# مقایسه زمان اولین تقسیم سلولی میتوز در جنین قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) نژاد فرانسه و مولدین موجود در اردبیل

**غلامرضا بیشکول[1*]، شیلا صفائیان [2]، حسین نگارستان [3] و محمدرضا نوروز فشخامی [4]**

۱و۳- گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

۲- گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

۴- موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۶/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۲/۲۵

**چکیده**

**این مطالعه برای تعیین فاصله زمانی اولین تقسیم میتوزی یا First Cleavage Interval (FCI) در دو گروه مولدین نژاد فرانسه و مولدین موجود در اردبیل به منظور تنظیم زمان القاء شوک برای به حداکثر رساندن میزان القاء تتراپلوئیدی و افزایش میزان بقاء در لاروهای شوک دیده انجام گردید. برای انجام این تحقیق از تخم‌های دو گروه مولدین نژاد فرانسه و اردبیل استفاده گردید و ۷ ساعت پس از لقاح به فاصله زمانی ۱۰ دقیقه تا ۱۰ ساعت پس از لقاح و در هر بار به تعداد ۱۰ عدد تخم نمونه برداری شد. نمونه‌ها با محلول فیکساتیو (داویدسون) فیکس شدند. فاصله زمانی اولین تقسیم میتوزی یا FCI زمانی در نظر گرفته شد که ۵۰ درصد تخم‌ها به مرحله تقسیم رسیدند و در بررسی میکروسکوپی، این مرحله، زمانی در نظر گرفته شد که خط میانی تقسیم ظاهر شد. پس از بررسی نمونه‌ها میانگین FCI برای مولدین نژاد فرانسه ۵۶۰ دقیقه پس از لقاح و برای مولدین موجود در اردبیل ۵۷۰ دقیقه پس از لقاح برآورد شد.**

**واژه‌های کلیدی:** قزل آلای رنگین کمان، تتراپلوئیدی، میتوز، FCI

* نگارنده پاسخگو: jahansetod@gmail.com

**مقدمه**

یکی از کاربردهای دستکاری های کروموزومی کـه در صنعت آبزی پروری مورد استفاده قـرار مـی‌گیـرد، بـرای عقیم کردن ماهیان می‌باشد (Nichols, 1990; piferrer *et al*,. 2009) . ماهیان دارای کروموزوم‌های با مضرب فـرد عقیم هستند و آنهـایی کـه دارای مضـربی زوج هسـتند زایـا می‌باشند (Weber & Hostuttler, 2012). بنابراین ماهیـان تتراپلوئید زایا و ماهیان تریپلوئید عقیم می‌باشند. تولید ماهیان تریپلوئید به دو روش مستقیم (القایی) و یا غیر مسـتقیم (غیرالقـایی) امکـان پـذیر اسـت (کلباسـی و همکاران، ۱۳۸۲). در روش مستقیم یا القایی بـا اعمـال شوک‌های محیطـی پـس از لقـاح، از آزاد شـدن دومـین گویچه قطبـی از تخـم جلـوگیری مـی‌کننـد و در روش غیرالقایی ابتدا مولدین تتراپلوئیـد بـر مبنـای حـذف اولین تقسیم جنینی از لقاح، بـا اعمـال شـوک‌هـای محیطی تولید می‌گردند و سپس با آمیزش ماهیان تتراپلوئید ماده و دیپلوئید نـر ماهیـان تریپلوئیـد حاصـل مـی‌شـود (Weber & Blance *et* Hostuttler, 2012; Zhang & Onozato, 2004; *al*., 1993; Chourrout, 1984). نتـایج گـزارش شـده در نوشته‌های مربوط به دستکاری‌های کروموزومی در قزل آلای رنگـین کمـان بـه وسـیله توقـف اولـین تقسـیم جنینی، در جنین‌های در حال توسعه‌ی تکـاملی بـرای تولید تتراپلوئید و تمام ماده و یا نرزایی بسیار متفـاوت مـی‌باشـد (Ihssen *et al*., 1990) . در تحقیـق‌هـای مختلف میزان بقاء از ۸ تا ۴۰ درصد و موفقیت القاء نیز از ۸ تا ۱۰۰ درصد متغیر بوده و زمان شروع القـاء نیـز در این تحقیق‌ها بسیار متفاوت گزارش گردیـده اسـت. بـه هـر حـال بـرای بهینـه سـازی دسـتورالعمل القـاء تتراپلوئیـد بایسـتی فاکتورهـای شـدت شـوک، طـول شـوک و زمـان شـروع شـوک بهینـه شـود (Hershberger & Hostuttler, 2012). از آنجـایی کـه القاء تتراپلوئیدی تابع شـرایط محیطـی و ویژگـی‌هـای ژنتیکی مولدین محل انجـام تحقیـق مـی‌باشـد، نتـایج متفـاوتی در ایـن خصـوص ارائـه گردیـده اسـت (Chourrout & Chevassus, 1986; Hershberger & Hostuttler, 2005; Thorgaard *et al*., 1981; Weber & Hostuttler, 2012).

یکی از پیش فرض‌هایی که در آن القاء تتراپلوئیـدی و ژینوژنزیز و نرزایی بـر پایـه آن اسـتوار اسـت، زمـان اولین تقسیم میتوزی می‌باشـد. بایسـتی زمـان اعمـال شوک در درصدی از فاصله زمانی اولین تقسیم یا FCI در دمای مشخص باشد. این زمان در نژادهای مختلف و در شـرایطی پرورشـی متفـاوت و حتـی در سـال‌هـای متفاوت در یک نژاد متفـاوت اسـت (Hershberger & Hostuttler, 2005). بـه همـین دلیـل نتـایج القـاء در پژوهش‌های مختلف به دلیل مد نظر قرار ندادن تفاوت‌های FCI در نژادهای مختلف و در شرایط پرورشی متفـاوت بـا هم تفاوت دارد (Weber & Hostuttler, 2012).

در تحقیق حاضر، به دلیل تفاوت‌های ذکـر شـده در FCI و اهمیت این تفاوت‌هـا، بـه تعیـین زمـان اولـین تقسیم میتوزی در جنین قزل آلای رنگین کمـان نـژاد فرانسوی و مولدین موجود در اردبیل برای القاء شـوک پرداخته شده است.

**مواد و روش‌ها**

این تحقیق در زمستان سال ۱۳۹۱، در مزرعه تکثیر و پرورش ماهی جهانستود واقع در ۱۳ کیلومتری شهرستان مشگین شـهر انجـام گرفتـه اسـت. در ایـن پـژوهش، از مخلوط تخمک سـه مـاهی مولـد مـاده نـژاد فرانسـه بـا میانگین وزنی ۸ کیلـوگرم و بـا میـانگین سـنی ۴ سـال استفاده شد. لقاح به روش خشک و با استفاده از مخلـوط اسپرم ۳ ماهی مولد نر بـا میـانگین وزنـی ۴ کیلـوگرم و میانگین سنی ۳ سال انجام شد و در مولـدین محلـی بـا میانگین وزنی ۵ کیلوگرم لقاح به روش فوق انجام گرفت. پس از گذشت مدت ۳ الی ۴ دقیقه و انجام عمـل لقـاح، اسپرم اضافی از روی تخمک‌ها شسته شد. سپس آب بـه تشتک حاوی تخم‌ها اضافه شد تا تخم‌ها به مرحله سفت شدن برسند. زمان شروع لقاح زمان صفر در نظـر گرفتـه شد (Hershberger & Hostuttler, 2005). تخم‌ها پس از رسیدن به مرحله سفت شدن، به انکوباتور منتقـل و در

دمای ۱۱ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. پس از ۷ ساعت یا ۴۲۰ دقیقه از زمان شروع لقاح تا ۱۰ ساعت یا ۶۰۰ دقیقه بعد از لقاح به مدت ۳ ساعت به فاصله زمانی ۱۰ دقیقه، تعداد ۱۰ عدد تخم به صورت تصادفی نمونه برداری شد. در نهایت، مجموعاً ۱۸ بار و به تعداد ۱۸۰ عدد تخم از هر گروه مولد نمونه برداری انجام شد. نمونه‌های تخم برداشته شده به سرعت به داخل ۲۰ میلی لیتر محلول فیکساتیو، شامل حجم‌های مساوی متانول و استیک اسید و آب مقطر انتقال یافت. این عمل به منظور توقف توسعه و تکامل جنینی در زمان نمونه برداری انجام گرفت. پس از ۱۰ دقیقه محلول فیکساتیو قبلی از روی تخم‌ها خالی شد و مجدداً محلول فیکساتیو داویدسون، شامل ۲۰۰ میلی لیتر فرمالین، ۱۰۰ میلی لیتر گلیسرول، ۳۰۰ میلی لیتر اتانول، ۱۰۰ میلی لیتر استیک اسید و ۳۰۰ میلی لیتر آب مقطر، به تخم‌ها اضافه شد. به این ترتیب از چروکیدگی تخم‌ها پیشگیری شد تا در فرصت کافی در زیر میکروسکوپ قابل مطالعه باشند (Hershberger & Hostuttler, 2005; Weber & Hostuttler, 2012).

یک روز بعد، تخم‌های دو گروه مولدین هر کدام ۱۸۰ عدد که در دسته‌های ۱۰ تایی نمونه برداری شده بودند، مجموعاً ۳۶۰ عدد تخم در زیر میکروسکوپ زایس (Zeiss) از لحاظ توسعه و تکامل جنینی بررسی شدند. میانگین FCI یا فاصله زمانی اولین کیلواژ، زمانی در نظر گرفته شد که در آن زمان ۵۰ درصد تخم‌ها بعد از لقاح به کلیواژ رسیدند. تعداد تخم‌های لقاح نیافته در این برآورد منظور نگردید و تعداد آنها از تعداد کل تخم‌ها کسر گردید (Hershberger & Hostuttler, 2005; Weber & Hostuttler, 2012).

## تجزیه و تحلیل آماری

برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگراف – اسمیرنوف و تجزیه، تحلیل آماری نتایج مربوط به دو گروه مولدین نژاد فرانسه و مولدین موجود در اردبیل از آزمون t مستقل در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده گردید.

## نتایج

نمونه‌های تخم از نظر میزان توسعه تکاملی و وجود یا عدم وجود ژرمینال دیسک در چهار گروه:

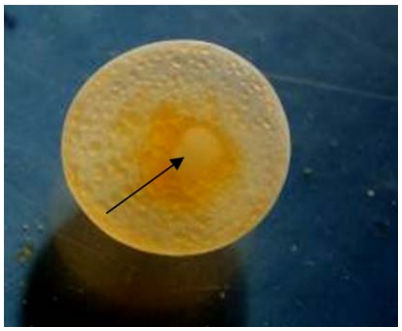
۱ـ تخم‌های قبل از تقسیم میتوز که در این تخم‌ها یک عدد ژرمینال دیسک قابل رویت بود.

۲ـ تخم‌های در حین تقسیم میتوز که در این تخم‌ها خط تقسیم یا شیار تقسیم در وسط ژرمینال دیسک قابل رویت بود.

۳ـ تخم‌های بعد از تقسیم میتوز که در این تخم‌ها ژرمینال دیسک به دو سلول کاملاً مساوی تقسیم شده بود.

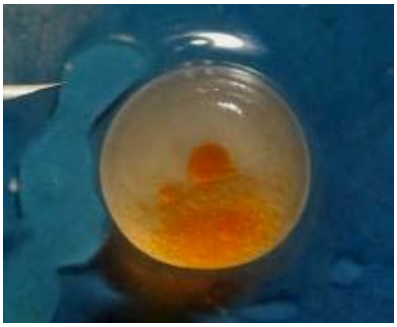
۴- تخم‌های لقاح نیافته که ژرمینال دیسک در آنها رویت نگردید، طبقه بندی شدند (شکل‌های ۱ الی ۴).

در دمای انکوباسیون ۱۱ درجه سانتی گراد، تخم‌های مولدین نژاد فرانسه ۵۵۰ دقیقه بعد از لقاح و تخم‌های مولدین موجود در اردبیل ۵۶۰ دقیقه بعد از لقاح به کلیواژ رسیدند. تخم‌های مولدین نژاد فرانسه با فاصله زمانی ۱۲۰ دقیقه، از زمان ۴۳۰ تا ۵۵۰ دقیقه بعد از لقاح به اولین مرحله تقسیم رسیدند و زمان شروع اولین تقسیم در تخم‌های مولدین موجود در اردبیل ۴۳۰ دقیقه بعد از لقاح و با فاصله زمانی ۱۳۰ دقیقه بود. در هر بار تعداد ۱۰ عدد تخم نمونه برداری شد. میانگین FCI یا فاصله زمانی اولین تقسیم جنینی که در این زمان ۵۰ درصد کل تخم‌های نمونه برداری شده به اولین تقسیم سلولی رسیدند، برای تخم‌های مولدین نژاد فرانسه ۵۶۰ دقیقه بعد از لقاح و برای تخم‌های مولدین موجود در اردبیل ۵۷۰ دقیقه بعد از لقاح برآورد شد (جدول ۱).

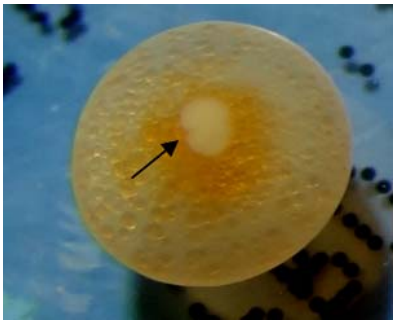


شکل ۱- تخم در حین تقسیم

شکل ۲- تخم قبل از تقسیم



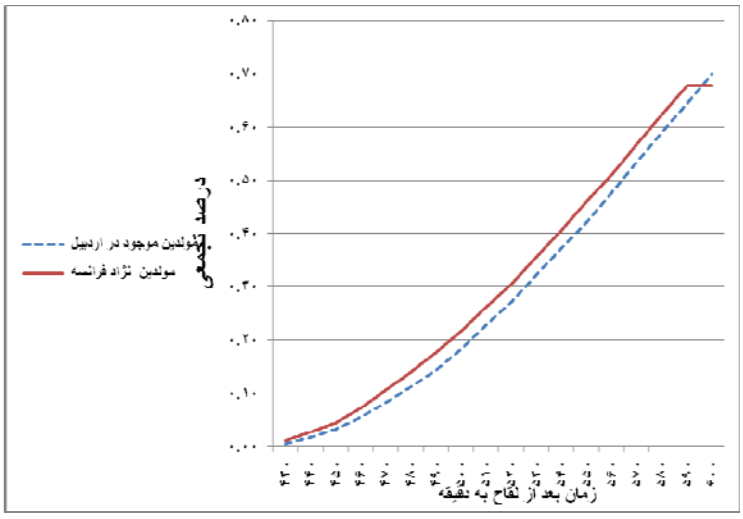
شکل ۳- تخم لقاح نیافته



شکل ۴- تخم بعد از تقسیم

جدول۱- تعیین زمان متوسط کلیواژ تخم‌ها در مولدین موجود در اردبیل و نژاد فرانسه

| تیمار / تکرار | FCI نژاد فرانسه به دقیقه | FCI مولدین موجود در اردبیل به دقیقه |
|---|---|---|
| I | ۵۶۲ | ۵۷۰ |
| II | ۵۵۸ | ۵۶۵ |
| III | ۵۶۰ | ۵۷۵ |
| میانگین | ۵۶۰ | ۵۷۰ |




شکل۵- تعیین ۵۰ درصد کلیواژ تخم‌ها در گروه مولدین

اختلاف میانگین FCI در دو گروه مولدین، ۱۰ دقیقه محاسبه شد (شکل ۵). داده‌های آماری مربوط به دو گروه مولدین نرمال و تفاوت FCI آن‌ها معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بود.

## بحث و نتیجه‌گیری

هدف از این تحقیق برآورد FCI میانگین برای تخم‌های مولدین قزل آلای رنگین کمان نژاد فرانسه و مولدین موجود در اردبیل بود، تا بدین ترتیب بتوان زمان استاندارد برای القاء حداکثر تتراپلوئید از تخم‌های هر دو گروه مولدین را به دست آورد. زیرا زمان FCI براساس نتایج محققین مختلف در ماهی قزل آلای رنگین کمان و سایر آزاد ماهیان متفاوت می‌باشد (Herstgen – Schwark, 1993; Hershberger & Hostuttler, 2005; Knight, 1963; Myers *et al*., 1987; Weber & Hostuttler, 2012). علاوه بر این، تحقیق در سرعت توسعه و تکامل جنینی در قزل آلای رنگین کمان (Ferguson *et al*., 1985; Robison & thorgaard, 2004) و در سایر آزاد ماهیان (Beacham, 1988; Hebert *et al*., 1998; Tallman, 1986) نشان داد که اختلاف موجود در سرعت و تکامل جنینی منشأ ژنتیکی دارد و امکان دارد این صفات با اولین تقسیم جنینی ارتباط داشته باشد. زمان شروع اولین تقسیم در جمعیت‌های مختلف با هم تفاوت داشته و این اختلاف‌ها همانطوری که اشاره شد منشأ ژنتیکی دارد (Hershberger & Hostuttler, 2005). علاوه بر تأثیر ژنتیک بر میزان FCI، شرایط محیطی و نگهداری مولدین نیز بر میزان FCI تأثیر گذار است. نتایج نشان داده است که مولدین با زمینه ژنتیکی مشترک در شرایط پرورشی متفاوت یعنی در دو مزرعه پرورشی جدا از هم دارای میزان FCI متفاوت هستند. حتی در یک مزرعه پرورشی یک جمعیت از مولدین قزل آلا، میزان FCI متفاوتی در یک سال پرورشی در مقایسه با سال پرورشی دیگر داشته‌اند (Weber & Hostuttler, 2012). عامل دیگری که در میزان FCI تأثیر دارد سن تخمک یا زمانی است که از آزاد شدن تخمک‌ها می‌گذرد. تخمک‌ها این زمان را چه در محفظه شکم ماهی و چه در محیط آزمایشگاهی سپری نمایند، میزان FCI آن‌ها تغییر می‌یابد. براساس نتایج محققین هر چه از زمان رها شدن تخمک بگذرد، میزان FCI افزایش می‌یابد. بر اساس نتایج Weber و Hostuttler در سال ۲۰۱۲، میان تخمک‌های لقاح یافته در روز اول و تخمک‌های لقاح یافته در روز سوم در میزان FCI و درصد لقاح تغییر چندانی دیده نشده بود، در تخمک‌های لقاح یافته در روز اول و روز هفتم ۱۵ دقیقه افزایش در میزان FCI و کاهش ۱۵ درصدی در میزان لقاح وجود داشت و در تخمک‌های لقاح یافته در روز اول و روز دهم میزان FCI، ۳۱ دقیقه افزایش یافته بود. همچنین براساس نتایج محققین دیگر سن تخمک گذاری چه در محفظه شکم ماهی و چه در شرایط آزمایشگاهی اثر معکوس روی کیفیت تخمک‌های ماهیان خواهد داشت (Azuma et al., 2003; Bromage et al., 1992; Komrakova & Holtz, 2009). در آزاد ماهی کوهو توانایی القاء تریپلوئیدی در تخمک‌های لقاح یافته در روز اول در مقایسه با تخمک‌های لقاح یافته در روز سوم و چهارم بهتر بود (Devlin *et al*., 2010; Azuma *et al*., 2003). اهمیت عملی FCI زمانی ظاهر می‌شود که با اندک تغییر در زمان القاء شوک براساس درصدی از FCI تغییری بزرگ در میزان القاء تتراپلوئیدی و درصد بقاء لاروها ایجاد می‌شود، این زمان بهینه در ۶۵ درصد از FCI برای القاء حداکثر تتراپلوئیدی و بیشترین بقاء لاروها به دست آمده است (Weber & Hostuttler, 2012). تغییر در زمان بهینه القاء شوک به میزان ۱۵ دقیقه باعث تغییر در میزان القاء تتراپلوئیده از ۱۰۰ درصد به صفردرصد شد (Hershberger & Hostuttler, 2007).

بر اساس نتایج تحقیق حاضر، دامنه زمانی برای مولدین نژاد فرانسه ۲ ساعت و برای مولدین موجود در اردبیل ۲ ساعت و ۱۰ دقیقه به دست آمد. در تحقیق Hershberger و Hostuttler در سال ۲۰۰۵، بیشترین

القـاء تتراپلوئیـدی در زمـان بهینـه القـاء شـوک در مولدینی به دست آمده بود کـه دارای زمینـه ژنتیکـی مشترکی بودند. زیرا براساس نتایج تحقیق اشاره شـده، در داخل جمعیت مولـدین، فاصـله بـین شـروع اولـین تسهیم تخم تا زمانی که همه تخم‌ها به مرحله تسـهیم رسیدند، ۲ ساعت و ۴۰ دقیقـه بـه طـول کشـید و در تخم‌های مولدین با منشأ ژنتیکی مشترک، این دامنه‌ی زمانی کمتر و ضریب تغییرات کوچک‌تر شـد و نتیجـه القاء به حداکثر رسید.

دامنه زمانی بـه دسـت آمـده در تحقیـق حاضـر در مقایسـه بـا دامنـه زمـانی محققـین ذکـر شـده کمتـر می‌باشد و به نظر می‌رسد علت این امر به دلیل زمینـه ژنتیکـی مشـترک در هـر دو گـروه مولـدین باشـد. در پژوهشی مشابه که از تخم‌های یـک جفـت مولـد نـر و ماده استفاده شده بود، درصد القاء تتراپلوئیدی به ۱۰۰ درصد رسیده بود(Horestgen *et al*., 1992) .

در تحقیق حاضر، هر دو گروه مولدین نژاد فرانسه و مولـدین موجـود در اردبیـل در یـک مزرعـه پرورشـی نگهداری شده بودنـد. بـه ایـن معنـی کـه فاکتورهـای محیطی و پرورشی در شرایط یکسانی قرار داشت ولـی این مولدین از نظر ژنتیکـی بـا هـم اخـتلاف داشـتند. میانگین FCI بـه دسـت آمـده بـرای تخـم‌هـای گـروه مولدین نژاد فرانسه ۵۶۰ دقیقـه پـس از لقـاح و بـرای مولـدین موجـود در اردبیـل ۵۷۰ دقیقـه بعـد از لقـاح برآورد گردید (جدول ۱) که در ایـن زمـان ۵۰ درصـد تخم‌ها به مرحله تسهیم یا کلیواژ رسیده بودند (شـکل ۵)، بنابر این به نظر می‌رسد، فاکتور ژنتیک باعث ایجاد اختلاف ۱۰ دقیقه‌ای در FCI میانگین دو گروه مولدین گردید. در تحقیقی که روی تخم‌هـای چهـار نـوع نـژاد مولدین به نام‌هـای ER، UV، SH و TL انجـام گرفـت میـانگین FCI بـه ترتیـب ۱۳/۸± ۵۱۲/۷، ۱۳/۸± ۵۲۶/۱، ۷/ ۱۰±۴۸۲/۵ و ۱۸/۳±۵۲۴/۹ برآورد گردید (Hershberger & Hostuttler, 2005). در تحقیق‌هـای دیگر بیشترین القاء تتراپلوئیدی براساس آزمون و خطا در زمان‌های مشخصی که تابعی از FCI مـی‌باشـد، بـه دست آمده است، به طوری کـه Thorgard و همکـاران در سال ۱۹۸۱ در ۵ ساعت، Chourrot در سال ۱۹۸۳ در هشـت و نـیم سـاعت پـس از لقـاح و Beak & Biggers در سـال ۱۹۸۳ در مـدت زمـان ۴۸۰ دقیقـه پـس از لقـاح بیشـترین القـاء تتراپلوئیـدی را بدسـت آوردند. به نظر مـی‌رسـد علـت تفـاوت در میـزان FCI میانگین در تحقیق حاضـر بـا نتـایج محققـین دیگـر و همچنین نتایج محققین اشاره شده با همدیگر به دلیل متغیرهایی مانند منشأ ژنتیکی، شرایط پرورشی و محل نگهداری مولدین و همچنین سن یـا زمـان رهـا شـدن تخمک‌ها در محوطه شکمی باشد.

لذا پیشنهاد می‌گردد که بـرای اعمـال شـوک بـه تخمک‌ها بهتر است که مولدین از نظـر آمـادگی بـرای رهاسازی تخمک‌ها هر روز بررسی شوند و در اولین روز رها شدن تخمک‌ها، با استفاده از تعدادی از آنها زمـان میانگین FCI بـرآورد شـود. سـپس براسـاس FCI بـه دست آمده زمان اعمال شـوک ارزیـابی شـده و در روز بعد نسبت به اعمال شوک اقدام گـردد، زیـرا کـه بـین FCI تخـم‌هـا روز اول تـا روز سـوم اخـتلاف چنـدانی براساس نتایج محققین ذکر شده وجود نداشت.

## منابع


کلباسی، م.ر.، باقری، ع.، پورقاسمی، م. و عبدالحی، ح. ۱۳۸۲. بررسی ایجاد ماهیان تتراپلوئید قزل آلای رنگین کمان به وسیله شوک‌های گرمایی. مجله علمی شیلات ایران، ۴: ۱۵۳-۱۴۳.

Azuma, T., Ohta, H., Oda, S., Muto, K., Yada, T. & Unuma, T. 2003. Change in fertility of Rainbow trout eggs retained in coelom. *Fisheries Science*, 69: 131–136.

Beacham,T. D. 1988. A genetic analysis of early development in pink and chum salmon at three different temperatures. *Genome*, 30:239-96.

Beck, M. L. & Biggers, C. J. l983. Erythrocyte measurements of diploid and triploid *Ctenopharyngodon idella* & *Hypophtalmichthys nobilis* hybrids. *Journal of Fish Biology*, 22:497-502.

Blanc, J. M., Poisson, H., Escaffre, A. M., Aguirre, P. & Valle'e, F. 1993. Inheritance

Knight, A. E. 1963. The embryonic and larval development of the Rainbow trout. *Transactions of the American Fisheries Society*, 92:344-355.

Komrakova, M. & Holtz, W. 2009. Factors responsible for successful chilled storage of unfertilized Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *Aquaculture*, 286: 156–163.

Myers, J., Iwamoto, R. N. & Hershberger, W. K. l987. The introduction of tetraploidy in salmonids. *Journal of the World Aquaculture Society*, 17: 1-17.

Nichols, K. M. 1990. Clonal lines and chromosome manipulation for aquaculture research and production. In: Overturf, K. (Ed.), Molecular Research in Aquaculture. Wiley-Blackwell, New Jersey.

Piferrer, F., Beaumont, A., Falguie're, J. C., Flajs-hans, M., Haffray, P. & Colombo, L. 2009. Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture*, 293: 125–156.

Tallman, R. F. 1986. Genetic differentiation among seasonally distinct spawning populations of chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *Aquaculture*, 57:211-217.

Thorgaard, G. H., Jazwin. M. E. & Stir, A. R. 198l. Polyploidy induced by heat shock in Rainbow trout: high interference over long map distance. *Genetics*, 103: 771-783.

Weber, G. M. & Hostuttler, M. A. 2012. Factors affecting the first cleavage interval and effects of parental generation on tetraploid production in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 344:231-238.

Zhang, X.L. & Onozato, H. 2004. Hydrostatic pressure treatment during first mitosis does not suppress first cleavage but the second one. *Aquaculture*, 240: 101–113.

of fertilizing ability in male tetraploid Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 110: 61–70.

Bromage, N., Jones, J., Randall, C., Thrush, M., Davies, B., Springate, J., Duston, J. & Barker, G. 1992. Brood stock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 100: 141–166.

Chourrout, D. l984.Pressure-induced retention of the second polar body and suppression of first cleavage in Rainbow trout production of all-triploid, all-tetraploid, and heterozygous and homozygous dipliod gynogenetics. *Aquaculture*, 6:111-126.

Devlin, R.H., Sakhrani, D., Biagi, C.A. & Eom, K. W. 2010. Occurrence of incomplete paternal-chromosome retention in GH-transgenic Coho salmon being assessed for reproductive containment by pressure-shock-induced triploidy. *Aquaculture*, 304: 66–78.

Ferguson, M. M., Danzrnan, R. G. & Allendorf, F. W. 1985. Developmental divergence among hatchery strains of Rainbow trout *(Salmo gairdneri):* pure strains. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 27(3):289-297.

Hebert, K. P., Goddard, P. L., Smoker, W. W. & Gharrett, A. J. 1998. Quantitative genetic variation and genotype by environment interaction of embryo development rate in pink salmon. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 55:2048-2057.

Hershberger, W. K. & Hostuttler, M. K. 2005. Variation in time to first cleavage in Rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)* embryos, *Journal of the World Aquaculture Society*, 36(1):96-102.

Hershberger, W. K. & Hostuttler, M. A. 2007. Protocols for more effective induction of tetraploid Rainbow trout. *North American Journal of Aquaculture*, 69: 367–372.

Herstgen - Schwark, G. 1993. Initiation of tetraploid breeding line development in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture and Fisheries Management*, 24(5):641-652.

Ihssen, P. E., McKay, L. R., McMillan, I. & Phillips, R. B. 1990. Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes: cytogenetic and fisheries applications. *Transactions of the American Fisheries Society*, 119:698-717.