

بهترین شرایط شوک حرارتی برای القای تتراپلویدی در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

سالار درافشان^{۱*} امیروفایی سعیدی^۲ علی نکوئی فرد^۳

۱) گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان-ایران

۲) دانش آموخته، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان-ایران

۳) موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج و مرکز مرجع آر تیما در منطقه میانی و غربی آسیا، ارومیه-ایران

(دریافت مقاله: ۷ مهر ماه ۱۳۹۳، پذیرش نهایی: ۱ آذر ماه ۱۳۹۳)

چکیده

زمینه مطالعه: تولید ماهیان تتراپلوید قزل‌آلای رنگین‌کمان به منظور استفاده از آنها در ایجاد گله‌های تریپلوید عقیم به روش غیرالقایی جهت معرفی به سامانه‌های پرورشی حایز اهمیت است. **هدف:** تعیین شوک حرارتی بهینه برای القای تتراپلویدی در قزل‌آلای رنگین‌کمان با تأکید بر اندازه تخمک بود. **روش کار:** به این منظور، سه شوک‌های گرمایی 28°C ، 30°C و 32°C به مدت ۵، ۱۰ دقیقه و در زمان‌های ۴۵، ۵۵، ۶۵، ۷۵ و ۸۵ ساعت - درجه پس از لقاح بر دو گروه با اندازه تخمکی متفاوت ($4/2 \pm 0/12\text{mm}$ و $5/5 \pm 0/20\text{mm}$) در دمای انکوباسیون 11°C اعمال گردید. درصد القای تتراپلویدی در لاروهای دارای شنای فعال با استفاده از سنجش ابعاد گلبولی و نیز تعداد مناطق سازمان دهنده هستکی تعیین شد. با توجه به درصد بازماندگی تا مرحله شنای فعال، بازده تتراپلویدی تعیین شد. **نتایج:** درصد القای تتراپلویدی در گروه تخمکی بالای 5mm در محدوده ۱۸ تا 69% و در گروه تخمکی زیر 5mm در گستره ۱۸ الی 76% بود. بالاترین بازده تتراپلویدی در گروه تخمکی بیش از 5mm (13%) با شوک حرارتی 28°C ، به مدت ۱۰ دقیقه و ۶۵ ساعت - درجه پس از لقاح و در گروه تخمکی زیر 5mm با شوک حرارتی 28°C ، به مدت ۵ دقیقه و ۷۵ ساعت - درجه پس از لقاح (7%) حاصل شد. **نتیجه‌گیری نهایی:** اگرچه القای تتراپلویدی در قزل‌آلای رنگین‌کمان پیش از این انجام شده است اما نتایج این تحقیق برای اولین بار نشان داد که بازده تتراپلویدی علاوه بر موارد مرتبط با شوک، متأثر از قطر تخمک مولدین است.

واژه‌های کلیدی: تغییر کروموزومی، اندازه تخمک، قزل‌آلای رنگین‌کمان

محیطی نسبت به احتباس گویچه قطبی اقدام شده و از این طریق، انواع تریپلوید ($3n$ کروموزومی) تولید می‌شود. واضح است که در این روش، بازده تریپلویدی همواره 100% نبوده و درصدی از نتایج دارای عدد کروموزومی غیرمطلوب هستند. در روش دیگر، با استفاده از شوک‌های محیطی در وهله اول نسبت به تولید انواع تتراپلوید اقدام می‌شود و سپس با آمیزش افراد تتراپلوید با والدین دیپلوید، انواع تریپلوید به روش غیرالقایی تولید می‌شود ($7, 13, 21$). در خارج از کشور تولید لاین‌های تجاری از گله‌های تتراپلوید قزل‌آلای رنگین‌کمان از سالیان گذشته آغاز شده است که هدف از توسعه آنها، تولید ماهیان تریپلوید در مقیاس تجاری است (15). همچنین از گله تتراپلویدی می‌توان از یک منبع بالقوه برای استفاده در سطوح دیگر پلویدی مثل پنتا، هگزا، هپتاپلویدی نام برد (11). اگرچه امکان القای پلویدی با استفاده از انواع شوک‌های شیمیایی، الکتریکی و فشار هیدرواستاتیک وجود دارد، اما استفاده از شوک‌های دمایی خصوصاً شوک گرمایی برای آزاد ماهیان بنا به دلایلی نظیر سهولت کاربرد و قابلیت اعمال بر حجم بالایی از تخم‌ها، مرسوم‌ترین روش محسوب می‌شود ($6, 7$). موفقیت القای پلویدی، تابع شرایط محیطی و ویژگی‌های والدین است و به دلیل اختلاف حساسیت در تخم‌های بین نژاد و گونه‌های نزدیک، شوک‌های مختلفی برای ایجاد نتایج بهینه مورد استفاده قرار می‌گیرند. از این رو، تاکنون نتایج

مقدمه

پلی پلویدی به دارا بودن بیش از دو سری کروموزوم در هر سلول اطلاق می‌شود که به طور طبیعی در برخی موجودات عمدتاً گیاهان رخ می‌دهد. با این وجود، بروز این پدیده (پلی پلویدی) در جانوران عمدتاً به طریق مصنوعی القا می‌شود. ویژگی‌های خاص آبزیان نظیر قابلیت تحمل سطوح مختلف پلویدی، لقاح خارجی، دوره رشد نسبتاً کوتاه و حجم بالای گامت‌های استحصالی در هر دوره تکثیر منجر به توسعه بیشتر دستکاری‌های کروموزومی در آبزیان به ویژه ماهیان شده است. پدیده بلوغ جنسی یکی از مهم‌ترین مشکلات پرورش دهندگان آبزیان خصوصاً ماهیان سردآبی است. بلوغ جنسی در آزاد ماهیان منجر به کاهش رشد (24)، کاهش مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا، کاهش کیفیت لاشه و رنگدانه‌های موجود در بافت‌ها می‌شود. علاوه بر این، تفاوت رشد وابسته به جنسیت در بسیاری از ماهیان (نظیر آزاد ماهیان) به اثبات رسیده است (10). لذا تولید و پرورش ماهیان عقیم به دلیل حذف کامل بلوغ در آنها مطلوب است (7). تولید ماهیان تریپلوید، روش تجاری عقیم‌سازی در ماهیان سردآبی خصوصاً قزل‌آلای رنگین‌کمان است. دوروش اصلی برای تولید ماهیان تریپلوید، روش القایی (مستقیم) و غیرالقایی (غیرمستقیم) است (21). در روش القایی، با استفاده از شوک‌های



حجم یکسان اسپرم چند مولد نر صورت گرفت. به منظور تعیین دما، دوره و زمان مناسب شوک جهت القای تتراپلویدی در قزل‌آلای رنگین‌کمان در حمام آبی با درجه حرارت‌های 28°C ، 30°C و 32°C برقرار گردید و تخم‌های لقاح یافته در زمان‌های ۴۵، ۵۵، ۶۵، ۷۵ و ۸۵ ساعت - درجه پس از لقاح و به مدت زمان‌های ۱، ۵ و ۱۰ دقیقه تحت شوک حرارتی قرار گرفتند. تیمارها بر اساس برخی مطالعات پیشین در خصوص القای تتراپلویدی یا ماده‌زایی میتوزی در قزل‌آلای رنگین‌کمان یا سایر آزادماهیان پیشنهاد شدند (مرور شده در ۲۱، ۱۰، ۷). تخم‌های لقاح یافته قبل و بعد از مرحله شوک دهی در دمای 11°C نگهداری شدند. هر تیمار (دما، دوره و زمان آغاز شوک) در ۳ تکرار و هر تکرار شامل 20 ± 170 قطعه تخم بود. در این مرحله با احتساب سه درجه حرارت، پنج زمان آغاز شوک دهی، سه دوره متفاوت شوک دهی و دو اندازه مختلف تخمکی (زیر 5mm و بالای 5mm) در مجموع ۹۰ تیمار مد نظر قرار گرفت که هر یک در سه تکرار اجرا شد و در کل ۲۷۰ واحد آزمایشی حاصل گردید. دو گروه شاهد در این آزمایش مدنظر قرار گرفت که عبارت بودند از شاهد که شامل اجرای دستکاری‌های فیزیکی و جابه‌جایی‌های مرسوم در حین عمل شوک دهی اما بدون اعمال شوک حرارتی، ۶۵ ساعت - درجه پس از لقاح به مدت ۵ دقیقه بر تخم‌های لقاح یافته در دمای آب انکوباسیون (11°C) و شاهد فیزیکی که شامل اجرای عملیات لقاح و انتقال تخم‌های لقاح یافته به انکوباسیون بدون اجرای هر گونه دستکاری اضافی بود. گروه‌های مذکور (شاهد و شاهد فیزیکی) نیز همانند گروه‌های آزمایشی در سه تکرار اجرا شدند و لذا مجموع واحدهای آزمایشی به ۲۷۶ عدد رسید. مراقبت‌های لازم در طی دوره انکوباسیون مطابق روش مرسوم در مراکز تکثیر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان اعمال گردید. متوسط میزان بازماندگی تا مرحله چشم‌زدگی، تفریخ و شنای فعال برای هر تکرار ثبت شد و از درصد بازماندگی تا مرحله شنای فعال برای محاسبه بازده تتراپلویدی استفاده شد. همچنین میزان ناهنجاری‌های ریختی در مرحله شنای فعال (نظیر پیچ خوردگی بدن، دو سر یا دو دم بودن) ثبت گردید. درصد تتراپلویدی در ماهیان تولید شده در مرحله شنای فعال باروش‌های سنجش ابعاد هسته و سلول گلبول قرمز و نیز آنالیز تعداد مناطق سازمان دهنده هستکی NORS، تعیین شد (۱۳). به این منظور از هر تکرار تعداد ۵-۲۰ قطعه لارو (بسته به تعداد کلی لاروهای بازمانده) در مرحله شنای فعال مورد ارزیابی قرار گرفتند. درصد القاء تتراپلویدی و بازده تتراپلویدی با استفاده از روابط زیر تعیین شد (۱۶، ۶).

تتراپلویدی

$100 \times (\text{تعداد کل ماهیان} / \text{تعداد ماهیان تتراپلوید}) =$

بازده تتراپلویدی

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS15 انجام گرفت. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف - اسمیرنوف سنجیده شد. برای تعیین شوک بهینه، در هر گروه تخمکی از

متفاوتی در این خصوص حتی برای یک گونه گزارش شده است (۲۰). همچنین تلاش‌ها به منظور بهینه‌سازی روش‌ها چه در زمینه القای تتراپلویدی (۱۴) و چه در زمینه تولید ماهیان تریپلوید (۲۳) همچنان ادامه دارد. در زمینه تعیین شوک بهینه برای القای تتراپلویدی در گونه‌های مختلف آزادماهیان خصوصاً قزل‌آلای رنگین‌کمان در خارج از کشور (۲۰، ۱۴، ۲۰) مطالعاتی منتشر شده است. اما تاکنون تنها یک گزارش علمی در داخل کشور به بررسی شوک حرارتی بهینه برای القای تتراپلویدی در قزل‌آلای رنگین‌کمان اشاره کرده است (۱۶). در هیچ‌یک از این مطالعات، اندازه تخم که به عنوان یک فاکتور تأثیرگذار در ارزیابی پاسخ به شوک حرارتی مدنظر قرار نگرفته است. لذا با توجه به تفاوت‌های نژادی و فیزیولوژیکی بین گروه‌های مختلف قزل‌آلای رنگین‌کمان، لازم است تا روش بهینه جهت تولید گله تتراپلوید در این گونه با تأکید بر اندازه تخمک تعیین گردد، به این طریق ضمن تولید گله‌های تتراپلوید قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌توان از آنها به عنوان مولد جهت تولید ماهیان تریپلوید عقیم به روش غیرالقایی، آمیزش مولدین تتراپلوید با مولدین دیپلوید استفاده کرد.

مواد و روش کار

این تحقیق در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی در یاسوج اجرا شد. به منظور تعیین اثر اندازه تخمک بر بازده تتراپلویدی دو گروه تخمک با اندازه متفاوت ($20 \pm 5/5$ و $12 \pm 4/2$) که به ترتیب از این پس تخمک‌های بالای 5mm و زیر 5mm نامیده می‌شوند، مورد استفاده قرار گرفت. به این منظور، علاوه بر اندازه تخمک، ویژگی‌های مرتبط با شوک نظیر درجه حرارت، طول دوره شوک (مدت زمان قرارگیری تخم‌های لقاح یافته در حمام آبی با درجه حرارت مورد نظر)، زمان آغاز شوک (زمان قرارگیری تخم لقاح یافته در حمام آبی پس از لقاح، مخلوط شدن تخمک با اسپرم و افزوده شدن آب سالن انکوباسیون به عنوان محرک لقاح بر حسب ساعت - درجه، مدت زمان بر حسب ساعت * میانگین دمای نگهداری تخم لقاح یافته 11°C) مورد توجه قرار گرفت و در نهایت بازده شوک (میانگین بازماندگی تخم‌های لقاح یافته تا مرحله شنای فعال * درصد وقوع تتراپلویدی موفق) به عنوان معیار تعیین بهترین شوک حرارتی استفاده شد. به منظور اجرای این آزمایش، تخم‌کشی از ۶۰ قطعه مولد سه تا چهار ساله ایرانی با میانگین وزنی $30.57 \pm 128.0\text{g}$ و طولی $4.96 \pm 61.36\text{Cm}$ تحت شرایط استاندارد صورت گرفت. پس از تخم‌کشی مجزا نسبت به تعیین اندازه قطر تخمکی با استفاده از کولیس اقدام شد. تخمک‌های مولدین با قطر بیش از $5(5 \pm 0.2\text{mm})$ به منظور حذف اثرات احتمالی تفاوت‌های ژنتیکی بین والدین با یکدیگر مخلوط شدند. مراحل مشابهی برای تخمک با قطر کمتر از $5(4.2 \pm 0.12\text{mm})$ اجرا شد. در مجموع حدود ۲۳۰۰۰ قطعه تخمک برای هر گروه جداسازی شدند. لقاح به روش خشک و با استفاده از



جدول ۱. اثر شوک‌های مختلف حرارتی بر بازماندگی تا مرحله چشم زدگی، تفریخ و شنای فعال و میزان بروز ناهنجاری‌های ریختی در قزل آلابی رنگین کمان با اندازه تخمک بیش از ۵mm. مطابق با نتیجه آزمون دانکن، در هر دمای شوک و برای هر ویژگی مورد بررسی، گروه‌های حداقل دارای یک حرف مشابه فاقد اختلاف معنی دار هستند ($p > 0.05$). تنها اطلاعات تیمارهای دارای بازماندگی ارایه شده است. مدت زمان پس از لقاح بر حسب ساعت * میانگین دمای آب بر حسب درجه سانتی‌گراد.

| درجه حرارت شوک (°C) | زمان آغاز شوک (ساعت-درجه) | دوره شوک (دقیقه) | درصد چشم زدگی | درصد تفریخ | درصد بازماندگی تا مرحله شنای فعال | درصد ناهنجاری ریختی |
|---------------------|---------------------------|------------------|----------------------|--------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| ۲۸ | ۴۵ | ۱ | ۷۹±۵ ^{abc} | ۸۰±۵ ^a | ۸۲±۳ ^b | ۴±۰/۲ ^{ab} |
| | | ۵ | ۷۰±۲ ^{bcd} | ۸۷±۳ ^a | ۸۳±۵ ^b | ۴/۳±۰/۲ ^a |
| | | ۱۰ | ۸۵±۷ ^{ab} | ۸۰±۲ ^a | ۷۸±۴ ^b | ۳±۰/۱ ^{ab} |
| ۵۵ | ۵۵ | ۱ | ۷۹±۳ ^{abc} | ۸۳±۲ ^a | ۷۸±۵ ^b | ۳/۵±۰/۷ ^{ab} |
| | | ۵ | ۴۶±۹ ^c | ۷۴±۳ ^a | ۶۸±۶ ^b | ۳/۶±۰/۴ ^b |
| | | ۱۰ | ۷۲±۷ ^{bcd} | ۸۲±۴ ^a | ۷۲±۲ ^b | ۴/۵±۰/۱ ^{ab} |
| ۶۵ | ۶۵ | ۱ | ۶۴±۶ ^{cd} | ۵۸±۲ ^b | ۵۲±۲ ^b | ۴/۷±۰/۱ ^c |
| | | ۵ | ۵۹±۷ ^{de} | ۷۷±۲ ^a | ۷۷±۳ ^{ab} | ۲/۲±۰/۳ ^{ab} |
| | | ۱۰ | ۶۰±۹ ^{de} | ۷۸±۳ ^a | ۶۸±۲ ^b | ۴±۰/۲ ^b |
| ۷۵ | ۷۵ | ۱ | ۸۲±۲ ^{ab} | ۸۲±۴ ^a | ۷۸±۲ ^b | ۳/۵±۰/۶ ^{ab} |
| | | ۵ | ۸۵±۳ ^{ab} | ۸۶±۳ ^a | ۷۸±۳ ^b | ۴/۲±۰/۱ ^{ab} |
| | | ۱۰ | ۸۲±۶ ^{ab} | ۸۳±۱ ^a | ۷۸±۳ ^{ab} | ۲/۵±۰/۳ ^{ab} |
| ۸۵ | ۸۵ | ۱ | ۷۹±۳ ^{abc} | ۸۳±۵ ^a | ۷۴±۳ ^{ab} | ۱/۶±۰/۷ ^{ab} |
| | | ۵ | ۷۸±۹ ^{bc} | ۸۰±۵ ^a | ۸۰±۴ ^{ab} | ۲/۹±۰/۶ ^{ab} |
| | | ۱۰ | ۷۹±۱۰ ^{abc} | ۷۲±۲ ^a | ۷۸±۶ ^b | ۳±۰/۳ ^a |
| ۳۰ | ۴۵ | ۱ | ۸۱±۲ ^{ab} | ۸۲±۶ ^a | ۸۱±۵ ^{ab} | ۲/۶±۰/۷ ^{ab} |
| | | ۵ | ۷۵±۳ ^{bed} | ۷۸±۵ ^{ab} | ۶۹±۳ ^{ab} | ۲/۳±۰/۷ ^{ababcd} |
| | | ۱۰ | ۶۲±۷ ^d | ۴۸±۳ ^c | ۶۰±۳ ^b | ۳/۸±۰/۹ ^{cd} |
| ۵۵ | ۵۵ | ۱ | ۸۱±۳ ^{abc} | ۷۹±۳ ^a | ۷۹±۵ ^a | ۳/۷±۰/۶ ^{ab} |
| | | ۵ | ۳۰±۷ ^e | ۶۳±۲ ^b | ۳۳±۴ ^b | ۴/۱±۰/۲ ^c |
| | | ۱ | ۸۹±۳ ^{ab} | ۸۲±۱ ^a | ۷۸±۲ ^b | ۳/۵±۰/۵ ^{abc} |
| ۶۵ | ۶۵ | ۵ | ۴۹±۳ ^c | ۷۹±۳ ^a | ۷۲±۳ ^b | ۳/۶±۰/۷ ^{abcd} |
| | | ۱۰ | ۶۹±۱ ^d | ۷۷±۵ ^{ab} | ۶۲±۴ ^b | ۲/۳±۰/۶ ^{bcd} |
| ۷۵ | ۷۵ | ۱ | ۷۹±۴ ^{bed} | ۸۵±۵ ^a | ۷۹±۳ ^{ab} | ۱/۸±۰/۳ ^{abc} |
| | | ۵ | ۷۴±۱ ^{bed} | ۸۹±۲ ^a | ۷۸±۲ ^b | ۳/۵±۰/۹ ^{abc} |
| | | ۱۰ | ۷۴±۷ ^{bed} | ۸۴±۱ ^a | ۷۳±۲ ^{ab} | ۱/۷±۰/۲ ^{abcd} |
| ۸۵ | ۸۵ | ۱ | ۷۲±۱ ^{cd} | ۸۰±۳ ^{ab} | ۷۵±۴ ^b | ۴±۰/۶ ^b |
| | | ۵ | ۷۷±۱ ^{bcd} | ۷۷±۲ ^{ab} | ۷۱±۲ ^b | ۴/۲±۰/۵ ^{abcd} |
| ۳۲ | ۴۵ | ۱ | ۷۲±۳ ^c | ۸۲±۱ ^a | ۷۹±۱ ^{ab} | ۱/۸±۰/۳ ^a |
| | | ۱ | ۷۵±۷ ^{de} | ۸۳±۴ ^a | ۸۲±۳ ^b | ۳/۸±۰/۷ ^a |
| | | ۱ | ۹۳±۲ ^{ab} | ۸۵±۳ ^a | ۷۹±۷ ^a | ۵/۲±۰/۶ ^a |
| | | ۱۰ | ۹±۷ ^f | ۲۶±۲ ^b | . | - |
| ۷۵ | ۷۵ | ۱ | ۷۵±۴ ^{de} | ۸۳±۱ ^a | ۸۰±۷ ^b | ۴/۳±۰/۲ ^a |
| ۸۵ | ۸۵ | ۱ | ۸۹±۱ ^{cd} | ۹۰±۱ ^a | ۷۸±۲ ^{bc} | ۴/۸±۰/۳ ^a |
| | | | ۹۴±۱ ^a | ۸۶±۴ ^a | ۸۵±۱ ^a | ۸۰/۵±۰/۳ ^a |
| | | شاهد | ۸۴±۳ ^{ab} | ۸۴±۳ ^a | ۷۹±۲ ^a | ۰/۸±۰/۲ ^a |
| | | شاهد فیزیکی | | | | |

نتایج

نتایج مرتبط با اثر تیمارهای مختلف حرارتی بر میزان بازماندگی تا مرحله چشم زدگی، تفریخ، شنای فعال و میزان ناهنجاری‌های ریختی برای دو گروه تخمکی با قطر بیش از ۵mm و کمتر از ۵mm در جدول ۱ و ۲ ارایه شده است. میزان بازماندگی در تمامی مراحل در گروه‌های شاهد در هر دو گروه اندازه تخمک بالا بود، با این وجود تیمار شاهد فیزیکی منجر به

آزمون چنددانه دانکن استفاده شد. برای مقایسه دو به دو میانگین تیمارها، مقایسه بین دو گروه تخمکی در یک تیمار از آزمون t-student استفاده شد. برای تعیین معنی دار بودن اختلاف بین پارامترهای مورد بررسی در تیمارها، تجزیه واریانس دو طرفه (UNIANOVA) مورد استفاده قرار گرفت. سطح اطمینان ۹۵٪ برای ارزیابی داده‌ها استفاده شد. داده‌ها به صورت $Mean \pm SEM$ و $Mean \pm SD$ ارایه گردید.



جدول ۲. اثر شوک‌های مختلف حرارتی بر بازماندگی تا مرحله چشم زدگی، تفریح و شنای فعال و میزان بروز ناهنجاری‌های ریختی در قزل‌آلای رنگین کمان با اندازه تخمک کمتر از ۵mm. مطابق با نتیجه آزمون دانکن، در هر دمای شوک و برای هر ویژگی مورد بررسی، گروه‌های حداقل دارای یک حرف مشابه فاقد اختلاف معنی دار هستند ($p > 0.05$). بیانگر تفاوت معنی دار در دو گروه اندازه تخمک در تیمار مشابه است (t -test, $p < 0.05$). تنها اطلاعات تیمارهای دارای بازماندگی ارایه شده است. (*) مدت زمان پس از لقاح بر حسب ساعت × میانگین دمای آب بر حسب درجه سانتی گراد.

| درجه حرارت شوک (C°) | زمان آغاز شوک (ساعت-درجه) | دوره شوک (دقیقه) | درصد چشم زدگی | درصد تفریح | درصد بازماندگی تا مرحله شنای فعال | درصد ناهنجاری ریختی |
|---------------------|---------------------------|------------------|----------------------|----------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| ۲۸ | ۴۵ | ۱ | ۷۵±۳ ^{ab} | ۸۵±۲ ^{ab} | ۷۸±۲ ^b | ۴/۳±۰/۲ ^a |
| | | ۵ | ۵۳±۴ ^{d*} | ۶۱±۳ | ۶۴±۳ ^b | ۴/۵±۰/۷ ^{ab*} |
| | | ۱۰ | ۶۴±۶ ^{c*} | ۸۴±۲ ^{ab*} | ۷۹±۲ ^{b*} | ۴/۴±۰/۶ ^a |
| | ۵۵ | ۱ | ۷۹±۴ ^a | ۸۸±۲ ^{ab} | ۷۹±۲ ^b | ۴±۰/۷ ^a |
| | ۶۵ | ۱ | ۷۶±۲ ^{ab} | ۸۷±۳ ^{ab*} | ۷۸±۳ ^b | ۳/۹±۰/۶ ^{a*} |
| | | ۵ | ۳۲±۲ ^{ef*} | ۲۸±۲ ^{g*} | ۶۰±۱ ^b | ۴/۱±۰/۳ ^{c*} |
| | | ۱۰ | ۲۹±۲ ^{f*} | ۲۸±۳ ^{g*} | ۳۲±۵ ^{b*} | ۵/۳±۰/۲ ^{d*} |
| | ۷۵ | ۱ | ۷۴±۲ ^{ab} | ۸۵±۳ ^{ab} | ۷۵±۴ ^{ab} | ۱/۹±۰/۸ ^{ab} |
| | | ۵ | ۶۹±۴ ^{bc} | ۸۰±۳ ^{abc} | ۷۴±۳ ^{b*} | ۳/۳±۰/۳ ^{ab} |
| | | ۱۰ | ۶۹±۳ ^{bc} | ۷۳±۲ ^{bc} | ۷۶±۲ ^b | ۳/۶±۰/۶ ^{ab} |
| | ۸۵ | ۱ | ۵۰±۱ ^{d*} | ۷۰±۱ ^{cd} | ۶۳±۲ ^b | ۳/۵±۰/۷ ^{bc*} |
| | | ۵ | ۴۰±۳ ^{e*} | ۵۶±۲ ^{ef*} | ۶۴±۲ ^{bc*} | ۵/۳±۰/۲ ^{bc*} |
| | | ۱۰ | ۸±۲ ^{g*} | ۵۰±۲ ^{fg*} | ۳۸±۵ ^{bc*} | ۵/۱±۰/۳ ^{d*} |
| ۳۰ | ۴۵ | ۱ | ۶۳±۲ ^{cde*} | ۸۵±۱ ^{ab} | ۷۵±۵ ^{b*} | ۴/۸±۰/۷ ^{abcd} |
| | | ۵ | ۴۲±۱ | ۶۰±۳ ^{g*} | ۶۰±۲ ^{c*} | ۵/۵±۰/۶ ^e |
| | | ۱۰ | ۳۰±۱ ^{d*} | ۵۹±۳ ^g | ۳۲±۵ ^b | ۳/۸±۰/۳ ^{f*} |
| | ۵۵ | ۱ | ۷۵±۱ ^{ab} | ۸۳±۲ ^{abc} | ۷۶±۷ ^b | ۴/۳±۰/۶ ^{abc} |
| | | ۵ | ۳۲±۱ ^h | ۶۲±۵ ^b | ۶۰±۴ ^{bc} | ۵±۰/۳ ^{e*} |
| | | ۱ | ۶۲±۲ ^{cde*} | ۷۳±۲ ^{def*} | ۶۱±۲ ^b | ۳/۸±۰/۱۵ ^{de*} |
| | | ۵ | ۴۹±۲ ^{gf*} | ۶۵±۳ ^{bcd} | ۶۱±۱ ^b | ۳/۹±۰/۳ ^{de} |
| | | ۱۰ | ۴۴±۳ ^{g*} | ۶۲±۱ ^{fg*} | ۵۵±۷ ^{bc*} | ۵±۰/۹ ^e |
| | ۷۵ | ۱ | ۵۸±۲ ^{ef*} | ۷۰±۵ ^{def} | ۶۵±۱ ^{ab} | ۱/۷±۰/۳ ^{cde} |
| | | ۵ | ۷۰±۲ ^{bed} | ۷۶±۲ ^{bed} | ۸۲±۴ ^{b*} | ۳/۵±۰/۹ ^a |
| | | ۱۰ | ۶۴±۷ ^{de} | ۸۰±۱ ^{abcd} | ۸۰±۲ ^{b*} | ۳/۷±۰/۳ ^{abc} |
| | ۸۵ | ۱ | ۷۰±۲ ^{bed} | ۸۵±۳ ^{abc} | ۷۹±۴ ^{ab*} | ۲/۵±۰/۸ ^{abc} |
| | | ۵ | ۵۹±۲ ^c | ۷۵±۲ ^{cde} | ۷۰±۷ ^b | ۳/۹±۰/۸ ^{bcde} |
| | | ۱۰ | ۱۸±۲ ^{i*} | ۳۲±۱ ^h | ۳۶±۷ ^b | ۳/۳±۰/۳ ^{f*} |
| | ۴۵ | ۱ | ۷۷±۲ ^{ab} | ۷۸±۲ ^{bc} | ۷۱±۲ ^b | ۴/۳±۰/۳ ^{bc} |
| | | ۵ | ۶۳±۲ ^{e*} | ۷۵±۳ ^c | ۷۸±۵ ^b | ۴/۸±۰/۶ ^{ab*} |
| | | ۵ | ۵۲±۲ ^{d*} | ۵۰±۱ ^d | ۶۵±۲ ^b | ۳/۹±۰/۹ ^{c*} |
| | ۶۵ | ۱ | ۶۲±۲ ^{e*} | ۶۸±۲ ^c | ۷۲±۷ ^b | ۳/۸±۰/۷ ^{abc} |
| | ۷۵ | ۱ | ۷۰±۴ ^b | ۸۸±۴ ^{ab} | ۷۸±۲ ^b | ۲/۵±۰/۵ ^{abc} |
| | | ۵ | ۳۰±۴ ^{f*} | ۵۲±۵ ^{d*} | ۳۱±۲ ^b | ۳±۰/۳ ^{d*} |
| | ۸۵ | ۱ | ۷۳±۱ ^{ab*} | ۹۰±۱ ^a | ۷۹±۳ ^a | ۴±۰/۳ ^{abc} |
| شاهد | شاهد | | ۸۰±۱ ^{a*} | ۸۹±۴ ^a | ۸۴±۲ ^a | ۰/۷±۰/۳ ^a |
| | شاهد فیزیکی | | ۷۲±۲ ^{abc*} | ۸۵±۳ ^a | ۸۰±۲ ^a | ۰/۹±۰/۶ ^a |

شوک، میزان بازماندگی خصوصاً تا مرحله چشم زدگی کاهش یافت به طوری که شوک حرارتی ۳۲°C خصوصاً در دوره‌های زمانی ۵ و ۱۰ دقیقه، تلفات کامل تخم‌ها در هر دو گروه مشاهده شد (جدول ۱، ۲). در تمامی درجه حرارت‌های مورد استفاده برای شوک دهی، در هر دو گروه تخمکی با افزایش دوره شوک، از ۱۰ و ۵ دقیقه میزان بازماندگی به طور معنی داری کاهش یافت. چنین روند کاهشی برای تخم‌هایی با قطر کمتر از ۵mm

کاهش نسبی اما غیر معنی دار میزان بازماندگی خصوصاً تا مرحله چشم زدگی در هر دو گروه تخمک شد ($p > 0.05$). جدول ۱، ۲). شوک حرارتی بیشترین تأثیر را بر میزان بازماندگی در مرحله چشم زدگی در هر دو گروه تخمکی داشت. به طوری که در اغلب موارد، میزان چشم زدگی تخم‌های تحت تیمار شوک حرارتی نسبت به گروه شاهد در همان اندازه به طور معنی داری کمتر بود ($p < 0.05$). جدول ۱، ۲). با افزایش میزان درجه حرارت



جدول ۳. خلاصه نتایج تجزیه واریانس اثر دما، دوره، زمان شوک دهی و قطر تخمک بر درصد تتراپلوییدی.

| منبع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات | معنی داری (Sig) |
|---------------------------------|------------|----------------|-----------------|
| تیمار | ۸۹ | ۱۲۲/۷۶۶ | <۰/۰۰۰ |
| دما | ۲ | ۳۹۰/۰۲ | <۰/۰۰۰ |
| زمان | ۴ | ۲۸۱/۷۴۷ | <۰/۰۰۰ |
| دوره | ۲ | ۱۵۷/۶۴۸ | <۰/۰۰۰ |
| اندازه تخمک | ۱ | ۰/۰۷۳ | <۰/۰۰۰ |
| زمان × دما | ۸ | ۸۵/۵۶۹ | <۰/۰۰۰ |
| دما × دوره | ۴ | ۱۶۹/۶۵۴ | <۰/۰۰۰ |
| زمان × دوره | ۸ | ۴۹/۸۵۶ | <۰/۰۰۰ |
| دما × زمان × دوره | ۱۶ | ۱۵۰/۴۴ | <۰/۰۰۰ |
| دما × اندازه تخمک | ۲ | ۲۷۳/۵۶۶ | <۰/۰۰۰ |
| زمان × اندازه تخمک | ۴ | ۷۲/۰۶۱ | <۰/۰۰۰ |
| دما × زمان × اندازه تخمک | ۴ | ۱۰۸/۵۵ | <۰/۰۰۰ |
| دوره × اندازه تخمک | ۲ | ۹۴/۲۱ | <۰/۰۰۰ |
| دما × دوره × اندازه تخمک | ۴ | ۷۰/۶۷۱ | <۰/۰۰۰ |
| زمان × دوره × اندازه تخمک | ۸ | ۱۶۰/۵۲۸ | <۰/۰۰۰ |
| دما × دوره × زمان × اندازه تخمک | ۱۶ | ۶۷/۲۲۸ | <۰/۰۰۰ |

جدول ۴. خلاصه نتایج تجزیه واریانس اثر دما، دوره، زمان شوک دهی و قطر تخمک بر بازده تتراپلوییدی.

| منبع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات | معنی داری (Sig) |
|---------------------------------|------------|----------------|-----------------|
| تیمار | ۸۹ | ۱۷/۱۴۸ | <۰/۰۰۰ |
| دما | ۲ | ۸۲/۸۷۶ | <۰/۰۰۰ |
| زمان | ۴ | ۳۳/۲۳۷ | <۰/۰۰۰ |
| دوره | ۲ | ۰/۰۱۴ | <۰/۴۷۹ |
| اندازه تخمک | ۱ | ۱۰/۰۵۰ | <۰/۰۰۲ |
| زمان × دما | ۸ | ۶/۰۸۰ | <۰/۰۰۰ |
| دما × دوره | ۴ | ۲۷/۸۶۲ | <۰/۰۰۰ |
| زمان × دوره | ۸ | ۴/۵۶۴ | <۰/۰۰۰ |
| دما × زمان × دوره | ۱۶ | ۱۹/۶۴۴ | <۰/۰۰۰ |
| دما × اندازه تخمک | ۲ | ۵۱/۸۹۶ | <۰/۰۰۰ |
| زمان × اندازه تخمک | ۴ | ۲۱/۰۱۹ | <۰/۰۰۰ |
| دما × زمان × اندازه تخمک | ۴ | ۱۹/۴۸۵ | <۰/۰۰۰ |
| دوره × اندازه تخمک | ۲ | ۱۸/۴۳۶ | <۰/۰۰۰ |
| دما × دوره × اندازه تخمک | ۴ | ۱۲/۶۰۷ | <۰/۰۰۰ |
| زمان × دوره × اندازه تخمک | ۸ | ۱۰/۳۴۷ | <۰/۰۰۰ |
| دما × دوره × زمان × اندازه تخمک | ۱۶ | ۱۲/۰۴۳ | <۰/۰۰۰ |

بازتر بود ($p < 0/05$)، جدول ۲). از منظر زمان آغاز شوک و تأثیر آن بر بازماندگی، نتایج نشان داد که آغاز شوک حرارتی در ۵۵ ساعت - درجه پس از لقاح معمولاً منجر به افزایش شدید تلفات شده است (جدول ۱، ۲).

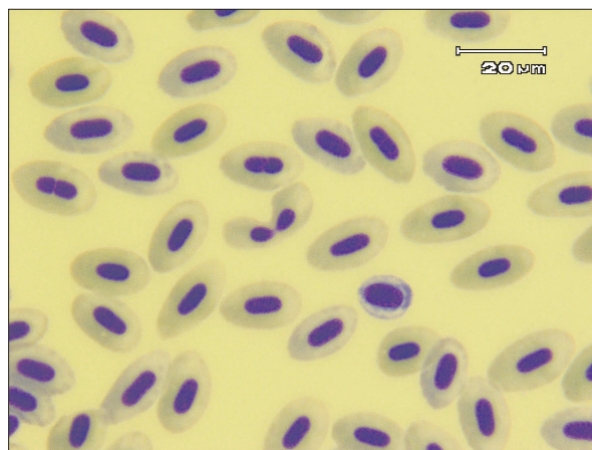
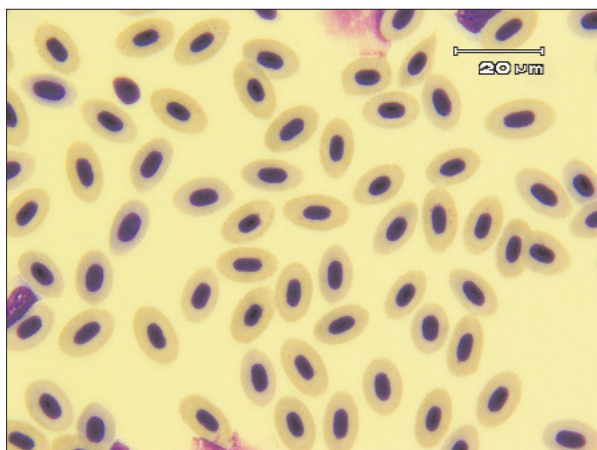
به طوری که در بسیاری موارد کمتر بین میزان بازماندگی، حتی تلفات کامل جنین‌ها پیش از چشم زدگی در تمامی درجه حرارت‌ها و دوره‌های زمانی شوک دهی (۱، ۵، ۱۰ دقیقه) در اعمال شوک در ۵۵ ساعت - درجه پس از لقاح مشاهده شد (جدول ۱، ۲). در مقایسه بین دو گروه تخمک با اندازه متفاوت مشخص شد که میزان بازماندگی تخمک‌های کوچکتر در مراحل مختلف خصوصاً در مرحله چشم زدگی کمتر از میزان بازماندگی انواعی با قطر بزرگتر بود ($p < 0/05$)، جدول ۱ و ۲). تلفات بیشتر جنین‌های ایجاد شده در تخمک‌هایی با اندازه کوچکتر از ۵mm در مقایسه با انواع بزرگتر در دو گروه شاهد و شاهد فیزیکی در مرحله چشم زدگی معنی دار بود ($p < 0/05$)، جدول ۱ و ۲). با این وجود در سایر مراحل مورد بررسی، تفریح و شنای فعال تفاوت محسوسی در مقایسه گروه‌های شاهد دو گروه تخمکی مشاهده نشد ($p > 0/05$)، جدول ۱ و ۲).

میزان ناهنجاری ریختی در مرحله شنای فعال در هر دو گروه لاروهای حاصل از تخمک‌هایی با قطر بیش از ۵ و کمتر از ۵mm در جدول ۱ و ۲ ارایه شده است. میزان ناهنجاری‌ها در گروه تخمک‌های بزرگتر در محدوده ۵/۲-۵/۰٪ و در گروه لاروهای تولید شده از تخمک‌های کوچکتر از ۵mm در محدوده ۵/۵-۵/۰٪ بود. در هر دو گروه اندازه تخمک، کمترین میزان ناهنجاری‌ها در گروه‌های شاهد و شاهد فیزیکی مشاهده شد. اعمال شوک حرارتی به طور معمول منجر به افزایش میزان ناهنجاری‌های ریختی در هر دو گروه اندازه تخمک شد ($p < 0/05$)، جدول ۱ و ۲). علاوه بر این در حدود ۳۰٪ موارد، میزان ناهنجاری‌های ریختی در گروه حاصل از تخمک‌های کوچکتر (کمتر از ۵mm) به طور معنی داری متفاوت، عمدتاً

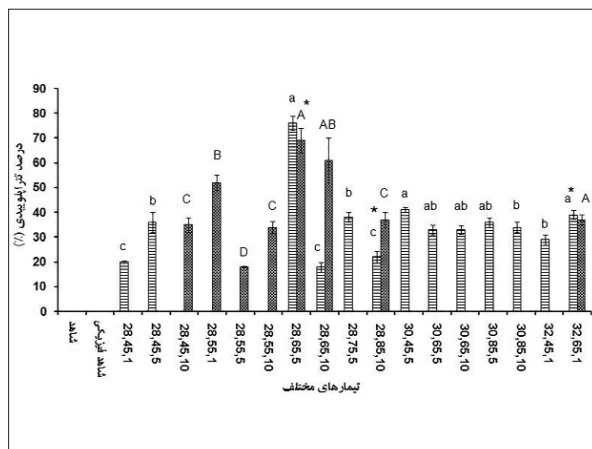
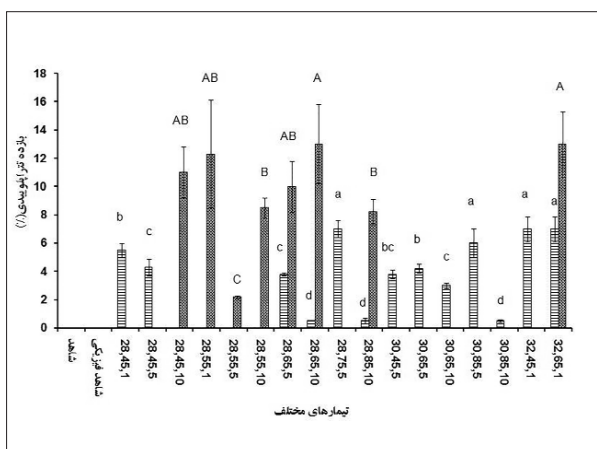
بیشتر از لاروهای حاصل از تخمک‌های بزرگتر بود ($p < 0/05$)، جدول ۲). با این وجود در مقایسه میزان ناهنجاری‌های ریختی گروه‌های شاهد بین دو گروه اندازه تخمکی تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($p > 0/05$)، جدول ۲). ابعاد گلبولی در لاروهای حاصل تیمارهای در معرض شوک، به طور معنی داری نسبت به ابعاد گلبولی لاروهای حاصل از گروه‌های شاهد بزرگتر بود ($p < 0/05$)، تصویر ۱). به طور خلاصه، نسبت ابعاد گلبولی گروه شاهد نسبت به گروه‌های تیمار شده با شوک حرارتی (تتراپلوییدی) در خصوص طول هسته، ۱:۱/۷۶، عرض هسته ۱:۱/۵۶، طول سلول ۱:۱/۶۹، عرض سلول ۱:۱/۳۹، مساحت هسته و سلول به ترتیب ۱:۲/۷۶ و ۱:۲/۳۶ و حجم هسته و سلول به ترتیب ۱:۴/۳۰ و ۱:۱/۳۱ برابر بود (تصویر ۱). نتایج بررسی تعداد مناطق سازمان دهنده هستکی (NORs) در لاروهای حاصل از شوک حرارتی نشان داد که تعداد این مناطق به طور معمول در هر سلول ۳ الی ۴ عدد است. در حالی که انواع دیپلوئید تعداد ۱ الی ۲ منطقه سازمان دهنده هستکی را نشان دادند.

در خصوص درصد القای تتراپلوییدی در نتاج، آنالیز واریانس نشان داد که اثر تمامی عوامل مورد بررسی، درجه حرارت شوک، دوره شوک، زمان آغاز شوک و همچنین قطر تخمک، به تنهایی یا در تلفیق با یکدیگر بر درصد القای تتراپلوییدی در قزل‌آلای رنگین‌کمان معنی دار بوده‌اند ($p < 0/05$)، جدول ۳). در هیچ یک از گروه‌های شاهد، افراد تتراپلوییدی مشاهده نشدند (تصویر ۲). در گروه تخمکی بالای ۵mm، درصد تتراپلوییدی برای دمای 28°C در دامنه‌های ۱۸ الی ۶۷٪ و برای شوک حرارتی 32°C حداکثر معادل ۳۷٪ بود (تصویر ۲). در این گروه، تعداد لاروهای بررسی شده از انواع تیمار شده با شوک حرارتی 30°C ، علایمی از حالت تتراپلوییدی را در خود نشان ندادند (تصویر ۲). در میان تیمارهای مختلف تخمک‌های با قطر کمتر از ۵mm، دماهای 28°C و 32°C به ترتیب





تصویر ۱. گلبول های قرمز در ماهیان دیپلوئید (الف) و تتراپلوئید (ب) قرز آلابی رنگین کمان. ابعاد بزرگتر گلبول های قرمز در انواع تتراپلوئید در مقایسه با دیپلوئید بارز است.



تصویر ۳. بازده تتراپلوئیدی در بین تیمارهای مختلف دما، زمان و دوره شوک در هر دو گروه تخمکی بالای ۵ و زیر ۵mm. با استفاده از آزمون دانکن در هر گروه از اندازه تخمک، میانگین هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک باشند، فاقد تفاوت معنی دار هستند ($p > 0.05$). در مقایسه بین دو گروه تخمکی در هر تیمار (دما، دوره، زمان آغاز) با استفاده از آزمون t-Test، تمامی گروه ها دارای تفاوت معنی دار بودند ($p < 0.05$). تخمک با قطر کمتر از ۵ تخمک با قطر بیشتر از ۵ .

تصویر ۲. درصد تتراپلوئیدی در بین تیمارهای مختلف (دما، زمان و دوره شوک) در هر دو گروه تخمکی بالای ۵ و زیر ۵mm. با استفاده از آزمون دانکن در هر گروه اندازه تخمک، میانگین هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک باشند، فاقد تفاوت معنی دار هستند ($p > 0.05$). در مقایسه بین دو گروه تخمکی در هر تیمار (دما، دوره، زمان آغاز) با استفاده از آزمون t-Test، گروه های بدون اختلاف معنی دار به وسیله علامت ستاره مشخص شده اند ($p < 0.05$). تخمک با قطر کمتر از ۵ تخمک با قطر بیشتر از ۵ .

همانگونه که بیان شد، در دمای شوک 30°C و در گروه بالای ۵mm، هیچ یک از تیمارها منجر به القای تتراپلوئیدی نشد (تصویر ۱) در حالی که در گروه کمتر از ۵mm در این دما، تنها تیمارهایی با دوره حداقل برابر ۵ دقیقه، در فاصله زمانی ۴۵، ۶۵ و ۸۵ ساعت - درجه پس از لقاح منجر به القای تتراپلوئیدی در این گروه تخمکی شدند (تصویر ۲).

در دمای 32°C بالاترین درصد تتراپلوئیدی در هر دو گروه تخمکی مربوط به زمان آغاز شوک ۶۵ ساعت - درجه پس از لقاح و دوره ۱ دقیقه معادل $33/7\%$ برای گروه بالای ۵mm و برای گروه زیر ۵mm معادل $27/5\%$ بود (تصویر ۲). در مقایسه بین دو گروه تخمکی، درصد تتراپلوئیدی در این دما، تفاوتی را نشان نداد ($p > 0.05$). در سایر گروه ها به دلیل بروز تلفات کامل پیش از رسیدن به مرحله شنای فعال و یا القاء نشدن تتراپلوئیدی، درصد تتراپلوئیدی برابر صفر بود (تصویر ۲).

منجر به القاء تتراپلوئیدی در دامنه معادل ۱۸ تا 33% ، 41% و 29% الی 39% شد (تصویر ۲). بالاترین درصد تتراپلوئیدی در گروه بالای ۵mm به ترتیب مربوط به تیمارهای 28°C ، ۶۵ ساعت - درجه و 10 دقیقه (69%)، 28°C ، ۶۵ ساعت - درجه و 5 دقیقه (67%) و 28°C ، ۵۵ ساعت - درجه و 1 دقیقه (51%) بود. کمترین میزان درصد تتراپلوئیدی در این دما، با شوک 55 ساعت - درجه و دوره 5 دقیقه معادل $17/1\%$ به دست آمد ($p < 0.05$). در گروه تخمکی زیر ۵mm، بیشترین و کمترین درصد تتراپلوئیدی به ترتیب مربوط به تیمار 28°C ، ۶۵ ساعت - درجه و 5 دقیقه (76%) و 28°C ، ۴۵ ساعت - درجه و 1 دقیقه ($18/7\%$) و سپس 28°C ، ۸۵ ساعت - درجه و 10 دقیقه ($17/7\%$) بود ($p < 0.05$). در هر دو گروه اندازه تخمک، بهترین درصد تتراپلوئیدی در دمای 28°C و زمان ۶۵ ساعت - درجه پس از لقاح حاصل شد (تصویر ۲).



جنین‌های آنیوپلویید (۲۷)، خروج اسپرم از تخمک در اثر اعمال شوک و در نتیجه تولید جنین‌های هاپلویید (۲۱) و همچنین افزایش بیان برخی پروتئین‌های خاص مرتبط با استرس نظیر (HSP70) Heatshock protein از این جمله است (۱۷). همچنین دستکاری‌های غیر ضروری تخم خصوصاً در مرحله حساس تخم لقاح یافته به جابه‌جایی نیز می‌تواند از دیگر عوامل دخیل در افزایش تلفات باشد. به طور مثال در ۴ ساعت اولیه پس از لقاح حساسیت تخم‌ها دو برابر ساعت اول پس از لقاح است (۱۲)، از این رو دستکاری تخم‌ها تا ۶ ساعت پس از لقاح ممکن است بقاء لاروی را تحت تأثیر قرار دهد (۳۰). همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که حساسیت جنین‌های حاصل از تخمک‌های کوچکتر نسبت به تخمک‌هایی با اندازه بزرگتر از ۵mm خصوصاً در مرحله چشم‌زدگی نسبت به تیمارهای شوک حرارتی بیشتر است و لذا تلفات بیشتری را نشان می‌دهند. میزان بقاء بالاتر لاروهای حاصل از تخم‌های بزرگتر، نسبت به لاروهای حاصل از تخم‌های کوچکتر پیش از این نیز گزارش شده است (۲۵، ۲۹). احتمالاً ذخیره انرژی بیشتر تخم‌های درشت‌تر به دلیل زرده بیشتر قابلیت بالاتری برای تحمل استرس‌ها را ایجاد می‌کند اگرچه علت واقعی این پدیده باید مورد بررسی دقیق قرار گیرد. بروز ناهنجاری‌های ریختی در لاروهای حاصل لقاح در آبزیان طبیعی است. ناهنجاری‌های ریختی در مقادیر کمتر از ۱٪ در گروه‌های شاهد سایر آزمایش‌ها نیز مشاهده شده است. از جمله Preston و همکاران در سال ۲۰۱۳، ۱۳-۰/۵ ناهنجاری ریختی را در گروه‌های شاهد قزل‌آلای قهوه‌ای *Salmo trutta* گزارش کردند (۲۳). افزایش بروز ناهنجاری‌ها در جنین‌های تیمار شده با شوک حرارتی می‌تواند به دلیل افزایش حضور انواع آنیوپلویید یا هاپلویید در جنین‌ها باشد. بروز چنین پدیده‌هایی در اثر اعمال شوک حرارتی یا سایر شوک‌های مرتبط با دستکاری کروموزومی پیش از این نیز گزارش شده است (۲۳، ۱۶).

در تحقیق حاضر نسبت‌های مختلفی از تتراپلوییدی در بچه‌ماهیان حاصل شد با این وجود در برخی موارد به دلیل بالا بودن دمای شوک یا نامناسب بودن زمان آغاز شوک و یا دوره طولانی شوک، تلفات کامل تخم‌ها قبل از تفریح یا پیش از آغاز تغذیه خارجی مشاهده شد که امکان سنجش درصد و بازده تتراپلوییدی را غیرممکن می‌کرد. استفاده از شوک حرارتی برای القای پلوییدی، تریپلوییدی و تتراپلوییدی در آزادماهیان پیش از این نیز گزارش شده است (۲، ۳، ۶، ۱۰). با این وجود بنا به دلیل مختلفی نظیر ویژگی‌های خاص شوک نظیر درجه حرارت شوک، دوره شوک دهی و زمان آغاز شوک (۱۰)، دمای آب حوضچه‌های نگهداری مولدین یا آب مخازن نگهداری تخم‌ها پس از لقاح و قبل از اعمال شوک (۲۰)، کیفیت گامت‌های مورد استفاده، خصوصاً درجه رسیدگی (فوق رسیدگی) تخمک‌ها (۵) و حساسیت خاص هر نژاد و یا حتی هر فرد نسبت به اعمال شوک (۱۸)، تفاوت‌های چشمگیری در بازده شوک مشاهده می‌شود. در این تحقیق بالاترین بازده تتراپلوییدی در هر دو گروه تخمکی در دمای

در خصوص بازده تتراپلوییدی، نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اثر تمامی عوامل مورد بررسی نظیر درجه حرارت شوک، زمان آغاز شوک و همچنین قطر تخمک (به جز دوره) به تنهایی بر بازده شوک تأثیرگذار بود. علاوه بر این اثر توأمان، دوگانه یا چندگانه عوامل فوق بر بازده تتراپلوییدی در قزل‌آلای رنگین‌کمان معنی‌دار بود ($p < 0.05$)، جدول ۴). بازده تتراپلوییدی برای تخمک‌های بالای ۵mm در دمای 28°C در دامنه ۲/۲ الی ۱۳٪ بود. میزان بازده در دمای 32°C به حداکثر ۱۳٪ رسید. به دلیل عدم امکان تشخیص افراد تتراپلویید، بازده تتراپلوییدی در گروه تحت تیمار شوک 30°C ، صفر در نظر گرفته شد (تصویر ۳). در گروه تخمک‌های زیر ۵mm، بازده تتراپلوییدی در دماهای 28°C ، ۳۰ و ۳۲ به ترتیب معادل ۰/۵، ۷٪، ۰/۴ الی ۴/۲٪ و حداکثر ۷٪ بود (تصویر ۳). هیچ نمونه تتراپلوییدی در گروه‌های شاهد مشاهده نشد، لذا بازده تتراپلوییدی برای این گروه‌ها صفر بود (تصویر ۳).

بهترین بازده تتراپلوییدی در دمای 28°C در گروه بالای ۵mm به ترتیب معادل ۱۳٪ مربوط به شوک حرارتی 28°C ، دوره ۱۰ دقیقه و در فاصله زمانی ۶۵ ساعت - درجه پس از لقاح و ۱۲٪ مربوط به دمای 28°C ، دوره ۱ دقیقه و فاصله زمانی ۵۵ ساعت - درجه پس از لقاح بود. دمای 32°C در دوره ۱ دقیقه و در فاصله زمانی ۶۵ ساعت - درجه پس از لقاح نیز بازده شوک معادل (۱۳٪) را ایجاد کرد (تصویر ۳). کمترین میزان بازده تتراپلوییدی در این گروه اندازه تخمکی (بالای ۵mm) مربوط به تیمار 28°C ، زمان ۵۵ ساعت - درجه و دوره ۵ دقیقه، معادل ۲/۲٪ بود (تصویر ۲). در حالی که در گروه زیر ۵mm، بالاترین میزان بازده تتراپلوییدی در تیمارهای 28°C ، زمان آغازین ۷۵ ساعت - درجه و دوره ۵ دقیقه، معادل ۳۲٪، زمان ۶۵ ساعت - درجه و دوره ۱ دقیقه، معادل ۷٪ بود (تصویر ۳). در دمای 30°C ، بازده تتراپلوییدی تنها برای تخمک‌های کمتر از ۵mm محاسبه شد. در این گروه تخمکی نیز، تیمارهایی با بازده صفر به دلیل تلفات کامل قبل از مرحله شنای فعال و یا عدم القای تتراپلوییدی نیز مشاهده شد (تصویر ۳). با این حال، بیشترین میزان بازده تتراپلوییدی در این دما و گروه اندازه تخمک، مربوط به تیمار ۸۵ ساعت - درجه پس از لقاح یا دوره ۵ دقیقه (۵/۶٪) و کمترین آن مربوط به تیمار ۸۵ ساعت - درجه پس از لقاح و دوره ۱۰ دقیقه (۰/۲۶٪) بود (تصویر ۳، $p < 0.05$).

بحث

تیمار شوک حرارتی صرف نظر از درجه حرارت، دوره و زمان آغاز شوک منجر به افزایش تلفات در هر دو گروه تخمکی و نیز افزایش معنی‌دار ناهنجاری‌های ریختی شد. کاهش بازماندگی لاروها در انواع دستکاری شده کروموزومی در مقایسه با گروه‌های دیپلویید پیش از این نیز در برخی دیگر از گونه‌های آبزیان نظیر قزل‌آلای رنگین‌کمان (۱۶) و توربوت (۲۲) گزارش شده است. موارد مختلفی به عنوان عامل اثرگذار بر کاهش بازماندگی خصوصاً در مراحل قبل از چشم‌زدگی مطرح شده‌اند که ایجاد



باشد (۱۵). این میزان اختلاف در FCI در بین جمعیت‌های مختلف می‌تواند بین ۲۰ تا ۵۰ دقیقه باشد (۱۳). لذا شاید تفاوت در زمان اولین تسهیم جنینی در تخم‌های مورد استفاده در این تحقیق با سایر مطالعات پیش از این، از دلایل اصلی تفاوت در زمان بهینه آغاز شوک‌دهی و طول دوره شوک باشد. با این وجود، اثبات این نظر نیازمند تعیین زمان دقیق تسهیم جنینی در دو گروه تخمکی مورد استفاده از قزل‌آلای رنگین‌کمان در این تحقیق خواهد بود. همچنین به نظر می‌رسد، که تخم‌هایی با اندازه کمتر از ۵mm در مقایسه با انواع بزرگتر خود به دلیل فضای کوچکتر بین غشاء سلول و مرکز آن، سریع‌تر تحت تأثیر شوک حرارتی قرار گرفته و لذا دوره کوتاه‌تر ۵ دقیقه یا کمتر در مقایسه با دوره‌های زمانی طولانی‌تر برای القای شوک در این دسته از تخمک‌ها پیشنهاد می‌شود. بازده تتراپلویدی در این تحقیق اندک و در بهترین شرایط برای تخمک‌هایی با قطر بیش از ۵mm حدود ۱۳٪ و در تخمک‌های کوچکتر از ۵mm حدود ۷٪ برآورد شد. بازده اندک تتراپلویدی عمدتاً به سبب تلفات بالای تخم پیش از این نیز گزارش شده است (۲، ۱۶). به نظر می‌رسد دستکاری فیزیکی تخم‌ها در زمان آغاز یا تکمیل تقسیم سلولی می‌تواند منجر به بروز صدمات جدی به جنین و تلفات شدید آنها شود. کمتر بودن بازده تتراپلویدی در تخمک‌های با قطر کوچکتر، برخلاف درصد تتراپلویدی بالاتر آنها نسبت به تخم‌های بزرگتر شاید به سبب حساسیت بیشتر تخمک‌ها با اندازه کوچکتر و در نتیجه نرخ بالاتر تلفات آنها در مقایسه با انواع بزرگتر باشد. در خصوص رابطه بین بقاء و اندازه اولیه تخمک در آزادماهیان نتایج متناقضی منتشر شده است. به عنوان مثال در قزل‌آلای رنگین‌کمان (۹، ۲۶)، قزل‌آلای قطبی *Salvelinus alpinus* (۲۹) و قزل‌آلای خال قرمز *Salmo trutta* (۸) بقای بالاتر تخم‌های درشت‌تر حداقل در مراحل آغازین انکوباسیون تأیید رسیده است. اگرچه در برخی دیگر از مطالعات، ارتباط چندانی در میزان بقاء و اندازه اولیه تخمک مشاهده نشده است (۱). به نظر می‌رسد نتایج این تحقیق می‌تواند بیانگر اثر مثبت اندازه تخمک بر بقای اولیه حداقل تا مرحله آغاز چشم‌زدگی در شرایط تنش حرارتی در قزل‌آلای رنگین‌کمان باشد. تیمار ۳۰°C در گروه تخمک با اندازه بیش از ۵mm منجر به القای تتراپلویدی نشد، در حالی که درجه حرارت‌های بالاتر و پایین‌تر از ۳۰°C، ۲۸°C و ۳۲°C قادر به القای تتراپلویدی بود. چنین فرایندی در تحقیقات پیش از این گزارش نشده است، با این وجود می‌توان دو پدیده مختلف را در این خصوص دخیل دانست. از جمله موارد می‌توان به حساسیت‌های فردی درون گله مولدین به شوک برای القای پلویدی اشاره کرد. این احتمال مطرح است که تمامی گروه‌های تخمکی که در آن مرز حله از آزمایش در معرض شوک قرار گرفته‌اند از مولدینی تأمین شده باشند که نسبت به اعمال شوک پاسخ مناسبی را ارائه ندادند. حساسیت متفاوت گروه‌های مختلف تخمک نسبت به اعمال یک شوک یکسان برای القای پلویدی در قزل‌آلای رنگین‌کمان پیش از این نیز گزارش شده است (۱۴). اگرچه به دلیل مخلوط شدن تخمک‌های

۲۸°C حاصل شد. در خصوص تعیین دمای بهینه برای القای پلویدی در آزادماهیان، Pandian & Koteeswaran در سال ۱۹۹۸ گزارش کردند که دمای مخازن شوک‌دهی برای القای موفقیت‌آمیز پلویدی در آزادماهیان باید در حدود ۱۸±۱°C بیشتر از دمای آب نگهداری مولدین و یا تخم‌ها باشد تا علاوه بر القای مناسب پلویدی، از تلفات شدید تخم‌ها در حین شوک‌دهی ممانعت به عمل آید (۲۱). لذا با توجه به دمای نگهداری تخم قبل از اعمال شوک که حدود ۱۱°C بود، دمای بهینه حدود ۲۸°C چندان دور از انتظار نیست.

در خصوص طول دوره شوک و یا زمان بهینه آغاز شوک‌دهی گزارش‌های متفاوتی تاکنون منتشر شده است. به عنوان مثال Kalbassi و همکاران در سال ۲۰۰۳، با استفاده از شوک ۲۸°C، بهترین بازده تتراپلویدی را در اعمال شوک در ۷۴ ساعت - درجه با دوره ۱۲ دقیقه گزارش نمودند (۱۶). در حالی که Thorgaard و همکاران در سال ۱۹۸۱ بهترین زمان آغاز شوک را ۵۰ ساعت - درجه و به مدت ۱ دقیقه در دمای ۳۶°C گزارش نموده است (۲۸). برخلاف آن، Chourrout در سال ۱۹۸۸ استفاده از شوک حرارتی ۲۸°C را در دوره زمانی کمتر از ۵۵ ساعت - درجه برای القای تتراپلویدی در قزل‌آلای رنگین‌کمان بی‌حاصل دانسته و بهترین زمان را برای القای تتراپلویدی ۸۵ ساعت - درجه عنوان کردند (۳). در حالی که در این تحقیق، بالاترین درصد تتراپلویدی در هر دو گروه تخم‌های بالاتر و کمتر از ۵mm عمدتاً در زمان ۶۵ ساعت - درجه پس از لقاح مشاهده شد. به نظر می‌رسد که تفاوت در زمان تقسیم سلولی در میان مولدین جمعیت‌های مختلف یا حتی در میان مولدین ماده متعلق به یک گله می‌تواند توجیه‌کننده این تفاوت‌ها در زمان بهینه آغاز شوک یا طول دوره شوک بین گزارش‌های متفاوت باشد. چنین تفاوت‌هایی می‌تواند متأثر از نژاد یا ذخیره ژنتیکی متفاوت مولدین و یا حتی اندازه متفاوت تخمک باشد. همچنین اختلاف در دمای آب انکوباسیون میان این تحقیق (۱۱°C) در مقایسه با دیگر مطالعات (محدوده بین ۹°C تا ۱۰°C) می‌تواند تا حدودی تفاوت در زمان بهینه آغاز شوک و یا دوره مناسب شوک‌دهی را توجیه کند. یافته‌های اخیر بر اساس مطالعات بافت‌شناسی نشان می‌دهد که غالباً اعمال شوک حرارتی تنها اندکی پیش از پرومتافاز میتوزی، منجر به ایجاد بازده تتراپلویدی بیشتری در مقایسه با سایر زمان‌ها در آزادماهیان می‌شود (۱۹). لذا به نظر می‌رسد برای تعیین زمان بهینه القای شوک، توجه به اولین تسهیم جنینی (FCI cleavage interval) First از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. تاکنون زمان‌های مختلفی نظیر ۵۵-۷۰٪ و ۱۰۰-۱۱۰٪ از FCI (۱۳) یا ۵۶/۳ تا ۶۸/۸٪ از فاصله زمانی اولین تسهیم جنینی به منظور زمان بهینه برای القای تتراپلویدی در آزادماهیان گزارش شده است (۱۴، ۲۰). با این وجود، نتایج مطالعات مختلف نشان داد که زمان اولین تسهیم جنینی در بین جمعیت‌های مختلف، گروه‌های تخمکی متفاوت و همچنین در یک گروه تخمکی، می‌تواند تا ۲۰٪ متفاوت



References

- Blanc, J.M. (2002) Effects of egg size differences on juvenile weight between and within lots in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. J World Aquacult Soc. 33: 278-286.1.
- Chourrout, D. (1982) Tetraploidy induced by heat shocks in rainbow trout *Salmo gairdneri* R. Reprod Nutr Dev. 22: 569-574.
- Chourrout, D. (1988) Induction of gynogenesis, triploidy and tetraploidy in fish. ISI Atlas of Science. Anim Plant Sci. 1: 65-70.
- Chourrout, D., Foisil, L. (1992) Chromosome doubling by pressure treatments for tetraploidy and mitotic gynogenesis in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: re-examination and improvement. Aquacult Fish Manag. 23: 567-575.
- Diaz, N.F., Iturra, P., Veloso, A., Estay, F., Colihueque, N. (1993) Physiological factors affecting triploid production in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Aquaculture. 114: 33-40.
- Dorafshan, S., Kalbassi, M.R., Pourkazemi, M., Amiri, B.M., Soltan Karimi, S. (2008) Effects of triploidy on the *Caspian salmon, Salmo trutta caspius* haematology. Fish Physiol Biochem. 34: 195-200.
- Dunhum, R.A. (2004) Aquaculture Fisheries Biotechnology, Genetic Approaches. CABI Publishing. London, UK.
- Einum, S., Fleming, I.A. (1995) Maternal effects of egg size in brown trout *Salmo trutta*; norms of reaction to environmental quality. The Royal Soc. 266: 2095-2100.
- Einum, S., Hendry, A.P., Fleming, I.A. (2002) Egg-size evolution in aquatic environments, does oxygen availability constrains size? The Royal Soc. 269: 2325-2330.
- Felip, A., Zanuy, S., Carrillo, M., Piferrer, F. (2001) Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. Genetica. 111: 175-195.
- Fujimoto, T., Yasui, G.S., Hayakawa, M., Sakao, S., Yamaha, E., Arai, K. (2010) Reproductive capacity

مولدین با یکدیگر احتمال بروز این پدیده می‌تواند بسیار اندک باشد. علاوه بر این، شاید ارزیابی ۵ الی ۲۰ قطعه لارو برای بررسی صحت پلوئیدی کافی نبوده است. به بیان دیگر، با توجه به اینکه بررسی گسترش‌های خونی و مناطق سازمان دهنده هستکی تنها در تعداد اندکی از لاروهای حاصل از آزمایش صورت گرفت، این احتمال وجود دارد که شاید به طور تصادفی هیچ یک از نمونه‌های مورد بررسی تتراپلوئید نباشند و در نتیجه، درصد القای تتراپلوئیدی در این گروه صفر در نظر گرفته شده باشد.

به طور کلی بر اساس نتایج این تحقیق می‌توان بیان نمود که جهت القای تتراپلوئیدی در قزل‌آلای رنگین کمان (گله ایرانی در شرایط توصیف شده در این تحقیق) در دمای آب انکوباسیون (۱۱°C) دمای مناسب جهت القای شوک حرارتی، ۲۸°C است. دوره و زمان آغاز شوک بسته به قطر تخمک متفاوت بوده و به طور معمول، تخمک‌های کوچکتر، تلفات بیشتری را در مقایسه با انواع بزرگتر تحت تأثیر شوک حرارتی، خصوصاً دوره‌های طولانی مدت نشان می‌دهند که بر بازده تتراپلوئیدی مؤثر است.

تشکر و قدردانی

نگارندگان از تمامی پرسنل مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج وابسته به موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور به سبب همکاری‌های ارزنده ایشان در انجام این تحقیق سپاسگزاری می‌نماید. بخش اعظم هزینه‌های انجام این تحقیق از محل پژوهانه شماره ۵۳۹۴۹/۵۰۲/۹۰/پرداختی از سوی معاونت پژوهشی دانشگاه صنعتی اصفهان به دکتر سالار درافشان تامین شده است.

of neo-tetraploid loaches produced using diploid spermatozoa from a natural tetraploid male. Aquaculture. 308: S133-S139.

- Jensen, J.O.T., Alderdice, D.F. (1983) Changes in mechanical shock sensitivity of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* eggs during incubation. Aquaculture. 32: 303-312.
- Hershberger, W.K., Hostuttler, M.A. (2005) Variation in time first cleavage in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* embryos A major factor in induction of tetraploids. J World Aquacult Soc. 36: 96-102.
- Hershberger, W.K., Hostuttler, M.A. (2007) Protocols for more effective induction of tetraploid rainbow trout. North Am J Aquacult. 69: 367-372.
- Horstgen-Schwark, G. (1993) Initiation of tetraploid breeding line development in rainbow trout,



- Oncorhynchus mykiss*. Aquat Fish Manag. 24: 641-652.
16. Kalbassi, M.R., Bagheri, A., Pourkazemi, M., Abdolhay, H. (2003) Tetraploid induction in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using heat shock. Iran Sci Fish J. 12: 143-153.
 17. Malison, J.A., Kayes, T.B., Held, J.A., Barry, T.P., Amundson, C.H. (1993) Manipulation of ploidy in yellow perch *Perca flavescens* by heat shock, hydrostatic pressure shock and spermatozoa inactivation. Aquaculture. 110: 229-242.
 18. Moffett, I.J.J., Crozier, W.W. (1995) An investigation into the reproducibility of triploid brown trout, *Salmo trutta* L., production using heat shock. Aquacult Res. 26: 67-70.
 19. Myers, J.M. (1986) Tetraploid induction in *Oreochromis* spp. Aquaculture. 57: 281-287.
 20. Palti, Y., Li, J.J., Thorgaard, G.H. (1997) Improved efficiency of heat and pressure shocks for producing gynogenetic rainbow trout. Prog. Fish-Cult. 59: 1-13.
 21. Pandian, T.J., Koteeswaran, R. (1998) Ploidy induction and sex control in fish. Hydrobiologia. 384: 167-243.
 22. Piferrer, F., Cal, R.M., Gomez, C., Bouza, C., Martinez, P. (2003) Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*) II. Effect of cold shock timing and induction of triploidy in a large volume of eggs. Aquaculture. 220: 821-831.
 23. Preston, A.C., Taylor, J.F., Craig, B., Bozzolla, P., Penman, D.J., Migaud, H. (2013) Optimisation of triploidy induction in brown trout (*Salmo trutta* L.). Aquaculture. 414-415: 160-166.
 24. Quillet, E., Cevassus, B., Devaux, A. (1988) Timing and duration of hatching in gynogenetic, triploid, tetraploid and hybrid progenies in rainbow trout. Genet Sel Evol. 17: 1-17.
 25. Rideout, R.M., Trippell, E.A., Litvak, M.K. (2005) Effects of egg size, food supply and spawning time on early life history success of haddock, *Melanogrammus aeglefinus*. Mar Ecol-Prog Ser. 285: 169-180.
 26. Springate, J.R.C., Bromage, N.R. (1985) Effects of egg size on early growth and survival in rainbow trout. Aquaculture. 47: 163-172.
 27. Sutterlin, A.M., Halder, J., Benfey, T.J. (1987) Early survival and subsequent morphological deformities in landlocked, anadromus and hybrid (L×A) diploid and triploid Atlantic salmon. Aquaculture. 64: 157-164.
 28. Thorgaard, G.H., Jazwin, M.E., Steir, A.R. (1981) Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout. Transac. Am Fish Soc. 110: 546-550.
 29. Wallace, J.C. Aasjord, D. (1984) An investigation of the consequences of egg size for the culture of Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. J Fish Biol. 24: 427-435.
 30. Winckler-Sosinski, L., Schwarzbald, A., Schulz, U.H. (2005) Survival of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Salmoniformes - Salmonidae) eggs in an Altitude stream in southern Brazil. Acta Limn Br. 17: 465-472.



Optimal heat shock condition for tetraploidy induction in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Dorafshan, S.^{1*}, Vafaei Saadi, A.², Nekoeifard, A.³

¹Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan-Iran

²Graduated from the Faculty of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan-Iran

³Shahid Motahhari Genetic and Breeding Center of Coldwater Fishes of Yasouj and Artemia Reference Center in the Middle and West of Asia, Urmiyeh, Urmiyeh-Iran

(Received 29 September 2014, Accepted 22 November 2014)

Abstract:

BACKGROUND: Tetraploid rainbow trout has a key role in producing infertile triploid fish by indirect method and introducing them in cultivation system. **OBJECTIVES:** The purpose of the present study was to determine the optimal heat shock for tetraploidy induction in rainbow trout with emphasis on egg size. **METHODS:** The efficiency of different shock temperatures: 28, 30 and 32 °C, durations: 1, 5 and 10 min and starting time: 45, 55, 65, 75 and 85 degree-hour post fertilization (dhPF) on two different egg size diameters (4.2 ± 0.12 and 5.5 ± 0.20 mm) for tetraploidy induction in rainbow trout were analyzed. Tetraploidy rates were determined using red blood cell sizes as well as number of nucleolar organizing regions (NORs) at swim up stage. **RESULTS:** Tetraploidy rates were in the range of 18-69 and 18-76 % for the groups of eggs over and less than 5 mm in diameter respectively. The statistical analysis showed that the highest tetraploidy efficiency (13%) for the larger egg size achieved by treating eggs at 28°C, for 10 min starting at 65dhPF. While for the smaller egg size, the highest efficacy (7%) was observed in group treated at 28°C, for 5 min starting at 75 dhPF. **CONCLUSIONS:** Although tetraploidy induction has been done previously in rainbow trout, for the first time, the results of this study showed that tetraploidy efficacy was affected by egg size as well as other shock related parameters.

Key words: chromosome change, egg size, rainbow trout

Figure Legends and Table Captions

Table 1. The effects of different heat shock treatments on the survival up to eyed, hatch and swim up stages as well as some morphological abnormalities in rainbow trout, group with egg size more than 5 mm.

Table 2. The effects of different heat shock treatments on the survival up to eyed, hatch and swim up stages as well as some morphological abnormalities in rainbow trout, group with egg size less than 5 mm.

Table 3. Summary of analysis of variance showing the effects of shock temperature, duration, starting time and egg diameter on tetraploidy percentage.

Table 4. Summary of analysis of variance showing the effects of shock temperature, duration, starting time and egg diameter on tetraploidy efficiency.

Figure 1. Red blood cells in diploid (a) and tetraploid (b) rainbow trout. Larger cell dimensions were obvious in tetraploids in comparison with diploids.

Figure 2. Tetraploidy rates (%) among different groups (temperature, starting time and duration) in two groups of egg size, over and less than 5 mm in diameter. In each egg size group, the mean with at least one same letter did not showed significant difference (DMRT, $p > 0.05$). By t-Test analysis, the non-significant difference between two egg size groups at each treat (temperature, starting time and duration) was showed by *.

Figure 3. Tetraploidy efficiency (%) among different groups (temperature, starting time and duration) in two groups of egg size, over and less than 5 mm in diameter. In each egg size group, the mean with at least one same letter did not showed significant difference (DMRT, $p > 0.05$). By t-Test analysis, the significant difference between two egg size groups at each treat (temperature, starting time and duration) was observed.



*Corresponding author's email: sdorafshan@cc.iut.ac.ir, Tel: 031-33913580, Fax: 031-33912840

J. Vet. Res. 69, 4:411-421, 2014