

بررسی تأثیر سن مولد بر زمان وقوع اولین تقسیم میتوزی تخم قزل آلاي رنگين کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به منظور بهبود بازده القای تتراپلوپیدی

هاجر سادات طباطبائی پزوه^۱، سالار درافشان^{۱*}، فاطمه پیکان حیرتی^۱، مجید طالبی^۲، تیلان بنفی^۳

^۱گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ۸۴۱۵۶۸۳۱۱۱، ایران.
^۲گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ۸۴۱۵۶۸۳۱۱۱، ایران.
^۳گروه زیست‌شناسی، دانشگاه نیوبرانزویک، فردریکتون، نیوبرانزویک، E3B 6E1، کانادا.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۳۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۰۴

چکیده

تعیین زمان وقوع اولین تقسیم میتوزی یا First Cleavage Interval (FCI) در تخم‌های تازه بارور شده ماهیان، نقش مؤثری در بهبود القای شوک جهت تتراپلوپیدی دارد. این مطالعه به منظور بررسی اثر سن مولد ماده در دو بازه 2^{+} و 4^{+} سال بر زمان وقوع اولین تقسیم میتوزی به منظور دستیابی به بیشینه بازده تتراپلوپیدی به اجرا درآمد. ۲۲ قطعه مولد از گروه سنی 2^{+} و ۱۶ قطعه مولد از گروه سنی 4^{+} ، به ترتیب با میانگین وزنی $(1635 \pm 357/83)$ و $(4242/5 \pm 1039/36)$ گرم انتخاب شدند. تخمک‌های استحصالی از هر مولد به‌طور مجزا با مخلوط اسپرم سه قطعه ماهی نر بارور گردید. زمان افزودن محلول فعال کننده به مخلوط اسپرم و تخمک، به‌عنوان زمان لقاح ثبت شد. در 4620 درجه-دقیقه پس از لقاح (در دمای 11 درجه سانتی‌گراد) از تخم‌های هر مولد، نمونه‌برداری آغاز شد و در تواترهای 10 دقیقه‌ای به مدت 1980 درجه-دقیقه ادامه یافت. در هر زمان، حداقل 30 قطعه تخم تثبیت و بررسی شد. وقوع شیار تسهیم در قطب حیوانی در حداقل 50% تخم‌های نمونه‌برداری شده، به‌عنوان زمان وقوع FCI برای آن مولد در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که وقوع اولین تقسیم سلولی در تخم‌های حاصل از مولدین جوان‌تر به‌طور معنی‌داری در فاصله زمانی کوتاه‌تری بعد از لقاح در مقایسه با مولدین مسن‌تر، رخ می‌دهد. میانگین این زمان برای مولدین با سن 2^{+} برابر $5528/64 \pm 104/06$ درجه-دقیقه و در گروه مولدین 4^{+} معادل $5802/5 \pm 60/16$ درجه-دقیقه بود، همچنین همبستگی ضعیفی بین زمان وقوع اولین تقسیم سلولی با اندازه تخمک مشاهده شد. از این رو به‌نظر می‌رسد، جهت دستیابی به نتایج بهینه در اعمال شوک دیر هنگام جهت القای تتراپلوپیدی، توجه به سن مولدین، ضروری است.

کلید واژگان: تتراپلوپیدی، قزل آلاي رنگين کمان، فاصله زمانی اولین تقسیم میتوزی، سن

مقدمه

دستکاری کروموزومی روشی برای کنترل تعداد و ترکیب یک مجموعه هاپلوئید کروموزومی است. این روش در ابتدای قرن بیستم در دوزیستان مورد بررسی قرار گرفت. تحقیقات دستکاری کروموزومی در ماهیان به نسبت سایر موجودات پرورشی تاریخچه کوتاهی دارد. تاکنون روش‌های مختلفی برای تغییر عملکرد طبیعی مرحله متافاز در طی چرخه سلولی انجام شده است که نتیجه آن افراد با وضعیت ژنومی متفاوت یعنی پلی‌پلوئیدها، ماده‌زادها و نر‌زادها هستند (Hussain, 1998). 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). القای تریپلوئیدی با این مکانیسم در ماهیان عموماً منجر به بروز تغییراتی در میزان بازماندگی، سرعت تکامل جنینی، رشد، ویژگی‌های خون‌شناسی و روند تکامل گنادی می‌شود (Babaheydari et al., 2016). کاهش بازماندگی خصوصاً در طی دوره انکوباسیون در ماهیان تریپلوئید در مقایسه با گروه شاهد توسط محققین مختلف در گونه‌های مختلف جنس آزادماهیان از جمله قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (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 به‌خودی خود عامل مرگ‌آوری در ماهیان نیست (Dunham, 2011). جهت رفع این مشکل و دستیابی به افراد تریپلوئید، می‌توان از روش غیر مستقیم (تلاقی ماهی دیپلوئید و تتراپلوئید) برای تولید ماهیان عقیم تریپلوئید استفاده کرد.

تتراپلوئیدی (دارا بودن چهار سری کروموزوم در هر سلول) نوعی 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) 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).

تلاش‌های زیادی برای تعیین شرایط بهینه برای القا تتراپلوئیدی انجام شده است. موفقیت القای تتراپلوئیدی در آبزیان، تابع شرایط محیطی و ویژگی‌های والدین است و به دلیل اختلاف در حساسیت در تخم‌ها، در بین نژادها و گونه‌های نزدیک، شوک‌های مختلفی اعمال می‌شود (Thorgaard, 1986; Weber et al., 2015). تحقیقات مختلف، درصد القا تتراپلوئیدی ۴۰-۸ درصد گزارش شده و در مطالعات اخیر موفقیت القای تتراپلوئیدی از ۸ درصد به ۱۰۰ درصد رسیده است (Weber and Hostuttler, 2012). تفاوت در بازده القای تتراپلوئیدی تابع عواملی مانند شدت شوک، مدت زمان اعمال شوک و زمان آغاز شوک است (Weber and Hostuttler, 2012). بهینه‌سازی شوک، عملیاتی همراه با آزمون و خطا است و با توجه به تنوع فردی، در هر فرد از افراد گله می‌تواند متفاوت باشد. علاوه بر این، در یک جمعیت گامتی مربوط به یک فرد نیز همگی در یک مرحله تقسیم سلولی به‌صورت همزمان نیستند. بهینه‌سازی باعث تولید بیشترین افراد زنده با شماره کروموزومی مورد نظر می‌گردد. برای بهبود میزان موفقیت در تتراپلوئیدها، زمان آغاز تیمار شوک‌دهی اهمیت دارد و از شاخص First cleavage internal (FCI) (فاصله زمانی لقاح تا تشکیل اولین شیار تقسیم سلولی) استفاده می‌شود (Gomelsky, 2003) و تعیین زمان مناسب جهت القا شوک براساس زمان اولین تقسیم میتوزی یکی از مهم‌ترین عوامل در القای تتراپلوئیدی است (Hershberger and Hostuttler, 2005).

زمان اعمال شوک در درصدی از فاصله زمانی اولین تقسیم سلولی در دمای مشخص است. کاربرد شوک اندکی پیش از وقوع اولین تقسیم میتوزی در مرحله سیتوکینز به دلیل شکسته شدن رشته‌های اکتین و جلوگیری از تشکیل شیار تسهیم، می‌تواند مؤثر باشد. همچنین اعمال شوک در طی متافاز یا پیش از وقوع آن در مرحله کاریوکلینز باعث جلوگیری از جداسازی کروموزوم‌های خواهری می‌شود. زمان وقوع این موارد در نژادهای مختلف و شرایط پرورشی مختلف

و در سال‌های مختلف در یک نژاد هم می‌تواند متفاوت باشد (Hershberger and Hostuttler, 2007). پس از انجام فرآیند لقاح در تخم‌ها قبل از تقسیم میتوز، ژرمینال دیسک قابل مشاهده است، پس از آن انجام اولین تقسیم سلولی و ایجاد شیار تسهیم در تخم‌ها و تقسیم شدن سلول به دو قسمت مساوی، قابل مشاهده است، این زمان برای بهینه‌سازی شوک از اهمیت بالایی برخوردار است.

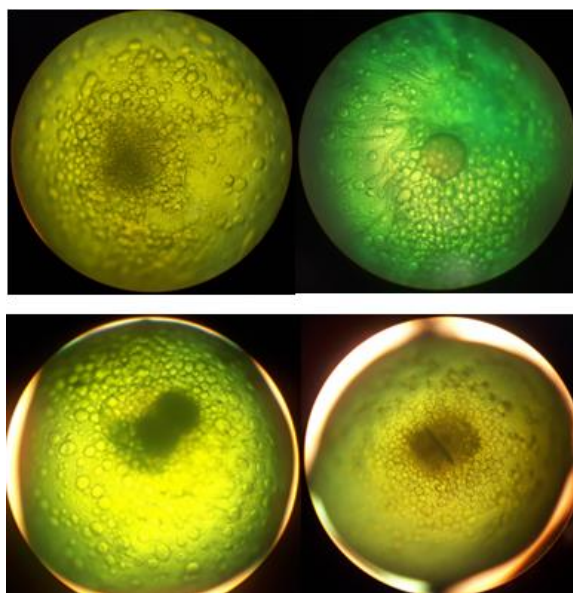
تفاوت در زمان تقسیم سلولی در میان گروه‌های مختلف مولدین در جمعیت‌های مختلف و یا حتی در بین مولدین ماده متعلق به یک گله می‌تواند توجیه‌کننده تفاوت‌ها در زمان بهینه آغاز شوک باشد. چنین تفاوت‌هایی می‌تواند تحت تأثیر نژاد یا ذخیره ژنتیکی متفاوت مولدین و یا حتی اندازه متفاوت تخمک باشد (زارعی و همکاران، ۱۳۹۸) همچنین مطالعات نشان داده است که سن تخمک، فاصله زمانی بین اوولاسیون تا لقاح چه در محفظه شکمی و چه در شرایط آزمایشگاهی اثر معکوس بر کیفیت تخمک‌های ماهی خواهد داشت (Bromage et al., 1992; Azuma et al., 2003). در بیشتر پژوهش‌های گذشته، اثر FCI بر القای تتراپلویدی در نظر گرفته نشده و این موضوع منجر به تفاوت زیادی در موفقیت القای تتراپلویدی شده است (Hershberger and Hostuttler, 2007). بنابراین به‌منظور افزایش بازده القای تتراپلویدی، بررسی FCI مورد توجه قرار گرفته است. تغییر در FCI در افراد و جمعیت‌های مختلف مانع از شناسایی یک زمان یکسان برای القای شوک دیر هنگام در قزل‌آلای رنگین کمان می‌شود. در مطالعه Weber و Hostuttler (۲۰۱۲) اثر پیری تخمک در داخل و خارج از بدن، بر FCI بررسی شد. آن‌ها بیان کردند که افزایش سن تخمک باعث افزایش FCI می‌شود. در ایران نیز مطالعاتی برای تعیین فاصله زمانی اولین تقسیم میتوزی، انجام شده است. در مطالعه بیشکول و همکاران (۱۳۹۳)، FCI در دو گروه مولدین نژاد فرانسه و مولدین موجود در اردبیل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میانگین FCI برای مولدین نژاد فرانسه در ۵۶۰ دقیقه و برای مولدین موجود در اردبیل ۵۷۰ دقیقه بعد از لقاح بود. همچنین مطالعات دیگری نیز در خصوص بهینه‌سازی شوک با توجه به اندازه تخمک (درافشان و همکاران، ۱۳۹۳) یا ارتباط زمان اولین تقسیم سلولی در ماهی آزاد دریای خزر (زارعی و همکاران، ۱۳۹۸) مورد بررسی قرار گرفته است. با این وجود،

تاکنون سن مولدین عنوان یک عامل تأثیرگذار در ارزیابی زمان تقسیم سلولی و بهینه‌سازی زمان اعمال شوک در القای تتراپلویدی در گله مولدین داخل کشور مورد بررسی قرار نگرفته است. بنابراین در تحقیق حاضر، هدف اصلی بررسی اثر سن مولد ماده بر وقوع اولین تقسیم سلولی یا تسهیم در تخم تازه لقاح‌یافته قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بود. علاوه بر این، برخی ویژگی‌های دیگر نظیر وزن، طول و اندازه تخمک نیز در گروه‌های سنی مختلف و ارتباط آن با FCI مورد توجه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق با مشارکت دانشگاه صنعتی اصفهان و شرکت آبرین‌نگین شایان فریدونشهر در زمستان ۱۳۹۸ اجرا شد. در این پژوهش از ۲۲ قطعه مولد ماده قزل‌آلای رنگین کمان با بازه سنی ۳⁺ و میانگین وزنی ($1635 \pm 357/83$) گرم و ۱۶ قطعه مولد ۴⁺ و میانگین وزنی ($4242/5 \pm 1039/36$) گرم استفاده شد. میانگین طول کل ماهیان برای ماهیان ۳⁺ معادل $54 \pm 1/64$ و برای ماهیان ۴⁺، $66 \pm 6/44$ سانتی‌متر بود. تعداد تخمک‌های استحصال شده از هر ماهی در هر گرم، با استفاده از ترازو با دقت ۰/۰۱ گرم برآورد شد. لقاح به روش خشک و با استفاده از مخلوط اسپرم سه قطعه مولد نر قزل‌آلای رنگین کمان با وزن حدود ۲۵۰۰ گرم انجام شد. قبل از انجام فرآیند لقاح، کیفیت اسپرم براساس درصد سلول‌های متحرک و مدت زمان تحرک مورد بررسی قرار گرفت.

زمان افزودن محلول فعال‌کننده بیلارد به مخلوط اسپرم و تخمک، به‌عنوان زمان لقاح ثبت شد. تخم‌های لقاح یافته هر مولد به سه بخش مجزا تقسیم شده و در سه تکرار برای هر مولد مورد بررسی قرار گرفتند که در مجموع ۱۱۴ واحد آزمایشی را تشکیل دادند. در ۴۶۲۰ درجه-دقیقه پس از لقاح (در دمای ۱۱ درجه سانتی‌گراد)، نمونه‌برداری از آن‌ها آغاز و در تواترهای ۱۰ دقیقه‌ای به مدت ۱۹۸۰ درجه-دقیقه نمونه‌برداری انجام شد، فاصله زمانی ۷ تا ۱۰ ساعت پس از لقاح به‌منظور بررسی FCI منظور شد. تخم‌های نمونه‌برداری شده ابتدا به ۲۰ میلی‌لیتر فیکساتور حاوی متانول، اسید استیک و آب مقطر با حجم برابر منتقل و پس از گذشت ۱۰ دقیقه به فیکساتور دویدسون شامل ۲۰ میلی‌لیتر فرمالین ۱۰



شکل ۱- مراحل اولیه تقسیم سلول، الف- لقاح انجام نشده، ب- مرحله تک سلولی، ج- تشکیل اولین شیار تسهیم و د- اولین تقسیم سلولی و تبدیل شدن به دو سلول، بزرگنمایی $40\times$

بررسی زمان اولین تقسیم سلولی تخم‌ها، در مولدین با دو میانگین سنی 3^+ و 4^+ سال، در این درجه حرارت در شکل ۱ ارائه شده است، تخم‌های بررسی شده از نظر تکامل

جنینی در چهار گروه به شرح زیر دسته‌بندی شدند:

الف- تخم‌هایی که فرآیند لقاح در آن‌ها انجام نشده بود. ب- تخم‌هایی که فرآیند لقاح انجام شده و ژرمینال دیسک قابل مشاهده بود ولی تسهیم انجام نشده است. ج- تخم‌هایی که در آن‌ها اولین شیار تسهیم مشخص بود و د- تخم‌هایی که اولین تقسیم سلولی به‌طور کامل صورت گرفته بود و ژرمینال دیسک به دو سلول تبدیل شده است. در این درجه حرارت، اولین علائم شکاف تسهیم در تخم مولدین با سن 4^+ ، $5720-5880$ درجه-دقیقه پس از لقاح و در تخم حاصل از مولدین با سن 3^+ ، $5420-5670$ درجه-دقیقه بود. بدین ترتیب میانگین زمانی وقوع اولین تقسیم سلولی در مولدین چهار ساله 4^+ معادل $5802/50 \pm 60/16$ درجه-دقیقه پس از لقاح و در مولدین با میانگین سنی 3^+ معادل $5528/64 \pm 104/06$ درجه-دقیقه پس از لقاح محاسبه شد (جدول ۱). با توجه به انحراف معیار موجود در میانگین داده‌های مرتبط با زمان وقوع اولین تقسیم سلولی در دو گروه مولدین جوان 3^+ و مسن 4^+ ، به‌نظر می‌رسد که هم‌زمانی بیشتری در وقوع این فرآیند در مولدین مسن‌تر، در مقایسه با انواع جوان‌تر وجود داشته است. علاوه بر این، اثر سن مولدین بر زمان وقوع اولین تقسیم سلولی با استفاده از آزمون t مستقل در هر گروه بررسی شد، اختلاف زمان اولین تقسیم

میلی‌لیتر گلیسرول، 30 میلی‌لیتر اتانول، 10 میلی‌لیتر اسیداستیک و 30 میلی‌لیتر آب مقطر انتقال داده شد (Hershberger and Hostuttler, 2005). پس از نمونه‌برداری، مراحل تقسیم سلولی با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $40\times$ مورد بررسی قرار گرفت. FCI یا فاصله زمانی اولین تقسیم سلولی، زمانی در نظر گرفته شد که در آن در 50 درصد تخم‌ها بعد از لقاح اولین شیار تسهیم مشاهده شد (Hershberger and Hostuttler, 2005; Weber and Hostuttler, 2012). تعداد تخم‌های لقاح نیافته در این بررسی در نظر گرفته نشد و تعداد آن‌ها از تعداد کل تخم‌ها کسر شد.

تحلیل آماری: تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ انجام گرفت. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. برای مقایسه میانگین FCI حاصل برای دو گروه ماهیان از نظر آماری با استفاده از آزمون t مستقل در سطح معنی‌داری $0/05$ درصد آنالیز شد و داده‌ها به‌صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ ارائه گردید. این آزمون برای مقایسه وزن، طول مولدین و اندازه تخمک‌ها، به‌صورت تعداد تخمک در هر گرم، نیز مورد استفاده قرار گرفت. نمودارهای رگرسیون برای همه تکرارها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2016 ترسیم و ضریب همبستگی محاسبه شد.

نتایج

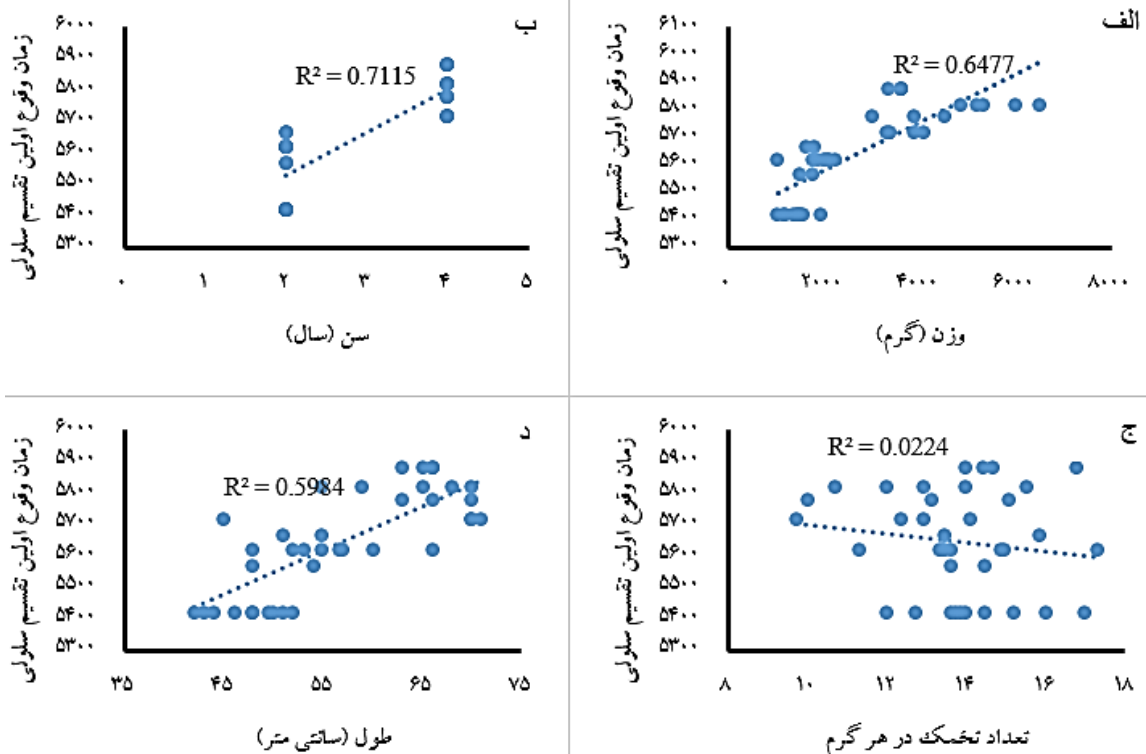
جدول ۱- اطلاعات زیست‌سنجی مولدین ماده و نتایج مرتبط به زمان وقوع اولین شیار تسهیم در هر مولد ماده در گروه‌های سنی

سن (سال)	وزن (گرم)	طول کل (سانتی‌متر)	زمان وقوع اولین شیار تسهیم (درجه-دقیقه)	میانگین وزن (گرم)	میانگین طول کل (سانتی‌متر)	میانگین زمان وقوع اولین شیار تسهیم (درجه-دقیقه)	میانگین تعداد تخمک در هر گرم
۴+	۵۳۲۰	۵۹	۵۸۲۰	* ۶۸/۵۱۰۱۳۵/۵۱۱ ۴۲۲۲/۹۱۱	* ۸۸/۶۳۵/۶۴ ۶۴/۵۳۵/۶۴	* ۸۰۲/۵۳۶/۵۸۰ ۵۸۰۲/۵۳۶/۵۸۰	۱۲/۴۵±۱/۵۰
	۵۱۵۰	۵۵	۵۸۲۰				
	۶۴۹۰	۷۰	۵۸۲۰				
	۶۰۰۰	۶۵	۵۸۲۰				
	۴۸۶۰	۶۸	۵۸۲۰				
	۳۶۰۰	۶۵	۵۸۸۰				
	۴۵۰۰	۷۰	۵۷۸۰				
	۳۸۵۰	۶۶	۵۷۸۰				
	۳۳۲۰	۶۳	۵۸۸۰				
	۳۰۰۰	۶۳	۵۷۸۰				
	۳۶۰۰	۶۶	۵۸۸۰				
	۳۶۰۰	۶۶	۵۸۸۰				
	۳۸۶۰	۴۵	۵۷۲۰				
	۴۰۷۰	۷۱	۵۷۲۰				
	۳۲۹۰	۷۰	۵۷۲۰				
	۳۳۷۰	۷۰	۵۷۲۰				
۳+	۱۸۱۵	۵۵	۵۶۷۰	* ۱۷/۵۱۳۵۳۵/۱۳۱ ۱۶۳۵۳۵/۱۳۱	* ۸۶/۳۱±۵/۶۷ ۵۱/۳۱±۵/۶۷	* ۶۰/۱۰۱±۱۰۴/۱۰۶ ۵۵/۸۸/۶۴±۱۰۴/۱۰۶	۱۴/۸۸±۱/۴۳
	۱۵۲۰	۴۸	۵۵۶۵				
	۱۶۳۵	۵۱	۵۶۷۰				
	۱۷۷۰	۵۴	۵۵۶۵				
	۱۷۶۰	۵۲	۵۶۲۰				
	۱۸۵۰	۵۳	۵۶۲۰				
	۱۹۹۰	۵۵	۵۶۲۰				
	۲۱۰۰	۵۶/۵	۵۶۲۰				
	۲۰۳۰	۵۷	۵۶۲۰				
	۱۰۳۶	۴۲	۵۴۲۰				
	۱۱۴۶	۴۳	۵۴۲۰				
	۱۹۵۰	۴۴	۵۴۲۰				
	۱۲۰۰	۴۶	۵۴۲۰				
	۱۳۹۶	۴۸	۵۴۲۰				
	۱۳۵۰	۵۱	۵۴۲۰				
	۱۵۶۰	۵۲	۵۴۲۰				
	۱۵۲۰	۵۰	۵۴۲۰				
	۱۴۴۰	۴۸	۵۴۲۰				
	۱۵۰۰	۴۹/۵	۵۴۲۰				
	۱۰۴۰	۴۸	۵۶۲۰				
	۲۲۴۰	۶۰	۵۶۲۰				
	۲۱۳۰	۶۰	۵۶۲۰				

(*) بیانگر تفاوت معنی‌دار بین دو گروه مورد بررسی، بر اساس آزمون t مستقل در سطح ۰/۰۵

طول کل ماهی، سن مولد و تعداد تخمک در هر گرم یا اندازه تخمک، رسم شد. ضریب همبستگی برای سن مولد و زمان وقوع اولین تقسیم سلولی برابر ۰/۷۱۷۵ (شکل ۲ الف) برای

میتوزی در دو گروه مورد مطالعه برابر با ۲۷۳/۹ درجه-دقیقه و معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۵$). نمودارهای رگرسیون جهت بررسی رابطه زمان وقوع اولین تقسیم سلولی با وزن ماهی،



شکل ۲- نمودار همبستگی (رگرسیون) و ضریب همبستگی زمان وقوع اولین تقسیم سلولی با سایر شاخص‌های زیستی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان. الف: سن ماهی، ب: وزن، ج: طول کل، د: تعداد تخمک در هر گرم. (به ترتیب بیشترین همبستگی با سن و کمترین آن با اندازه تخمک مشاهده شد)

وزن برابر با 0.6477 (شکل ۲ ب)، برای طول ماهی برابر با 0.5984 (شکل ۲ ج)، و برای اندازه تخمک، تعداد تخمک در هر گرم بسیار اندک و برابر با 0.0224 (شکل ۲ د) بود. نمودارهای ترسیم شده نشان داد که بالاترین ضریب همبستگی در رابطه سن ماهی و زمان وقوع اولین تقسیم سلولی وجود داشت. پس از آن ارتباط وزن و طول ماهی در برابر زمان اولین تقسیم سلولی ضریب همبستگی بیشتری را نشان داد. تقریباً ارتباطی بین زمان وقوع شیار تسهیم با اندازه تخمک (تعداد تخمک در هر گرم) مشاهده نشد (شکل ۲).

بحث

تعیین زمان اولین تقسیم سلولی در ماهیان اطلاعات ارزشی را در خصوص احتمال موفقیت شوک‌دهی در القای تتراپلویدی فراهم می‌کند. سه عامل زمان اعمال شوک (زمان بعد از لقاح)، شدت شوک (تفاوت درجه حرارت بین آب سالن انکوباسیون و درجه حرارت حمام آب گرم برای شوک‌های گرمایی) و طول مدت اعمال شوک از مهم‌ترین عوامل مرتبط با شوک برای القای موفقیت‌آمیز تتراپلویدی در ماهیان هستند (Pandian and Koteeswaran, 1998).

دمای یخچال فراهم می‌کند. با این وجود درصد لقاح، چشم‌زدگی و تفریح در مقایسه با تخمک‌هایی که تنها یک روز در این محیط‌ها نگهداری شده بودند، کاهش یافته بود. در مطالعه دیگری، Azuma و همکاران (۲۰۰۳)، در توضیح دلیل کاهش درصد‌های لقاح و تفریح با افزایش طول دوره نگهداری تخمک، به بررسی میکروسکوپی قطر تخمک، ساختارهای بلاستومر و نحوه پراکنش قطرات چربی پرداختند و عنوان کردند که با افزایش طول دوره نگهداری، فارغ از نوع محیط نگهداری، کاهش در تعداد بلاستومرها، تأخیر در فرآیند وقوع اولین تقسیم میتوزی تخم یا کلیواژ و همچنین تغییر در میزان ذخایر چربی تخم مشاهده می‌شود که در نهایت می‌تواند منجر به بروز پدیده پیری و فوق‌رسیدگی تخمک شود. در مطالعه حاضر، تمامی ماهیان در شرایط یکسان از نظر دمایی و تراکم و تغذیه نگهداری شده بودند و در فاصله زمانی حدود ۸۰ درجه-روز از آخرین معاینه آن‌ها برای تکثیر گذشته بود. بدین معنی که، در بدترین حالت، تخمک‌ها در فاصله یک هفته ای از زمان آغاز آزمایش، در حفره شکمی رهاسازی شده بودند. از آنجا که مدت زمان معمول بررسی رسیدگی جنسی ماهیان ماده در مزارع تکثیر در ایران در حدود یک هفته تا ۱۰ روز، بسته به دمای آب متغیر است، این بازه زمانی در محدوده مورد قبول برای اجرای فرآیند قرار می‌گیرد. از طرف دیگر، محدود بودن میزان تغییرات میانگین و SD بیانگر مشابه بودن گروه‌های مورد بررسی در هر کلاس سنی بود. با این وجود از آنجا که تعیین زمان دقیق اوولاسیون تخمک در این آزمایش صورت نگرفته است، شاید بخشی از تفاوت مشاهده شده بین دو گروه سنی مولدین از این منظر قابل توجیه باشد که تعیین آن، نیازمند بررسی بیشتر است.

در مطالعه بیشکول و همکاران (۱۳۹۳)، دامنه زمانی برای مولدین نژاد فرانسه ۲ ساعت و برای مولدین موجود در اردبیل ۲ ساعت و ۱۰ دقیقه به‌دست آمد و زمینه ژنتیکی مشترک و شرایط پرورشی یکسان از دلایل نزدیک بودن این زمان به هم ذکر شد. در مطالعه Hershberger و Hostuttler (۲۰۰۵) در مولدین با زمینه ژنتیکی یکسان، بیان شد که در درون جمعیت مولدین، زمان آغاز اولین تقسیم سلولی دارای ضریب تغییرات کمتری است و نتیجه القا تتراپلویدی را به‌حداکثر می‌رساند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با وجود والدین با منبع ژنتیکی یکسان، اختلاف سن

Quillet و همکاران (۱۹۸۸) بهترین زمان را برای القای تتراپلویدی را ۸۵ ساعت-درجه، درافشان و همکاران (۱۳۹۳)، بالاترین درصد تتراپلویدی را عمدتاً در زمان ۶۵ ساعت-درجه پس از لقاح گزارش کردند. به‌نظر می‌رسد که تفاوت در زمان تقسیم سلولی در میان گروه‌های مختلف مولدین در جمعیت‌های مختلف یا حتی در میان مولدین ماده متعلق به یک گله، می‌تواند توجیه‌کننده این تفاوت‌ها در زمان بهینه آغاز شوک در بین گزارش‌های متفاوت باشد. بنابراین، محاسبه و تعیین زمان اولین تقسیم سلولی و تعیین زمان شوک‌دهی براساس آن می‌تواند منجر به حداکثر موفقیت در القای تتراپلویدی شود. در ارتباط با تعیین زمان اولین تقسیم سلولی در گونه‌های مختلف آزادماهیان در خارج و داخل کشور تلاش‌های زیادی برای تعیین شرایط بهینه بر القا تتراپلویدی انجام شده است (Hershberger and Hostuttler, 2005؛ بیشکول و همکاران ۱۳۹۳؛ درافشان و همکاران ۱۳۹۳؛ Weber et al., 2015؛ زارعی و همکاران ۱۳۹۸). نتایج مطالعه Weber و Hostuttler (۲۰۱۲) نشان داد که در مولدین با زمینه ژنتیکی یکسان در شرایط پرورشی متفاوت زمان وقوع اولین تقسیم سلولی متفاوت است. همچنین سن تخمک (مدت زمانی که از آزاد شدن تخمک‌ها می‌گذرد) بر FCI تأثیرگذار است و هرچه از زمان آزادسازی تخمک بگذرد یا به اصطلاح تخمک پیرتر شود، زمان وقوع FCI افزایش یافته و درصد لقاح کاهش می‌یابد، البته این عامل در بازه‌های زمانی تا ۲۱ روز بعد از اوولاسیون مورد بررسی قرار گرفته است. با این وجود، تخم-کشی از ماهیان در بازه زمانی یک هفته تا ۱۰ روز پس از اوولاسیون معمولاً اجرا می‌شود که تغییر چندانی را در کیفیت تخمک‌های استحصالی ایجاد نمی‌کند. براساس نتایج مطالعات دیگر، زمان آزادسازی تخمک در حفره شکمی یا در شرایط آزمایشگاه باعث کاهش کیفیت تخمک‌ها و افزایش زمان آغاز اولین تقسیم سلولی شده است (Azuma et al., 2003; Komrakova and Holtz, 2009). در مطالعه صائبی و همکاران (۱۴۰۱) مشاهده شد که نگهداری تخمک‌های بارور نشده قزل‌آلای رنگین‌کمان در محیط برون‌تنی، *In Vitro* می‌تواند کیفیت تخمک‌ها را متأثر از محیط نگهداری به‌شدت تحت تأثیر قرار دهد. آن‌ها گزارش کردند که محیط مصنوعی بافر شده با Hepes بهترین قابلیت را برای نگهداری کوتاه مدت تخمک تا هفت روز در

تخم و نسبت متفاوت سطح به حجم در تخم هایی با اندازه متفاوت خصوصاً در زمان اعمال شوک حرارتی مشهود خواهد بود. واضح است که با افزایش سن ماهیان مولد، به تبع آن افزایش قطر تخمک نیز رخ خواهد داد با این وجود در مطالعه حاضر کمترین همبستگی بین زمان وقوع تقسیم سلولی و اندازه تخمک مشاهده شد. شاید اندازه نسبتاً نزدیک تخمک ها در دو گروه سنی تا حدودی این همبستگی اندک را توجیه نماید، با این وجود بررسی دقیق تر در این خصوص ضروری است.

به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که زمان وقوع اولین تقسیم سلولی در قزل آلائی رنگین کمان می تواند تحت تأثیر از سن ماهی تغییر کند. اگرچه سن بر روی سایر شاخص های زیستی ماهی نیز تأثیرگذار است با این وجود توجه به سن به عنوان یک عامل کلیدی در وقوع اولین تقسیم سلولی و در نتیجه اعمال شوک برای القای تتراپلویدی در قزل آلائی رنگین کمان می تواند مطرح باشد. نتایج این تحقیق برای اولین بار به تفاوت های بارز دو کلاس سنی از مولدین قزل آلائی رنگین کمان در این خصوص پرداخت، نتایجی که می تواند در راستای تولید گله های مولد تتراپلوید و در نهایت تولید نتاج تریپلوید غیرالقایی به منظور توسعه آبزی پروری اثرگذار باشد.

تشکر و قدردانی

نتایج منتشر شده در این مقاله، حاصل قرارداد پروژه تحقیقاتی شماره ۱۲۰۵ مورخ ۱۴۰۰/۶/۲۹ در قالب برنامه ICRP فی مابین دانشگاه صنعتی اصفهان و مرکز مطالعات و همکاری های علمی بین المللی است. بدین وسیله بر خود لازم می دانیم از حمایت های مرکز همکاری های علمی بین المللی وزارت علوم، تحقیقات و فناوری (CISSC) ایران سپاسگزاری نماییم. علاوه بر این ضروری است از مدیریت و پرسنل شرکت آبزی نگین شایان فریدونشهر، شهرک علمی و تحقیقاتی اصفهان نیز سپاسگزاری نماییم.

مولدین ماده و در پی آن اختلاف طول و وزن ماهی منجر به بروز اختلاف حدود ۲۷۴ درجه-دقیقه در زمان آغاز اولین تقسیم سلولی می شود که خود می تواند منجر به تغییر قابل توجه در بازده القای تتراپلویدی شود. همچنین در مطالعه دیگر اثر القا تتراپلویدی در یک جفت ماهی نر و ماده بررسی شد، که درصد القا تتراپلویدی به ۱۰۰ درصد رسید (Horstgen, 1993)، بنابر نتایج این تحقیق، در مطالعه حاضر FCI به صورت فردی برآورد شده و لقاح به صورت انفرادی انجام شد. در بررسی نمودار رگرسیون ارتباط FCI و تعداد تخمک در هر گرم، ضریب همبستگی پائینی بین این دو مورد دیده شد که نشان دهنده نقش اندک اندازه تخمک در زمان اولین تقسیم سلولی بود. بررسی ها نشان داده است که زمان اولین تقسیم سلولی در یک گروه ماهی در دو سال متوالی نیز دارای تفاوت معنی دار است که شاید به دلیل افزایش سنی ماهیان باشد که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفته است، اگرچه میزان این اختلاف در گروه های ژنتیکی متفاوت، متغیر گزارش شده است (Weber and Hostuttler, 2012). زمان آغاز تقسیم سلولی در مطالعه حاضر، در گروه مولدین با سن بیشتر از ۴ سال به طور معنی داری بالاتر از گروه با سن بیشتر از دو سال بود و در درون هر جمعیت این زمان تقریباً مشابه بود. در مطالعه حاضر اگرچه ماهیان مسن تر، اندازه تخم بزرگتری نسبت به ماهیان جوان تر داشتند اما این تفاوت معنی دار نبود، بنابراین وجود همبستگی ضعیف بین زمان وقوع اولین تقسیم سلولی و اندازه تخمک را شاید بتوان به اندازه نسبتاً مشابه تخمک ها در دو گروه سنی مولدین نسبت داد. برخلاف نتایج ما، گزارش درافشان و همکاران (۱۳۹۳)، تفاوت معنی داری را در بازده یک شوک یکسان، از نظر زمان اعمال، شدت و دوره شوک، در دو گروه تخمک با اندازه کاملاً متفاوت در قزل آلائی رنگین کمان گزارش کرد. به نظر می رسد در صورتی که اندازه تخمک ها در دو میانگین با تفاوت فاحش نسبت به یکدیگر قرار گیرند، بازده شوک می تواند در دو گروه متفاوت باشد. این مساله بیشتر به دلایلی نظیر گرادیان حرارتی داخل

منابع

- بیشکول غ.، صفایان ش.، نگارستان ح.، نوروز فشخامی م. ۱۳۹۳. مقایسه زمان اولین تقسیم سلولی میتوز در جنین قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) نژاد فرانسه و مولدین موجود در اردبیل. پژوهش های علوم و فنون دریایی. ۱۰(۲): ۳۳-۳۳.
- درافشان س.، وفایی سعدی ا.، نکوئی فرد ع. ۱۳۹۳. بهترین شرایط شوک حرارتی برای القای تتراپلویدی در قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله تحقیقات دامپزشکی. ۶۹(۴): ۴۲۱-۴۲۱.

- زارعی ث.، درافشان س.، پیکان حیرتی ف. ۱۳۹۸. تعیین زمان اولین تقسیم میتوزی در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*). فصلنامه محیط زیست جانوری. ۱۱(۱): ۲۵۳-۲۵۶.
- صائبی ن.، درافشان س.، کلباسی م.ر. ۱۴۰۱. مطالعه تغییرات شاخصهای فیزیکی و بقا تخمک قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) نگهداری شده در محیطهای مختلف طی چند دوره زمانی. نشریه علوم آبی پروری. ۱۰(۳): ۳۵-۴۶.
- کلباسی م.ر.، باقری ع.، پورقاسمی م.، عبدالحی ح. ۱۳۸۲. بررسی ایجاد ماهیان تتراپلوئید قزل‌آلای رنگین‌کمان به وسیله شوک‌های گرمایی. مجله علمی شیلات ایران. ۴: ۱۵۳-۱۴۳.
- Azuma T., Ohta H., Oda S., Muto K., Yada T., Unuma T. 2003. Changes in fertility of rainbow trout eggs retained in coelom. *Fisheries Science* 69(1), 131-136.
- Babaheydari S.B., Keyvanshokoo S., Dorafshan S., Johari S.A. 2016. 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.
- Bromage N., Jones J., Randall C., Thrush M., Davies B., Springate J., Duston J., Barker G. 1992. Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 100(1-3), 141-166.
- Chourrout D. 1980. Thermal induction of diploid gynogenesis and triploidy in the eggs of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Reproduction Nutrition Développement* 20(3A), 727-733.
- Dunham R.A. 2011. Combining genetic enhancement programs. In *Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches* (pp. 278-282). Wallingford UK: CABI.
- Gomelsky B. 2003. Chromosome set manipulation and sex control in common carp: a review. *Aquatic Living Resources* 16(5), 408-415.
- Happe A., Quillet E., Chevassus B. 1988. Early life history of triploid rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Aquaculture* 71(1-2), 107-118.
- Hebert K.P., Goddard P.L., Smoker W.W., Gharrett A.J. 1998. Quantitative genetic variation and genotype by environment interaction of embryo development rate in pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55(9), 2048-2057.
- Hershberger W.K., Hostuttler M.A. 2005. 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.
- Hershberger W.K., Hostuttler M.A. 2007. Protocols for more effective induction of tetraploid rainbow trout. *North American Journal of Aquaculture* 69(4), 367-372.
- Hörstgen-Schwark G. 1993. Initiation of tetraploid breeding line development in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research* 24(5), 641-652.
- Hussain M.G. 1998. Manipulation of chromosomes in fish: review of various techniques and their implications in aquaculture. *Banqladesh Journal of Fisheries Research* 2(1), 99-108.
- Komrakova M., Holtz W. 2009. Factors responsible for successful chilled storage of unfertilized rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *Aquaculture* 286(3-4), 156-163.
- Pandian T.A., Koteeswaran R. 1998. Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia* 384, 167-243.
- Quillet E., Chevassus B., Blanc J.M., Krieg F., Chourrout D. 1988. Performances of auto and allotriploids in salmonids I. Survival and growth in fresh water farming. *Aquatic Living Resources* 1(1), 29-43.
- Tallman R.F. 1986. Genetic differentiation among seasonally distinct spawning populations of chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *Aquaculture* 57(1-4), 211-217.
- 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.
- Thorgaard G.H., Scheerer P.D., Hershberger W.K., Myers J.M. 1990. Androgenetic rainbow trout produced using sperm from tetraploid males show improved survival. *Aquaculture* 85(1-4), 215-221.
- 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.

Effect of brood fish age on first cleavage interval to improve the efficiency of tetraploid induction in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Hajar Sadat Tabatabaei Pozveh¹, Salar Dorafshan^{1*}, Fatemeh Paykan Heyrati¹, Majid Talebi², Tillmann J. Benfey³

¹Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, 84156-83111, Iran.

²Department of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, 84156-83111, Iran.

³Department of Biology, University of New Brunswick, Fredericton, New Brunswick, E3B 6E, Canada.

*Corresponding author: sdorafshan@iut.ac.ir

Received: 25. Jun.2023

Accepted: 21. Aug.2023

Abstract

First cleavage interval (FCI) determination in fertilized fish eggs has a key role in improving late shock for tetraploid induction. This study was conducted to investigate the effect of female brood fish age 2⁺ and 4⁺ years on FCI to optimize the time of shock induction to obtain the highest tetraploidy. 22 and 16 female brood fish at 2⁺ and 4⁺ year class were selected with an average weight 1635±357.83 and 4242.5±1039.36 g, respectively. The female fish were hand stripped and the eggs from each breeder were separately fertilized by the mix of 3 male milt. The eggs then were incubated separately in 3 replicates for each female. The time of adding the activating solution was recorded as the fertilization time. Sampling was started at 4620 degree-min after fertilization (at 11°C) and continued at 10-min intervals for 1980 degree-min. At least, 30 of eggs from each female fish, 10 from each replicate from each female were randomly collected at each sampling time. The fish eggs were fixed and then checked at 40x magnification. FCI in at least 50% of sampled eggs was considered as the time of occurrence of FCI for the female fish. The results showed that FCI occurred in eggs from younger breeders significantly in a shorter time after fertilization compared to the older group. The average FCI was recorded as 5528.64±104.06 and 5802.5±60.16 degree-min for 2⁺ and 4⁺ respectively. A low regression was recorded between FCI and egg size. So, it is recommended to consider the female fish age for optimizing tetraploidy yield using late shock in rainbow trout.

Keywords: Tetraploidy, Rainbow trout, First Cleavage Interval, Age