بتوان اختلاف در رشد و بقای ماهیان تتراپلوییدها و دیپلوییدها را به تفاوت‌های متابولیکی ناشی دو برابر شدن کروموزم‌ها، بهم خوردن نسبت سلول به هسته و کاهش تعداد سلول‌ها نسبت داد (Fauconneau *et al.,* 1989). در برخی مطالعات، نتایج متفاوتی به‌دست آمده است به‌عنوان مثال Horstgen-Schwark (1993) بعد از گذشت نه ماه وزن مشابهی را برای تتراپلوییدها و دیپلوییدهای قزل‌آلای رنگین‌کمان گزارش کرده است. برخی محققان برای تتراپلوئیدها حتی رشد بالاتر از دیپلوئیدها گزارش کرده‌اند (بهرامی باباحیدری، ۱۳۹۶). این محققان علت این تناقض را به زمان بررسی رشد که در ۳۸ روز بعد از شروع تغذیه فعال انجام شده بود، نسبت داده‌اند.

تشخیص پلوئیدی یکی از مهم‌ترین مسائل مربوط به پلوئیدسازی در ماهیان است. چراکه در روش‌های پلوئیدسازی به‌ندرت ماهیان تماما تریپلوئید و یا تتراپلوئید به‌دست می‌آید. از طرف دیگر، بسیاری از روش‌های تشخیص پلوئیدی، پرهزینه، وقت‌گیر و نیازمند تجهیزات و تخصص ویژه هستند که استفاده از آنها را محدود ساخته است. به‌همین دلیل در سال‌های اخیر، توجه بسیاری از محققان به‌سمت یافتن یک روش راحت، کم‌هزینه و معتبر معطوف شده و در این راستا استفاده از اندازه گلبول قرمز پیشنهاد شده است (Lincoln & Scott, 1983; Benfey & Sutterlin, 1984a, b; Small & Benfey, 1987; Espinosa *et al.,* 2005; Bencsik *et al.*, 2013). استفاده از این روش علاوه بر راحت و کم‌هزینه بودن، بسیار قابل اطمینان است به‌طوریکه در برخی تحقیقات دقت آن ۱۰۰٪ گزارش شده است (Espinosa *et al.,* 2005). نکته مهم در این روش آن است که در ماهیان پلی‌پلوئید طول سلول همیشه افزایش می‌یابد و عرض سلول معمولا افزایش می‌یابد، اما ارتفاع سلول بدون تغییر باقی می‌ماند (Benfey & Sutterlin, 1984b).

نتیجه‌گیری کلی

در آزمایش تریپلوئیدسازی مطالعه حاضر، شوک گرمای ۲۶/۵ درجه سانتی‌گراد در ۲۰ دقیقه بعد از لقاح به‌مدت ۱۲ دقیقه با درصد تفریخ ۶۶/۶ درصد و نرخ تریپلوئیدسازی ۸۷ درصد بهتر از سایر گروه‌ها بود. در آزمایش تتراپلوئیدسازی، شوک گرمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در ۵۹ ساعت–درجه بعد از لقاح به‌مدت ۱۰ دقیقه با درصد تفریخ ۵۴/۹ درصد و نرخ تتراپلوئیدسازی ۷/۹۴ درصد نسبت به سایر تیمارها مناسب‌تر بود. ماهیان تریپلوئید از نظر رشد با دیپلوئیدها اختلاف معنی‌داری نداشتند اما رشد ماهیان تتراپلوئید به‌طور معنی‌داری کمتر از دیپلوئیدها بود. بررسی مقایسه‌ای گلبول‌های قرمز ماهیان دیپلوئید، تریپلوئید و تتراپلوئید نشان داد که از نظر تمام شاخص‌های بررسی‌شده به‌استثنای عرض هسته، ماهیان تریپلوئید و تتراپلوئید نسبت به ماهیان دیپلوئید اختلاف معنی‌داری نشان دادند. بنابراین از این شاخص‌ها می‌توان برای تفکیک ماهیان تریپلوئید و تتراپلوئید از ماهیان دیپلوئید استفاده کرد. اندازه هسته نمی‌تواند به‌عنوان شاخص مناسبی برای تفکیک تریپلوئیدها و تتراپلوئیدها در نظر گرفته شود، به‌دلیل آنکه از نظر طول، عرض و مساحت هسته بین ماهیان تریپلوئید و تتراپلوئید اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. اما اندازه سلول شاخص خوبی برای تفکیک تمام گروه‌ها می‌باشد. چراکه طول، عرض و مساحت سلول در ماهیان تتراپلوئید نه‌تنها از دیپلوئیدها بلکه از تریپلوئیدها نیز به‌طور معنی‌داری بیشتر بود.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافعی توسط نویسندگان وجود ندارد.

REFERENCES

Alcantar-Vazquez, J. P., Dumas, S., Puente-Carreon, E., Pliego-Cortés, H. S., & Peña, R. (2008). Induction of triploidy in spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus* Steindachner, 1868) by cold shock. *Aquacaltural Research*, *39*, 59-63.

Bahrami Babaheydari, S., Keyvanshokooh, S., Dorafshan, S., & Johari, S. (2017). Effects of tetraploidization on hatching, survival, growth performance and proximate composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Research & Biological Products*, *30*(4), 231-240. (*in Persian*).

Bekcan, S., Atar, H. H., & Yavuzcan, H. (2016). The survival rate of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, walbaum) at the stages of eyed eggs, larvae and fry in tetraploid applications. *Journal of Applied Biological Sciences*, *10*(3), 20-23.

Bencsik, I., Pacala, N., Dumitrescu, G., Dronca, D., Stanculet, J., & Petculescu-Ciochina, L. (2013). Triploidy determination in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) based on erythrocytes dimensions. *Animal Science and Biotechnologies*, *46*(1), 113-117.

Benfey, T. J., & Sutterlin, A. M. (1984a). Triploidy induced by heat shock and hydrostatic pressure in landlocked Atlantic salmon *(Salmo salar* L.). *Aquaculture*, *36*, 359-367.

Benfey, T. J., & Sutterlin, A. M. (1984b). Growth and gonadal development in triploid landlocked Atlantic salmon *Salmo salar*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *41*, 1387-1392.

Cal, R. M., Vidal, S., Gómez, C., Álvarez-Blázquez, B., Martínez, P., & Piferrer, F. (2006). Growth and gonadal development in diploid and triploid turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, *251*, 99-108.

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. *Theoritcal and Applied Genetic*, *72*, 193-206.

Diaz, N. F., Iturra, P., Veloso, A., Estay, F., & Colihueque, N. (1993). Physiological factors affecting triploid production in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, *114*, 33-40.

Doğankaya, L., & Bekcan, S. (2014). The effects of pressure and heat shocks induced at different times after fertilization on triploid production in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W. 1792). *Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, *10*(2), 35-43.

Dorafshan, S., Vafaei Saadi, A., Nekoeifard, A. (2014). Optimal heat shock condition for tetraploidy induction in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Veterinary Research*, *69*(4), 411-421. (*in Persian*).

Dunhum, R. A. (2004). Aquqculture Fisheries Biotecnology: Genetic Approaches. Cambridge. CABI Publishing.

Espinosa, E., Josa, A., Gil, L., & Marti, J. I. (2005). Triploidy in rainbow trout determined by computer-assisted analysis. *Journal of Experimental Zoology*, *303*A, 1007-1012.

Fauconneau, B., Kaushik, S. J., & Blanc, J. M. (1989). Uptake and metabolization of dissolved compounds in rainbow trout fry. *Comparative Biochemistry and Physiology*, *93*, 839-843.

Felip, A., Piferrer, F., Zanuy, S., & Carrillo, M. (2001). Comparative growth performance of diploid and triploid European sea bass over the first four spawning seasons. *Journal of Fish Biology*, *58*, 76-88.

Gandomkar, H. A., Rastiannasab, A., Nazari, S., Kazemi, E., & Jahanabad, J. M. (2020). Efficiency and optimization of heat shock in production of rainbow trout tetraploid. *Scientific Research Journal of Animal Environment*, *12*(4), 335-343. (*in Persian*).

Gjedrem, T., Robinson, N., & Rye, M. (2012). The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: a review. *Aquaculture*, *350-353*, 117-129.

Güner, M., Peker, Z., & Altunok, M. (2016). Optimization of thermal shock for poliplody induction in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under photoperiodic control of spawning. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *16*, 797-804.

Horstgen-Schwark, G. (1993). Initiation of tetraploid breeding line development in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture and Fisheries Management*, *24*, 641-652.

Howell, W. M., & Black, D. A. (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizer with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Expereintia*, *36*(8), 1014-1015.

Hwang, G. D. (2012). Inland fisheries research institute yearly research report. Korea: Chungcheongbuk-do.

Irani, A., & Agh, N. (2020). Rainbow trout larvae production in an airlift-based recirculating system. *Aquaculture*, *518*, 734831.

Kalbasi, M. R., Bagheri, A., Pourkazemi, M., & Abdolhai, H. (2004). Induction of t etraploidy in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) by heat shock. I*ranian Scientific Fisheries Journal*, *12*(4), 143-152. (*in Persian*).

Kalbassi, M. R., & Johari S. A. (2008). A Study on the Production Possibility of All-Female Triploid Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Crop Production and Processing*, *12*(44), 269-278. (*in Persian*).

Kizak, V., Güner, Y., Türel, M., & Kayim, M. (2013). Comparison of growth performance, gonadal structure and erythrocyte size in triploid and diploid brown trout (*Salmo trutta fario* L., 1758). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *13*, 571-80.

Kim, H. S., Chung, K., & Son, J. (2017). Comparison of different ploidy detection methods in *Oncorhynchus mykiss*, the rainbow trout. *Fisheries and Aquatic Sciences*, *20*(1), 1-7.

Johari, S. A., & Kalbassi., M. R. (2007). Investigation

of red blood cell alterations in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Journal of Biology*, *19*(4), 492-495. (*in Persian*).

Johnstone, R. (1985). Induction of triploidy in Atlantic salmon by heat shock. *Aquaculture*, *49*, 133-139.

Lamatsch, D. K., Steinlein, C., Schmid, M., & Schartl, M. (2000). Non-invasive determination of genome size and ploidy level in fishes by flow cytometry detection of triploid *Poecilia formosa*. *Cytometry*, *39*, 91-95.

Lincoln, R. F., & Scott, A. P. (1983). Production of all-female triploid rainbow trout. *Aquaculture*, *30*, 375-380.

Liu, S., Sezakki, D., Hashimoto, K., Kobayashi, H., & Nakamura, M. (1978). Simplified techniques for determination of polyploidy in ginbuna, *Carassius auratus langsdorfi*. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, *44*, 601-606.

Maxime, V. (2008). The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish. *Fish and Fisheries*, *9*(1), 67-78.

Olele, N. F., & Tiguiri, O. H. (2013). Optimization of triploidy induction and growth performance of *Claria anguillarias* (African catfish) using cold shock. *Academic journal of interdisciplinary studies*, *2*, 189-96.

Pandian, T. J., & Koteeswaran, R. (1998). Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia*, *384*, 167-243.

Piferrer, F., Beaumont, B., Falguiere, J. C., Flajshans, D. M., Haffray, P. E., & Colombo, L. (2009). Polyploy fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture*, *293*, 125-56.

Porto-Foresti, F., Oliveira, C., Tabata, Y. A., Rigolino, M. G., & Foresti, F. (2002). NORs inheritance analysis in crossings including individuals from two stocks of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Hereditas*, *136*,227-30.

Pradeep, P. J., Srijaya, T. C., Jose, D., Papini, A., Hassan, A., & Chatterji, A. K. (2011). Identification of diploid and triploid red tilapia by using erythrocyte indices. *Caryologia*, *64*, 485-492.

Shimizu, Y., Oshiro, T., & Sakaizumi, M. (1993). Electrophoretic studies on diploid, triploid and tetraploid forms of the Japanese silver crucian carp, *Carassius auratus* langsdorfi. *Japanese Journal of Ichthyology*, *40*, 65-75.

Small, S. A., & Benfey, T. J. (1987). Cells size in triploid salmon. J Exp Zool, *241*, 339-342.

Solar, I. I., Donaldson, E. M., George, A., & Hunter, G. A. (1984). Induction of triploidy in rainbow trout (*salmo gairdneri* Richardson) by heat shock, and investigation of early growth. *Aquaculture*, *42*, 57-67.

Sourinezhad, I., & Kalbassi, M. R. (2011). Investigation of growth indices of all female and mixed sex diploid and triploid rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in the second year of culture. *Iranian Journal Of Biology*, *24*(4), 517-527. (*in Persian*).

Sourinezhad, I., Kalbasi, M. R., Khodabandeh, S., & Rezaei, M. (2009). Comparative study of ovary development of all female diploid and tnploid rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in the second year of culture. *Iranian Journal Of Biology*, *22*(1), 111-123. (*in Persian*).

Thorgaard, G. H. (1983). Chromosome sex manipulation and sex control in fish. In: Hoar, W., Randall, D. and Donaldson, E., editors. Fish physiology, 9, New York, NY: Academic Press.

Thorgaard, G. H., & Disney, G. (1990). Chromosome preparation and analysis. In: Schreck, C., Moyle, P., editors. Methods for fish biology. Bethesda, MD: American Fisheries Society.

Tiwary, B. K., Kirubagaran, R., & Ray, A. K. (1997). Induction of triploid by cold shock in catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Asian Fisheries Science*, *10*, 123-129.

Tiwary, B. K., Kirubagaran, R., & Ray, A. K. (2004). The biology of triploid fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, *14*, 391-402.