

مقاله پژوهشی

بررسی القای ماده‌زایی میوزی با استفاده از پرتوی فرابنفش و شوک سرمایی در
ماهی پرت خونی

فردین شالویی^{۱*}، مهدیه مرادی^۲، حسین رحیمی پردنجانی^۲، روح‌اله رحیمی^۴

DOI: 10.22124/japb.2024.26606.1528

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: بهمن ۱۴۰۲

چکیده

هدف از این مطالعه امکان ایجاد ماده‌زایی در ماهی پرت خونی (Blood Parrot) با استفاده از اسپرم‌های پرتو دیده و شوک سرمایی بود. برای این منظور از ۲۰ قطعه ماهی پرت ماده و ۳ قطعه ماهی فلاورهورن نر (گرید A) که دارای دوره زیست‌هستند، استفاده شد. در ابتدا ژنوم اسپرم‌های ماهی فلاورهورن با استفاده از پرتوی فرابنفش در دامنه ۲۵۴ نانومتر و با مقدار تابش ۳۰ ژول بر متر مربع تخریب شد و با تخم‌های به دست آمده از ماهی پرت لقاح داده شدند. چهار دقیقه پس از لقاح، تخم‌های لقاح یافته هاپلوئید با استفاده از شوک سرمایی (۹۰±۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۳۰ دقیقه به حالت دیپلوئید تبدیل شدند. به منظور بررسی ماده‌زایی از روش فنوتیپیک با بررسی رنگ چشم‌ها و شکل بدن در بچه‌ماهیان استفاده شد. بر اساس نتایج به دست آمده، درصد تخم‌گشایی و بقای لاروها و بچه‌ماهیان در گروه اسپرم پرتو دیده به طور معنی‌داری از گروه شاهد کمتر بود. تنها ۱۵/۷۸ درصد از بچه‌ماهیان در تیمار اسپرم پرتو دیده کاملاً شبیه والد ماده بودند ($P < 0.05$). طبق نتایج، تاثیر پرتوی فرابنفش و شوک سرمایی بر درصد بازماندگی جنین و لاروها بلافاصله پس از لقاح مشهودتر بود و پس از تخم‌گشایی تاثیر آنها کاهش یافت. به طور کلی، این مطالعه نشان داد که امکان القای ماده‌زایی ماهی پرت با استفاده از پرتوی فرابنفش وجود دارد، ولی افزایش درصد تخم‌گشایی و میزان بقای ماده‌زاده‌های تولید شده نیازمند پژوهش‌های بیشتری است. بنابراین بررسی مقادیر دیگر پرتوی فرابنفش با مدت زمان‌های مختلف برای پرتودهی و استفاده از دماهای مختلف در حین انجام شوک دمایی برای افزایش بازده ماده‌زایی این گونه در آینده پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: تابش فرابنفش، فلاورهورن، ماده‌زایی، لقاح، ماهی پرت.

- ۱- استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.
- ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.
- ۳- کارشناس ارشد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.
- ۴- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

* نویسنده مسئول: fardin.shaluei@gmail.com

مقدمه

برای تولید جمعیت تمام ماده با هدف افزایش رشد و بازدهی، از ماده‌زایی میوزی استفاده می‌شود (Shahhosseini, 2020). در روش ماده‌زایی میوزی، تقسیم تخمک در مرحله متافاز میوز II متوقف می‌شود، به عبارت ساده‌تر از خروج گویچه قطبی دوم جلوگیری به عمل می‌آید. در این روش بعد از تخریب محتویات ژنتیکی اسپرم از تخمک‌های هاپلوئید طبیعی برای تلفیق با اسپرم‌های پرتو دیده استفاده می‌شود و سپس با به کار بردن شوک‌های محیطی (سرما یا گرما)، فشار هیدرواستاتیکی (Samonte-Padilla et al., 2011)، مواد شیمیایی (مانند کلشی‌سین، سیتوکالازین B و اکسید نیتروژن) (Ozdemir and Ekici, 2017)، نیروی الکتریکی یا اعمال بیهوشی (Morgan et al., 2006) می‌توان مرحله میوز II را سرکوب کرد تا دومین گویچه قطبی در سلول محبوس بماند. در نتیجه‌ی این فرایند تخم‌های لقاح یافته دیپلوئید تولید می‌شود که رشد طبیعی دارند و از لحاظ ژنتیکی حاوی ژنوم مادری هستند و جنسیت ماده دارند. افرادی که از سرکوب میوز II حاصل شده‌اند، اصطلاحاً ماده‌زاده‌های میوزی نامیده می‌شوند که به دلیل وقوع فرایند بازترکیبی در هنگام میوز، کاملاً

امروزه دست‌کاری کروموزوم به منظور بهبود وضعیت ژنتیکی ماهیان (Paschos et al., 2001) و تولید جمعیت‌های تک‌جنس، تمام ماده، تمام نر، تریپلوئید و یا تتراپلوئید (Meng et al., 2016; Juarez-Juarez et al., 2017) با موفقیت استفاده شده است. یکی از این اهداف مهم، امکان ایجاد افراد دیپلوئید ماده‌زاد (Gynogenetic Diploids) است (Chen et al., 2017) که در آن فرد تمام مواد وراثتی خود را از والد مادری به ارث می‌برد (Miao et al., 2014). فرایند ماده‌زایی شامل تکوین جنینی لاروها تنها با محتویات ژنتیکی مادر و بدون دخالت مواد وراثتی پدری است. به عبارت دیگر، ماده‌زایی نوع خاصی از بکرزایی (پارتنوژن، Parthenogenesis) است که در آن جنین بعد از فعال شدن تخم با اسپرمی که از نظر ژنتیکی غیرفعال شده است، رشد و نمو می‌یابد (Luczynski et al., 2024). افراد ماده‌زاد در مقایسه با دیپلوئیدهای طبیعی معمولاً دارای نرخ مرگ و میر بالاتر و سرعت رشد کندتری هستند (Meng et al., 2016). ماده‌زایی به دو طریق میوزی و میتوزی انجام می‌شود. ماده‌زایی میتوزی به علت بازده کم معمولاً برای تولید اجداد خالص برای تکثیر انجام می‌شود، ولی

- یک ماهی دورگه (هیبرید) است که احتمالا از تلاقی *Amphilophus citrinellus* و *Paraneetroplus melanurus* ایجاد می‌شود. جنس نر این گونه قابلیت باروری ندارد و از نظر جنسی عقیم است و فقط جنس ماده قابلیت باروری دارد و دستیابی به مولد جنس نر این گونه به دلیل پیچیده بودن و مخفی بودن شجره تولید این ماهی و زمان‌بر بودن امکان ندارد (Kwik et al., 2020). بنابراین هدف از این مطالعه بررسی القای ماده‌زایی و سلامت ماده‌زاده‌های این گونه با استفاده از تابش پرتوی فرابنفش روی اسپرم‌های ماهی فلاوره‌ورن (*Amphilophus hybrid*) و استفاده از شوک سرمایی برای حبس کردن گویچه قطبی دوم بود. طبق پژوهش‌های انجام شده این روش تاکنون در داخل و خارج کشور روی طوطی‌ماهیان انجام نشده است. از سوی دیگر چون ماهی پرت قابلیت باروری ندارد و یک ماهی دورگه و وارداتی است، بهترین راه برای تولید این ماهی، ماده‌زایی با استفاده از جنس نر خانواده‌ای نزدیک به این ماهی است که در این مطالعه از ماهی فلاوره‌ورن استفاده شد. علاوه بر این، استفاده از جنس نر ماهی فلاوره‌ورن در این مطالعه، برای ایجاد نتاج تمام ماده بود. همچنین به علت بازده کمتر ماده‌زایی میتوزی، در این همسان نیستند (Hassanzadeh Saber and Hallajian, 2014; Pan et al., 2017). معمولا به دلیل مشکلات دسترسی به پرتوی گاما، برای پرتودهی از پرتوی فرابنفش حاصل از لامپ‌های ۲۵۴ نانومتر استفاده می‌شود. استفاده از پرتوی فرابنفش نسبت به پرتوی گاما ساده‌تر و ارزان‌تر است و می‌توان با تغییر فاصله بین لامپ و نمونه و همچنین تغییر شدت و طول مدت تابش، کروموزوم‌ها را غیرفعال کرد (Arai et al., 1992). در پژوهش‌های انجام شده القای ماده‌زایی با استفاده از پرتوی فرابنفش روی بسیاری از گونه‌های ماهیان از جمله ماهی سیلور بارب (*Barbonymus gonionotus*) (Rahman et al., 2021)، تیلایای نیل (*Oreochromis niloticus*) (Myers et al., 1995)، لای‌ماهی (*Tinca tinca*) (Nowosad et al., 2015)، ماهی خاویاری استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) (Fopp- Bayat et al., 2017)، ماهی باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*) (Peruzzi and Chatain, 2000) و بسیاری از ماهیان دیگر با موفقیت انجام شده است.
- ماهی پَرْتْ خونی (Bloody Parrot) یکی از پر فروش‌ترین ماهیان زینتی آب شیرین است که به طور طبیعی در طبیعت وجود ندارد بلکه

(صبح و بعد از ظهر) با نرخ ۵ درصد وزن بدن انجام شد.

نحوه تخم‌گیری از ماهیان

ماهی پرت در شرایط مساعد هر ۱۵ روز یک بار تخم‌ریزی می‌کند. می‌توان بعد از چند روز مراقبت در زمان تخم‌ریزی، تخم‌های ماهی را قبل از تخم‌ریزی استخراج کرد. برای تنظیم زمان دقیق تخم‌ریزی هورمون HCG به میزان ۳۰۰۰ واحد در لیتر در قسمت صفاقی ماهی در یک مرحله تزریق شد. در ماهی فلاورهورن نر نیازی به تزریق هورمون نبود و با نگهداری در کنار ماهی‌های ماده، به صورت طبیعی اسپرم کافی برداشت شد.

پرتودهی به اسپرم‌ها

ابتدا به منظور حصول اطمینان از قابلیت لقاح و سلامت اسپرم‌های مولدین مدت زمان تحرک و نوع حرکت اسپرم با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت (Shahhosseini, 2020). سپس اسپرم استحصالی (اسپرم‌های سه ماهی با یک نسبت با هم مخلوط شدند) به نسبت ۱ به ۱۰ با رقیق کننده مصنوعی که شامل کلرید سدیم (۵/۵۲ گرم در لیتر)، کلرید پتاسیم (۲ گرم در لیتر)،

پژوهش از ماده‌زایی میوزی برای تولید جمعیت تمام ماده استفاده شد. با کاربردی شدن این مطالعه از واردات این ماهی به کشور می‌توان جلوگیری کرد.

مواد و روش‌ها

منشا مولدین و شرایط پرورش

تعداد ۲۰ قطعه ماهی پرت با میانگین وزن 100 ± 20 گرم و طول کل ۲۰ سانتی‌متر و ۳ قطعه ماهی نر فلاورهورن گرید A با میانگین وزن 100 ± 20 گرم و طول کل ۱۸ سانتی‌متر از بازار ماهیان تزئینی خریداری و به آزمایشگاه خصوصی واقع در اصفهان منتقل و در آکواریوم‌هایی به ابعاد $40 \times 40 \times 120$ نگهداری شدند. ماهی‌های پرت و فلاورهورن در شرایط مناسب تکثیر با دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. در تمام طول آزمایش دمای آب ۲۸ درجه سانتی‌گراد، pH ۷/۵، سختی کل ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر و اکسیژن محلول $8/80 \pm 0/06$ میلی‌گرم در لیتر بود. برای آکواریوم‌ها از آب شهری پس از کلرزدایی استفاده شد که روزانه ۲۰ درصد تعویض می‌شد. غذادهی این ماهیان توسط جیره تجاری (BioMar، فرانسه) دو بار در روز

یافته با اسپرم پرتو دیده، هر کدام در پنج تکرار، تقسیم شدند. در مرحله بعد به پتری‌های فوق، اسپرم پرتو دیده همراه با ۲۰ میلی‌لیتر آب اضافه شد و به مدت ۶۰ ثانیه به آرامی مخلوط شدند. در نهایت تخم‌ها با آب ۲۸ درجه سانتی‌گراد شستشو داده شدند و چسبندگی آنها با شستشو توسط ۱۰ میلی‌لیتر شیر (با چربی ۳/۵ درصد) به مدت ۱ دقیقه برطرف شد. بعد از شستشوی تخم‌ها و برای سرکوب میوز II، ۴ دقیقه بعد از لقاح، شوک سرمایی با دمای ۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد (Pradeep et al., 2014). برای تیمار شاهد تخمک‌ها بعد از لقاح با اسپرم (بدون پرتو دهی) و در نهایت شستشو و از بین بردن چسبندگی آنها، بدون القای شوک سرمایی درون انکوباتور نگهداری شدند.

تفریخ و شمارش تخم‌ها

به منظور طی کردن دوره جنینی، تخم‌ها داخل ۱۰ عدد انکوباتور ویس ۱/۵ لیتری با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از طی مرحله انکوباسیون و تفریخ تخم‌ها، لاروها بعد از جذب کیسه زرده به مدت ۳۰ روز با ناپلی آرتمیا و بعد از آن با غذای اکستروید تغذیه شدند. در ۴۵ روزگی بررسی‌ها و سرشماری آماری انجام شد و بچه‌ماهی‌های خالص و دورگه از روی

HCL-Tris (۴۲/۲ گرم در لیتر) با PH ۵/۷ بود، رقیق شد (Myers et al., 1995). این کار به منظور بی‌حرکت کردن اسپرم در زمان آزمایش و کاهش تراکم اسپرم انجام شد (Porter, 1998). برای تخریب کامل مجموعه کروموزومی اسپرم، از پرتوی فرابنفش با دامنه ۲۵۰ نانومتر (Nowosad et al., 2015) و با مقدار تابش ۳۰ ژول بر متر مربع استفاده شد. برای ایجاد این مقدار از دو لامپ UVC ۱۶ وات (فیلیپس، لهستان) استفاده شد. به این صورت که ابتدا ۲ عدد لامپ به مدت ۳۰ دقیقه قبل از پرتو دهی برای رسیدن به اوج تابش روشن شدند و سپس روی ظرف پتری قرار داده شدند. برای رسیدن به مقدار تابش مورد نظر، فاصله لامپ‌ها تا ظرف پتری به کمک UV متر (UVC-254A، Lutron، تایوان) روی ۱۲ سانتی‌متر تنظیم و مدت زمان تابش ۱/۵ دقیقه در نظر گرفته شد (Don and Avtalion, 1993).

لقاح و اعمال ماده‌زایی میوزی

تخمک‌های استحصالی از مولدین ماده به تعداد ۱۲۰-۱۰۰ عدد تخمک درون ۱۰ عدد پتری شیشه‌ای از جنس کوارتز به قطر ۱۰۰ میلی‌متر قرار داده شدند. تخمک‌ها به دو تیمار شاهد (لقاح یافته با اسپرم معمولی) و تیمار لقاح

ریزتر با رنگ روشن بودند که بیشتر به والد نر شباهت داشتند. در حالی که بچه‌ماهی‌های ماده‌زاد دارای بدنی گرد، فک مثلی و چشمانی درشت و زردرنگ بودند و صفات فنوتیپی والد ماده خود را به ارث برده بودند.

تجزیه و تحلیل‌های آماری

داده‌های به دست آمده ابتدا توسط آزمون کولموگراف-اسمیرنوف از لحاظ نرمال بودن بررسی شدند. داده‌های درصدی قبل از انجام تجزیه و تحلیل با Arc sin تبدیل شدند. مقایسه میانگین درصد تخم‌گذاری و بقای لاروها و بچه‌ماهی‌ها در گروه شاهد و گروه اسپرم پرتو دیده از آزمون T در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0.05$) و در نرم‌افزار SPSS 21 انجام شد.

نتایج

تاثیر القای ماده‌زایی بر درصد تخم‌گذاری

میزان تخم‌گذاری تخم‌های لقاح یافته ماهی پرت خونی ماده با اسپرم پرتو دیده و معمولی ماهی فلاورهورن نر در شکل ۱ نشان داده شده است. بر اساس نتایج، درصد تخم‌گذاری در گروه اسپرم پرتو دیده به طور معنی‌داری از گروه شاهد کمتر بود ($P < 0.05$ ؛ جدول ۱).

فنوتیپ آنها مشخص شدند (Pradeep et al., 2012). درصد تخم‌گذاری (H)، بازماندگی لارو (از بدو تولد تا زمان شروع تغذیه فعال) (SR_L) و بچه‌ماهیان (SR_F) با استفاده از رابطه‌های ۱ تا ۳ محاسبه شد (Shahhosseini, 2020).

رابطه ۱:

$$H(\%) = (N_i / N_f) \times 100$$

N_i : تعداد کل تخم‌های واحد آزمایشی؛ N_f : تعداد تخم‌های تخم‌گذاری شده.

رابطه ۲:

$$SR_L(\%) = (N_i / N_f) \times 100$$

N_i : تعداد کل لاروها در ابتدای آزمایش؛ N_f : تعداد لارو باقیمانده تا شروع تغذیه فعال.

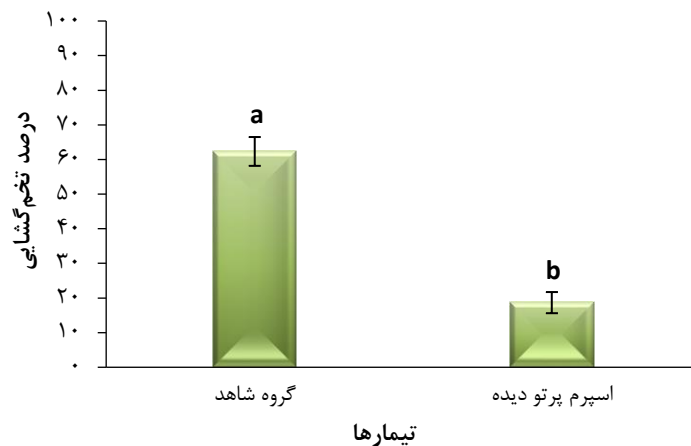
رابطه ۳:

$$SR_F(\%) = (N_i / N_f) \times 100$$

N_i : تعداد بچه‌ماهی‌ها در شروع تغذیه فعال؛ N_f : تعداد بچه‌ماهی‌ها در انتهای دوره آزمایش.

تشخیص بچه‌ماهی‌های ماده‌زاد از روی فنوتیپ

در این پژوهش درصد ماده‌زایی ماهیان از روی ظاهر بچه‌ماهی‌ها و شباهت آنها به والد ماده و میزان از بین رفتن DNA والد نر مشخص شد. به طوری که ماهی‌های دورگه دارای بدنی کشیده و خاکستری رنگ، بدون نقش و نگار و خال‌های آبی‌رنگ، فک دهانی کشیده و چشمان



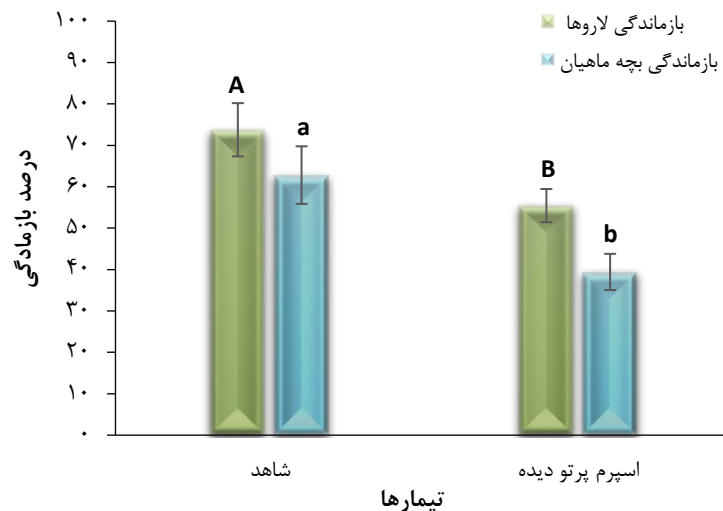
شکل ۱: مقایسه درصد تخم‌گذاری در تخم‌های لقاح یافته پرت خونی با اسپرم پرتو دیده و معمولی (شاهد) فلاورهورن (میانگین $\pm$ خطای استاندارد). حروف متفاوت روی هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار گروه‌ها با یکدیگر است ($P < 0.05$).

جدول ۱: مقایسه شاخص‌های بررسی شده در زاده‌های به دست آمده از تخم‌های لقاح یافته پرت خونی با اسپرم پرتو دیده و معمولی (شاهد) فلاورهورن (میانگین $\pm$ خطای استاندارد)

P-value	تیمارهای آزمایشی		شاخص
	اسپرم پرتو دیده	شاهد	
۰/۰۰۴	۱۸/۶۶ $\pm$ ۳/۰۵ ^b	۶۲/۳۳ $\pm$ ۴/۱۶ ^a	درصد تخم‌گذاری
۰/۰۲۹	۵۵/۴۵ $\pm$ ۴/۰۱ ^b	۷۳/۷۷ $\pm$ ۶/۴۳ ^a	درصد بازماندگی لاروها
۰/۰۴۹	۳۹/۴۳ $\pm$ ۶/۳۷ ^b	۶۲/۸۲ $\pm$ ۶/۹۵ ^a	درصد بازماندگی بچه‌ماهیان
–	۱۵/۷۸ $\pm$ ۲/۹۴	–	درصد ماده‌زایی
–	۲۳/۶۵ $\pm$ ۴/۹۳	–	درصد دورگه

حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار گروه‌ها با یکدیگر است ($P < 0.05$).

تاثیر القای ماده‌زایی بر بازماندگی لاروها و بچه‌ماهیان
 داده شده است. بر اساس نتایج، بازماندگی لاروها و بچه‌ماهیان در گروه اسپرم پرتو دیده به طور معنی‌داری از گروه شاهد کمتر بود ($P < 0.05$).
 میزان بازماندگی لاروها و بچه‌ماهیان در گروه اسپرم پرتو دیده و شاهد در شکل ۲ نشان



شکل ۲: مقایسه میانگین درصد بازماندگی لاروها و بچه ماهیان به دست آمده از تخم‌های لقاح یافته پرت خونی با اسپرم پرتو دیده و معمولی (شاهد) فلاورهورن (میانگین $\pm$ خطای استاندارد). حروف متفاوت روی ستون‌های مربوط به هر شاخص، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار گروه‌ها با یکدیگر است ($P < 0.05$).

ماده‌زایی، این کار از طریق اعمال شوک‌های دمایی که در آن شاخص‌های دما، مدت شوک‌دهی و شروع دقیق شوک‌دهی به درستی رعایت شده باشد، انجام می‌گیرد و تخم‌های هاپلوئید به دیپلوئید تبدیل می‌شوند (Polonis et al., 2018). به طور کلی، دمای مطلوب برای شوک‌دهی تخم در گونه‌های مختلف ماهیان متفاوت است و این عامل، نقش مهمی در نوع ماده‌زاد تولید شده دارد (Samonte-Padilla et al., 2011). معمولاً از شوک گرمایی با دمای حدود ۳۴ درجه سانتی‌گراد برای گونه‌های آب سرد و از شوک سرد با دمای حدود ۴-۰ درجه

تاثیر القای ماده‌زایی بر درصد ماده‌زایی و لاروهای دورگه

درصد لاروهای ماده و دورگه در تیمار اسپرم‌های پرتو دیده در جدول ۱ نشان داده شده است. بر اساس نتایج این پژوهش ۱۵/۷۸ درصد از بچه ماهیان در تیمار اسپرم‌های پرتو دیده کاملاً شبیه والد ماده بودند.

بحث

در ماده‌زایی طبیعی، بازگشت جنین‌های هاپلوئید به حالت دیپلوئید به طور خودبه‌خودی صورت می‌پذیرد، ولی در القای مصنوعی

سانتی‌گراد برای گونه‌های آب گرم استفاده می‌شود. مدت زمان شوک نیز تا حد امکان باید کوتاه باشد (Kucharczyk et al., 2014). در این مطالعه برای سرکوب میوز II در مرحله لقاح، ۴ دقیقه بعد از لقاح از شوک سرمایی ($9 \pm 0/5$) درجه سانتی‌گراد) به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد (Pradeep et al., 2014). در بسیاری از مطالعات ماده‌زایی، مدت زمان پرتودهی اسپرم با پرتوی فرابنفش با طول موج ۲۵۴ نانومتر، در سخت‌پوستان ۵-۸۰ ثانیه، در نرم‌تنان ۳۰ ثانیه و در ماهی‌ها ۱۲-۱/۵ دقیقه گزارش شده است (Manan et al., 2022). در این مطالعه برای تخریب ژنوم اسپرم، از روش توصیه شده پژوهشگران دیگر به منظور تخریب ژنوم اسپرم تیلاپپای نیل (Don and Avtalion, 1993) استفاده شد. نتایج این پژوهش نشان داد که القای ماده‌زایی در ماهی پرت باعث تخم‌گذاری ۱۸/۶۶±۳/۰۵ درصد از تخم‌ها و القای ماده‌زایی در ۱۵/۷۸±۲/۹۴ درصد از بچه‌ماهیان شد. یکی از دلایل کم بودن میزان تخم‌گذاری و درصد بقای لاروها در فرایند ماده‌زایی، سندرم هاپلوئید است که به دلیل از بین رفتن محتویات ژنتیکی اسپرم اتفاق می‌افتد. این تخم‌ها از لحاظ ریخت‌شناسی دچار ناهنجاری شده و قبل یا بلافاصله بعد از تخم‌گذاری از بین می‌روند (Ozdemir and Ekici, 2017). بنابراین، کم بودن میزان تخم‌گذاری و بقای بچه‌ماهی‌ها در روش ماده‌زایی امری کاملاً عادی بوده (Aluko, 1998) و ممکن است به علت هموزیگوتی شدید آنها، بیان آلل‌های مغلوب و نوع روش‌های اعمال شده روی گامت‌ها باشد (Michalik et al., 2015). هم‌راستا با نتایج این پژوهش، در مطالعات گذشته روی ماده‌زایی ماهیان پرورشی با استفاده از پرتوی فرابنفش درصد تخم‌گذاری در تخم‌های بارور شده گربه‌ماهی آفریقایی (*Clarias anguillaris*) ۶/۲ درصد (Aluko, 1998)، در ماهی خاویاری استرلیاد ۳ درصد (Fopp-Bayat et al., 2017) و درصد بقا لاروها در زمان شنای آزاد در قزل‌آلای قهوه‌ای (*Salmo trutta*) در زمان تغذیه فعال ۱۰/۴۸ درصد (Michalik et al., 2015)، در اردک‌ماهی (*Esox lucius*) ۱۶/۲ درصد (Luczynski et al., 2024)، در ماهی خاردار اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) ۱۷ درصد (Oral et al., 2017)، در ماهی گورخری (*Danio rerio*) ۱۷/۳ درصد (Ozdemir and Ekici, 2017)، در لاروهای گربه‌ماهی آفریقایی ۴۳/۶ درصد (Aluko, 1998) و در ماهی قرمز (*Carassius auratus*) ۷-۹ درصد (Paschos et al., 2001) گزارش شده است.

وجود تفاوت بین نتایج میزان بقا در پژوهش‌های مختلف، به عواملی مانند گونه ماهی و شرایط متفاوت آزمایشی از جمله مقادیر مختلف پرتودهی و شرایط شوک‌دهی بستگی دارد (Shahhosseini, 2020). برخی پژوهشگران بیان کرده‌اند که اثرات ژنتیکی مانند کیفیت گامت، ژنتیک تخمک (Roff et al., 2017) و درجه رسیدگی تخمک هنگام استحصال از جنس ماده (Felip et al., 2001) نیز از جمله مواردی است که می‌تواند بر روی بقا یا مرگ جنین حاصل از ماده‌زایی موثر باشد.

در مجموع، ماهی پرت یک گونه دورگه و وارداتی است و تولیدکنندگان این ماهی نیز بیوتکنیک تولید این گونه را منتشر نمی‌کنند. علاوه بر این جنس نر ماهی پرت عقیم است. در

نتیجه بهترین راه برای تولید این ماهی زینتی باارزش استفاده از روش ماده‌زایی است. در این پژوهش از ماده‌زایی میوزی برای تولید جمعیت تمام ماده در ماهی پرت استفاده شد و نشان داده شد که ماده‌زایی میوزی در ماهی پرت امکان‌پذیر است. باتوجه به این که تخمک ماهی پرت با اسپرم‌های پرتودیده ماهی فلاوره‌ورن فعال شد، احتمالاً اسپرم پرتودیده ماهی فلاوره‌ورن و استفاده از شوک سرمایی ۹ درجه سانتی‌گراد نیز برای حبس کردن جسم قطبی دوم و القای ماده‌زایی این ماهی تاثیرگذار بوده است. به هر حال، افزایش درصد تولید ماده‌زادها در این گونه مستلزم پژوهش‌های بیشتر است.

منابع

- Aluko P.O. 1998.** Induction of artificial meiotic gynogenesis with ultraviolet rays in the Africa catfish, *Clarias anguillaris*. Nigerian Journal of Biotechnology, 9(1): 76–81. doi: 10.1111/j.1095-8649.1993.tb00301.x
- Arai K., Masaoka T. and Suzuki R. 1992.** Optimum conditions of UV ray irradiation for genetic inactivation of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) eggs. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 58(7): 1197–1201. doi: 10.2331/suisan.58.1197
- Chen R., Lou B., Xu D., Zhan W., Takeuchi Y., Yang F. and Liu F. 2017.** Induction of meiotic gynogenesis in yellow drum (*Nibea albiflora*, Sciaenidae) using heterologous sperm and evidence for female homogametic sex determination. Aquaculture, 479: 667–674. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.07.009
- Don J. and Avtalion R.R. 1993.** Ultraviolet irradiation of tilapia spermatozoa and the Hertwig effect: Electron microscopic analysis. Journal of Fish Biology, 42(1): 1–14. doi: 10.1111/j.1095-8649.1993.tb00301.x
- Felip A., Zanuy S., Carrillo M. and Piferrer F. 2001.** Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. Genetica, 111: 175–195. doi: 10.1023/a:1013724322169
- Fopp-Bayat D., Ocalewicz K., Kucinski M., Jankun M. and Laczynska B. 2017.** Disturbances in the ploidy level in the gynogenetic sterlet *Acipenser ruthenus*. Journal of Applied Genetics, 58: 373–380. doi: 10.1007/s13353-017-0389-2
- Hassanzadeh Saber M. and Hallajian A. 2014.** Study of sex determination system in ship sturgeon, *Acipenser nudiventris* using meiotic gynogenesis. Aquaculture International, 22(1): 273–279. doi: 10.1007/s10499-013-9676-z
- Juarez-Juarez V., Alcantar-Vazquez J.P., Antonio-Estrada C., Marin-Ramirez J.A. and Moreno-De La Torre R. 2017.** Feminization by 17 α -ethinylestradiol of the progeny of XY-female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Effects on growth, condition factor and gonadosomatic index. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 17(3): 599–607. doi: 10.4194/1303-2712-v17_3_16
- Kucharczyk D., Zarski D., Targonska K., Luczynski M. J., Szczerbowski A., Nowosad J. and Mamcarz A. 2014.** Induced artificial androgenesis in common tench, *Tinca tinca* (L.), using common carp and common bream

- eggs. Italian Journal of Animal Science, 13(1): 196–200. doi: 10.4081/ijas.2014.2890
- Kwik J.T.B., Lim R.B.H., Liew J.H. and Yeo D.C.J. 2020.** Novel cichlid-dominated fish assemblages in tropical urban reservoirs. Aquatic Ecosystem Health and Management, 23(3): 249–266. doi: 10.1080/14634988.2020.1778308
- Luczynski M.J., Nowosad J., Luczynska J. and Kucharczyk D. 2024.** The induction of meiotic gynogenesis in Northern pike (*Esox lucius*) using the heterologous European perch (*Perca fluviatilis*) sperm. Fisheries and Aquatic Life, 31(4): 186–197. doi: 10.2478/aopf-2023-0018
- Manan H., Hidayati A.N., Lyana N.A., Amin-Safwan A., Ma H., Kasan N.A. and Ikhwanuddin M. 2022.** A review of gynogenesis manipulation in aquatic animals. Aquaculture and Fisheries, 7(1): 1–6. doi: 10.1016/j.aaf.2020.11.006
- Meng Z., Liu X., Liu B., Hu P., Jia Y., Yang Z., Zhang H., Liu X. and Lei J. 2016.** Induction of mitotic gynogenesis in turbot *Scophthalmus maximus*. Aquaculture, 451: 429–435. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.09.010
- Miao L., Tang X.N., Li M.Y., Wang T., Wang S., Zhang X.L. and Chen J. 2014.** Artificial gynogenesis in *Pseudosciaena crocea* (Perciformes, Sciaenidae) with heterologous sperm and its verification using microsatellite markers. Aquaculture Research, 45(7): 1253–1259. doi: 10.1111/are.12057
- Michalik O., Dobosz S., Zalewski T., Sapota M. and Ocalewicz K. 2015.** Induction of gynogenetic and androgenetic haploid and doubled haploid development in the brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus 1758). Reproduction in Domestic Animals, 50(2): 256–262. doi: 10.1111/rda.12480
- Morgan A.J., Murashige R., Woolridge C.A., Luckenbach J.A., Watanabe W.O., Borski R.J., Godwin J. and Daniels H.V. 2006.** Effective UV dose and pressure shock for induction of meiotic gynogenesis in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) using black sea bass (*Centropristis striata*) sperm. Aquaculture, 259(1-4): 290–299. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.05.045
- Myers J.M., Penman D.J., Basavaraju Y., Powell S.F., Baoprasertkul P., Rana K.J. and McAndrew B.J. 1995.** Induction of diploid androgenetic and mitotic gynogenetic Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Theoretical and Applied Genetics, 90: 205–210. doi: 10.1007/BF00222203
- Nowosad J., Kucharczyk D., Liszewski T., Targonska K. and Kujawa R. 2015.** Comparison of temperature shock timing to

- induced artificial mitotic gynogenesis and androgenesis in common tench. *Aquaculture International*, 23: 45–53. doi: 10.1007/s10499-014-9796-0
- Oral M., Colleter J., Bekaert M., Taggart J.B., Palaiokostas C., McAndrew B.J., Vandeputte M., Chatain B., Kuhl H., Reinhardt R., Peruzzi S. and Penman D.J. 2017.** Gene-centromere mapping in meiotic gynogenetic European seabass. *BMC Genomics*, 18: 1–12. doi: 10.1186/s12864-017-3826-z
- Ozdemir R.C. and Ekici A. 2017.** Different heat shock application effect on gynogenetic production of zebrafish (*Danio rerio*). *Fisheries and Aquaculture Journal*, 8(2): 1–6. doi: 10.4172/2150-3508.1000196
- Pan Z.J., Zhu C.K., Wang H., Chang G.L., Ding H.Y., Qiang X.G. and Yu X.S. 2017.** Induction of meiotic gynogenesis in bagrid catfish (*Pseudobagrus ussuriensis*) with homologous sperm and its confirmation for female homogamety. *Aquaculture Research*, 48(11): 5659–5665. doi: 10.1111/are.13388
- Paschos I., Natsis L., Nathanailides C., Kagalou I. and Kolettas E. 2001.** Induction of gynogenesis and androgenesis in goldfish *Carassius auratus* (var. oranda). *Reproduction in Domestic Animals*, 36(3-4): 195–198. doi: 10.1007/s10126-020-09963-6
- Peruzzi S. and Chatain B. 2000.** Pressure and cold shock induction of meiotic gynogenesis and triploidy in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.: Relative efficiency of methods and parental variability. *Aquaculture*, 189(1-2): 23–37. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00355-0
- Polonis M., Fujimoto T., Dobosz S., Zalewski T. and Ocalewicz K. 2018.** Genome incompatibility between rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea trout (*Salmo trutta*) and induction of the interspecies gynogenesis. *Journal of Applied Genetics*, 59: 91–97. doi: 10.1007/s13353-017-0425-2
- Porter M.D. 1998.** Calibrating ultraviolet irradiation of fish sperm: Optimizing the Hertwig effect. *Journal of Applied Aquaculture*, 8(2): 13–26. doi: 10.1300/J028v08n02_02
- Pradeep P.J., Srijaya T.C., Hassan A., Chatterji A.K., Withyachumnarnkul B. and Jeffs A. 2014.** Optimal conditions for cold-shock induction of triploidy in red tilapia. *Aquaculture International*, 22: 1163–1174. doi: 10.1007/s10499-013-9736-4
- Pradeep P.J., Srijaya T.C., Papini A. and Chatterji A.K. 2012.** Effects of triploidy induction on growth and masculinization of red tilapia [*Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) × *Oreochromis*

- niloticus* (Linnaeus, 1758)]. Aquaculture, 344: 181–187. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.03.006
- Rahman M.R., Sarder M.R., Nishat A.A., Islam R. and Kohinoor A.H.M. 2021.** Induction of meiotic and mitotic gynogenesis in silver barb (*Barbonymus gonionotus*) through cold shock treatment. Aquaculture International, 29: 2161–2179. doi: 10.1007/s10499-021-00744-z
- Roff G., Doropoulos C., Mereb G. and Mumby P.J. 2017.** Mass spawning aggregation of the giant bumphead parrotfish *Bolbometopon muricatum*. Journal of Fish Biology, 91(1): 354–361. doi: 10.1111/jfb.13340
- Samonte-Padilla I.E., Eizaguirre C., Scharsack J.P., Lenz T.L. and Milinski M. 2011.** Induction of diploid gynogenesis in an evolutionary model organism, the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). BMC Developmental Biology, 11: 1–11. doi: 10.1186/1471-213X-11-55
- Shahhosseini G. 2020.** Meiotic gynogenesis inducing in Caspian Sea salmon (*Salmo trutta caspius*) using gamma irradiation followed by sex determination using SDY gene. Journal of Nuclear Science and Technology, 41(3): 145–154. doi: 10.24200/nst.2020.1156



Research Paper

Evaluation of induction of mitotic gynogenesis using ultraviolet radiation and cold shock in blood parrot fish

Fardin Shalui^{1*}, Mahdiah Moradi², Hossein Rahimi Pordanjani³, Ruhollah Rahimi⁴

DOI: 10.22124/japb.2024.26606.1528

Received: February 2024

Accepted: June 2024

Abstract

The objective of this study was to investigate the possibility of inducing gynogenesis in the blood parrot fish using irradiated sperm and cold shock. For this purpose, 20 female parrot fish and 3 male flowerhorn fish (Grade A), which have the potential to produce reproductive hybrids, were used. Initially, the sperm genome obtained from the flowerhorn fish was damaged using ultraviolet radiation at a wavelength of 254nm and with a radiation dose of 30J/m², after which it was used to fertilize the eggs obtained from the parrot fish. cold shock (9±0.5°C) was applied for 30 minutes to restore diploidy 4.5 minutes after fertilization. For assess gynogenesis, phenotypic analysis was conducted examining the eye color and body shape of the offspring. Based on the obtained results, the hatching and survival rates of fish larvae and fry in the irradiated sperm group were significantly lower than those of the control group. Only 15.78% of the offspring in the irradiated sperm treatment showed complete resemblance to the maternal parent (P<0.05). According to the results, the immediate impact of ultraviolet radiation and cold shock on the embryo and larval survival rates was more pronounced immediately after fertilization and decreased after hatching. In general, this study demonstrated the possibility of inducing gynogenesis in parrot fish using ultraviolet radiation. However, increasing the hatching rate and the survival rate of the produced gynogenetic individuals requires further investigation. Therefore, examining different doses of ultraviolet radiation with varying exposure durations and utilizing different temperatures during thermal shock treatments is recommended to enhance the efficiency of gynogenesis induction of this species in the future.

Key words: *Ultraviolet Irradiation, Flowerhorn, Gynogenesis, Fertilization, Parrot Fish.*

1- Assistant Professor in Fisheries Department, Faculty of Natural Resources and Earth Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

2- M.Sc. Student in Fisheries, Faculty of Natural Resources and Earth Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

3- M.Sc. in Fisheries Department, Faculty of Natural Resources and Earth Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

4- Associate Professor in Fisheries Department, Faculty of Natural Resources and Earth Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

*Corresponding Author: fardin.shaluei@gmail.com

