ایجاد ماده‌زایی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان توسط پرتو فرابنفش[1و2]

قباد آذری تاکامی[3] حمید فرحمند[4] برزان بهرامی کمانگر[5]

چکیده

به‌منظورایجاد ماده‌زایی‌میوزی در ماهی‌قزل‌آلای‌رنگین‌کمان(*Oncorhynchus mykiss*)، ژنوم اسپرم بااستفاده‌از تابش‌فرابنفش($\mu w/cm^2$ ٢٨٨٧) تخریب گردید. پس از لقاح این اسپرم با تخمک‌های سالم، حالت دیپلوئیدی به تخم‌های لقاح‌یافته هاپلوئید با استفاده از شوک‌حرارتی($27\pm 0/5^{\circ}c$) به مدت ١٠ دقیقه برگردانده شد. شوک حرارتی در دو زمان ٣٠ و ٤٠ دقیقه پس از لقاح استفاده گردید. پرتو فرابنفش از یک دستگاه لامپ میکروب‌کش ٣٠ وات با حداکثر شدت در طول موج ٢٥٤ نانومتر، تامین شد. اسپرم قبل از پرتودهی در دو نوع محلول رقیق‌کننده به نسبت ١:٤ رقیق شد و پرتودهی در مدت زمان‌های ١، ٣، ٥، ٨ و ١٥ دقیقه انجام گرفت. برای مقایسه تاثیر تیمارهای مختلف سه گروه آزمایشی ماده‌زاد در قالب طرح آزمایشی کرت دوبار خردشده، هاپلوئید در قالب طرح آزمایشی کرت خردشده و شاهد در قالب طرح آزمایشی بلوک کامل تصادفی در نظر گرفته شد. در این تحقیق، رنگ طلایی ماهیان به عنوان نشانگر برای تشخیص ماده‌زادها به‌کار رفت. همچنین گسترش‌های کروموزومی تهیه‌شده از ماده‌زادها، دیپلوئید بودن آنها را تایید کرد. بیشترین عملکرد با توجه به درصد ایجاد ماده‌زایی و بقای نسبی ماده‌زادها از تیمارهای حاصل از ٨ دقیقه پرتودهی و زمان اعمال شوک حرارتی در ٣٠ دقیقه پس از لقاح به‌دست آمد، ولی تفاوتی بین اثر دو محلول رقیق‌کننده در تیمارها مشاهده نشد. میانگین ایجاد ماده‌زایی از سه تکرار و در تیمارهای مختلف از صفر تا ٦٠/٦١ درصد متغیر بود. با وجود این درتکرار دوم، نتایج ١٠٠درصد ماده‌زایی در تیمارهای حاصل از ٨ دقیقه پرتودهی مشاهده گردید.

واژه‌های کلیدی: ماده‌زایی، اسپرم، قزل‌آلای رنگین‌کمان، پرتو فرابنفش و ژنوم

١- تاریخ دریافت: ٧٩/٨/٢، تاریخ تصویب نهایی: ٨٠/٦/٢٦

٢- کلیه هزینه‌های مربوط به اجرای این تحقیق از محل اعتبارات طرح‌های پژوهشی اصلاح نژاد ماهیان پرورشی و ایجاد ماده‌زایی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مصوب شورای پژوهشی دانشگاه تهران تامین گردید

٣- استاد گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

٤- عضو هیات علمی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران

٥- کارشناس ارشد شیلات

مقدمه

تولید دودمان‌های خالص[۱] به‌دلایل مختلف همواره مورد توجه بوده است. ماهیان خالص در برنامه‌های اصلاح نژاد معمولا از طریق روش‌هایی مانند آمیزش‌های خویشاوندی و تنی در طی چند نسل به‌دست می‌آیند که مستلزم صرف هزینه و زمان نسبتا زیادی است. تانی گوچی[۲] (۱۹۹۲) تکرار بیست نسل آمیزش تنی را در ماهیان برای به‌دست آوردن یک دودمان خالص لازم می‌داند. این درحالی است که ماده‌زایی در ماهیان و سایر آبزیان مانند صدف‌ها، روشی سریع برای ایجاد همخونی و تولید دودمان‌های خالص است (۶، ۱۳ و ۱۴). این شیوه یکی از روش‌های دستکاری کروموزومی[۳] در ماهیان است که در اثر آن نتاج[۴] تولیدشده ژنوم خود را تنها از مادر و از طریق تخمک به ارث می‌برند و اسپرماتوزوئید از لحاظ ژنتیکی نقشی ندارد و فقط از نظر فیزیولوژیکی موجب تحریک تقسیمات سلولی در سلول جنین می‌گردد. در روش ماده‌زایی، ابتدا با استفاده از روش‌هایی مانند پرتودهی یا مواد شیمیایی جهش‌زا، ژنوم اسپرم را تخریب می‌کنند و به‌دنبال لقاح این اسپرم‌ها با تخمک‌های سالم، جنین‌های هاپلوئید ایجاد می‌شوند که قادر به ادامه حیات نیستند. بنابراین پس از لقاح با استفاده از شوک‌های محیطی مانند شوک فشار هیدرواستاتیک، شوک دمایی و شوک شیمیایی، حالت دیپلوئیدی به جنین‌های هاپلوئید برگردانده می‌شود.

ماده‌زایی علاوه بر استفاده در ایجاد خلوص ژنتیکی، در تهیه دودمان‌های کلونال و ایزوژنیک[۵] نیز به‌کار می‌رود (۱۴و۱۸). علاوه براین، تولید جمعیت‌های تمام ماده جهت پرورش، تعیین جنسیت، تهیه نقشه ژن نسبت به سانترومر و استفاده از آن در انتقال صفات افراد بهگزین شده به نتاج از اهمیت بالایی برخوردار است (۳).

هدف اصلی این تحقیق که برای اولین بار در شرایط ایران تجربه شد، تعیین شرایط بهینه جهت حذف ژنوم اسپرم، استفاده از شوک گرمایی و زمان مناسب آن برای برگرداندن حالت دیپلوئیدی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان به‌منظور ایجاد ماده‌زایی میوزی بود. به‌علاوه، برای اولین بار در آزمایش‌های ماده‌زایی، قابلیت استفاده از یک محلول جدید رقیق‌کننده در آزمایش ماده‌زایی به‌منظور حفظ خواص فیزیولوژیکی اسپرم در طی پرتودهی نیز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مولدین و شاخص تشخیص ماده‌زادها

به‌منظور تشخیص ماده‌زادها پس از اجرای تیمارهای ماده‌زایی، از شاخص الگوی رنگ در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان که تحت کنترل دو ژن است، استفاده شد (۸ و ۱۸). رابطه این دو ژن به‌صورت فعالیت ژنی‌افزایشی[۶] است و به ازای سه ژنوتیپ ممکن، سه فنوتیپ رنگ طبیعی، ابرش و طلایی ایجاد می‌کنند (۲). بنابراین تعداد ۲۷ قطعه مولد ماده به رنگ طلایی (ژنوتیپ $G'G'$) در آذرماه ۷۶ از موسسه پرورش قزل‌آلای یاسوج انتخاب و به موسسه ماهی‌سرای کرج، محل اجرای آزمایش‌ها انتقال داده شدند. مولدین نر نیز از رنگ طبیعی (ژنوتیپ GG) و از میان ذخیره مولدین موسسه ماهی سرای کرج انتخاب شدند.

پرتودهی و رقیق‌سازی اسپرم

در هر تکرار آزمایش، اسپرم از ۶-۵ قطعه مولد رنگ طبیعی اخذ و در مدت اجرای تکرار در کنار یخ نگهداری شد. به‌منظور تخریب ژنوم اسپرم از پرتو ماورای بنفش حاصل از یک لامپ میکروب‌کش[۷] (۳۰w) استفاده شد. شدت پرتو فرابنفش حاصل از

۱ - Homozygote line
۲ - Taniguchi
۳ - Chromosomal manipulation
۴ - Progeny
۵ - Clonal and Isogenic line
۶ - Additive gene action
۷ - Germicidal

لامپ، در سازمان انرژی اتمی ایران اندازه‌گیری گردید. در طول موج ۲۵۴ nm و در فاصله ۴۰cm از لامپ، شدت پرتو معادل $۲۸/۸۷\mu w/cm^2$ تعیین شد. با توجه به رابطه ارائه شده توسط گوری‌کزکو[1] و همکاران (۱۹۹۱)، شدت پرتودهی در فاصله 4cm از سطح اسپرم رقیق شده معادل $۲۸۸۷\mu w/cm^2$ تعیین گردید.

اسپرم در تمام تیمارها به نسبت ۱:۴ در دو محلول رقیق‌کننده، رقیق شد. محلول شماره ۱ (محلول بیلارد)[2]، محلولی است که در سال ۱۹۸۶ توسط کوروت[3] در سال ۱۹۸۶ در آزمایش ماده‌زایی به کار رفت و محلول شماره ۲ که برای اولین بار در آزمایش‌های ماده‌زایی در این تحقیق استفاده شد، محلول تغییرشکل‌یافته محلولی است که لان استینر[4] و همکاران در سال ۱۹۹۵ به‌منظور حفظ و انجماد اسپرم در چند گونه از آزادماهیان استفاده نمودند (جدول ۱). در هر تیمار ۱/۵cc اسپرم به ۶ سانتی‌مترمکعب رقیق‌کننده اضافه شد و در درون یک پتری دیش که بر روی بستری از یخ خردشده قرار داشت، ریخته شد. تیمارهای مختلف پرتودهی شامل مدت زمان‌های ۱، ۳، ۵، ۸ و ۱۵ دقیقه در هریک از محلول‌ها بود. در مدت پرتودهی مخلوط اسپرم رقیق‌شده توسط یک دستگاه همزن مغناطیسی (۶۰ دور در دقیقه) به‌هم زده شد.

لقاح و اعمال شوک حرارتی

تخمک در هر تکرار آزمایشی از ۷-۶ قطعه مولد طلایی اخذ و در طول انجام آزمایش تا زمان استفاده درون ظرفی درب‌دار در کنار یخ نگهداری شد. به‌منظور برگردانیدن حالت دیپلوئیدی به جنین‌های حاصل از لقاح اسپرم پرتودیده با تخمک سالم، از شوک حرارتی $۲۷\pm۰/۵^{\circ}c$ به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. این شوک توسط یک دستگاه حمام آب گرم تامین و در زمان‌های ۳۰ یا ۴۰ دقیقه پس از لقاح، مطابق با مرحله متافاز میوز دوم اعمال گردید (۳، ۹ و ۱۲). دمای آب انکوباتور قبل و بعد از شوک‌دهی۱۴/۵ درجه‌سانتی‌گراد بود. از هر ۷/۵cc مخلوط اسپرم پرتودیده، جهت لقاح سه دسته تخمک ۳۰ گرمی استفاده شد. دو دسته برای اعمال شوک حرارتی در ۳۰ و ۴۰ دقیقه پس از لقاح و یک دسته بدون اعمال شوک حرارتی به عنوان تیمار هاپلوئید در نظر گرفته شد.

طرح‌های آماری و تیمارهای مورد استفاده

سه گروه آزمایشی به‌منظور تشخیص تیمار بهینه جهت ایجاد ماده‌زایی در نظر گرفته شد. گروه اول آزمایشی ماده‌زاد (لقاح اسپرم پرتودیده از مولد رنگ طبیعی با تخمک سالم از مولد رنگ طلایی و اعمال شوک حرارتی پس از لقاح)، در قالب طرح آماری کرت دوبار خردشده[5]، که در آن کرت اصلی محلول‌های رقیق‌کننده اسپرم در دو سطح و کرت فرعی مدت‌زمان‌های پرتودهی اسپرم در پنج سطح در نظر گرفته شد. گروه دوم گروه آزمایشی هاپلوئید (لقاح اسپرم پرتودیده با تخمک سالم بدون اعمال شوک حرارتی) در قالب طرح آماری کرت خرد شده، که در آن کرت اصلی محلول‌های رقیق‌کننده اسپرم در دو سطح و کرت فرعی مدت زمان‌های پرتودهی اسپرم در پنج سطح در نظر گرفته شد. گروه سوم، گروه آزمایشی شاهد به‌منظور مقایسه اثر محلول‌های رقیق‌کننده اسپرم در بقا و مقایسه آن با شرایط لقاح بدون رقیق‌سازی در قالب طرح بلوک کامل تصادفی به اجرا درآمد. کلیه تیمارها در هر سه گروه آزمایشی در سه تکرار انجام گرفت. نتایج تیمارها در هر گروه آزمایشی براساس روش تجزیه واریانس با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C و مقایسه میانگین‌ها با روش آزمون جدید چنددامنه‌ای دانکن تا سطح ۵ درصد صورت پذیرفت (۴).

---

[1] - Goryczko
[2] - Billard
[3] - Chourrout
[4] - Lahnsteiner
[5] - Split-Split plot

تهیه گسترش کروموزومی

پس از ۲۱ هفته از زمان تخم‌گشایی، به‌منظور تایید تاثیر تیمارهای مختلف در ایجاد ماده‌زایی، از بچه‌ماهیان رنگ طلایی و ابرش در گروه آزمایشی ماده‌زاد، گسترش کروموزومی تهیه گردید. از هر دسته تعداد ۵ عدد بچه‌ماهی موردبررسی قرار گرفت.

جدول ۱- ترکیب و اجزای محلول‌های رقیق‌کننده اسپرم

محلول شماره ۱		محلول شماره ۲	
غلظت(g/Lit)	ترکیب شیمیایی	غلظت($g/200cm^3$)	ترکیب شیمیایی
۵/۵۲	NaCl	۱/۲۰۴	NaCl
۲/۰۰	KCl	۰/۵۹۶	KCl
۲/۴۲	Tris	۰/۰۳۹	$MgSO_4$
۳/۷۵	Glycin	۰/۲۲	$CaCl_2$
		۰/۹۵۳	Hepes*
۷/۶	pH	۷/۱	pH

*** N-(2-hydroxyethyl)-Piperazine-N-2-ethan-Sulfonic acid**

تهیه گسترش براساس روش مستقیم و پس از تزریق صفاقی محلول ۰/۲٪ کلشی‌سین[1] از اندام‌های کلیه و قسمت قدامی کلیه، آبشش و کبد تهیه و تعداد کروموزم در هر گسترش تعیین شد (۳).

نتایج

بررسی نتایج گروه آزمایشی ماده‌زاد

میزان موفقیت در ایجاد ماده‌زایی براساس درصد لاروهای طلایی در هر واحد آزمایشی گروه ماده‌زاد و به‌صورت میانگین از سه تکرار تعیین گردید. وجود لاروها با فنوتیپ طلایی دلیل بر عدم انتقال ژنوم پدری و ماده‌زادبودن لاروهاست، زیرا انتقال ژنوم پدری موجب ایجاد فنوتیپ ابرش ($G'G'$) می‌گردد. در این گروه آزمایشی، علاوه بر بررسی درصد ایجاد ماده‌زایی در تیمارهای مختلف، مقدار بقای نسبی ماده‌زادها (بقای هر واحد آزمایشی نسبت به شاهد) و درصد لارو ناقص ماده‌زاد نیز مورد بررسی قرار گرفت. جدول ۲ خلاصه نتایج تجزیه واریانس گروه آزمایشی ماده‌زاد را نشان می‌دهد. در هر سه پارامتر اندازه‌گیری شده، اثر ساده (۴) مدت زمان‌های پرتودهی اسپرم، و نیز اثر ساده زمان اعمال شوک حرارتی پس از لقاح در بقای نسبی ماده‌زادها تفاوت معنی‌داری را بین تیمارها نشان داده‌اند. شکل‌های ۱، ۲ و ۳ مقایسه میانگین‌های اثر ساده مدت زمان‌های متفاوت پرتودهی اسپرم را به ترتیب در ایجاد ماده‌زایی، بقای نسبی ماده‌زادها و درصد لارو ناقص ماده‌زاد نشان می‌دهند. دامنه میانگین درصد ایجاد ماده‌زایی در این مقایسه، از ۰/۲۹۶درصد در تیمارهای حاصل از یک دقیقه پرتودهی تا ۵۶/۷۹۸درصد در تیمارهای حاصل از ۸ دقیقه پرتودهی متفاوت است (شکل ۱). همچنین دامنه میانگین‌بقای نسبی‌ماده‌زادها در این‌مقایسه‌از ۰/۱۴۹درصد در تیمارهای حاصل از یک دقیقه‌پرتودهی تا ۹/۳۳۶درصد در تیمارهای حاصل از ۸ دقیقه پرتودهی متغیر است (شکل۲). در این مقایسه، میانگین‌های درصدلارو ناقص ماده‌زاد در دو گروه قابل بررسی است (شکل ۳). گروه اول که کمترین مقدار لارو ناقص ماده‌زاد را دارد، مربوط به تیمارهای حاصل از یک دقیقه پرتودهی و گروه دوم مربوط به تیمارهای حاصل از ۳، ۵، ۸ و ۱۵ دقیقه پرتودهی است. در گروه اخیر، اگرچه تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد بین تیمارها مشاهده نمی‌شود، ولی همواره کمترین مقدار لارو ناقص

[1] - Colchicine

ماده‌زاد مربوط به تیمار حاصل از ٨ دقیقه پرتودهی است. از طرف دیگر، مقایسه میانگین آثار متقابل سه عامل محلول‌های رقیق کننده اسپرم، زمان‌های اعمال شوک حرارتی پس از لقاح و مدت زمان‌های پرتودهی اسپرم، تفاوت‌های معنی‌داری را بین تیمارهای مختلف در سطح ٥ درصد بر پارامترهای اندازه‌گیری‌شده نشان داده است (جدول ٣). بیشترین میانگین درصد ایجاد ماده‌زایی (٦٠/٦١٪) از سه تکرار مربوط به تیمار محلول شماره ٢، اعمال شوک حرارتی در ٤٠ دقیقه پس از لقاح و مدت زمان پرتودهی ٨ دقیقه است. این در حالی است که این مقدار، تفاوت معنی‌داری در سطح ٥ درصد با سایر تیمارهای حاصل از ٨ دقیقه پرتودهی و تیمارهای حاصل از ١٥ دقیقه پرتودهی نشان نداده، ولی نسبت به سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری را نشان داده است (جدول ٣). در عین حال، نتایج تکرار دوم حاصل از تیمار ٨ دقیقه پرتودهی با محلول شماره یک و اعمال شوک حرارتی در ٣٠ دقیقه پس از لقاح و همچنین تیمار ٨ دقیقه پرتودهی با محلول شماره ٢ و اعمال شوک حرارتی در ٣٠ و ٤٠ دقیقه پس از لقاح، نتایج ١٠٠درصد ماده‌زایی دربرداشته است.

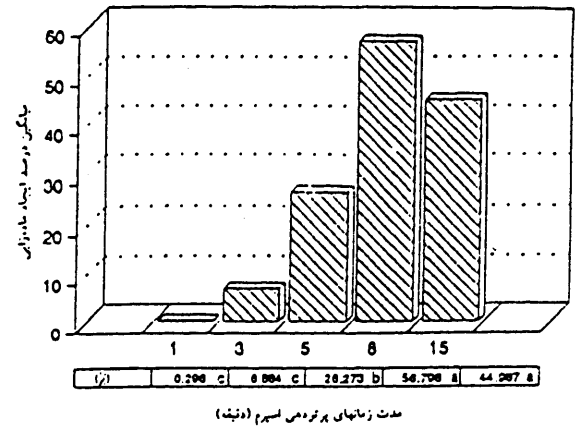
بالاترین میانگین درصد بقای نسبی نیز از سه تکرار (١٥/٢٥٣٪) مربوط به تیمار ١٥ دقیقه پرتودهی، اعمال شوک در ٣٠ دقیقه پس از لقاح و محلول رقیق‌کننده شماره یک است. با وجود این، این تیمار تفاوت معنی‌داری با تیمار ٨ دقیقه پرتودهی، اعمال شوک در ٣٠ دقیقه پس از لقاح و محلول رقیق‌کننده شماره یک ندارد.

در مقایسه آثار متقابل سه عامل در میانگین درصد لارو ناقص ماده‌زاد نیز بجز تیمارهای مربوط به ١ دقیقه پرتودهی که اصولا تاثیری در ایجاد ماده‌زایی نداشته‌اند، کمترین میانگین درصد لارو ناقص مربوط به تیمار ٨ دقیقه پرتودهی، اعمال شوک حرارتی در ٤٠ دقیقه پس از لقاح و محلول شماره ٢ است. اگرچه این تیمار با سایر تیمارهای ٨ دقیقه‌ای تفاوت معنی‌داری نداشته است.

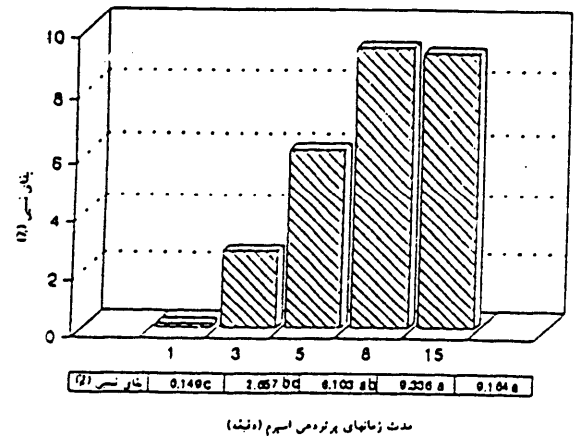
جدول ٢- خلاصه نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف پرتودهی، محلول رقیق‌کننده و شوک حرارتی در ایجاد ماده‌زایی در گروه آزمایشی ماده‌زاد

منابع تغییرات	درجه‌آزادی	میانگین مربعات			
		درصد ایجادماده‌زایی	بقای نسبی ماده‌زاد	درصدلاروناقص‌ماده‌زاد
تکرار	٢	٢٣٨٤/٧٨٣*	٣٨٤/٠٧٧ ns	٤١٠/١٥٤ ns
محلول‌های‌رقیق‌کننده‌اسپرم	١	٣٦/٤٥٧ ns	١٠٧/٧٣٦ ns	٦٨٦/١٤٠ ns
اشتباه کرت اصلی	٢	٦١/٢٧	٧٣/٥٨٥	٣٧/٦٨٥
زمان‌های اعمال شوک حرارتی پس از لقاح	١	٣٥/١٢٩ ns	١٥٦/٧٥٢*	٤٩٤/٤٤٤ ns
محلول رقیق‌کننده اسپرم × شوک حرارتی	١	١/٣٨٩ ns	٧/٨٠٥ ns	٢٩٥/٣٤٩ ns
اشتباه کرت فرعی	٤	٤١/٨٩٥	١٧/٣٤٦	٢٢٧/٥١٣
مدت زمان‌های پرتودهی	٤	٥١٥٩/٨٩٣**	٤٦٧/١٧٩**	١١٩٠/٦٨٢**
محلول‌رقیق‌کننده‌اسپرم× مدت‌زمان‌پرتودهی	٤	٥٩/٣١٧ ns	٥٠/١١٤ ns	٤٠٧/١٠٩ ns
شوک حرارتی×مدت‌زمان پرتودهی	٤	٨٦/٨٥٣ ns	٣٤/٤٣٩ ns	٢٢٤/٠٠٩ ns
محلول‌رقیق‌کننده‌اسپرم×شوک‌حرارتی×مدت‌زمان پرتودهی	٤	٧٢/٨٦٣ ns	٩/٢٩٤ ns	٣٨٢/٧٢٣ ns
اشتباه کرت فرعی فرعی	٣٢	١٧٤/٥١٦	٢٤/٩٩٧	٢١٧/٠٤١

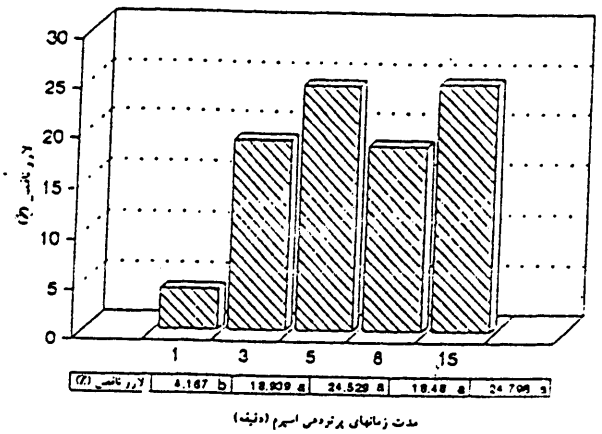
ns ، تفاوت معنی‌دارنیست *تفاوت معنی‌دار(P<٠/٠٥) **تفاوت معنی‌دار (P<٠/٠١)



شکل ۱- مقایسه میانگین‌های اثر مدت زمان‌های پرتودهی در تیمارهای مختلف جهت ایجاد ماده‌زایی
(میانگین‌هایی که حروف مشترک دارند، تفاوت معنی‌داری در سطح ٥درصد ندارند)



شکل ۲- میانگین‌های بقای نسبی ماده‌زادها در تیمارهای حاصل از پنج مدت زمان پرتودهی
(میانگین‌هایی که حروف مشترک دارند، تفاوت معنی‌داری در سطح ٥ درصد ندارند)



شکل ۳- میانگین‌های درصد لاروهای ناقص در تیمارهای حاصل از پنج مدت زمان پرتودهی
(میانگین‌هایی که حروف مشترک دارند، تفاوت معنی‌داری در سطح ٥ درصد ندارند)

جدول ٣-خلاصه نتایج مقایسه میانگین‌های اثر مجموع تیمارهای اعمال شده جهت ایجاد ماده‌زایی درگروه آزمایشی ماده‌زاد*

محلول‌های رقیق‌کننده اسپرم	زمان‌های اعمال شوک حرارتی‌پس‌از لقاح(دقیقه)	مدت زمان پرتودهی (دقیقه)	ایجاد ماده‌زایی (٪)	بقای نسبی (٪)	لارو ناقص ماده‌زاد (٪)
		١	٠/٠٠ E	٠/٠٠ C	٠/٠٠ B
		٣	٧/٦٦٧ CDE	٤/١٠٣ BC	١٦/٦٧ B
	٣٠	٥	٣٠/٧٠٣ ABCDE	٨/٤٠٠ ABC	١٨/٠٤ B
		٨	٥٧/٩٤٠ A	١٥/١٥٦ A	١٨/٠٣ B
		١٥	٣٩/٧٢٠ ABC	١٥/٢٥٣ A	٥٥/٧٧ B
محلول‌رقیق‌کننده‌شماره١		١	٠/٠٠ E	٠/٠٠ C	٠/٠٠ B
		٣	٧/٤١٠ CDE	٣/١٦٧ BC	٣١/٣١ AB
	٤٠	٥	٢٩/٩٠٣ ABCDE	٨/٥٦٧ ABC	٢٦/٢٨ AB
		٨	٤٩/٣٢٠ AB	٣/٤٥١ BC	٢٩/٥٥ AB
		١٥	٤٢/٧٠٧ AB	١٢/٨٠٧ BC	١٧/١٠ B
		١	١/١٨٤ E	٠/٥٩٧ C	١٦/٦٧ B
		٣	٨/٠٨٧ CDE	٢/٣١٧ BC	٢٧/٧٨A B
	٣٠	٥	٢٩/٠٨٣ ABCDE	٤/٧٣٣ ABC	٢٣/٢٤ B
		٨	٥٩/٣٢٠ A	١٢/٨٤٦ AB	٢٠/٦٢ B
		١٥	٣٧/٦٩٣ABCD	٥/٣٥٦ ABC	١٦/٤٠ B
محلول‌رقیق‌کننده‌شماره٢		١	٠/٠٠E	٠/٠٠ C	٠/٠٠ B
		٣	٤/٣٧٤ DE	١/٠٤٠ C	٠/٠٠ B
	٤٠	٥	١٥/٤٠٣ BCDE	٢/٧١٠ BC	٣٠/٥٦ AB
		٨	٦٠/٦١٠A	٥/٨٩١ ABC	٥/٧٠٩ B
		١٥	٥٩/٨٣٠A	٣/٢٤١ BC	٩/٩١٤ B

* میانگین‌های هر ستون که حروف مشترک ندارند، اختلافشان معنی‌دار است ($p<0/05$)

بررسی نتایج گروه آزمایشی هاپلوئید

در صورت تاثیر پرتو ماورای بنفش درحذف ژنوم اسپرم، نتایج گروه آزمایشی هاپلوئید که در آن شوک حرارتی به‌منظور ابقای دومین جسم قطبی استفاده نشده بود، قبل یا بعد از تخم‌گشایی بواسطه هاپلوئید بودنشان از بین می‌رفتند (۶ و ۱۴). بنابراین با توجه به بقای جنین‌ها در تیمارهای مختلف این گروه آزمایشی، تاثیر پرتو ماورای بنفش در حذف ژنوم اسپرم مشخص می‌گردد. جدول ۴ خلاصه نتایج تجزیه واریانس بقای جنین‌ها را در تیمارهای مختلف نشان می‌دهد. نتایج بیانگر آن است که اثر ساده مدت زمان‌های پرتودهی اسپرم در بقای جنین‌ها تفاوت بسیار معنی‌داری دارد، در حالیکه محلول‌های رقیق‌کننده اسپرم تفاوت معنی‌داری را نشان نداده‌اند.

مقایسه میانگین آثار ساده پنج مدت زمان پرتودهی از سه تکرار (α=۰/۰۵) در بقای این گروه آزمایشی (شکل ۴)، نشان می‌دهد که تیمارهای حاصل از مدت زمان ۸ دقیقه پرتودهی با بقای ۲/۷۹۵درصد کمترین مقدار بقا را داشته‌اند. اگرچه این مقدار، تفاوت معنی‌داری با تیمارهای حاصل از ۱۵ دقیقه پرتودهی ندارد. این در حالی است که در تکرار دوم آزمایش در تیمارهای ۸ دقیقه پرتودهی، تمامی جنین‌ها قبل از تخم‌گشایی یا در فاصله کوتاهی پس از تخم‌گشایی از بین رفته بودند.

جدول ۴- خلاصه نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای پرتودهی و محلول‌های رقیق‌کننده در بقای گروه آزمایشی هاپلوئید

منابع تغییرات	درجه‌آزادی	میانگین‌مربعات‌درصدبقا
تکرار	۲	٤۳٤/۳۷٥ ns
محلول‌های رقیق‌کننده اسپرم	۱	۱٦٥/٤۸۷ ns
اشتباه کرت اصلی	۲	۲۷/۰٦
مدت‌زمان‌های پرتودهی اسپرم	٤	٦۹۸/٤۱۳**
محلول‌های رقیق‌کننده×مدت‌زمان‌های پرتودهی	٤	۳۱/۱٤۹ ns
اشتباه کرت فرعی	۱٦	٤٥/۹٥۸

ns، تفاوت‌معنی‌دارنیست *تفاوت معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) **تفاوت معنی‌دار ($p<۰/۰۱$)

بررسی نتایج گروه آزمایشی شاهد

این گروه آزمایشی که تمامی بچه‌ماهیان آن به رنگ ابرش ($G'G$) بودند، به‌منظور بررسی تاثیر محلول‌های رقیق‌کننده اسپرم و شرایط لقاح بدون رقیق‌کننده اسپرم، درحفظ خواص فیزیولوژیکی اسپرم با توجه به مقدار بقای حاصل از هر تیمار طرح‌ریزی شده بود. جدول ۵ خلاصه نتایج تجزیه واریانس این گروه آزمایشی را نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، جدول نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین شرایط لقاح از لحاظ رقیق‌سازی اسپرم در بقای لاروها وجود ندارد. مقایسه میانگین‌های درصد بقا و درصد لارو ناقص از سه تکرار آزمایشی نیز تفاوت معنی‌داری را نشان نداده است ($p<۰/۰۵$). با وجود این، بقا در تیمار محلول رقیق‌کننده شماره ۱ بیشتر از سایر تیمارها بوده است (شکل ۵).

جدول ۵- خلاصه نتایج واریانس اثر شرایط لقاح از نظر رقیق‌سازی اسپرم در بقا و درصد لاروهای ناقص ایجادشده

منابع‌تغییرات	درجه‌آزادی	میانگین مربعات	
		درصدبقا	درصد لاروناقص
تکرار	۲	٦۲/۷۸۲n.s	۳۹/۰۱۳n.s
شرایط لقاح	۲	۲۰۷/۲٤۳n.s	٤/٦٤٦n.s
اشتباه	٤	٥۸/۱۸۲	۹/٥۲٦

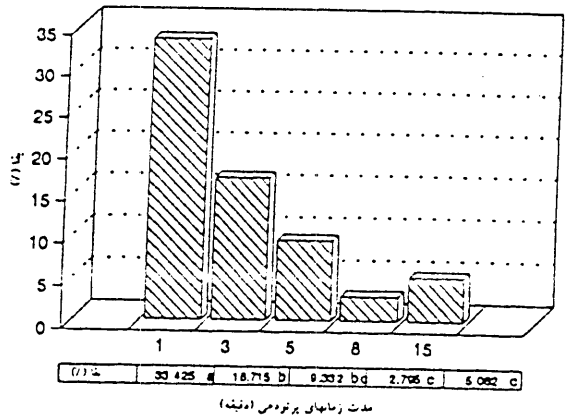
ns، تفاوت معنی‌دار نیست

نتایج حاصل از گسترش‌های کروموزومی

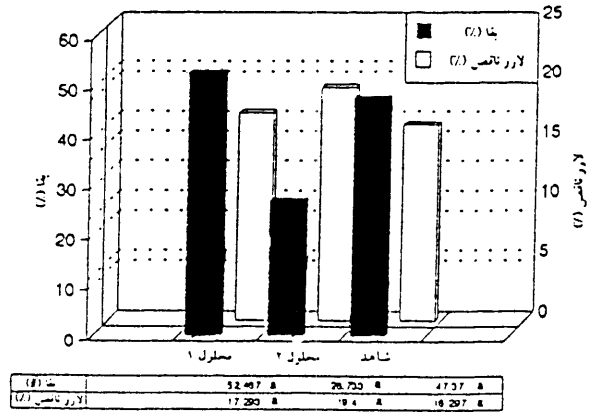
نتایج شمارشی گسترش‌های کروموزومی از بچه‌ماهیان

گروه آزمایشی ماده‌زاد، دیپلوئید بودن آنها را تایید کرد. تعداد کروموزوم در هر گسترش در ماهیان طلایی ۶۰-۵۸ عدد تعیین شد. این در حالی است که گسترش‌های تهیه‌شده از بچه‌ماهیان فنوتیپ ابرش در همین گروه آزمایشی، دلالت بر تریپلوئید بودن آنها داشت. در این ماهیان تعدادکروموزوم درهر گسترش ۹۰-۷۸ عدد تعیین گردید. بچه‌ماهیان ابرش مربوط به تیمارهایی از گروه آزمایشی ماده‌زاد بودند که تاثیر پرتو ماورابنفش در حذف ژنوم اسپرم کامل نبوده است. مقایسه درصد لاروهای ناقص در دو گروه آزمایشی ماده‌زاد و شاهد به‌منظور بررسی احتمال تاثیر سوء تیمارهای حاصل از عوامل پرتودهی، شوک حرارتی و محلول‌های رقیق‌کننده در ایجاد لاروهای ناقص ماده‌زاد، مقایسه‌ای بین میانگین‌های درصد لارو ناقص ماده‌زاد در گروه آزمایشی ماده‌زاد با میانگین درصد لارو ناقص گروه شاهد با استفاده از آزمون t انجام گرفت. لاروهای ناقص در هر دو گروه آزمایشی به شکل‌های انحراف ستون مهره‌ها به حالت عمودی

یا افقی، کوتاهی سرپوش برانشی، کوتاه‌بودن ناحیه ساقه دمی، نداشتن چشم، کشیدگی فک‌ها و دوقلوهای بهم چسبیده، دیده می‌شدند. نتایج نشان داد که درسطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری بین این دو میانگین وجود ندارد. ارزش t با درجه آزادی ۶۱ در این مقایسه معادل ۰/۲۷۶۹- تعیین شد. همچنین مقایسه‌های انفرادی بین میانگین لاروهای ناقص ماده‌زاد در هر یک از تیمارهای ۳، ۵، ۸ و ۱۵ دقیقه تفاوت معنی‌داری با میانگین درصد لارو ناقص در شاهد نشان نداد. تنها میانگین درصد لارو ناقص ماده‌زاد در تیمارهای حاصل از یک دقیقه پرتودهی به‌طور معنی‌داری کمتر از میانگین لارو ناقص در گروه شاهد بود ($p<0/05$). از طرف دیگر، تجزیه رگرسیون بین متغیر مستقل درصد ایجاد ماده‌زایی و متغیر وابسته درصد لاروهای ناقص ماده‌زاد در هر تیمار نشان داد که دو متغیر همبستگی معنی‌داری در سطوح آماری مورد قبول ندارند ($r = 0/028$).



شکل ٤- میانگین بقا در تیمارهای حاصل از پنج مدت زمان پرتودهی در گروه آزمایشی هاپلوئید
(میانگین‌هایی که حروف مشترک دارند، در سطح ٥ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند)



شکل ٥- میانگین درصد بقا و درصد لاروهای ناقص در تیمارهای حاصل از شرایط لقاح از نظر محلول‌های رقیق‌کننده
(میانگین‌هایی که حروف مشترک دارند، تفاوت معنی‌داری در سطح ٥ درصد ندارند)

بحث و نتیجه‌گیری

ایجاد ماده‌زایی و بقای نسبی ماده‌زادها

مجموع نتایج حاصل از تیمارهای مختلف نشان دادکه با توجه به توارث فنوتیپ رنگ، بقا در گروه هاپلوئید و گسترش‌های کروموزومی، گستره‌ای از ماده‌زایی ایجاد شده است. از مجموعه عوامل مورد استفاده جهت ایجاد ماده‌زایی، اثر دو محلول رقیق‌کننده اسپرم تفاوت معنی‌داری را در نتایج ماده‌زایی و بقای نسبی آنها نشان نداد. این مسئله در نتایج گروه شاهد نیز مشاهده شد. اصولا در آزمایش ماده‌زایی با استفاده از پرتو ماورای‌بنفش محلول رقیق‌کننده، در حفظ خواص فیزیولوژیکی اسپرم در طی پرتودهی و تسهیل نفوذ پرتو در اسپرم، نقش دارد. عدم اختلاف دو محلول نشان می‌دهد که شرایط رقیق‌سازی اسپرم (نسبت رقت، ضخامت لایه اسپرم و به‌هم زدن مخلوط)، می‌تواند نقش موثرتری از اجزای آنها داشته باشد. شرایط رقیق‌سازی در کارهای انجام‌شده توسط محققان مختلف، متفاوت است . گوری کزکو (۱۹۹۱) از رقت‌های ۱:۱۰، ۱:۲۰ و ۱:۴۰ مایع منی قزل‌آلا جهت رقیق‌سازی اسپرم استفاده کرد و بهترین عملکرد را از رقت ۱:۴۰ با ضخامت ۰/۹۵ سانتی‌متر به‌دست آورد. در حالی که کوروت (۱۹۸۶a) از رقت ۱:۴ محلول بیلارد با ضخامتی حدود ۰/۱ سانتی‌متر استفاده کرده است. این در حالی است که در این تحقیق ضخامت لایه اسپرم رقیق‌شده حدود ۰/۲ سانتی‌متر بود. با وجود این، در این بررسی‌ها اشاره‌ای به میزان تاثیر محلول رقیق‌کننده در موفقیت ماده‌زایی نشده است. موثر بودن اعمال شوک حرارتی در ابقای دومین جسم قطبی، با توجه به نتایج گسترش کروموزومی ماده‌زادها و هاپلوئید بودن جنین‌ها در گروه هاپلوئید تایید می‌شود. به‌علاوه وجود بچه‌ماهیان رنگ ابرش تریپلوئید در گروه ماده‌زاد نیز موثر بودن شوک حرارتی را در بقای دومین جسم قطبی نشان می‌دهد. نتایج به‌دست آمده از زمان‌های اعمال شوک حرارتی عدم اختلاف این دو زمان را در نتایج ماده‌زایی نشان داد. در حالی که در بقای نسبی ماده‌زادها این دو زمان تفاوت معنی‌داری داشتند. عوامل مختلفی مانند مدت زمان اعمال شوک حرارتی، دمای آب انکوباتور قبل از اعمال شوک، و زمان اعمال شوک در میزان موفقیت دیپلوئید شدن نقش دارند (۳). از طرف دیگر، برگرداندن دیپلوئیدی براساس ابقای دومین جسم قطبی در دو مرحله امکان‌پذیر است: اول با جلوگیری از وقوع مرحله آنافاز تقسیم هسته‌ای با شکستن دوک تقسیم متافازی (۹، ۱۲ و ۱۳)، و دوم پس از شکل گرفتن دومین جسم قطبی با اعمال شوک، جذب جسم قطبی توسط اووپلاسم (۹). به‌علت تدریجی بودن این مراحل، چنین استنباط می‌شود که اعمال شوک در یک دامنه زمانی امکان‌پذیر است. موثر بودن دامنه زمانی استفاده‌شده در این تحقیق، با نتایج پوردوم[۱] و همکاران (۱۹۸۵) و پالتی[۲] و همکاران (۱۹۹۷) در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان همخوانی دارد. علاوه بر این، برخی گزارش‌های دیگر، دامنه زمانی کمتری نسبت به آنچه در این تحقیق بیان شد، بیان داشته‌اند (۱۴و ۱۸). در اکثر گزارش‌ها، دمای آب انکورباتور قبل و بعد از شوک حرارتی ۱۰ درجه‌سانتی‌گراد گزارش شده، حال آنکه در این‌تحقیق دمای آب انکوباتور۱۴/۵درجه سانتی‌گراد بوده است. با وجود این تفاوتی بین نتایج این تحقیق با گزارش‌های مذکور مشاهده نمی‌شود. پالتی و همکاران (۱۹۹۷) بیان می‌دارند که دمای آب انکوباتور قبل از اعمال شوک حرارتی در دامنه ۱۴/۶-۸/۸ درجه‌سانتی‌گراد تاثیری در زمان اعمال شوک حرارتی جهت ابقای دومین جسم قطبی در قزل‌آلای رنگین‌کمان ندارد. از مجموع مطالب چنین برمی‌آید که در اعمال شوک حرارتی برای ابقای دومین جسم قطبی، افزایش برخی عوامل مانند درجه حرارت شوک، موجب کاهش دامنه استفاده از سایر عوامل مانند زمان اعمال شوک

---

۱ -Purdom
۲ - Palti

می‌گردد. از طرف دیگر، موثرتر بودن زمان اعمال شوک حرارتی در ۳۰ دقیقه پس از لقاح در این تحقیق نشان داد که سلول تخم در این زمان حساسیت کمتری به آسیب‌های ناشی از اعمال شوک حرارت دارد.

از پنج مدت زمان پرتودهی اسپرم، مدت‌زمان‌های ۸ و ۱۵ دقیقه پرتودهی بیشترین تاثیر را در حذف ژنوم اسپرم داشته‌اند. این یافته‌ها با نتایج به‌دست آمده توسط تامسون و اسکات[1] (۱۹۸۴) و همچنین نتایج گوری کزکو و همکاران (۱۹۹۱) در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان همخوانی دارد. در عین حال، کویلت[2] و همکاران (۱۹۹۱) مدت‌زمان‌های کمتری را مناسب تشخیص داده‌اند. علت این اختلاف را می‌توان در تفاوت شرایط پرتودهی از قبیل نسبت رقت و شدت تابش بررسی کرد. کوروت (۱۹۸۶a) بهترین مدت‌زمان پرتودهی در قزل‌آلای رنگین‌کمان را کمتر از مدت زمان فوق بیان نموده است. این در حالی است که نسبت رقت استفاده‌شده توسط وی بسیار بیشتر و شدت پرتو ماورای‌بنفش به‌کارفته نیز چندین برابر شرایط استفاده‌شده در این تحقیق بوده است.

نتایج تاثیر مدت زمان‌های پرتودهی اسپرم نشان می‌دهد که درصد ایجاد ماده‌زایی و بقای نسبی ماده‌زادها با افزایش مدت‌زمان‌های پرتودهی افزایش می‌یابد و در تیمارهای ۸ دقیقه پرتودهی به حداکثر می‌رسند و بعد در تیمارهای ۱۵ دقیقه پرتودهی مجددا کاهش پیدا می‌کنند (شکل‌های ۱ و ۲). این روند افزایش و کاهش که در بقای گروه هاپلوئید نیز مشاهده می‌شود (شکل ۴)، در واقع فاز دوم منحنی هرتوینگ است که در سال ۱۹۹۳ توسط دان و آتالیون[3] توضیح داده شده است. پرتو ماورای‌بنفش، به‌واسطه تشکیل دایمرهای پریمیدینی در رشته DNA موجب تخریب ژنوم اسپرم می‌گردد. با افزایش مدت زمان‌های پرتودهی تشکیل دایمرهای پیریمیدینی در طول زنجیره DNA افزایش می‌یابد و در ۸ دقیقه پرتودهی به حداکثر می‌رسد. با افزایش مدت‌زمان پرتودهی، پرتو ماورای‌بنفش اثر سوئی بر توانایی اسپرماتوزوئید در تحرک می‌گذارد، به‌طوری‌که بقای نسبی و درصد ایجاد ماده‌زایی مجددا کاهش می‌یابد. اگرچه این کاهش، تفاوت معنی‌داری را نشان نداده است. حداکثر درصد ایجاد ماده‌زایی از میانگین سه تکرار در این تحقیق که معادل ۶۰/۶۱ درصد می‌باشد، از نتایج به‌دست آمده توسط گوری کزکو و همکاران (۱۹۹۱) و کویلت و همکاران (۱۹۹۱) کمتر است. آنها در گزارش‌های خود ۱۰۰درصد ماده‌زایی را در قزل‌آلای رنگین‌کمان بیان داشته‌اند. نکته قابل تامل در این مقایسه، این است که نتایج آنها براساس یک‌بار یا حداکثر دوبار آزمایش است. در این صورت، چنانچه فقط نتایج تکرار دوم در این تحقیق با نتایج آنها مقایسه شود، نتایج کاملا همخوانی دارد. عدم گرم کردن لامپ در تکرار اول و تاثیر نوسان برق بر لامپ در تکرار سوم، موجب گردید که نتایج در این دو تکرار کمتر از ۱۰۰درصد در تیمار بهینه ۸ دقیقه پرتودهی باشد. از طرف دیگر، مقایسه بقای نسبی ماده‌زادها در تیمارهای ۸ دقیقه پرتودهی با نتایج گوری کزکو و همکاران (۱۹۹۱) همخوانی دارد.

لارو ناقص ماده‌زاد

مجموع مقایسه‌های به‌عمل آمده بین میانگین‌های لارو ناقص ماده‌زاد و لارو ناقص در گروه شاهد، نشان می‌دهد که تیمارهای استفاده‌شده جهت ایجاد ماده‌زایی، تاثیری در به وجود آوردن لاروهای ناقص و بدشکل ندارند، بلکه عوامل دیگر مانند عوارض ژنتیکی یا عوامل محیطی و مواد ضدعفونی‌کننده می‌توانند در این مورد نقش داشته باشند. از سوی دیگر، با قبول اینکه برخی ژن‌های نامطلوب در یک جمعیت دارای رابطه غالبیت ناقص بوده و در حالت ناخالص موجب بروز حالات غیرطبیعی و در حالت

[1] - Thompson & Scott
[2] - Quillet
[3] - Don & Avtalion

خالص موجب مرگ می‌گردند، به‌نظر می‌رسد که با توجه به افزایش درصد ایجاد ماده‌زایی و در نتیجه بالارفتن خلوص ژنتیکی در جمعیت‌های حاصل از تیمارهای ۸ دقیقه پرتودهی، ژن‌های نامطلوب در این جمعیت‌ها بیشتر حذف شده‌اند. اگرچه از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای حاصل از ۸ دقیقه پرتودهی با سایر تیمارهای پرتودهی مشاهده نشد ($p<۰/۰۵$)، ولی کمتر بودن میانگین درصد لارو ناقص در این گروه تیمارها می‌تواند دلیل بر این امر باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از کلیه کارکنان محترم موسسه ماهی‌سرای کرج بخصوص مدیریت محترم موسسه جناب آقای علی باقرآل و کارشناس ارشد پرورش ماهی جناب آقای طومار نجف‌زاده که با در اختیار قرار دادن امکانات کارگاهی و ماهیان مورد آزمایش در به ثمر رسیدن این پژوهش کمک‌های شایان توجهی بعمل آورده‌اند صمیمانه سپاسگزاری می‌شود. همچنین از کارشناسان و همکاران محترم مجتمع پرورش و تکثیر ماهیان سردآبی یاسوج بخاطر همکاری در این طرح، تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

۱- آذری تاکامی، قباد، فرهاد امینی و حمید فرحمند، ۱۳۷۵. بررسی ایجاد تغییر جنسیت و عقیمی در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به‌وسیله هورمون ۱۷-آلفا متیل تستوسترون، مجله منابع طبیعی ایران (۴۹): ۳-۱۶.

۲- امینی، فرهاد، ۱۳۷۴. مبانی ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان، انتشارات معاونت طرح و برنامه شرکت شیلات، شماره ۲۸۵، ۳۴۴ ص.

۳- بهرامی کمانگر، برزان، ۱۳۷۷. ایجاد ماده‌زایی در ماهی قزل‌آلای رنگین، پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۱۶۳ ص.

۴- یزدی صمدی، بهمن، عبدالمجید رضائی و مصطفی ولی‌زاده، ۱۳۷۷. طرح‌های آماری در علوم کشاورزی، انتشارات دانشگاه تهران، ۷۶۴ ص.

5-Churrout, D., 1986a. Techniques of chromosome manipulation in Rainbow trout: a new evaluation with karyology. Theor. Appl. Genet. 72, 627-632.

6-Chourrout, D., 1986b. Use of grayling sperm (*Thymallus thymallus*) as a marker for the production of gynogenesis Rainbow trout. Theor. Appl Genet. 72,633-636.

7-Don, J. & R.R. Avtalion, 1993. Ultraviolet irradiation of tilapia spermatozoa and Hertwing effect, electron microscopic analysis. J.Fish Biol. 42, 1-14.

8-Goryczko, K., S. Dobosz, T.Makinen & L.Tomasik, 1991. Uv-irradiation of Rainbow trout sperm as a practical method for induced gynogenesis. J. Appl. Ichtyol. 7; 136-146.

9-Komen,J., J.Duynhouwer, C.J.J. Richter & E.A. Huisman, 1988. Gynogenesis in common carp, I.Effectes of genetic manipulation of sexual products and incubation conditions of eggs. Aquaculture. 69, 3-4,227-239.

10-Lahnsteiner, F., T. Weismann & R.A. patzner, 1995. A uniform method for cryopreservation of semen of the salmonid fishes. Aquaculture Research. 26, 801-807.

11-Palti, J.J.L. & G.H. Thorgard, 1997. Improved efficiency of heat and pressure shocks for producing gynogenetic Rainbow trout. Progressive Fish Culturist. 59, I, 1-13.
12- Purdom, C.E., 1983. Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. Aquaculture. 33, 287-300.
13-Purdom, C.E., D. Thompson and Y.D. lou, 1985. Genetic engineering in Rainbow trout by the suppression of meiotic and mitotic metaphase. J. Fish Biol. 27, 73-79.
14-Quillet, E., P.Garcia, & R.Guyomard, 1991. Analysis of the production of all homozygous lines of Rainbow trout by gynogenesis. J. Exp. Zool. 275, 367-374.
15-Quillet, E., 1994. Survival, growth and reproductive traits of mitotic gynogenetic Rainbow trout females. Aquaculture. 123, 223-236.
16-Taniguchi, N., 1992. Genetic improvement by gynogenesis-selection method. ISR. J. Aquaculture, Bamidgeh, 44(4), 135.
17-Thompson, D. & A.P. Scott, 1984. An analysis of recombination data in gynogentic diploid Rainbow trout. Heredity. 53, 441-452.
18-Thorgard, G.H., P. Spruell, P.A. Wheeler, P.D. Scheerer, A.S. Peek, J.J. Valentine, & B. Hilton, 1995. Incidence of albinos as a monitor for induced triploidy in Rainbow trout. Aquaculture. 137, 121-130.
19- Young, WP., P.A. Wheeler, R.D. Fields & G.H. Thorgaard, 1996. DNA-fingerprinting confirms isogenicity of androgenetically derived Rainbow trout lines. J. Heredity. 86(1), 77-81.

Induction of Gynogenesis in Rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)* by Uv-irradiation

Gh. Azari Takami[1] H. Farahmand[2] B. Bahrami Kamangar[3]

Abstract

In order to induce meiosis gynogenesis in rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)*, spermatozoa genome was destroyed by Uv irradiation (2887 μ w/cm^2) and after fertilization with intact ovum, diploidy was returned by applying a thermal shock ($27 \pm 0.5°c$) for 10 minutes. Thermal shock was applied at 30 and 40 minutes after fertilization. Uv-irradiation was supplied from a germicidal lamp (30w) with maximum intensity at 245nm. Before irradiation, sperm was diluted with two kinds of solutions at a ratio of 1:4 and then subjected to 1,3,5,8 and 15 minutes of irradiation. Statistical design for comprising effects on 3 different treatment groups were observed as split split plot on gynogenesis and split plot on haploid and randomized complete block on control. Golden color in rainbow trout was used as a marker for distinguishing gynogenetic offspring. Furthemore, for confirmed diploidy chromosome slides were prepared. The best performance was achieved in treatment of 8 minute irradiation and applied thermal shock of 30 minutes after fertilization, but there was no significant difference between the two solutions ($P>0.05$). The mean percentage gynogenesis was 60.61% in the treatments of three replications. Neverthless, 100% gynogenesis was achieved from 8 minute irradiation in the second replication.

Keywords: Gynogenesis, Spermatozoa, Rainbow trout, Uv-irradiation, Genome

[1] - *Professor, Natural Resources Faculty of Tehran University*
[2] - *Faculty Member, Natural Resources Faculty of Tehran University*
[3] - *Senior Expert in Fisheries, Natural Resources Faculty of Tehran University*