مقاله مروری

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

سالار درافشان*[1]، هاجر سادات طباطبایی پزوه[1]، فاطمه پیکان حیرتی[1]، مجید طالبی[2]

[1]گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ۸۳۱۱۱-۸۴۱۵۶، اصفهان، ایران.

[2]گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ۸۳۱۱۱-۸۴۱۵۶، ایران.

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

تاریخ دریافت: ۹۹/۴/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۲/۲۵

چکیده

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

واژگان کلیدی: تتراپلویید، شوک دیرهنگام، تقسیم میتوز، اثرات فیزیولوژی.

مقدمه

دستکاری کروموزومی روشی برای کنترل تعداد و ترکیب یک مجموعه هاپلویید کروموزومی است. این روش در ابتدای قرن بیستم از دیدگاه زیست‌شناسی در دوزیستان مورد بررسی قرار گرفت. تحقیقات دستکاری کروموزومی در ماهی نسبت به محصولات زراعی و دیگر حیوانات تاریخچه کوتاهی دارد. از سال ۱۹۴۳ اولین اقدامات آغاز شده و تاکنون انواع تکنیک‌های مختلفی برای تداخل در عملکرد طبیعی مرحله متافاز در طی چرخه سلولی با استفاده از عوامل فیزیکی و یا شیمیایی ایجاد شده است، که در نتیجه آن افراد با وضعیت ژنومی متفاوت، یعنی پلی پلوییدها (تریپلوییدها و تتراپلوییدها)، ماده‌زادها (میوزی و میتوزی) و افراد نرزاد تولید می‌شود (Hussain, 1998). از دهه ۱۹۵۰ تا ۱۹۷۰، چندین مطالعه در انواع گونه‌های مختلف ماهی برای بررسی تاثیر پلوییدی و توارث تک والدی در حیوانات توسط دانشمندان در کشورهای مختلفی نظیر انگلستان، امریکا، نروژ و ژاپن انجام شده است (Arai and Fujimoto, 2018).

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

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

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

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

پلی پلوییدی

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

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

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

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

تتراپلوییدی: تتراپلوییدی (دارا بودن چهار سری کروموزوم در هر سلول) نوعی از پلی‌پلوییدی در ماهیان است که روش تولید آن همانند تریپلوییدی با استفاده از شوک‌های فیزیکی یا شیمیایی است. با این تفاوت که شوک دیرهنگام و در فاصله بعد از لقاح و قبل از تکمیل اولین تقسیم میتوزی سلول و تبدیل شدن به دو سلول است (Hershberger and Hostuttler, 2007). در تتراپلوییدی نیز اعمال شوک فشار برای تولید افراد تتراپلویید بهتر از سایر شوک‌ها است (Bury, 1989). در تولید افراد تتراپلویید گاهی افراد موزاییک دارای سلول های 3N، 4N و 5N تولید شده است. این گامت‌ها کاربری و اهمیت ویژه‌ای دارند زیرا برنامه‌های مختلفی را برای دستکاری پلوییدی ایجاد می‌کنند. به عنوان مثال از لقاح افراد تتراپلویید و دیپلویید افراد تریپلوییدی ایجاد می‌شوند که عقیم هستند و این روش برای تولید انبوه آبزیان تریپلویید با بازماندگی و درصد تریپلوییدی مطلوب می‌توان استفاده کرد، به بیان دیگر تتراپلوییدی می‌تواند یک منبع مهم در تولید ماهیان تریپلویید کاملاً عقیم محسوب شود (Pandian and Koteeswaran, 1998). ماده‌زادهای دیپلویید می‌توانند از تخم دیپلویید و اسپرم اشعه دیده شده ایجاد گردند. همچنین از لقاح یک ماهی آلوتتراپلویید از یک گونه و ماهی دیپلویید گونه دیگر امکان تولید هیبریدهای تریپلویید عقیم وجود دارد (Wang *et al*., 2020).

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

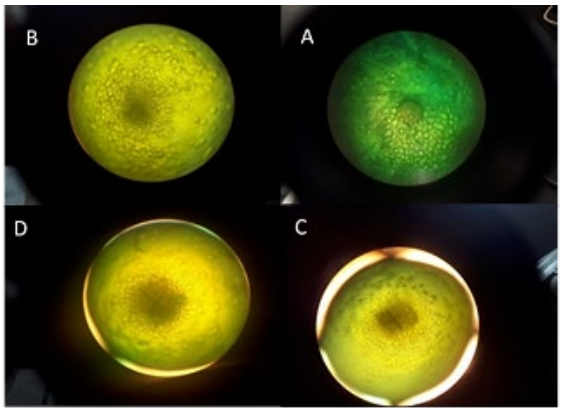
القای تتراپلوییدی

تلاش‌های زیادی برای تعیین شرایط بهینه برای القا تتراپلوییدی انجام شده است، موفقیت القای تتراپلوییدی در آبزیان، تابع شرایط محیطی منطقه و ویژگی‌های والدین است و به‌دلیل اختلاف حساسیت در تخم‌ها، در بین نژادها و گونه‌های نزدیک، شوک‌های مختلفی اعمال می‌شود و نتایج مختلفی حتی برای یک گونه تاکنون ارائه شده است (Thorgaard, 1986). عواملی از جمله دما در شوک‌های سرمایی و گرمایی، قدرت در فشار هیدرواستاتیک، غلظت مواد شیمیایی، مدت زمان شوک دهی و زمان شروع و متوقف کردن عملیات شوک‌دهی نیز در القای تتراپلوییدی مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین عوامل دیگری نظیر ویژگی‌های خاص هرگونه (سرعت تکامل جنینی و تقسیمات سلولی) و دمای آب انکوباسیون قبل از اعمال شوک (Pandian and Koteeswaran, 1998)، اختلاف دمای آب نگهداری مولدین مورد استفاده برای عملیات تکثیر و دمای شوک (Phillips *et al*., 1986) کیفیت گامت‌های مورد استفاده خصوصاً اندازه و درجه رسیدگی تخمک‌ها و حساسیت‌های

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

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

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

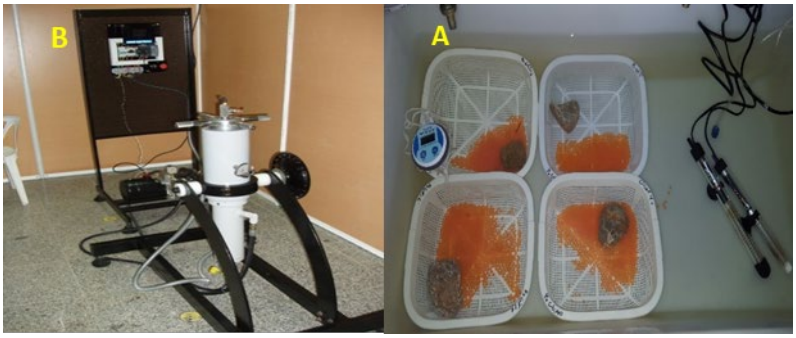


شکل ۱ – مراحل اولیه تقسیم سلول. A– لقاح انجام نشده، B- مرحله تک سلولی، C- تشکیل اولین تقسیم سلولی و تبدیل شدن به دوسلول و D تشکیل دومین تقسیم سلولی و تبدیل شدن به ۴ سلول . بزرگنمایی ۴X.

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

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

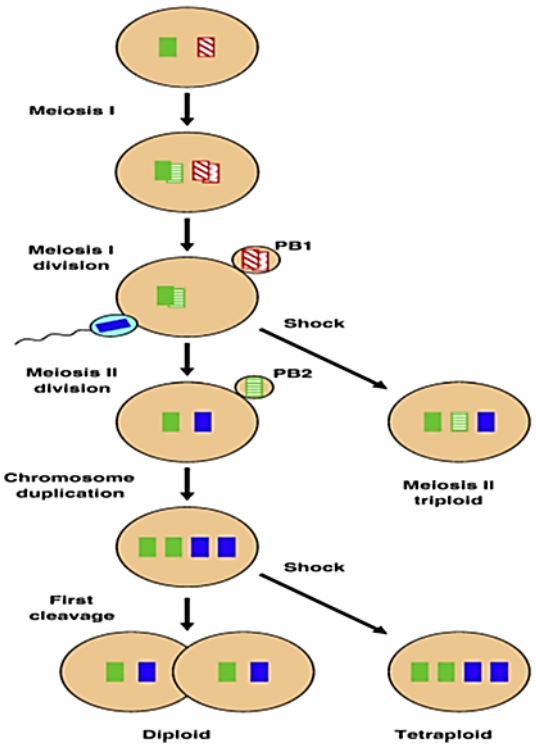
تولید افراد تتراپلویید مستلزم سرکوب اولین تقسیم سلول است که با استفاده از شوک‌های فیزیکی



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

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

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



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

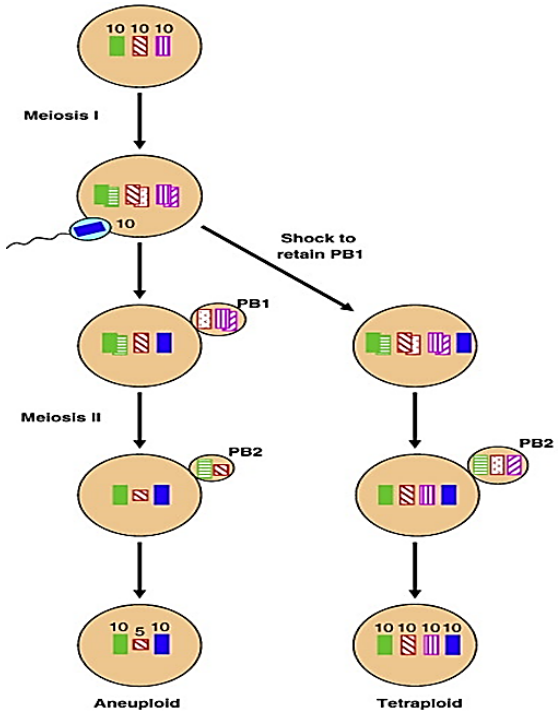
تغییر اندازه تخم، میزان بقا در گروه‌های آزمایش تغییر می‌کند و درصد القای تتراپلوییدی در گروه تخمکی بالای ۵ میلی‌متر در محدوده ۱۸ تا ۶۹ درصد و در گروه تخمکی زیر ۵ میلی‌متر در گستره ۱۸ الی ۷۶ درصد گزارش شده است (درافشان و همکاران، ۱۳۹۳). در گونه *Danio rerio* نیز شوک گرمایی در بازه‌های زمانی متفاوت آزمایش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

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

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

بررسی صحت پلوییدی

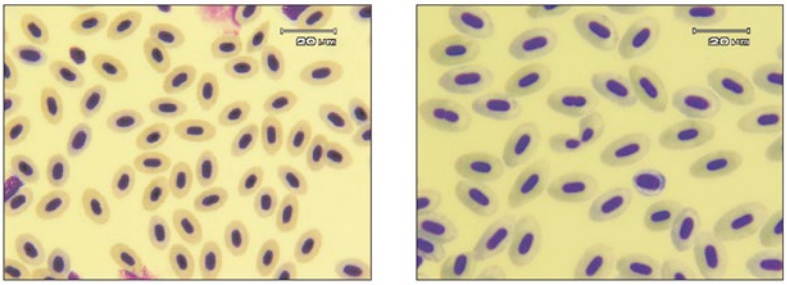
بازده تولید افراد پلی‌پلویید با استفاده از شوک‌های فیزیکی یا شیمیایی به‌ندرت به صد در صد می‌رسد و درمورد القای تترپلوییدی این بازده کمتر است (کیوان شکوه و درافشان، ۱۳۹۶). روش‌های مختلفی برای تشخیص عدد پلوییدی در آبزیان وجود دارد این روش‌ها به دو بخش اصلی تقسیم می‌شوند: روش‌های مستقیم (کاریولوژی، اندازه‌گیری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



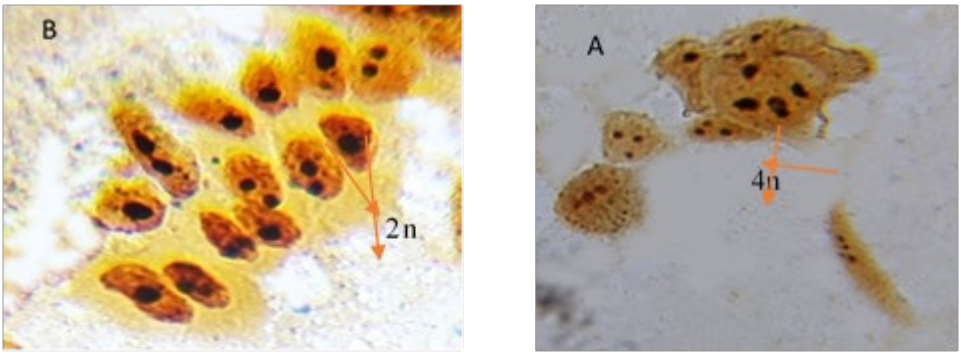
شکل ۴ – القای تتراپلوییدی در بی‌مهرگان آبزی. خروج هر دو گویچه قطبی در زمانهای مختلف بعد از لقاح سلول تخمک رخ خواهد داد (Piferrer *et al*., 2009).

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

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



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



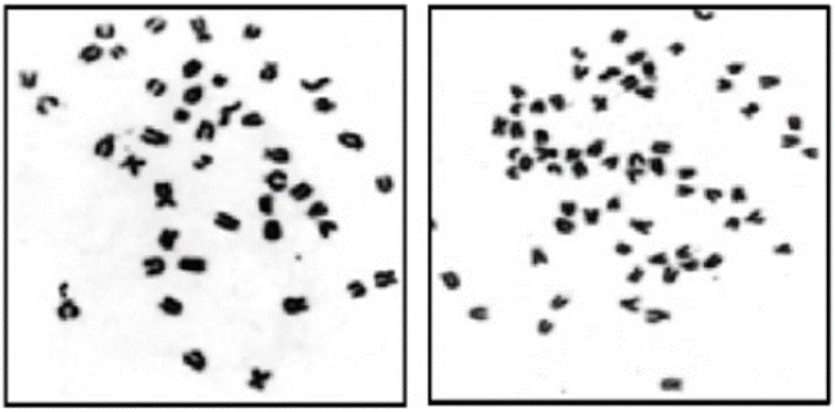
شکل ۶ – A) نقاط سازمان‌دهنده هستکی در فرد تتراپلویید، با حداکثر چهار نقطه ، B) نقاط سازمان دهنده هستکی در فرد دیپلویید با یک و دو نقطه در قزل‌آلای رنگین‌کمان.

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

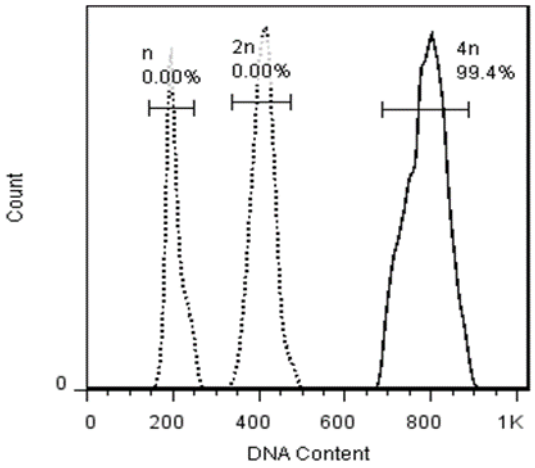
شمارش نقاط سازمان دهنده هستکی: شمارش نقاط سازمان دهنده هستکی نوعی جایگزین ساده و ارزان برای سایر روش‌های تعیین صحت پلوییدی است، که برای انواع مختلف ماهی کاربرد دارد (شکل ۶). در بسیاری از گونه‌ها با افزایش سطح پلوییدی، تعداد هستک‌ها افزایش می‌یابد (Phillips *et al*., 1986). این روش شامل رنگ‌آمیزی سلول‌ها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

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

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



شکل ۷ – مقایسه تعداد کروموزم در فرد دیپلویید (A) و تتراپلویید (B)(Piferrer *et al*. 2009).



شکل ۸ – مقایسه حجم DNA در سلول هاپلویید (اسپرم)، دیپلویید و تتراپلویید با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر.

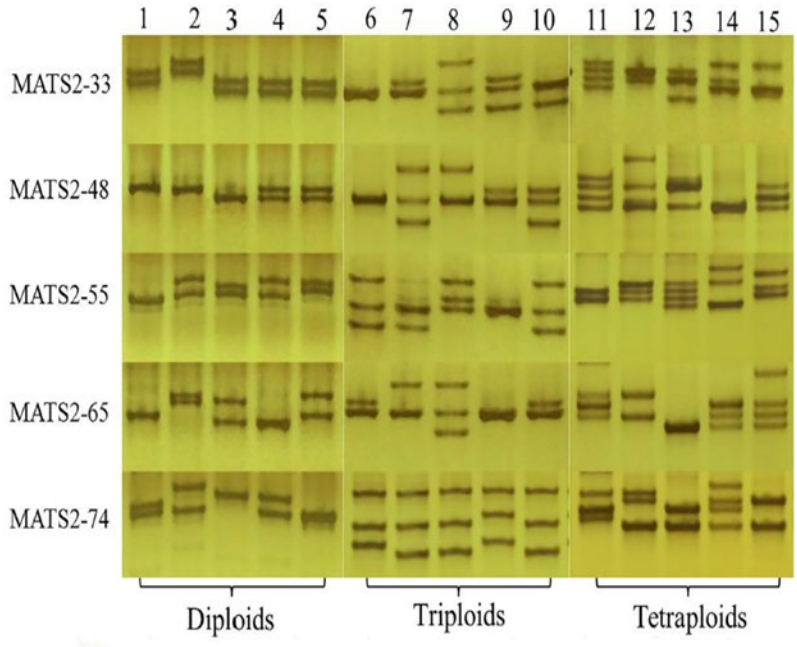
نمونه استفاده از این روش را در بسیاری از مطالعات غیر امکان نموده است.

نشانگرهای مولکولی: استفاده از نشانگر ریزماهواره می‌تواند یکی از روش‌های شناسایی افراد پس از دستکاری کروموزومی باشد (Glover *et al*., 2016). این روش با تحلیل تعداد کروموزوم‌ها در بررسی سطح پلوییدی در ماهیان خاویاری استفاده شده است (Fopp-Bayat and Woznicki, 2006). نشانگر ریزماهواره همچنین برای بررسی سطح پلوییدی در گونه‌هایی مانند مولی (*Poecilia formosa*) (Lampert *et al*., 2006)، گلدفیش (*Carassius auratus*)، ماهی پهن (*Scophthalmus maximus*) (Tsumura *et al*., 1991) و ماهی آزاد اطلس (*Salmo salar*) (Glover *et al*., 2016) و قزل‌آلای قهوه‌ای (Sanz *et al*., 2020) مورد استفاده قرار گرفته است. نشانگرهای ریزماهواره با نمایش تعداد باندهای متفاوت در افراد دیپلویید و پلی‌پلویید منجر به شناسایی افراد از یکدیگر می‌شوند (شکل ۹).

عملکرد تتراپلوییدها

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

موفقیت القا پلی‌پلوییدی در آبزیان، تابع شرایط



شکل ۹ – نمایش باندهای حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در افراد دیپلوییدِ دارای یک یا دو باند، تریپلوییدِ دارای یک، دو یا سه باندو تتراپلوییدِ با حداقل ۱ و حداکثر ۴ باند در گونه *Misgurnus anguillicaudatus* (Feng *et al*., 2018).

محیطی و ویژگی‌های والدین است و به دلیل اختلاف حساسیت در تخم‌ها، بین نژادها و گونه‌های نزدیک، شوک‌های مختلفی برای نتایج بهینه مورد استفاده قرار می‌گیرند. از این‌رو نتایج متفاوتی در این خصوص حتی برای یک گونه ارائه شده است (Weber and Hostuttler, 2012). زمان آغاز شوک‌دهی (زمان پس از لقاح)، دوره شوک‌دهی و دمای شوک از مهم‌ترین عوامل مؤثر در موفقیت شوک در جهت القای پلوییدی محسوب می‌گردند (Dunham, 2011).

همچنین عوامل دیگری نظیر ویژگی‌های خاص هرگونه (سرعت تکامل جنینی و تقسیمات سلولی) و دمای آب انکوباسیون قبل از اعمال شوک (Pandian and Koteeswaran, 1998)، اختلاف دمای آب نگهداری مولدین مورد استفاده برای عملیات تکثیر و دمای شوک (Phillips *et al*., 1986)، کیفیت گامت‌های مورد استفاده خصوصاً اندازه تخمک (درافشان و همکاران، ۱۳۹۳)، و حساسیت‌های خاص هر نژاد یا جمعیت نسبت به شوک در بازده شوک مؤثر خواهند بود.

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

صورت گرفته است، ولی به نظر می‌رسد با القای تتراپلوییدی و به دلیل افزایش هموزایگوسیتی در ماهیان تتراپلویید نسبت به ماهیان دیپلویید، زمان تفریخ در ماهیان تتراپلویید نیز یکنواخت‌تر است.

رشد: مطالعات متفاوتی در ارتباط با رشد در بین گروه‌های دیپلویید و تتراپلویید صورت گرفته است، در ماهی لوچ (*Misgurnus mizolepis*) میزان رشد در گروه تتراپلویید به طور قابل ملاحظه‌ای (۲۳ درصد) کمتر از گروه دیپلویید است (Nam *et al*., 2001). کاهش رشد در گروه تتراپلویید در مقابل گروه دیپلویید قزل‌آلای رنگین‌کمان را نیز گزارش شده است (Chourrout *et al*., 1986). از سوی دیگر رشد مشابه در بین گروه‌های دیپلویید و تتراپلویید قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز گزارش شده و بیان گردیده که رشد در تتراپلوییدها متأثر از خصوصیات ژنتیکی و کیفیت تخم است.

حتی در موفق‌ترین موارد میزان رشد ماهیان تتراپلویید بسیار پایین تر از ماهیان دیپلویید گروه شاهد بوده‌اند (تقریباً ۴۰ درصد گروه شاهد). چنین رشد کاهشی ممکن است مربوط به اثرات مضر وضعیت پلوییدی بالاتر باشد. در ماهی لوچ که تتراپلوییدی خود به خودی وجود دارد، در ماهی دیپلویید و تتراپلویید که از نظر ژنتیکی یکسان بودند، تتراپلوییدها به طور قابل توجهی کوچکتر از دیپلوییدها بودند. در ماهیانی که تتراپلوییدی به طور موفقیت آمیز رخ داده است، مشکلات نه تنها در بقا و رشد بلکه در ظرفیت تولیدمثلی نیز رخ داده است.

تولیدمثل: در قزل‌آلای رنگین‌کمان نرهای تتراپلویید از نظر جنسی بالغ شده و تولید اسپرم می‌کنند. در *M. mizolepis* از میان ۴۸ فرد نر تتراپلویید، تنها سه فرد قادر به تولید اسپرم دیپلویید بوده و این سه فرد در تولید جمعیت تریپلویید غیرالقایی استفاده شده است. براساس این مطالعه ماهیان نر تتراپلویید از نظر تکامل گنادی می‌توانند در چهار دسته قرار گیرند، دسته اول افرادی که دارای گنادهای کوچک و غیرکارآمد هستند، گروه دوم افرادی که دارای گنادهای بارور با قابلیت تولید اسپرم هاپلویید هستند، گروه سوم افرادی که داری گنادهای بارور با قابلیت تولید اسپرم موزاییک هستند و گروه چهارم افرادی که دارای قابلیت تولید اسپرم دیپلویید هستند (Nam and Kim, 2004). بررسی تکامل گناد در افراد نر و ماده در طی دوره پرورش می‌تواند اطلاعات مفیدی در مورد زمان بلوغ در ماهیان نر و ماده تتراپلویید و اختلاف آن‌ها با گروه دیپلویید و مراحل تکامل گناد در اختیار ما قرار دهد (Chourrout *et al*., 1986). مطالعات اندکی در ارتباط با تکامل گنای در افراد تتراپلویید انجام شده‌است و یکی از چالش‌های فراروی تولید افراد تتراپلویید محسوب می‌شود.

کاربرد تتراپلوییدی

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

دیپلوییدها است (Arai and Fujimoto, 2018).

تولید جمعیت‌های تریپلوییدعقیم: باوجود بازماندگی اندک در ماهیان تتراپلوییدها، افرادی قادر به حفظ بقا هستند به بلوغ جنسی می‌رسند، قادر به تولید گامت‌های زایا هستند. استفاده از ماهیان تتراپلوییدماده نسبت به ماهی تتراپلوییدنر جهت تلاقی با ماهیان دیپلوییدوتولید ماهیان اینترپلوییدها (تریپلوییدغیرالقایی)، معایبی دارد که می‌توان به تولید اندک تعداد سلول‌های جنسی ماده (تخمک) نسبت به تعداد سلول‌های جنسی نر (اسپرم) اشاره کرد، به‌علاوه نرهای تتراپلوییدقزل‌آلای‌رنگین‌کمان گامت‌هایی تماماً دیپلوییدتولید می‌کنند در حالی‌که ماده‌های تتراپلوییداصولاً اوسیت‌های دیپلوییدبا تعدادی اوسیت‌های تریپلوییدو تتراپلوییدتولید می‌نمایند و ناهنجازی بیشتری را نشان می‌دهند (Chourrout and Nakayama, 1987).

درصد افراد تریپلوییدکه از روش آمیزش بین افراد تتراپلوییدو دیپلوییدایجاد شده‌اند تا ۹۷ درصد گزارش شده است (Chourrout *et al*., 1986). ماهیان تولید شده به روش غیر مستقیم، در معرض شوک‌دهی در القاء تریپلوییدی قرار نمی‌گیرند و تریپلوییدمشتق شده از تتراپلوییدها مزایایی نسبت به القای تریپلوییدی مستقیم دارد. تولیدات حاصل از آمیزش والدین دیپلوییدو تتراپلوییدصددرصد تریپلوییدهستند (Devlin *et al*., 2010) درحالی‌که وقوع تریپلوییدی در روش القایی صددرصد نیست، علاوه بر این تریپلوییدحاصل شده از تتراپلوییدها دارای درجه هتروزایگوسیتی بالاتری نسبت به تریپلوییدایجاد شده به وسیله شوک است. تریپلوییدهای حاصل از تلاقی تتراپلوییدو دیپلوییدمزایای برتری نسبت به تریپلوییدهای میوزی و گروه شاهد در قزل آلای رنگین کمان داشتند (Myers *et al*., 1995; Chourrout *et al*., 1986). مولدین دیپلوییدو تتراپلوییدمورد استفاده جهت تولید افراد تریپلوییدمی‌تواند از بین ماهیان با صفات برتر انتخاب شوند (Hershberger and Hostuttler, 2007).

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

جمع‌بندی

القای تریپلوییدی، برای تولید افراد عقیم و کنترل بیولوژیکی و جلوگیری از انتشار گونه‌های غیربومی و افزایش رشد، قابلیت اجرا دارد. تولید افراد تریپلوییدبه دو روش مستقیم و غیر مستقیم امکان‌پذیر است، که در روش غیرمستقیم نیازمند جمعیت مولد تتراپلوییدهستیم. تولید ماهیان تتراپلوییدبه منظور استفاده ار آن‌ها در ایجاد گله‌های تریپلوییدعقیم به روش غیر القایی جهت معرفی آن‌ها به سامانه‌های پرورشی دارای اهمیت است. بقای پایین نتاج تتراپلوییداز مشکلات این تولیدات محسوب می‌شود، ولی چون برای ایجادجمعیت مولد نیاز به تعدادزیاد افرادتتراپلوییدنیست، با بقا پایین نیز می‌توان جمعیت مورد نیاز را تولید نمود. باتوجه به مطالعات صورت گرفته به نظر می‌رسد که آبزیان تتراپلوییددر رشد و صفات فیزیولوژیک رفتار متفاوتی را نسبت به افراد دیپلوییدنشان دهند، با این حال مطالعات جامعی در ارتباط با تکامل گنادی و تولید مثل تتراپلوییدها و پارامترهای خون‌شناسی انجام نشده است و این موضوع از چالش‌های فراروی القای تتراپلوییدی است. در آبزیان با توجه به سیستم تعیین جنسیت از تلاقی افراد نر و ماده دیپلوییدو تتراپلوییدد، نتاج با نسبت‌های جنسی مختلف ایجاد خواهد شد و با توجه به اینکه در بسیاری از گونه‌ها از جمله آزادماهیان و کپورماهیان رشد در جنس ماده بیشتر از جنس نر است استفاده از سایر مکانیسم‌ها از جمله به‌کارگیری تغییرجنسیت هورمونی همراه با القای تتراپلوییدی می‌تواند به دستیابی جمعیت‌های تک جنس منجر شود که برای پرورش از اهمیت زیادی برخوردار است.

منابع

بهرامی باباحیدری ص.، کیوان شکوه س.، درافشان س.، جوهری الف. ۱۳۹۵. تاثیر القای تتراپلوییدی بر تخم گشایی، بازماندگی، شاخص‌های رشد و ترکیب بیوشیمیایی لاشه قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). دامپزشکی ایران، ۱۷: ۲۴۰-۲۳۱.

درافشان س.، وفایی سعدی ا.، نکویی‌فرد ع. ۱۳۹۳. بهترین شریط شوک حرارتی برای القای تتراپلوییدی در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhyndhus mykiss*)، ۶۹ (۴): ۴۱۱-۴۲۱.

کیوان شکوه س.، درافشان س. ۱۳۸۹. زیست‌فناوری و ژنتیک در شیلات و آبزی‌پروری، دانشگاه صنعتی اصفهان. ۱۹۱ص.

Ara. K., Takafumi F. 2018. Chromosome manipulation techniques and applications to Aquaculture. *Sex Control in Aquaculture* I, 137–62.

Bahrami Babaheydari S., Keyvanshokooh S., Dorafshan S., Johari S.A. 2016a. Effects of Tetraploidy induction on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss,* Walbaum, 1792) Proteome at Early Stages of Development. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics* 20, 57-64

Bahrami Babaheydari S., Keyvanshokooh S., Dorafshan S., Johari S.A. 2016b. Proteome changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fertilized eggs as an effect of triploidization heat-shock treatment. *Animal Reproduction Science* 166(2015), 116-121.

Bury D. 1989. Induction of polyploidy in percichthyid basses and ictalurid catfishes with hydrostatic pressure shocks.

Cassani J.R., Caton W.E. 1986. Efficient production of triploid grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) utilizing hydrostatic pressure. *Aquaculture* 55(1), 43-50.

Cherfas N.B., Ilyasova V.A. 1980. Induced Gynogenesis in Silver Crucian Carp and Carp Hybrids. Genetika 16(7): 1260–69.

Chourrout D. 1980. Thermal induction of diploid gynogenesis and triploidy in the eggs of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Reproduction Nutrition Developpement* 20(3 A), 727-733.

Chourrout D., Chevassus B., Krieg F., Happe A., Burger G., Renard P. 1986. Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females - potential of tetraploid fish. *Theoretical and Applied Genetics* 72(2), 193-206.

Chourrout D., Nakayama I. 1987. Chromosome studies of progenies of tetraploid female rainbow trout. *Theoretical and Applied Genetics* 74(6), 687-692.

Devlin R.H., Dionne S., Carlo A.B., Ki W.E. 2010. Occurrence of incomplete paternal-chromosome retention in gh-transgenic coho salmon being assessed for reproductive containment by pressure-shock-induced triploidy. *Aquaculture* 304(1–4), 66-78.

Ding J., Yaqing C., Zichen W., Jian S. 2007. Polyploidy Induction by hydrostatic pressure shock and embryo development of sea cucumber *Apostichopus Japonicus*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 25(2), 184-90.

Dunham R.A. 2011. Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches: Second Edition Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches: Second Edition. Cabi.

Fopp-Bayat D., Pawel W. 2006. Verification of Ploidy Level in Sturgeon Larvae. *Aquaculture Research* 37(16), 1671-75.

Fujimoto T., Yasui G.S., Hayakawa M., Sakao S., Yamaha E., Arai K. 2010. Reproductive capacity of neo-tetraploid loaches produced using diploid spermatozoa from a natural tetraploid male. *Aquaculture* 308, S133-S139.

Fujimoto T., Sakao S., Yamaha E., Arai K. 2007. Evaluation of different doses of UV irradiation to loach eggs for genetic inactivation of the maternal genome. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 307(8), 449-462.

Glover K.A., Bos J.B., Urdal K., Madhun A.S., Sørvik A.G.E., Unneland L., Seliussen B.B., Skaala O., Skilbrei O.T., Tang Y., Wennevik V. 2016. Genetic screening of farmed Atlantic salmon escapees demonstrates that triploid fish display reduced migration to freshwater. *Biological Invasions* 18(5), 1287-1294.

Myers J.M., Powell S.F., McAndrew B.J. 1995. Induction of tetraploidy in brown trout, *Salmo trutta* L., using hydrostatic pressure. *Aquaculture Research* 26(3), 229-232.

Myers J.M., Hershberger W.K., Iwamoto R.N. 1986. The induction of tetraploidy in salmonids. *Journal of the World Aquaculture Society* 17(1-4), 1-7.

Najafpour B., Dorafshan S., Paykan Heyrati F., Power D.M. 2019. Embryonic Development of the Endangered Caspian Brown Trout, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877). *Journal of Applied Ichthyology* 35(2), 473-79.

Nam Y.K., Cho H.J., Cho Y.S., Noh J.K., Kim. C.G., Kim. D.S. 2001. Accelerated growth, gigantism and likely sterility in autotransgenic triploid mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Journal of the World Aquaculture Society* 32(4), 353-363.

Nam Y.K., Kim D.S. 2004. Ploidy status of progeny from the crosses between tetraploid males and diploid females in mud loach (*Misgurnus mizolepis*). *Aquaculture* 236(1-4), 575-582.

Nascimento N.F., Pereira-Santos M., Levy-Pereira N., Monzani P.S., Niedzielski D., Fujimoto T., Senhorini J.A., Nakaghi. L.S.O., Yasui G.S. 2020. High percentages of larval tetraploids in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* induced by heat-shock: The first case in *Neotropical characins*. *Aquaculture* 734938.

Pandian T.J., Koteeswaran R. 1998. Ploidy Induction and Sex Control in Fish. *Hydrobiologia* 384(1–3), 167-243.

Phillips R.B., Zajicek K.D., Ihssen P.E., Johnson O. 1986. Application of silver staining to the identification of triploid fish cells. *Aquaculture* 54(4), 313-319

Piferrer F., Beaumont A., Falguière J.C., Flajšhans M., Haffray P., Colombo L. 2009. Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture* 293(3-4), 125-156.

Sakao S., Fujimoto T., Kimura S., Yamaha E., Arai K. 2006. Drastic mortality in tetraploid induction results from the elevation of ploidy in masu salmon *Oncorhynchus masou*. *Aquaculture* 252(2-4), 147-160.

Sanz. N.; Nebot, A.; & Araguas, R.M. 2020. Gomelsky B. 2003. Chromosome set manipulation and sex control in common carp: A review. *Aquatic Living Resources* 16(5), 408-415.

Guo X., Allen Jr S.K. 1994. Viable tetraploids in the pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body 1 in eggs. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(1), 42–50.

Happe A., Edwige Q., Chevassus B. 1988. Early life history of triploid rainbow. *Aquaculture* 71(1–2), 107-118.

Herbst, E.C., 2002. Induction of Tetraploidy in Zebrafish *Danio rerio* and Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. (August): 127.

Hershberger W.K., Hostuttler M.A. 2007a. Protocols for More Effective Induction of Tetraploid Rainbow Trout. *North American Journal of Aquaculture* 69(4), 367–72.

Hershberger W.K., Hostuttler M.A. 2007b. Variation in time to first cleavage in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* embryos: A major factor in induction of tetraploids. *Journal of the World Aquaculture Society* 36(1), 96-102.

Hu F., Fan J., Qin Q., Huo Y., Wang Y., Wu C., Liu Q., Li W., Chen X., Liu C. 2019. The sterility of allotriploid fish and fertility of female autotriploid fish. *Fronteries in Genetics* 10, 1-10.

Hussain M.G. 1998. Manipulation of Chromosomes in Fish: Review of Various Techniques and Their Implications in Aquaculture. *Bangladesh Journal of Fisheries* Research 2(1), 99-108.

Standish K., Allen JR. 1983. Flow cytometry: and shellfish assaying experimental polyploid fish the procedure must be non-lethal and preferably rapid. Our laboratory to the animal and success in identifying ploidy has been flow cytometry. Fluorescent Dye Followed by the Quantifi 33, 317-28.

Kim H.S., Ki H.Ch., Jung H.S. 2017. Comparison of Different Ploidy Detection Methods in *Oncorhynchus mykiss*, the Rainbow Trout. *Fisheries and Aquatic Sciences* 20(1), 1-7.

Lampert K.P., Lamatsch D.K., Schories S., Hopf A., De Leon F.J.G., Schartl M. 2006. Microsatellites for the gynogenetic Amazon molly, *Poecilia formosa*: useful tools for detection of mutation rate, ploidy determination and overall genetic diversity. *Journal of Genetics* 85(1), 67-71

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

Sourinezhad I., Kalbassi M., Soltan Karimi S. 2007. Effect of triploidy induction on some hematological indices changes in all-female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in winter. *Modern Genetics Journal* 2(2), 51-58.

Stanley J.G., Standish K., Allen Jr., Hidu H. 1981. Polyploidy Induced in the American Oyster, *Crassostrea virginica*, with Cytochalasin B. *Aquaculture* 23(1-4), 1-10.

Thorgaard G.H. 1983. Chromosome Set Manipulation and Sex Control in Fish. *Fish Physiology* 9, 405-434.

Thorgaard G.H. 1986. Ploidy Manipulation and Performance. *Aquaculture* 57(1-4): 57-64.

Thorgaard G.H., Jazwin M.E., Stier A.R. 1981. Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout. *Transactions of the American Fisheries Society* 110(4), 546-550.

Tsumura K., Blann V.E., Lamont C.A. 1991. Progeny test of masculinized female rainbow trout having functional gonoducts. *The Progressive Fish-Culturist* 53(1), 45-47.

Wang Y., Zhang M., Tao S., Xie X., Tan, H., Cao L., Wang J., Qin Q., Zhang C., Tao M., Ma M., Chen B., Liu S. 2020. Unreduced diploid sperm from diploid hybrids and formation of a new type of tetraploid hybrid. *Aquaculture* 515, 734584.

Weber G.M., Hostuttler M.A. 2012. Factors affecting the first cleavage interval and effects of parental generation on tetraploid production in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 344, 231-238.

Weber G.M., Hostuttler M.A., Semmens K.J., Beers B.A. 2015. Induction and viability of tetraploids in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 72(10), 1443-1449.

Yasui G.S., Fujimoto T., Arai K. 2010. Restoration of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, from cryopreserved diploid sperm and induced androgenesis. *Aquaculture* 308, S140-S144.

Zhang X., Mutsukawa K., Onozato H. 2005. Correlation between delay in the earlier cleavage stage and the tetraploidization rate in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* embryos treated with heat or hydrostatic pressure shock during the first cell cycle. *Fisheries Science* 71(1), 239-241.

Review Article

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

Salar Dorafshan[*1], Hajar Sadat Tabatabai Pozveh[1]. Fatemeh Paykan Heyrati[1], Majid Talebi[2]

[1]Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, 84156-83111, Iran.
[2]Department of Biotechnology, Collage of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, 84156-83111, Iran.
*Corresponding author: sdorafshan@cc.iut.ac.ir
Received: 2020/7/11 Accepted: 2021/3/15

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

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