مجموعه مقالات
چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹٤، پژوهشکده کشاورزی هسته ای)
The 4th National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

مقایسه میزان تفریخ، بد شکلی و بازماندگی بین لارو تریپلوئید و لارو تمام ماده ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تولید شده با استفاده از پرتو گاما

غلامرضا شاه حسینی*[۱]، مهدی سلطانی[۲]، مرضیه حیدریه[۱]، اشکان زرگر[۲]، علی طاهری میر قائد[۲]، علیرضا نیسی[۳]

۱. عضو هیأت علمی پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، پژوهشکده کشاورزی هسته ای،
۲. عضو هیأت علمی دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان
۳. کارشناس ارشد، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، پژوهشکده کشاورزی هسته ای

*نویسنده مسئول: gshahhosseini@nrcam.org

چکیده: جهت تخریب ژنوم اسپرم ماهی قزل آلای رنگین کمان از پرتو گاما با دزهای ۴۵۰، ۶۰۰، ۷۵۰، ۹۰۰ و ۱۰۵۰گری و جهت القای دیپلوئیدی پس از لقاح مصنوعی از شوک دمایی ۲۸ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. پس از تفریخ ماهیان درصد تفریخ، بدشکلی و بازماندگی ماهیان گروه های مختلف اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل بیشترین میزان بدشکلی و کمترین میزان تفریخ و بازماندگی را در گروه تریپلوئید نشان می‌دهد ($p<۰/۰۵$). همچنین نتایج نشان داد که تفاوتی بین بازماندگی و درصد بدشکلی سایر گروه های آزمایشی ملاحظه نمی‌شود. نتایج پژوهش نشان می‌دهد استفاده از پرتو ۴۵۰ گری جهت ماده‌زایی ماهی فزل آلای رنگین کمان بیشترین بازده را در بین گروه های ماده زایی شده دارد ($p<۰/۰۵$).

واژگان کلیدی: قزل آلای رنگین کمان، پرتو گاما، ماده زایی، تریپلوئید، بدشکلی

Comparison of hatching, deformity and survival rates between triploid larva and all by use of gamma irradiation female larvas in rainbow trout's (*Oncorhynchus mykiss)*

G. Shahhosseini [1]*, M. Soltani[2], M. Heidarieh[1], A. Taheri Mirghaed[2], A. Zargar[2], A. Neissi[1]

Nuclear Agriculture Research School – Nuclear Science and Technology Research Institute[1], Faculty of Veterinary Medicine - University of Tehran[2]

* gshahhosseini@nrcam.org

Abstract: Gamma irradiation with doses of 450, 600, 750, 900 and 1050 Gray was used for DNA sperm damage in rainbow trout and heat shock (28 °C) was used for induction of the diploid after fertilization. Fish hatch rate, deformity and survival of fish was measured after hatching. The results demonstrated highest deformity and lowest hatching and survival in triploid group ($p<0.05$). Also the difference between hatching, survival and deformation rate is not observed in other experimental groups. The results showed that the 450 group has been maximum efficiency in comparison with other gynogenesis groups in rainbow trout ($p<0.05$).

Keywords: Rainbow Trout, Gamma Irradiation, Gynogenesis, Triploid, Deformity

مقدمه

یکی از مشکلات موجود در صنعت پرورش آبزیان، فرارسیدن زودهنگام بلوغ جنسی است [۱, ۲]. در بسیاری از گونه ها از جمله آزادماهیان امکان بالغ شدن جنس نر در طی عملیات پرورش بسیار بالا می باشد در حالی که جنس ماده در این دوره به ندرت بالغ می شود. لذا استفاده از جمعیت های تمام ماده که به طرق مختلف تولید شده باشند، باعث افزایش بازده تولید در این گونه می‌گردد [۲-۵]. پدیده بلوغ جنسی در بسیاری از ماهیان از جمله قزل آلای رنگین کمان باعث کاهش رشد بدن می

شود [۶-۸]. تولید جمعیت ماهی تمام نر قزل آلای رنگین کمان برای عرضه به بازار، با توجه به رشد گناد نر در سال اول پرورش هیچگونه توجیه اقتصادی برای عرضه به بازار ندارد و استفاده از ماهی تمام ماده قزل آلای رنگین کمان برای پرورش با توجه به تولید گناد از سال دوم پرورش به بعد از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. حتی اگر افزایش رشد در کل گله قزل آلای رنگین کمان تمام ماده ۱۰ درصد بیشتر شود در یک مزرعه ۲۰ تنی پرورش قزل آلای رنگین کمان با صرف هزینه کمتر به سود بیشتری می‌رسیم و این از نظر تولیدکننده اهمیت زیادی دارد. زیرا انرژی که باید صرف تولید گوشت شود، صرف توسعه اندام های تولیدمثلی و بروز صفات ثانویه جنسی و رفتارهای تولید مثلی می شود [۲, ۵]. از سوی دیگر بلوغ جنسی باعث کاهش کیفیت گوشت می شود، زیرا چربی و پروتئین ماهیچه تخلیه شده و جای آن را آب می گیرد ونیز رنگدانه های ماهیچه ها خارج شده و وارد تخمک ها می شوند [۴, ۶, ۹]. یکی از راه های افزایش رشد القای تریپلوئیدی می‌باشد که معمولا با شوک حرارتی صورت می گیرد.

از دیگر راه های افزایش بازده القای ماده زایی یا نر زایی با توجه به نوع گونه می‌باشد. در گونه هایی مانند آزادماهیان که ماده‌ها هوموگامت (XX) هستند، برای تولید جمعیت تمام ماده از ژینوژنز استفاده می شود [۱, ۸, ۱۰]. به منظور تولید جمعیت ماهیان ژاینوژنز درگونه قزل آلای رنگین کمان، پس از بررسی میزان رسیدگی جنسی، تکثیر با استفاده از غیر فعال کردن اسپرم نر با دزهای مختلف با اشعه گاما ساطع شده از کبالت ۶۰ پرتودهی انجام می‌گردد. نتایج تحقیقات نشان می دهد که القای تریپلوئیدی با استفاده از شوک دمایی می‌تواند تأثیر زیادی روی بدشکلی آزاد ماهیان از جمله قزل آلای رنگین کمان داشته باشد [۸, ۱۱-۱۳]. با توجه به اینکه از شوک دمایی برای ماده زایی این گونه از ماهی هم استفاده میگردد ماده زایی نیز ممکن است روی میزان بازماندگی تأثیر داشته باشد و در نهایت روی میزان بازماندگی لارو تفریخ شده تأثیر منفی داشته باشد. هدف از این مطالعه بررسی میزان بدشکلی و بازماندگی لارو قزل آلای رنگین کمان تریپلوئید القا شده با شوک دمایی و همچنین لارو قزل آلای رنگین ماده زایی شده با پرتو گاما و شوک حرارتی می‌باشد.

مواد و روشها

پس از جمع آوری اسپرم از ماهی مولد نر قزل آلای رنگین کمان جهت غیر فعال سازی ژنتیکی اسپرم اخذ شده از پرتو گاما استفاده شد. از محلول رقیق کننده حاوی گلاسین (CaCl2.2H2O 0.735 g/l و NaCl 7.705 g/l با pH برابر ۷,۷)، برای رقیق کردن اسپرم استفاده شد. اسپرم با دزهای ۴۵۰، ۶۰۰، ۷۵۰، ۹۰۰ و ۱۰۵۰ گری پرتو گاما حاصل از کبالت ۶۰ در آزمایشگاه گاماسل با استفاده از(Gamma cell PX-30-ISSIE, Russia) با دز ۰/۱۵۶ گری بر ثانیه پرتودهی شد. در مرحله بعد لقاح به صورت خشک در گونه های قزل آلا و آزاد با مخلوط نمودن تخمک و اسپرم پرتودیده (۱-۰/۵ میلی لیتر اسپرم برای هر ۱۰۰۰ قطعه تخمک) انجام شد. جهت القای پلوییدی در تخم‌های گونه های قزل آلا حمام آبی با درجه حرارتهای ۲۸ درجه سانتی گراد برقرار گردیده و تخم های لقاح یافته در زمان ۱۰ دقیقه پس از لقاح به مدت ۱۰ دقیقه تحت شوک حرارتی قرار گرفت و پس از اعمال شوک نیز به سیستم مدار بسته پرورش تخم ماهی آزاد با دمای ۱۱ درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. بمنظور بررسی شرایط اپتیمال لقاح اسپرم و تخمک یک گروه شاهد در نظر گرفته شده که پس از لقاح با تخمک و اسپرم

نرمال، بدون استفاده از شوک حرارتی می باشد. همچنین بمنظور بررسی شرایط اپتیمال شوکهای حرارتی یک گروه شاهد هاپلوئیدکه حاصل لقاح اسپرم اشعه داده و تخمک نرمال ولی بدون شوک حرارتی است (هاپلوئید) نیز در نظر گرفته شد. همچنین برای القای تریپلوئیدی اسپرم عادی (پرتو نخورده) هاپلوئید با تخمک هاپلوئید لقاح داده شد و سپس بلافاصله تخم های لقاح یافته دیپلوئید با استفاده از شوک حرارتی (گرمایی) ۰/۵±۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه القای تریپلوئیدی شد.

طرح آزمایش

در قالب یک طرح کاملاً تصادفی تخم های تیمار های مختلف آزمایشی (تریپلوئید، ۴۵۰، ۷۵۰، ۶۰۰، ۹۰۰، و۱۰۵۰ گری) با ۳ تکرار (هر کدام ۱۰۰۰ تخم) برای طی دوره تکامل جنینی درون انکوباتور مدار بسته قرار داده شدند . مخزن نگهداری آب در این انکوباتور توسط یک هواده مرکزی به صورت شبانه روزی هوا دهی و دمای آن نیز به صورت شبانه روزی کنترل و در دمای ۱۰درجه سانتی گراد به صورت اتوماتیک ثابت نگداشته می‌شد. جریان آب در کلیه واحدهای آزمایشی به صورت شبانه روزی برقرار بود.

میزان تفریخ، بدشکلی و بازماندگی لارو

بعد از تفریخ لارو ماهی تیمارهای مختلف میزان تفریخ و بدشکلی ماهیان آزاد تیمارهای مختلف اندازه گیری شد و همچنین میزان بازماندگی لارو پس از جذب کیسه زرده در تیمارهای مختلف آزمایشی اندازه گیری شد.:

۱۰۰ × (تعداد کل لاروهای تفریخ شده / تعداد لارو با قیمانده از تفریخ)=درصد بازماندگی

۱۰۰ × (تعداد کل لاروهای نمونه برداری شده / تعداد لارو ماهیان بدشکل)=درصد بدشکلی

۱۰۰ × (تعداد کل لاروهای نمونه برداری شده / تعداد لارو ماهیان. تفریخ شده)=درصد تفریخ

تجزیه و تحلیل آماری داده ها

نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف اسمیرنف بررسی شد. داده‌های درصدی پیش از انجام آنالیزها با (Arc sin) تبدیل شدند. برای مقایسه میانگین داده‌ها از تجزیه واریانس یک‌طرفه (ONE-WAY-ANOVA) انجام و سطح معنی‌دار بودن در بین تیمارها از طریق آزمون (Tukey) در سطح احتمال ۵ درصد انجام گردید[۱۴]. تجزیه و تحلیل آماری به وسیله نرم‌افزار SPSS 17 در محیط ویندوز انجام شد.

نتایج و بحث

میزان تفریخ، بدشکلی و بازماندگی لارو

نتایج حاصله نشان داد که پرتودهی سبب کاهش تریپلوئیدی تأثیر منفی روی بدشکلی، درصد تفریخ و بازماندگی ماهیان قزل آلای رنگین کمان دارد ($p<۰/۰۵$). همچنین نتایج نشان داد که در کلیه تیمارها ماده زایی تأثیری روی بدشکلی ندارد (جدول). نتایج نشان داد میزان تفریخ لارو در تیمار پرتودهی شده به صورت معنی داری کاهش پیدا کرده بود ($p<۰/۰۵$). ولی میزان بازماندگی لارو در کلیه تیمارهای ماده زایی شده با پرتو گاما تفاوتی با تیمار شاهد نداشت (جدول)

جدول- مقایسه میانگین درصد تفریخ، بدشکلی و بازماندگی ماهی قزل الای رنگین کمان تحت دزهای مختلف پرتو تابی

	شاهد	دزهای پرتو تابی (گری)				
		٤٥٠	٦٠٠	٧٥٠	٩٠٠	١٠٥٠	تریپلوئید
درصد تفریخ	۸۱±۲/۲^{d}	۵۶±۳/۱۱^{c}	۳۸±۲/۴۱^{b}	۴۱±۱/۹۷^{b}	۴۰±۲/۴۲^{b}	۳۹±۴/۱۳^{b}	۳۲±۳/۳۲^{a}
درصد بدشکلی	۲±۰/۲^{a}	۳±۰/۴^{a}	۳±۰/۲^{a}	۲±۰/۶^{a}	۲±۰/۴۲^{a}	۲±۰/۱۲^{a}	۸±۰/۱۱^{b}
درصد بازماندگی	۷۰±۱/۳^{b}	۶۹±۲/۶^{b}	۶۸±۲/۲۲^{b}	۶۹±۱/۵۱^{b}	۷۱±۲/۲۲^{b}	۶۸±۲/۱^{b}	۵۴±۲/۴^{a}

اعداد (SD ± میانگین) در یک ردیف با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار هستند ($P < ۰/۰۵$)

برای این کار ابتدا باید کیفیت اسپرم و تخمک مورد بررسی قرار گیرد و پس از حصول اطمینان از آنها در جهت لقاح استفاده کرد. به این منظور ابتدا کیفیت اسپرم و تخمک در این بررسی مورد ارزیابی قرار گرفت که پس از اطمینان از مناسب بودن آنها پروسه لقاح صورت گرفت عدم بروز اختلاف در کیفیت نمونه اسپرم، نشان دهنده شرایط انتقال و حمل مناسب نمونه بوده است. در بعضی از مطالعات اسپرمهای هترولوگ گونه دیگر، بدون شوک یا شوک داده شده برای شروع ژاینوژنز در تخمها استفاده می شود [۷, ۱۴]. در این بررسی از اسپرم هومولوگ گونه قزل آلا استفاده گردید.

یکی از پارامترهای مهم در لقاح میزان تفریخ و بدشکلی می باشد که میزان این بدشکلی به مقدار پرتو تابیده شده شوک حرارتی و شرایط لقاح و انکوباسیون بستگی دارد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد القای ماده زایی ، با استفاده از دزهای مختلف حاصل از پرتو گاما سبب کاهش تفریخ میشود[۱۴]. ولی این القا منجر به افزایش بدشکلی و کاهش بازماندگی نمی‌شود[۵, ۱۵]. با توجه به این میتوان نتیجه گیری کرد استفاده از ماده زایی با هدف افزایش بازده تولید در مقایسه با القای

تریپلوئیدی دارای ارزش اقتصادی بیشتری می‌باشد که استفاده از دز ۴۵۰ گری برای القای ماده زایی در ماهی قزل آلای رنگین کمان پیشنهاد می‌شود.

References:

۱. Bye, V.J. and R.F. Lincoln, *Commercial methods for the control of, sexual maturation in rainbow trout (Salmo gairdneri R.).* Aquaculture, 1986. **57**: p. 299-309.

۲. Sheehan, R., et al., *Better growth in all-female diploid and triploid rainbow trout.* Trans . Am. Fish. Soc, 1999. **128**: p. 491-498.

۳. Pandian, T.J. and S.G. Sheela, *Hormonal induction of sex reversal in fish.* Aquaculture, 1995. **138**: p. 1-22.

۴. Benfey, T.J., *Use of all-female and triploid salmonids for aquaculture in Canada.* Bulletin of the Aquaculture Association of Canada, 1996. **96-2**: p. 6-8.

۵. Omoto, N., et al., *Sex ratio of triploids and gynogenetic diploids induced in the hybrid sturgeon, the bester (Huso huso female X Acipenser ruthenus male).* Aquaculture, 2005. **245**: p. 39-47.

۶. Johnstone, R., et al., *Sex reversal rainbow trout.* Aquaculture, 1979. **18**: p. 13-19.

۷. Yousefian, M., *Stock Identification and Genetic Variation at Microsatellite Loci of Caspian Sea Salmon (Salmo trutta caspius).* World Journal of Fish and Marine Sciences, 2010 . :(۶)۲p. 508-512.

۸. Quillet, E., et al., *The potential of brown trout (Salmo trutta L.) for mariculture in temperate waters.* Agric Sci, 1992. **6**: p. 63-76.

۹. Chouliara, I., et al., *Preservation of Salted, Vacuum-Packaged, Refrigerated Sea Bream (Sparus aurata) fillets by Irradiation, Microbiological, Chemical and Sensory Attributes.* Food Microbiology, 2004. **21**: p. 351-359.

۱۰. Billard, R., *Reproduction in rainbow trout: sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes* .Aquaculture, 1992. **100** p. 263-298.

۱۱. Donaldson, E.M., *Manipulation of reproduction in farmed fish.* Animal Reproduction Science, 1996. **42**(1): p. 381-392.

۱۲. O'Flynn, F., et al., *Comparisons of cultured triploid and diploid Atlantic salmon (Salmo salar L* .(.ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil, 1997. **54**(6): p. 1160-1165.

۱۳. Abedian-Kenari, A., et al., *Dietary nucleotide supplements influence the growth, haemato-immunological parameters and stress responses in endangered Caspian brown trout*)*Salmo trutta caspius Kessler, 1877).* Aquaculture Nutrition, 2013. **19**: p. 54-63.

۱۴. Luckenbach, J.A., et al., *Induction of diploid gynogenesis in southern flounder (Paralichthys lethostigma) with homologous and heterologous sperm.* Aquaculture, 2004. **237** :(۱)p. 499-516.

۱۵. Komen, J., et al., *Gynogenesis in common carp (Cyprinus carpio) in Growth, phenotypic variation and gonad differentiation in normal and methyl testosterone treated homozygous clones and F1 hybrids.* Aquaculture, 1993. **111**: p. 271-280.