بهینه سازی شوک حرارتی جهت القاء تتراپلوئیدی در آبزیان زینتی

علی نکوئی فرد*[۱]، صبا احمدیان[۲]، احد گل قاسم قره باغ[۲]

۱- مرکز تحقیقات آرتمیای کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه، ایران، صندوق پستی۳۱٦

۲- گروه منابع طبیعی و شیلات، دانشگاه پیام نور واحد ارومیه، ارومیه، ایران، صندوق پستی ۳٦۹۷-۱۹۳۵

* a.nekoueifard@areeo.ac.ir

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹٤ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۵

چکیده

تتراپلوئیدی روشی مهم برای تولید ماهیان تریپلوئید به طریق غیرالقائی است که برای تولید دیگر سطوح پلوئیدی (پنتا، هگزا، هپتا و اکتاپلوئیدی) در آبزیان اهمیت دارد. استفاده عملی از تتراپلوئید در ماهیان زینتی وتولید ماهیان تریپلوئیدی بستگی به موثر بودن فرآیند القاء شوک وتوانایی تتراپلوئیدها در تولید مثل و ایجاد نسل قابل زیست دارد؛ لذا اولین و مهمترین عامل جهت دستیابی به ماهین تتراپلوئید در گله های مختلف، بهینه سازی شوک القای پلوئیدی است. القاء تتراپلوئیدی در ماهی کاملا به زمان آغاز شوک و دوره شوک حرارتی بستگی دارد، افزایش دمای شوک می تواند روی نرخ بقاء اثر منفی داشته باشد درحالی که تغییر در زمان آغاز شوک بستگی به حساسیت تخم ها به طور مثال قطر تخمک می تواند منجر به افزایش یا کاهش بقاء را در جنین ها شود.

کلمات کلیدی: لقاح، ماهی، تتراپلوئید، شوک حرارتی، آبزیان زینتی، تخم.

Downloaded from ornamentalaquatics.ir at 0:57 +0430 on Sunday April 21st 2019

Downloaded from ornamentalaquatics.ir at 0:57 +0430 on Sunday April 21st 2019

مقدمه

کاربرد روش های مدرن و نوین در پرورش آبزیان به تدریج با درک بهتر اصول و قوانین ژنتیکی توسعه یافته است. پدیده بلوغ جنسی یکی از مهمترین مشکلات پرورش دهندگان آبزیان به ویژه ماهیان سردآبی است. بلوغ جنسی در آزادماهیان منجر به کاهش رشد (Purdom, 1993) کاهش مقاومت در برابر عوامل بیماریزا کاهش کیفیت لاشه و رنگدانه های موجود در بافت ها می شود . لذا تولید و پرورش ماهیان عقیم یا تمام ماده به دلیل حذف کامل بلوغ و یا تاخیر در بروز آن در آبزیان پرورشی ارجحیت دارد (Dunhum, 2004). پلی پلوئیدی دارا بودن بیش از دو سری کروموزوم در هر سلول است که به طور طبیعی در برخی از گیاهان رخ میدهد و منجر به پدیده ژیگانتیسم (بزرگ شدن سلول های بدن) می شود. پدیده پلی پلوئیدی در جانوران از طریق القاء کردن به وجود می آید. در پستانداران نادر است و در پرندگان، خزندگان، دوزیستان و ماهی ها رخ می دهد. وقوع پلی پلوئیدی می تواند در اثر اختلالات سلولی در بین لقاح و اولین تقسیم میتوزی جنین رخ دهد. تتراپلوئیدی (دارا بودن چهار سری کروموزوم در هر سلول) نوع دیگری از پلوئیدی در ماهیان است که روش تولید آن همانند تریپلوئیدی با استفاده از شوک های فیزیکی یا شیمیایی است.با این تفاوت که شوک دیر هنگام و بعد از جدایی دومین گویچه ی قطبی و قبل از اولین تقسیم میتوزی سلول تخم است. تتراپلوئیدی میتواند به عنوان یک منبع مهم در تولید ماهیان تریپلوئید کاملا عقیم محسوب شود. امکان القای پلوئیدی با استفاده از انواع شوک های شیمیایی (Pillips, 1986) الکتریکی (Thorgaard, 1981) و فشار هیدرو استاتیک (Mair,1993) وجود دارد. زمان آغاز شوک دهی (زمان پس از لقاح) دوره شوک دهی و دمای شوک از مهمترین عوامل موثر در موفقیت شوک جهت القای پلوئیدی محسوب می گردند (Dunhum, 2004). همچنین عوامل دیگری نظیر ویژگی های خاص هرگونه (سرعت تکامل جنینی و تقسیمات سلولی) و دمای آب انکوباسیون قبل از اعمال شوک (Pandian,1998) اختلاف دمای آب نگهداری مولدین و دمای شوک (Pillips, 1986) کیفیت گامت های مورد استفاده به ویژه اندازه و درجه رسیدگی تخمک ها) و حساسیت های خاص هر نژاد یا جمعیت نسبت به شوک در بازده شوک موثر خواهند بود (Diaz, 1993).

۱-تتراپلوئیدی

تتراپلوئیدی یک راه ممکن برای دستکاری ژنوم در ماهیان است. یکی از کاربرد های مهم آن در ماهی ها تولید جمعیت های تریپلوئید تماما عقیم است که توسط لقاح بین تتراپلوئیدها و دیپلوئیدها تولید می شود. تریپلوئیدی به عنوان یک روش برای کاهش اثرات ناشی از بلوغ در آبزی پروری کاربرد دارد. جلوگیری از ممانعت از بلوغ جنسی باعث می شود که کیفیت لاشه در طول فصل تخم ریزی و تولید مثل حفظ شود و همچنین مشکلات ناشی از بلوغ زودرس و مرگ و میر بعد از تخم ریزی را کاهش دهد (Myers,1995). جلوگیری از بلوغ جنسی باعث تولید گوشت به مراتب بیشتر در ماهیان عقیم می شود. تلاش برای تولید ماهیان عقیم به طریق هورمونی و ژنتیکی امکان پذیر است. تیمارهای هورمونی ممکن است اثرات زیان آوری بر روی رشد و رفتار های تولید مثلی داشته باشد از این رو، روش های ژنتیکی موثرتر از روش های هورمونی هستند. ماهیان تریپلوئید به دلیل داشتن یک دسته کروموزوم اضافی و به واسطه اخلال در تقسیم میوز به هنگام گامتوژنز معمولا عقیم هستند. ایجاد تریپلوئیدی در ماهیان به دو روش مستقیم (القایی) یا غیر مستقیم (غیر القایی) امکان پذیر است. در روش القایی با استفاده از شوک های فیزیکی (شوک های دمایی و یا فشار) و یا شوک های شیمیایی در هنگام تقسیم دوم میوز در مرحله متافاز از خروج گویچه قطبی دوم جلوگیری به عمل آمده و به این طریق جنین های تریپلوئید تولید می شود. در روش غیر القایی ابتدا مولدین تتراپلوئید از طریق اختلال در اولین تقسیم جنینی پس از لقاح با استفاده از شوک های فیزیکی و شیمیایی تولید می گردد و سپس با آمیزش ماهیان تتراپلوئید نر و دیپلوئید ماده و یا آمیزش معکوس آن ماهیان تریپلوئید حاصل می گردد. از مزایای روش غیر القایی موفقیت کامل در تولید ماهیان تریپلوئید (Myers, 1995) و نیز بهبود نسبی بازماندگی است. والدین دیپلوئید و تتراپلوئید می توانند برای بهبود تولید انتخاب شوند و تولید ماهیان تریپلوئید با خصوصیات یکسان یا حتی برتر را سبب شوند. شرط لازم برای چنین استراتژی تکثیر توسعه و تکامل نسل تتراپلوئیدها است. القای مصنوعی تتراپلوئیدی درگونه های مختلف ماهیان به وسیله شوک دیر هنگام صورت میگیرد.این شوک ها پس از جدایی دومین گویچه قطبی و قبل از اولین تقسیم و یا در حین اولین تقسیم میتوزی سلول به کار برده می شوند. تتراپلوئیدی می تواند به وسیله کاربرد شوک ها در فازهای مختلف چرخه ی سلول در اولین تقسیم میتوز القا شود (Benfey, 1984).

تتراپلوئیدهای خود بخودی در ماهی لوچ گزارش شده است (Arai, 1991). تتراپلوئیدی می تواند از هیبریدگیری (به طور مثال در کپور) نیز به وجود آید. از آن جا که القای تتراپلوئیدی توسط شوک گرمایی سهل الوصول تر از دیگر شوک های فیزیکی است، لذا معمول ترین روش جهت دستکاری کروموزومی در ماهیان محسوب می شود (Abdel-Rahman, 1999). القای تتراپلوئیدی براساس سرعت تکامل جنینی تنظیم می شد و از این رو برای انواع مختلف گونه های ماهیان متفاوت است. تخم هایی که کیفیت پایینی دارند، به شوک حرارتی نیز واکنشی ضعیف نشان می دهند و میزان بازماندگی در آن ها بسیار پایین است. مدت زمان تکامل جنینی گروه های پلوئیدی کوتاه تر از مابقی گروه ها می باشد. گروه های

Downloaded from ornamentalaquatics.ir at 0:57 +0430 on Sunday April 21st 2019

تتراپلوئید قبل از گروه های تریپلوئید و دیپلوئید تفریخ می شوند. به علاوه نرهای تتراپلوئید قزل آلای رنگین کمان گامت هایی تماما دیپلوئید تولید می کنند در حالیکه ماده های تتراپلوئید اصولا اووسیت های دیپلوئید با تعدادی اووسیت های تریپلوئید و تتراپلوئید تولید می نمایند (Chourrout, 1987).

پس از انجام هرگونه دستکاری کروموزومی لازم است که صحت آن مورد ارزیابی قرار گیرد. تا کنون روش های متنوعی برای این منظور مورد استفاده قرار گرفته است که به برخی از رایج ترین آن ها در خصوص اشاره شده است. به دلیل اینکه بافت های فرد پلی پلوئید دارای محتوای DNA بیشتر، اندازه هسته، تعداد کروموزوم بیشتر و اندازه سلولی بزرگتری نسبت به موجود دیپلوئید است. پلوئیدی میتواند به وسیله چندین روش شناسایی شود.

جهت شناسایی ماهیان دستکاری شده میتوان از روش های مختلفی استفاده کرد که به طور کلی شامل روش های مستقیم (نظیر کاریوتیپ) و روش های غیر مستقیم (نظیر گسترش خونی، آنالیز NORs، مارکر های ژنتیکی و فلوسایتومتری) است. روش های گسترش خونی و آنالیز NORs به دلیل سادگی و سرعت مناسب، بیشترین کاربرد را دارند. در این روش گسترش خونی اندازه گیری سطح و حجم هسته های سلول های قرمز خون انجام می پذیرد. اندازه گیری ابعاد سلولی و هسته یکی از روش های معتبر جهت انواع پلوئیدی است. یک روش ساده تععین سطح پلوئیدی در ماهیان استفاده از رنگ آمیزی نیترات نقره سلول است. این روش شامل تعیین حداکثر تعداد هستک ها در هر سلول است که با استفاده از رنگ آمیزی نیترات نقره مشخص می شود.هر بافتی در هر نوع سلولی میتواند مورد استفاده واقع شود و احتیاج به آنالیز کروموزوم نیست (Diaz,1993).

۲-القاء تتراپلوئیدی در ماهیان

اولین مطالعه در مورد القاء تتراپلوئیدی در قزل آلای رنگین کمان و ماهی آزاد اقیانوس اطلس، به وسیله نگهداری تخم های تازه لقاح یافته برای مدت زمان کوتاه در محلول سیتوکالاسین B انجام شد. هدف این کار به دست آوردن قزل آلای تریپلوئید به وسیله لقاح تخم معمولی با اسپرم حاصل از ماهیان نر تتراپلوئید بود. القاء تتراپلوئیدی در قزل آلای رنگین کمان به وسیله شوک گرمایی ۲۸ درجه سانتی گراد در تخم های لقاح یافته صورت گرفت. شروع شوک بین ۶/۵ ساعت تا ۹ ساعت پس از لقاح و مدت شوک بیش از ۱۴ دقیقه بود. در نرخ بقاء اختلافات زیادی بین گروه های مختلف وجود داشت و نسبت های مختلفی از تتراپلوئید، دیپلوتتراپلوئید و جنین های دیپلوئید به دست آمد. نرخ مرگ و میر تتراپلوئید ها بالا بود. برای تعیین سطح پلوئیدی از روش های سلولی مثل کاریوتیپ استفاده شد (Chourrout,1982). ذات بالقوه تتراپلوئیدی افزایش هتروزیگوسیتی و نیز امکان استفاده از آن ها به عنوان مولد برای تولید ماهیان تریپلوئید است (Diter, 1988). از معایب تتراپلوئیدی میتوان به افزایش حجم سلول ها و در نتیجه کاهش تعداد سلول ها اشاره کرد.به عنوان مثال بزرگی سر اسپرم، عبور آن از میکروپیل تخمک های هاپلوئید را مشکل یا غیر ممکن می سازد). همچنین می تواند مشکلاتی در جفت شدن و جدا شدن کروموزوم های همولوگ در خلال تقسیم میوز به وجود آورند که منجر به آنیوپلوئیدی می شود (Chourrout, 1987).

پوردام و همکاران در سال ۱۹۸۵ در مطالعه ای از شوک حرارتی ۲۸ درجه سانتی گراد، در فاصله زمانی ۴ ساعت و ۳۰ دقیقه پس از لقاح و برای مدت زمان ۱۰ دقیقه، برای تولید تتراپلوئید و دیپلوئید های ماده زاد و تولید هیبرید تتراپلوئید بین قزل آلای رنگین کمان و دیگر گونه های آزاد ماهیان استفاده نمودند. در این آزمایش برای تعیین پلوئیدی از انالیز الکتروفورزی و اندازه گیری هسته ی سلول استفاده شد (Purdom, 1985).

امیر وفایی سعدی و همکاران در سال ۱۳۹۰ در تحقیقات خود روی قزل آلای رنگین کمان به این نتیجه رسیدند که جهت القای تتراپلوئیدی در ماهی قل آلای رنگین کمان در دمای آب انکوباسیون (۱۱ درجه) دمای مناسب جهت القای شوک حرارتی، ۲۸ درجه سانتی گراد و زمان مناسب آغاز شوک دهی ۶۵ ساعت – درجه پس از لقاح است. این زمان آغاز تقریبا معادل با شروع تقسیمات جنینی در این دما است. در مورد دوره شوک بسته به اندازه تخمک (بالای ۵ میلی متر و زیر ۵ میلی متر) به ترتیب ۱۰ و ۵ دقیقه جهت القاء مناسب هستند (نکوئی فرد ،۱۳۹۰). استفاده از شوک فشار جهت القاء تتراپلوئیدی بیشتر از شوک گرمایی موثر است (Chourrout,1982).

۳-روش های شناسایی ماهیان دستکاری شده کروموزومی

تتراپلوئید ها به طور مشخص اریتروسیت های بزرگتر و ابعاد هسته ای بزرگتری از دیپلوئید ها دارند. برای شناسایی پلوئیدی از گلبول های قرمز استفاده می کنند که اندازه محور بزرگ هسته گلبول قرمز می تواند منعکس کننده تفاوت بین انواع دیپلوئید و پلی پلوئیدها باشد. همچنین در ماهی قزل آلای رنگین کمان تنها با انداه گیری ابعاد هسته گلبول قرمز به منظور سنجش صحت تتراپلوئیدی استفاده شده است(Woznicki *et al*,.2002) . در ماهی لوچ نیز برای تعیین سطوح پلوئیدی از روش اندازه گیری ابعاد گلبول قرمز استفاده شده است.Phillips و همکاران (۱۹۸۶) و Flajšhans و همکاران (۱۹۹۲) روشی را برای تعیین سطح پلوئیدی به کار بردند که امکان شناسایی نمونه های مختلف پلوئیدی را فراهم می کرد آن ها در بعضی از گونه های ماهیان تعداد هستک ها در اینتر فاز سطح پلوئیدی را منعکس می کنند، استفاده نمودند.

Downloaded from ornamentalaquatics.ir at 0:57 +0430 on Sunday April 21st 2019

Babiak و همکاران (۱۹۹۸) از این روش در قزل آلای رنگین کمان دستکاری شده توسط شک حرارتی برای شناسایی تتراپلوئید ها استفاده نمودند. محققین دیگری نشان دادند که آنالیزهای کمتر از ۴۰ سلول در مرحله اینترفاز سلولی توانایی مثبت در شناسایی هاپلوئید، دیپلوئید و تریپلوئید گونه سیم دریایی دارد (Babiak *et al*,. 1998).

دلایلی برای میزان کاهش بقا در تتراپلوئید ها وجود دارد که می توان به پدیده موزائیک شدن، آنیوپلوئیدی، افزایش نامتناسب سطح سلول نسبت به حجم آن و وقوع اشتباهات سلولی اشاره کرد. علت میزان کاهش بازماندگی در اثر القا شوک این است که شوک های مکانیکی یا فیزیکی در ماهی قزل آلای رنگین کمان میتوان به وسیله انعقاد زرده به تخم ها آسیب برساند. به طور مثال در ۴ ساعت اولیه پس از لقاح حساسیت تخم ها دو برابر ساعت اول پس از لقاح است، از این رو دستکاری تخم ها تا ۶ ساعت پس از لقاح ممکن است بقاء لاروی را تحت تاثیر قرار دهد .میزان بقا در مرحله چشم زدگی در دمای ۲۸ و ۳۰ تا حد زیادی با زمان آغاز شوک ارتباط داشت. علت این امر میتواند حساسیت بالای تخم ها در مراحل اولیه جنینی باشد. شوک دهی در دماهای بالا منجر به افزایش میزان مرگ ومیر در میان تخم های شوک دیده می گردد. علت این است که دماهای بالا برای القاء تتراپلوئیدی سبب به وجود آمدن پدیده موزائیک و درنتیجه بالا رفتن میزان مرگ و میر در میان تتراپلوئیدها است. استفاده از شوک هایی با شدت بالا می تواند نرخ پایین بقاء را توجیه کند. از طرف دیگر علت مرگ و میر بالا خصوصا در مراحل قبل از چشم زدگی تولید انبوه بچه ماهیان آنیوپلوئید در اثر شوک است (Chourrout, 1984). میزان بقاء لارو های حاصل از تخم های بزرگتر، نسبت به لارو های حاصل از تخم های کوچک تر بیشتر است. علت آن است که ذخیره انرژی زیادتر می تواند حساسیت به استرس را در تخم های بزرگتر کاهش دهد. در نتیجه گروه های ماهیان نورس بزرگ که از تخم های بزرگ به وجود آمده اند، احتمالا بهترین قابلیت تحمل استرس ها را نسبت به ماهیان نورس کوچکتر دارا هستند (Hutchings, 1991).

۴-سنجش ابعاد گلبول های قرمز در انواع دیپلوئید وتتراپلوئید

خون از جمله بافت هایی است که به شدت تحت تاثیر ویژگی های زیستی و محیطی قرار می گیرد، عوامل مختلف از جمله سن، بلوغ جنسی، جنسیت، درجه حرارت محیط همه از عواملی هستند که به طور موثر بر بافت خون اثر گذار می باشند (درفشان، ۱۳۸۵). گلبول های قرمز خون در ماهیان تتراپلوئید قزل آلای رنگین کمان به طور قابل ملاحظه ای نسبت به گلبول های قرمز در انواع دیپلوئید وسیع و حجیم تر هستند. افزایش ابعاد گلبولی در اثر القای پلوئیدی حالتی مرسوم است و عموما به دلیل افزایش میزان محتوی مواد وراثتی هسته رخ می دهد. اندازه هسته گلبول قرمز در تتراپلوئیدها اندکی بزرگتر از دیپلوئیدها است (Chourrout,1986). القای تتراپلوئیدی در ماهیان منجر به افزایش ابعاد گلبولی می گردد، اگرچه نسبت افزایش ابعاد در گونه‌های مختلف متفاوت است (Pillips,1986). به طور کلی طول هسته یا سلول نسبت به عرض آن به نسبت بیشتری تحت تاثیر پلوئیدی قرار می گیرد به طوری که در بسیاری از موارد تنها سنجش طول هسته (محور بزرگ) به عنوان شاخص القاء پلوئیدی در ماهیان مورد استفاده قرار گرفته است. درصد ناهنجاری در گلبول های قرمز ماهیا تتراپلوئید در مقایسع با انواع دیپلوئید بسیار بیشتر بود، این ناهنجاری ها عمدتا شامل وجود سلول هایی با هسته یا سیتوپلاسم تقسیم شده و نیز حضور گلبول های قرمز نابالغ در گسترش ها بود. اگرچه علت این ناهنجاری ها مشخص نیست اما برخی مطالعات نشان داده اند که ماهیان پلی پلوئید تحت شرایط استرس زا، سهم قابل توجهی از گلبول های قرمز ناهنجار تولید می کنند که در واقع نشان دهنده رها سازی پیش از موعد گلبول های قرمز در جریان خون است (درفشان، ۱۳۸۵). این امر شاید بیانگر حساسیت بالاتر ماهیان پلی پلوئید نسبت به عوامل استرس زای محیطی در مقایسه با انواع دیپلوئید باشد (Aldridge,1990).

تاکنون شوک های حرارتی متنوعی جهت القاء پلوئیدی در آزاد ماهیان مورد استفاده قرار گرفته است. اصولا در القاء پلوئیدی عوامل متفاوتی می تواند تاثیر گذار باشد، از جمله مهمترین این عوامل، ویژگی های خاص شوک به کار رفته نظیر درجه حرارت شوک، دوره شوک دهی و زمان آغاز شوک است (Felip,2001). علاوه بر عوامل مذکور، عواملی همچون دمای آب حوضچه های نگهداری مولدین یا آب مخازن نگهداری تخم ها پس از لقاح و قبل از اعمال شوک (Phillips,1986). کیفیت گامت های مورد استفاده، به ویژه درجه رسیدگی (فوق رسیدگی تخمک ها) و حساسیت خاص هر نژاد و یا حتی هر فرد نسبت به اعمال شوک، میتواند در بازده شوک موثر باشد. تفاوت در زمان تقسیم در میان جمعیت های مختلف یا در میان مولدین ماده ی مختلف می تواند میزان تغییرات درصد القاء تتراپلوئیدی را توجیه کند؛ از این رو اغلب روش‌ها براساس زمان آغاز شوک و مدت زمان شوک هستند. علاوه بر تاثیرات ژنتیکی، تکنیک و روش مورد استفاده در القاء تتراپلوئیدی نیز نتایج متفاوتی را در میزان درصد و بازده پلوئیدی به وجود می آورد. به طور کلی در تخم های بالای ۵ میلی متر میزان بازده تتراپلوئیدی بیشتر از گروه زیر ۵ میلی متر می باشد. به نظر می رسد که تخم های کوچک تر به دلیل فضای کوچکتر بیشتر تحت تاثیر شوک قرار می گیرند، چرا که فاصله هسته تخم با دیوار سلول کمتر است لذا شوک حرارتی بیشترین تاثیر را بر روی این نوع تخم ها می گذارد (Diaz,1993).

Downloaded from ornamentalaquatics.ir at 0:57 +0430 on Sunday April 21st 2019

منابع

درفشان، س.، ۱۳۸۵. دستکاری های کروموزومی ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* و قزل آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* و مقایسه رشد در نسل F_1، رساله دکتری شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۴۰ ص.

نکوئی فرد. ع.، درافشان. س. و وفائی سعدی. ا.، ۱۳۹۰. بهینه سازی شوک حرارتی جهت القاء تتاپلوئیدی در ماهی قزل آلای رنگین کمان، دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده منابع طبیعی، ۶۴ ص.

Abdel-Rahman, A., kennetheb, E., jilla, D. and Tows. L., 1999. Induction of Triploidy and Tetraploidy in Nile Tilapia,oreochromis niloticus. Journal of the World aquaculture society, 30: 28-34.

Aldridge, F.J., Marston, R.Q. and Shireman, J.V., 1990. Induced triploids and Tetraploids in bighead carp, Hypophthalmichthys *nobilis*, verified by multi-embryo cytofluorometric analysis. Aquaculture, 87(2): 121-131.

Arai, K., Matsubara, K. and Suzuki, R., 1991, "Karyotype and erythrocyte size of spontaneous Tetraploidy and triploidy in the loach *Misgurnus anguillicoudatus*. Nippon Suisan Gakkaishi, 57(12): 2167-2172.

Babiak, I., Glocowski, J., Luczynsky, M., Goryczko, K., Dobosz, S. and Kuzminski, H., 1998. The effect of individual male potency on fertilization ability of fresh and cryopreserved milt of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture research, 29(5): 337-340.

Benfey, T.J. and Sutterlin, A.M., 1984, Growth and gonadal development in triploid landlocked Atlantic Salmon Salma Salar, Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 41:1387-1392.

Chourrout, D. and Nakayama, I., 1987, Chromosome studies of progenies of tetraploid female rainbow trout, Theoretical and Applied Genetic. 74: 687-692.

Diaz, N.F., Iturra, P., Veloso, A., Estay, F. and Colihueque, N., 1993, Physiologes factors affecting triploid production in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture, 114: 33-40.

Dunhum, R.A., 2004. Aquaculture Fisheries Biotecnology. Genetic Approaches, CABI Publishing, 372 p.

Flajšhans, M., Rab, P., & Dobosz, S. ,1992. Frequency analyses of active NORs in nuclei of artificially induced triploid fishes. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 85(1), 68-72.

Hutchings, J.A., 1991. Fitness consequences of variation in egg size and food abundance in brook trout *Salvelinus fontinalis*, Evolution, 45(5): 1162-1168.

Mair, G.C., 1993. Chromosome set Mainpulotion in Tilapia –techniques, Problems and prospects. Aquaculture, 111: 227-244.

Pandian, T.J. and Koteeswaran, R., 1998. Ploidy induction and sex control in fish. Hydrobiologia, 384:167-243.

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

Purdom,C.E.,1993.Chromosome engineering. *Genetics and Fish Breeding*, 204-222 pp.

Woznicki, P., & Kuzminski, H., 2002. Chromosome number and erythrocyte nuclei length in triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Caryologia*, 55(4), 295-298.