

## "مقاله مروری"

## مروری بر ماده‌زایی (گاینوژنیز) مصنوعی در تاس‌ماهیان دریای کاسپین

محمد حسن‌زاده صابر<sup>\*</sup>

۱- بخش ژنتیک و بیوتکنولوژی انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۴/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۷/۱۰

## چکیده

در ماهیان خاویاری، پرورش تک‌جنس ماده، اقتصادی بوده و یکی از روش‌ها برای دستیابی به آن، القای گاینوژنیز (ماده‌زایی) می‌باشد. گاینوژنیز مرحله‌ای است که یک تخمک، بدون تاثیر ژنتیکی جنس نر تکامل می‌یابد یا به عبارتی یک روش تولید مثل است که در آن فرزندان، منحصراً از اطلاعات ژنتیکی مادر شکل می‌گیرند. در این تکنیک، می‌بایست اسپرم مورد استفاده غیرفعال ژنتیکی شود که برای غیرفعال کردن اسپرم از روش‌های مختلف اشعه ایکس، گاما (اشعه‌های یونیزه) و یا اشعه ماوراء بنفش (UV) استفاده می‌گردد. فعال‌سازی تکامل جنینی با اسپرم غیرفعال ژنتیکی منجر به تولید تخم‌هاپلوئید شده که به منظور دیپلوئیدسازی بایستی در زمان تقسیم میوزی دوم یا اولین تقسیم میوزی، از شوک‌های فیزیکی استفاده کرد. در این صورت تمامی فرزندان ایجاد شده دارای وراثت مادری بوده که بسته به نوع سیستم تعیین جنسیت، میزان تولید نتاج ماده مشخص می‌شود. در تاس‌ماهیان تعیین جنسیت به عهده مادر می‌باشد بنابراین با القای گاینوژنیز، هر دو جنس نر (نسبت کمتر) و ماده (نسبت بیشتر) تولید می‌شود که علاوه بر نقش آن در پرورش و تولید خاویار، می‌تواند در جلوگیری از انقراض این گونه‌های با ارزش نقش مهمی را ایفا کند.

**کلمات کلیدی:** تاس‌ماهیان، جنس ماده، گاینوژنیز، اسپرم غیرفعال ژنتیکی، دیپلوئیدسازی.

## مقدمه

ارزش اقتصادی ماهیان خاویاری علاوه بر نقش موثر آن در تنوع زیستی و تکامل، به دلیل داشتن گوشت بدون استخوان و خوش طعم و دارا بودن خاویار سیاه می باشد. به دلیل کاهش جمعیت طبیعی تاس ماهیان لازم است که آنها از طریق توسعه آبرزی پروری تولید شوند. تولید آنها در شرایط کنترل شده در دهه های اخیر افزایش یافته است و به سمت تجاری شدن (Wei et al., 2011; Bronzi et al., 2011) و به خصوص با اهداف حفاظتی پیش می رود (Takahashi and Officer, 2010; Williot et al., 2002). ماهیان خاویاری در شرایط کنترل شده رشد سریع نشان داده و به نسبت محیط طبیعی سریع تر به بلوغ جنسی می رسند (Chebanov and Billard, 2001). کاهش خاویار استحصال شده از منابع دریایی در دریای کاسپین (Birstein, 1993) با تقاضای شدید بین المللی برای خاویار و ایجاد بازار مستعد برای خاویار پرورشی روبرو گردیده است. پرورش تاس ماهیان می تواند فشار صید از منابع طبیعی را کاهش دهد و پرورش تمام ماده ماهیان خاویاری، تولید خاویار را افزایش داده و پاسخگوی تقاضای مصرف کننده می باشد، به همین دلیل تولید و پرورش ماهیان ماده دارای ارزش بالاتری از تولید و پرورش نرها و یا پرورش آنها بصورت مختلط در ماهیان خاویاری می باشد (Mims and Shelton, 1998). جهت تولید جمعیت های تمام ماده در تاس ماهیان می بایست کنترل جنسیت مورد توجه ویژه ای قرار گیرد (VanEennaam et al., 1996). دستکاری های ژنتیکی به خصوص گاینوژنیز می تواند به منظور تغییر نسبت جنسی نتاج در تاس ماهیان استفاده شود. بسیاری از مطالعات اظهار کرده اند که جنسیت در

تاس ماهیان اساسا به طور ژنتیکی تعیین می شود بنابراین نسبت جنسی آنها در حالت طبیعی اکثرا ۱:۱ مشاهده می شود و علائمی از تعیین جنسیت محیطی رویت نمی شود (Wuertz et al., 2018; Hurvitz et al., 1997; Doroshov et al., 2007). تولید ماهیان تمام ماده یا ماهیان ماده با تعداد بالاتر نسبت به نرها می تواند با دستکاری های ژنتیکی (گاینوژنیز) (Lebeda et al., 2014) یا تغییرات هورمونی امکان پذیر باشد. از آنجائی که سیستم تعیین جنسیت هتروگامتی ماده در تاس ماهیان، تاکنون به عنوان الگوی رایجی معرفی شده است (Fopp-Bayat et al., 2018) لذا گاینوژنیز به وسیله اسپرم غیرهمسان، می تواند گامی موثر در جهت احیای هر دو جنس نر و ماده از ذخایر منقرض شده در طبیعت باشد (Omoto et al., 2005; Hassanzadeh, 2015; Nowosad et al., 2014; Saber et al., 2014).

گاینوژنیز مرحله ای است که یک تخمک، بدون تاثیر ژنتیکی جنس نر تکامل می یابد یا به عبارتی یک روش تولید مثل است که در آن فرزندان، منحصر از اطلاعات ژنتیکی مادر شکل می گیرند (Arai, 2001; Donaldson and Devlin, 1996). این حالت بطور طبیعی در تعداد کمی از گونه های ماهیان رخ داده و می تواند در ماهیان پرورشی به منظور آمیزش خویشاوندی سریع القا شود (Purdum, 1969; Thorgaard, 1983). این روش در واقع یک نوع تکثیر بکرزایی (Parthenogenesis) محسوب می شود و فعال کردن روند تکاملی سلول تخم از طریق اسپرمی که از لحاظ ژنتیکی غیرفعال شده است صورت می گیرد. گاینوژنیز زمانی آغاز می شود که باروری تخمک ها با اسپرم همسان غیر فعال شده با اشعه UV تکامل یابد. تکامل تخمک شاید با لقاح اسپرم غیرهمسان متعلق به

گونه دیگر همراه باشد. استفاده از اسپرم غیرهمسان در القای گاینوژنیز این مزیت را دارد که اگر اشعه کافی به اسپرم نرسد، در هنگام لقاح یا دوره‌ای تشکیل نمی‌گردد (Peruzzi et al., 1993) و یا در صورت تشکیل دوره‌ای، فنوتیپ آن‌ها با گونه خالص مادری و یا گونه خالص پدری متفاوت است همچنان‌که Yamazaki در سال ۱۹۸۳ اعلام کرد که استفاده از اسپرم غیرهمسان در القای گاینوژنیز می‌تواند نشان دهد که در صورت تولید هیبرید، نتایج حاصله از لحاظ ریخت‌شناسی قابل تشخیص هستند. در هر دو حالت اسپرم اشعه دیده قدرت تحریک و بارورسازی تخم و فعال نمودن مراحل تکاملی را دارد ولی اطلاعات ژنتیکی پدر در آن مشارکت نمی‌کند.

### گاینوژنیز طبیعی

چندین گونه از ماهیان دارای روش تولید مثلی هستند که در آمیزش نرمال آن‌ها فرزندان گاینوژنتیک تولید می‌گردد. ماهی مولی آمازون (Girard, 1860) *Poecilia formosa* یک گونه گاینوژن است (Hubbs and Hubbs, 1932; Schultz, 1971) شکل طبیعی با دوره‌ای بین *P. mexicana* و *P. latipina* (Monaco et al., 1984) ایجاد می‌شود. نتایج این ماهی تمام ماده هستند و از تخمدان دیپلوئید تک جنسی با توقف در نوترکیبی اول یا تقسیم میوزی اول به دست آمده‌اند (Rasch et al., 1982). لقاح تخم‌های مولی آمازون از طریق اسپرم جنس مرتبط با *Poecilia* فعال شده ولی اطلاعات ژنتیکی پدر هیچ‌گونه مشارکتی در جنین ندارد. ممکن است که اسپرم آن‌ها با محیط سیتوپلاسمی تخم مولی آمازون ناسازگار باشد و در نتیجه فاقد کروموزوم‌های پدری شوند همچنان‌که در

دوره‌ای دیگر گونه‌ها شرح داده شده است (Yuzhen et al., 1989). بدین ترتیب نوزادان مولی آمازون به‌طور ژنتیکی در لکوسهای تعیین‌کننده جنسیت با مادرشان مطابقت داشته و گونه تکثیر شده تمام ماده است.

جمعیت‌های مشخصی از ماهی طلائی (Carassius auratus Linnaeus, 1758) نیز می‌توانند از طریق گاینوژنیز تولید مثل نمایند (Cherfas et al., 1994; Dong et al., 1996). برای زیر گونه *C. auratus gibelio* هر دو حالت دیپلوئید دوجنسی و تریپلوئید تمام ماده تشخیص داده شد (Boron, 1994). گزارش شده که تخمدان تریپلوئیدها دوکی شکل سه قطبی تکامل نیافته در مرحله میوز I ناشی از یک تقسیم غیرکاهشی میوزی می‌باشد (Cherfas, 1966). فعالیت تخم با اسپرم سایر کپورماهیانی که در همان منطقه زیست می‌کنند آغاز می‌شود ولی عدم ظهور نرها در جمعیت‌های گاینوژنتیک نشان‌دهنده عدم دخالت ژن‌های پدری می‌باشد (Ding et al., 1992; Rokicki and Kulikowski, 1994). در بعضی دیگر از گونه‌های کپور ماهیان نظیر کپور ماهی قنات شکم قرمز شمالی (*Phoxinus eos*) و کپور ماهی قنات فلس‌دار شمالی (*Phoxinus neogaeus*) دوره‌های دیپلوئید تمام ماده هستند و بطور کلونی در حالت گاینوژنیز تولید می‌کنند (Goddard and Dawley, 1990). در جنس *Cobitis* (رفتگر ماهی)، اشکال هیبرید دیپلوئید، تریپلوئید و تتراپلوئید تشخیص داده شده‌اند که شکل دیپلوئید تمام ماده است و به‌صورت گاینوژنیز تولید مثل می‌کند (از طریق تخمدان به‌وجود آمده از یک تقسیم غیرکاهشی میوزی در تریپلوئید (Vasilyev et al., 1991).

### گاینوژنیز القایی (مصنوعی)

گاینوژنیز القایی یا مصنوعی را می‌توان از تلاقی سلول تخمک هاپلوئید با اسپرمی که از لحاظ ژنتیکی غیرفعال شده است تولید کرد. برای غیرفعال کردن اسپرم از روش‌های مختلف اشعه ایکس، گاما (اشعه‌های یونیزه) و یا اشعه ماوراء بنفش (UV) استفاده می‌گردد. اشعه‌های یونیزه و UV موتاژن‌های فیزیکی قوی هستند که به عنوان عوامل سرطان‌زا، به ترتیب قابلیت شکست کروموزوم و DNA را دارند (Pandian, 2011). اشعه یونیزه ممکن است که DNA کروموزومی را با ایجاد شکستگی‌های دو رشته (DSB) تخریب کند که کشنده‌ترین شکل آسیب‌های DNA است. اشعه UV موجب آسیب‌هایی روی DNA می‌شود که ممکن است موجب DSB شود (Piferrer et al., 2004). هر چند هر دوی آن‌ها برای غیرفعال سازی DNA هسته‌ای در گامت‌های ماهیان برای القای گاینوژنیز و ایجاد افرادی با DNA هسته‌ای مادری مفید هستند (Pandian, 2011). اشعه‌های ایکس و گاما به علت انرژی بسیار زیاد و بالا بودن قدرت نفوذپذیری آن سبب تخریب کامل ژنوم اسپرم و حتی در حد شکستن اسپرم مؤثر است (Chourrout, 1988). اگرچه اشعه گاما و ایکس دارای نفوذ پذیری قوی است ولی از معایب آن می‌توان به احتمال شکستن قطعه‌ای از کروموزوم اسپرم و نفوذ آن به داخل تخم اشاره نمود. میزان نفوذ اشعه UV به مراتب کمتر از اشعه‌های یونیزه است ولی به علت قابلیت حمل و نقل ساده و کم‌خطر بودن بیش‌تر ترجیح داده می‌شود. به علت نتایج بسیار متفاوت در بازماندگی گاینوژنتیک‌ها که در مطالعات اولیه مشاهده گردید، محققین مبادرت به استاندارد کردن روش‌های اشعه‌دهی نمودند. در این راستا لازم است که یک سری آزمایش

و خطا در تاباندن اشعه مورد نظر بر روی اسپرم گونه خاص صورت پذیرد تا مدت زمان و فاصله منبع اشعه تا نمونه اسپرم به دقت محاسبه، تنظیم و استاندارد گردد (پورکاظمی و همکاران، ۱۳۸۹). اشعه UV سبب تخریب و شکسته شدن پیوند هیدروژنی بین بازهای آلی در زنجیره DNA اسپرم می‌گردد و موجب تشکیل پیوند دایمر بین بازهای آلی می‌شود.

تاباندن اشعه برای اولین بار در سال ۱۹۱۱ توسط Hertwig انجام شد. او تخم‌های قورباغه را لقاح داد و شدت‌های متفاوتی از اشعه X را بر روی اسپرم تابانید که دارای نتایجی به شرح ذیل بود:

استفاده از شدت‌های پایین، تعداد جنین‌های غیر طبیعی را افزایش می‌دهد. افزایش شدت‌های حاصله در افزایش میزان غیرنرمالی و کاهش تعداد نرمالی جنین‌های تکامل یافته نقش دارد. در یک شدت معین، هیچ نتایجی مشاهده نشد و این همان شدتی بود که ۱۰۰٪ کشندگی را سبب می‌گردید. در بالای شدت کشندگی، جنین‌های حاصله مجدداً فعال شده ولی اکثر آنها بدشکل و بعضی از آنها سالم بودند. Hertwig احتمال داد که این افراد گاینوژنتیک هستند. دلایل اثرات هرتویگ برای دانشمندان معاصر شناخته شده است: در شدت ۱۰۰ درصد کشندگی، DNA تا سطح غیرقابل عملکرد طبیعی تخریب می‌شود هرچند آن تکامل و رشد را مختل می‌کند تا جایی که به توقف کامل برسد. یک اشعه با دوز بالاتر سبب تخریب DNA حاصله با فقدان کامل عملکرد می‌شود هرچند پروتئین‌های هسته‌ای لازم برای شروع تقسیم سالم مانده و بدین ترتیب می‌تواند تقسیم سلولی را کامل کند. روند گاینوژنیز به همین صورت می‌باشد (Cabrita et al., 2008). لاروهای گاینوژنتیک دیپلوئید را می‌توان

از دو طریق در طی تقسیم میوز یا میتوز ایجاد کرد (Onozato, 1984):

جلوگیری از تقسیم دوم میوز (احتباس دومین گویچه قطبی) که اصطلاحاً به آن دیپلوئیدهای گاینوزنتیک میوزی (یا گاینوزن‌های دیپلوئید، یا گاینوزنوت‌های دیپلوئید و یا گاینوزنتیک‌های دیپلوئید) می‌گویند (Arai and Fujimoto, 2018) ولی بعضی از محققین از عبارت میوزن‌ها (Meiogene) یا گاینوزن‌های جسم قطبی استفاده می‌کنند (Arai, 2001; Pandian, 2011). جلوگیری از اولین تقسیم میتوزی که به فرزندان حاصله میتوزن می‌گویند.

#### ۱- جلوگیری از تقسیم میوز دوم

گاینوزن‌های میوزی با شوک‌های رایجی که احتباس گویچه دوم قطبی را القا می‌کند بعد از تقسیم دوم میوزی تشکیل می‌شود. گویچه دوم قطبی در تخم با پیش هسته مادری در زیگوت بمنظور تشکیل هسته دیپلوئید آمیخته می‌شود. گویچه قطبی حاوی یک دسته کروموزوم مادری است که طی تقسیم غیر کاهشی میوز تشکیل می‌شود ولی به‌طور ژنتیکی با هسته تخم هاپلوئید منطبق نیست که ناشی از تاثیر نوترکیبی (تبادل کروموزومی) بین لکوس ژن و سانترومر می‌باشد که می‌تواند اطلاعات ژنتیکی را در میان جفت‌های کروموزومی معاوضه کند. بدین ترتیب بعضی از لکوسها در ژنوم گاینوزن‌های میوزی هموزیگوس (خالص) نیست (Devlin and Nagahama, 2002).

جلوگیری از تقسیم میوز دوم رایج‌ترین روش برای تولید بچه ماهیان گاینوزنتیک می‌باشد و علت اصلی آن تکنیک ساده و سهولت در انجام آن می‌باشد (Nagy et al., 1978; Chourrout and Tiews, 1987).

کار با این روش تخریب و شکستن تقسیم سلولی در تقسیم میوزی با استفاده از شوک‌های فیزیکی که به تخم وارد می‌شود، می‌باشد. شوک‌های فیزیکی می‌تواند بصورت شوک‌های حرارتی (سرما یا گرما) و یا شوک فشار باشد که در هر دو حالت میکروتوبول‌هایی که دوک‌های تقسیم سلولی میوزی را تشکیل می‌دهند شکسته می‌شود. به عبارتی، در زمان القای دیپلوئید گاینوزنتیک میوزی یا تریپلوئیدی، کروموزوم‌ها در تخم، نیمی از تتراد را دارند که تتراد معنی دوظرفیتی دارد. همه نیم تترادها از یک ماده دیپلوئید هتروزیگوت، فرزندان هموزیگوت تولید خواهند نمود مشروط بر آن که آن‌ها غیر نوترکیب باشند، در واقع نوترکیبی تولید ژنوتیپ‌های هتروزیگوت می‌کند (Arai and Fujimoto, 2018).

گاینوزنریز یک وسیله پر قدرت برای سیستم تعیین جنسیت ژنتیکی در گونه‌های دوجنسی است. آن می‌تواند در ماده‌های هوموگامتی (XX) تولید ۱۰۰٪ نتاج ماده را نماید اما در یک گونه با سیستم جنسیتی هتروگامتی ماده، گاینوزنریز به نسبت‌های متفاوتی نرهای ZZ، ماده‌های ZW و ماده‌های برتر WW را ایجاد می‌نماید که بستگی به تبادل کروموزومی بین عامل تعیین جنسیت و سانترومر دارد. اگر تبادل کروموزومی بین عامل تعیین جنسیت و سانترومر به وقوع نپیوندد هیچ نتاج هتروزیگوتی تولید نمی‌شود. زمانی که عامل تعیین جنسیت به‌طور مستقل از سانترومر دسته بندی می‌شود، حدود ۶۷٪ نتاج هتروزیگوت ممکن است تولید شود و این مقدار ممکن است به بالای ۸۸ درصد با زایا بودن ماده‌های برتر WW برسد (Van Eenennaam, 1999). Pandian در سال ۲۰۱۱ اظهار کرده که نسبت جنسی در ماهیان

هتروگامتی اثبات شده با گاینوژنریز، دسته بندی مستقل عامل تعیین جنسیت از سانترومر را نشان می دهد یعنی به ازای هر نر، دو ماده وجود دارد. در تعریف کامل تری از Nagahama و Devlin (۲۰۰۲) عنوان شده که اگر لکوس تعیین جنسیت پیوستگی شدیدی با سانترومر نداشته باشد، نو ترکیبی ممکن است موجب معاوضه لکوس های تعیین جنسیت بین سانترومرها با کروماتیدهای هتروزیگوت ZW روی هر کروموزوم گردد. در این صورت نسبت های جنسی نتاج بشرح ذیل خواهد گردید: ۱- در حالت نو ترکیبی خیلی پایین ۵۰٪ ماده WW تولید می شود، ۲- اگر نو ترکیبی اتفاقی باشد ۶۷٪ ماده ایجاد می شود که نتاج متشکل از افراد ZZ و WW با تعداد مساوی است و باقیمانده ZW است و ۳- ۱۰۰٪ ماده ZW تولید می شود (در حالتی که معاوضه اجباری با دخالت شدید سانترومر و لکوس تعیین جنسیت وجود داشته باشد).

## ۲- جلوگیری از اولین تقسیم میتوزی

در گاینوژنریز میتوزی هسته مادری بطور طبیعی در طی اولین چرخه سلولی جنین دو برابر می شود تا تشکیل دو دسته کروموزوم هاپلوئید منطبق با هم را بدهد. شوک های فیزیکی (معمولاً حرارت یا فشار) بکار رفته در این زمان می تواند این دو دسته کروموزوم را القا کند تا سلول دیپلوئید با همان هسته ها تشکیل شود. در این مرحله هر کروموزوم دارای ۲ کروماتید مشابه خواهری هستند که در اولین تقسیم سلولی از همدیگر جدا می شوند. از آنجائی که دو دسته کروموزوم در یک گاینوژن میتوزی از یک هسته هاپلوئید دو برابر شده بدست آمده است لذا این سلول ها در تمام لکوس ها هموزیگوت (خالص) می باشند (Devlin and

Nagahama, 2002). به عبارتی ژنوتیپ فرزندان کاملاً شبیه ژنوتیپ مادری است و فرزندان از لحاظ ژنتیکی بسیار مشابه هستند. القای گاینوژنریز میتوزی می تواند در ماده های هوموگامتی (XX) تولید ۱۰۰٪ نتاج ماده را نماید اما در ماده های هتروگامتی (ZW) در طی گاینوژنریز میتوزی، هستک هاپلوئید، یک کروموزوم Z یا W دارد که بعد از شوک دو برابر می شود. اگر کروموزوم W در شرایط هموزیگوت کشنده نباشد تعداد مساوی نر ZZ و ماده WW تولید می شود. در غیر این صورت فقط نرهای ZZ تولید می گردد.

همانند استاندارد کردن اشعه دهی به اسپرم، برای شوک های فیزیکی (گرما، سرما و فشار) ضروری است یک سری آزمایش برای تنظیم بهترین زمان شوک دهی (چند دقیقه پس از لقاح) مدت زمان شوک دهی (طول دوره زمانی یا مدت شوک دهی) و شدت میزان شوک برای گونه مورد نظر باید صورت پذیرد تا نتایج مطلوب از آزمایش مربوطه بدست آید (پور کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹) ولی می توان با استفاده از بررسی های سیتولوژیکی در مراحل اولیه تکامل جنین، زمان بکار گیری شوک میتوزی را بدست آورد (Peruzzi and Chatain, 2003).

Pandian در سال ۲۰۱۱ سه هدف اصلی را برای ایجاد ماهیان گاینوژنتیک متصور شده است:

- ۱- تشخیص مکانیزم سیستم تعیین جنسیت (هوموگامتی یا هتروگامتی بودن ماهیان ماده)
- ۲- تولید سریع لاین های ایزوژنیک یا کلونی برای اصلاح ذخایر مولدین
- ۳- تولید نتاج تمام ماده در گونه هایی نظیر تاس ماهیان جهت دستیابی به خوایر

با استفاده از گاینوژنیز می‌توان مکانیسم و فاکتورهای تعیین‌کننده جنسیت در ماهی را توصیف کرد. اگر ماهیان نر هوموگامت باشند، با القای گاینوژنیز، نسبت‌های جنسی متفاوت ایجاد می‌شود که عمدتاً ۲ ماده به ازای یک نر می‌باشد. اگر ماهی نر هتروگامت باشد، گاینوژنیز می‌تواند ۱۰۰٪ نتاج تمام ماده XX تولید نماید (Van Eenennaam *et al.*, 1999; Felip *et al.*, 2001; Devlin and Nagahama, 2002; Omoto *et al.*, 2005; Flynn *et al.*, 2006; Fopp- Bayat, 2010; Zhang *et al.*, 2011).

از اهداف اصلی دیگر تولید ماهی گاینوژنتیک، تولید لاین همخون است (Hussain *et al.*, 1998). براساس روش کلاسیک تلاقی تنی حداقل ۱۵-۱۰ نسل نیاز است تا لاین خالص تولید گردد و این کار برای گونه‌هایی مثل کپور که حداقل ۱/۵ سال برای رسیدن به سن بلوغ نیاز دارند بین ۱۵-۱۰ سال به طول می‌انجامد ولی با استفاده از تکنیک گاینوژنیز و تغییر جنسیت حداکثر پس از ۵-۴ نسل یعنی ۷/۵-۶ سال می‌توان لاین خالص کپور معمولی را تولید نمود. این زمان برای گونه‌هایی که زمان رسیدگی جنسی و بلوغ آن کوتاه‌تر است کوتاه و برای گونه‌هایی مثل تاس‌ماهیان که طولانی‌تر است بیشتر خواهد بود (پورکاظمی و همکاران، ۱۳۸۹). از دیگر کاربردهای گاینوژنیز بررسی ژن‌های جهش یافته و اثر ژن‌های مغلوب در حالت هموزیگوت است (Hussain *et al.*, 1998). با استفاده از تکنیک‌های گاینوژنیز و آندروژنیز لاین‌های کاملاً خالص در انواع ماهیان از قبیل ماهی زبرا (*Brachydanio rerio*)، کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، تیلپیا رودخانه نیل (*Tilapia nilotica*) و قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorynchus mykiss*)

تولید گردید (Komen *et al.*, 1991; Sarder *et al.*, 1999). این لاین‌ها در تمام ژنوم خود دارای ژنوتیپ مشابه و یکسانی هستند. ماهیانی که بیش از حد هموزیگوت باشند توانایی خود را در پاسخ به عوامل محیطی از دست می‌دهند و حتی اختلافات بسیار جزئی محیطی اثرات متفاوتی بر افراد مختلف می‌گذارد (Komen *et al.*, 1991). میزان خویشاوندی از طریق گاینوژنیز دقیقاً معادل یا مساوی با یک نسل از تلاقی تنی می‌باشد. گاینوژن میتوزی تماماً بصورت هموزیگوت هستند اما اکثر بچه ماهیان بعث فراوانی بالای ژنوتیپ‌های کشنده که ۱۰۰٪ در افراد هموزیگوت یافت می‌شود در طی تکامل جنینی تلف می‌شوند.

هدف دیگر تولید ماهی گاینوژنتیک در آبنی‌پروری تولید جمعیت‌های تک جنس ماده می‌باشد (Thorgaard, 1983; Price, 1984; Ihssen *et al.*, 1990). در بعضی از گونه‌ها رسیدن ماهی به بلوغ جنسی در سیستم پرورشی پلی‌کالچر سبب تکثیر طبیعی ماهی می‌گردد. بعنوان مثال بعضی از گونه‌های ماهی تیلپیا در سنین پائین‌تر از یکسال به بلوغ جنسی می‌رسند و در استخرهای پرورشی در اثر زادآوری سریع، بچه ماهیان زیادی تولید می‌شود که از یک طرف نظم بیولوژیکی استخر از حالت تعادل خارج می‌گردد و از طرف دیگر پرورش‌دهنده به جای تولید ماهیان با وزن بازاری، با تعداد بیش از حد بچه ماهی در استخر مواجه خواهد شد (Ezaz *et al.*, 2004). ثانیاً وقتی جنس ماده دیرتر به سن بلوغ برسد با تولید ماهی تمام ماده، پرورش دهنده می‌تواند ماهیان بزرگتر از وزن معمولی تولید و به بازار عرضه دارد (Piferrer, 2001). ثالثاً در بعضی از گونه‌ها نظیر ماهیان خاویاری جنس ماده به علت تولید

خاویار و ارزش اقتصادی از اهمیت بالاتری نسبت به جنس نر برخوردار است و اکثر پرورش دهندگان ماهیان خاویاری تمایل دارند ماهی جنس ماده را پرورش دهند (Fopp-Bayat et al., 2007).

هدف دیگر از القای گاینوژنیز، حفاظت از گونه های در حال انقراض است که می تواند از بقیه اهداف مهم تر باشد.

### دلایل استفاده از اسپرم غیرهمسان

در اکثر مطالعات گاینوژنیز، هم اسپرم همسان و هم اسپرم غیرهمسان برای تکامل تخم استفاده می شود (Meng et al., 2016). درصد لاروهای زایی گاینوژنتیک القا شده با اسپرم همسان، بطور واضح بالاتر از اسپرم غیرهمسان می باشد ولی ممانعت از ورود اسپرم هایی که بطور ناقص غیرفعال شده اند سخت می باشد و بدین ترتیب تشخیص دیپلوئید گاینوژنتیک از دیپلوئید نرمال به آسانی انجام پذیر نیست (Pan et al., 2017). مارکرهای مولکولی چند شکلی نظیر AFLP و SSR می توانند این مشکل را با تشخیص خصوصیات ژنتیکی مادری (Dan et al., 2013) حل کنند. اسپرم غیرهمسان به خصوص با تعداد کروموزوم متفاوت، نمی تواند تخم ها را لقاح دهد تا تولید دورگه های بین گونه ای با فاصله دور نماید و می توان با اطمینان لاروهای باقیمانده را گاینوژن های واقعی نامید، چون که دورگه ها علائم ظاهری را نشان داده و یا به طور کامل کشنده هستند. البته میزان لقاح و القای دیپلوئیدی در اسپرم غیرهمسان کمتر از اسپرم همسان می باشد (Chen et al., 2012; Ji et al., 2010). در القای گاینوژنیز یا به دلیل راحت بودن و یا به دلیل ناتوانی در دورگه های زایا و یا هر دوی آنها از اسپرم

غیرهمسان استفاده می گردد (Morgan et al., 2006). در مواردی که هم کیفیت و کمیت اسپرم همسان پایین باشد، می توان از اسپرم غیرهمسان استفاده نمود (Meng et al., 2016).

استفاده از اسپرم غیرهمسان در آزمایشات القای گاینوژنیز ممکن است آلودگی جزیی مربوط به استفاده از اسپرم همسان اشعه دیده را نداشته باشد (Varadaraj, 1990) و یا برای دوری از مشکلات ناشی از فعالیت مجدد در نور مفید باشد (Ijiri and Egami, 1980). از طرفی اشعه UV نفوذپذیری کمتری نسبت به اشعه های یونیزه دارد. بر این اساس، در مطالعات انجام شده مربوط به ماده زایی مشخص گردید که میزان آلودگی ناشی از حضور ژنوم پدری در فرزندان گاینوژنتیک در اسپرم UV داده شده معادل ۰/۰۳ درصد می باشد (Quillet, 1994). در صورتی که این میزان با استفاده از اشعه گاما برابر با ۰/۰۰۶ درصد ارزیابی گردید (Thorgaard, 1986). بنابراین استفاده از اسپرم غیرهمسان UV داده شده این امکان را فراهم می سازد که اگر اشعه به میزان کافی در اسپرم های مورد تیمار نفوذ نماید، یا دورگه ای تشکیل نمی شود (Peruzzi et al., 1993) و یا در صورت تولید دورگه، فنوتیپ آنها با گونه مادری و پدری متفاوت است. هم چنان که Yamazaki در سال ۱۹۸۳ اعلام کرد که استفاده از اسپرم غیرهمسان می تواند تفاوت مورفولوژیک دورگه ها را از والدین نشان دهد. در مجموع چهار حالت در لقاح تخمک با اسپرم غیرهمسان در ماهیان با شوک دهی ایجاد می شود: ۱- ماده زایی/نر زایی ۲- تولید دورگه ۳- دورگه تریپلوئید و ۴- مرگ (Pandian and Koteeswaran, 1998).

## چگونگی تشخیص ماهیان دیپلوئید گاینوژنتیک

چندین روش برای تشخیص ماهیان گاینوژنتیک وجود دارد:

۱- در بعضی از گونه‌ها، ماهیان ماده از طریق صفات ظاهری مثل رنگ (Naruse *et al.*, 1985)، باله‌ها، فلس (Gomelsky *et al.*, 1992) و سایر اندام‌های ریختی تشخیص داده می‌شوند زیرا با جنس نر تفاوت دارند (مثل بسیاری از ماهیان آکواریومی و کپور ماهیان) (Komen *et al.*, 1991). هم‌چنین در ماهیان زال (Fopp-Bayat and Ocalewicz, 2015) می‌توان به‌خوبی فرزندان حاصله از لحاظ منشاء مادری (هموزیگوت یا هتروزیگوت) را از منشاء پدری تفکیک نمود.

۲- اندازه‌گیری و مقایسه سطوح هورمون‌های جنسی در گروه‌های دیپلوئید شاهد و گاینوژنتیک

۳- بررسی کروموزوم‌های جنسی در گونه‌هایی که دارای کروموزوم جنسی مشخص هستند نظیر قزل‌آلای رنگین‌کمان (Chourrout, 1984)

۴- با استفاده از بافت شناسی غدد جنسی (Zhang *et al.*, 2011)

۵- استفاده از مارکرهای بیوشیمیایی در صورتی که الل به‌صورت هموزیگوت در مادر کدگذاری شده باشد (Taniguchi *et al.*, 1994؛ پورکاظمی و همکاران، ۱۳۸۹).

۶- استفاده از مارکرهای مولکولی نظیر میکروستلایت (Hassanzadeh Saber *et al.*, 2008; AFLP, (Zhang *et al.* 2011; Ma *et al.*, 2018) و یا با استفاده (Chen *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2018)

از روش RAPD اثبات نمود (VanEenennaam *et al.*, 1996).

طریقه تشخیص ماهیان گاینوژنتیک تلاقی یافته با اسپرم UV داده شده غیرهمسان بسیار ساده‌تر از ماهیان گاینوژنتیک تلاقی یافته با اسپرم UV داده شده همسان است (Xiao *et al.*, 2011) که به شرح ذیل می‌باشد:

۱- استفاده از خصوصیات فنوتیپی که در مادر با پدر (از گونه دیگر) متفاوت است و فرزندان گاینوژنتیک خصوصیات ظاهری مادر را دارند.

۲- بررسی تعداد و شکل کروموزوم‌ها که اگر به‌دلیلی اشعه به اسپرم نرسد در تلاقی بین اسپرم غیرهمسان با تخمک دورگه تشکیل می‌شود که در دورگه‌ها، تعداد و شکل کروموزوم‌ها با تعداد و شکل کروموزوم‌های والد مادر مشابه نخواهد بود (Chen *et al.*, 2012).

۳- میزان تکامل گناد که در فرزندان گاینوژنتیک با فرزندان دورگه متفاوت است.

۴- استفاده از نشانگرهای بیو شیمیایی

۵- استفاده از نشانگرهای مولکولی که نشان دهنده جایگاه ژنی متفاوت در پدر غیرهمسان با مادر و فرزندان او می‌باشد.

## مزایای ماهیان دیپلوئید گاینوژنتیک

۱- خصوصیات نامطلوب که توسط ژن‌های نهفته کنترل می‌گردند با آمیزش خویشاوندی ظاهر گشته و می‌توان ماهیان دارای این خصوصیات را به راحتی از گله حذف نمود.

۲- در بعضی از گونه‌ها که ژن‌های آن‌ها در حالت نهفته کشنده می‌باشد، با مرگ ماهیان، این ژن از

## روش‌های ارزیابی کیفی اسپرم با DNA غیرفعال شده توسط اشعه UV

هدف نهایی اسپرماتوزو رها سازی مواد ژنتیکی جهت مشارکت در تکامل جنینی است. فشردگی بالای کروماتین با پروتئین‌ها و آنتی اکسیدان‌ها در مایع سمینالی پلاسما، DNA را از آسیب‌ها حفاظت نموده تا به تخمک برسند. هر چند تخم‌ها مکانیزم مولکولی خودشان را جهت احیای تغییرات احتمالی در ساختار کروماتینی اسپرم تا درجه معینی دارند. با این حال بعضی از عوامل مختلف در شکست مراحل اسپرماتوزنیز و تاثیر استرسورهای محیطی بر روی سلول‌های اکسپوز شده، می‌تواند اکسیداسیون پایه یا شکست‌های رشته‌ای را در DNA گسترش دهد (Cabrita et al., 2008).

اگرچه روش‌های متفاوتی برای غیرفعال سازی اسپرم وجود دارد اما به طور مرسوم از نور UV برای تخریب شدید DNA استفاده می‌شود. لامپ‌های رایج UV-C طول موج کوتاه را برای این منظور تولید می‌کند (Lebeda et al., 2014).

ارزیابی کامل اسپرم می‌بایست شامل تست یک پارچگی DNA به منظور ارزیابی پتانسیل لقاح اسپرم باشد تا سلامت اسپرم حفظ شود (Ciereszko et al., 2005). ولی این موضوع به ندرت در ارزیابی کیفی اسپرم آبزیان مورد توجه قرار می‌گیرد. کاربرد آنالیز کروماتین در آبرزی پروری می‌تواند در ارتباط با تشخیص مشکلات ویژه تکثیر نظیر مشارکت کم بعضی از نرها در باروری ماده‌ها در یک مخزن مشترک باشد ولی اختصاصا به منظور ارزیابی آسیب وارد شده به وسیله عوامل مختلف نظیر عوامل سمی، اشعه UV یا انجماد سلول‌ها به کار می‌رود. گاهی اوقات هدف از

جمعیت خارج می‌شود، مانند ژن کنترل کننده الگوی فلس در کپور معمولی.

۳- تحمل بیشتر نسبت به بیماری‌ها در ماهیان گاینوژن (Liu et al., 2007; Xiao et al., 2009).

۴- بروز صفات مطلوب در فرزندان گاینوژن که بیشتر در نتاج اللو گاینوژنیز به علت حضور مقدار کمی از DNA پدری از اسپرم غیر فعال شده با UV مشاهده می‌گردد (Liu et al., 2004).

۵- شوک حرارتی جنین‌های ضعیف را از بین برده و ماهیان گاینوژنتیک باقی مانده دارای زیست پذیری بالاتر و تحمل بیشتر به بیماری هستند (Xiao et al., 2011).

۶- تولید لاین ایزوژنتیک با استفاده از گاینوژنیز میوزی و تولید لاین کلونی (هموزیگوس) با استفاده از گاینوژنیز میتوزی (Wu et al., 1981; Nagy and Csanyi, 1984).

۷- تهیه نقشه ژنتیکی (Danzmann and Gharbi, 2007).

۸- تعیین مکانیزم جنسیت (Yuandong et al., 2006, 2007; Xiao et al., 2009).

۹- تولید بالاتر در بعضی از گونه‌ها (Pandian and Koteeswaran, 1998).

۱۰- احیای گونه‌های در حال انقراض با استفاده از گاینوژنیز میوزی که در آن، نو ترکیبی می‌تواند در سیستم هتروگامتی ماده هر دو نتاج نر و ماده را با نسبت متفاوت تولید نماید نظیر تاس ماهیان (Grunina et al., 2011).

سیکلوبوتان- پریمیدین (CPDs) یا فراورده‌های نوری ۴-۶ (PPs 4-6) تاثیر می‌گذارد (Rastogi et al., 2010).

تحرك اسپرم مهمترین مقیاس در ارزیابی کیفی اسپرم می‌باشد. تحرك می‌تواند وسیع‌ترین بیومارکر استفاده شده برای کیفیت اسپرم باشد و در حالات متفاوت برای آنالیز اسپرم بکار گرفته شده است. ارتباط بین تحرك و ظرفیت لقاح توسط چندین نویسنده (Billard et al., 1993; Ohta et al., 1995; Linhart et al., 2000) گزارش شده است ولی تعدادی از محققین دیگر مخالف ارتباط بین تحرك و باروری هستند (Cognie et al., 1989; Herráez et al., 1993). تست تحرك شامل درصد اسپرماتوزوای متحرک (Levandusky and Cloud, 1988) و مدت کلی تحرك (Duplinsky, 1982) می‌باشد.

عامل دیگر در ارزیابی کیفی اسپرم، میزان لقاح اسپرم در بدو ورود به تخم می‌باشد. البته این ارزیابی به عوامل دیگری از جمله قابلیت دسترسی و کیفیت تخم یا روش‌های لقاح و انکوباسیون تخم بستگی دارد. عامل دیگر در کیفیت اسپرم توانایی لقاح و تفریح تخم می‌باشد که رایج‌تر است زیرا تکامل اولیه می‌تواند حتی با اسپرماتوزوای غیرنرمال نیز پیش برود. در اکثر گونه‌های دریایی این بررسی تا تفریح لارو نیز می‌تواند انجام شود چون زمان تکامل جنینی خیلی کوتاه است ولی در گونه‌هایی که زمان تکامل جنینی خیلی طولانی دارند می‌توان بعد از مرحله گاسترولاسیون این ارزیابی را انجام داد (Cabrita et al., 2008).

به‌نظر می‌رسد بهترین شاخص در بحث کیفیت اسپرم برای موفقیت تولید مثل، یکپارچگی DNA باشد (Li et al., 2008) تا جایی که طبق نظر بعضی از

غیرفعال‌سازی DNA در اسپرماتوزوای متحرک، استفاده از آن در القای گاینوژنیز است.

روش‌های متفاوتی برای ارزیابی آسیب به کروماتین اسپرم وجود دارد که شامل تانل و سنجش دنباله یا تخریب تک‌سلولی بر روی ژل الکتروفورز می‌باشد که هر دوی آن‌ها شکستگی‌های رشته‌ای ساده یا دوبل رشته DNA را شناسایی می‌کند (Cabrita et al., 2014). سنجش دنباله روشی تطبیق‌پذیر، حساس و کم‌هزینه برای ارزیابی شکست رشته‌ای در سلول‌های افراد می‌باشد (Collins, 2004; Simon and Carrell, 2013). سنجش دنباله فقط به سلول‌های کمی نیاز دارد. آن در ارزیابی میزان ناباروری در نرها ثابت شده (Lewis and Agbaje, 2008) و ارتباط آن با ارتقای تولیدمثل توسط Simon و همکاران (۲۰۱۱) پایه گذاری شد. در این روش برای آنالیز آسیب ایجاد شده بر DNA توسط رادیکال‌های آزاد، اشعه UV، ذخیره‌سازی کوتاه‌مدت و بلندمدت (انجماد) اسپرم تازه در باس دریایی، سیم دریایی، لامپری دریایی، قزل‌آلای رنگین‌کمان و تاس‌ماهی استرلیاد استفاده شده است (Labbe et al., 2001; Zilli et al., 2003; Cabrita et al., 2005; Ciereszko et al., 2005; Dietrich et al., 2005; Pérez-Cerezales et al., 2009; Lebeda et al., 2014b). بعضی از کاربردها (به عنوان مثال گاینوژنیز) به اسپرماتوزوای زایا و متحرک با هسته غیرفعال نیاز دارد. غیرفعال‌سازی معمولاً با اشعه انجام می‌شود و کامت اسای می‌تواند به‌منظور نظارت بر تاثیر این روش استفاده شود. تلفیق کامت اسای و آنالیز تحرك اسپرم برای بهینه نمودن پروسه‌های گاینوژنتیک در ماهیان پیشنهاد شده است (Dietrich et al., 2005). اشعه UV بکار رفته در گاینوژنیز به‌منظور غیرفعال‌سازی ژنوم اسپرم بر روی دایمرهای

پژوهشگران این عامل نسبت به سایر پارامترهای اسپرمی نظیر تحرک، نشانگر بهتری برای عملکرد اسپرم بوده (Tuncer et al., 2010) و امروزه به عنوان یکی از شاخص‌های مهم کیفیت مایع سمینال در ارزیابی توان باروری جنس نر شناخته می‌شود. DNA اسپرم به شدت فشرده است تا حجم اسپرماتوزوا را به منظور به حداقل رساندن آسیب توسط عوامل خارجی کاهش دهد و بدین ترتیب رونویسی ژنوم را غیرفعال کند (Singh et al., 2003). حفاظت مازاد از DNA اسپرم با آنتی اکسیدان‌های پلاسمای سمینال اعمال می‌شود (Ciereszko et al., 1999). با وجود همه این سیستم‌های دفاعی، تخریب DNA اسپرم رخ می‌دهد و بدین ترتیب نرها نابارور می‌شوند (Irvine et al., 2000). از طرف دیگر فقدان مکانیزم‌های احیا در اسپرم، آسیب به DNA اسپرم را برگشت ناپذیر می‌کند. اسپرم برخلاف اکثر سلول‌های سوماتیک، سیستم مؤثری برای ترمیم آسیب DNA ندارد (Genesca et al., 1992). در گذشته ارزیابی آسیب DNA اسپرم به علت فشردگی شدید کروماتین هسته آن دشوار بود (Lopez-Fernandez et al., 2008) ولی در سال‌های اخیر ورود زیست‌فناوری به عرصه آبرزی پروری و استفاده از روش‌های تخصصی جدید جهت ارزیابی کیفیت مایع سمینال در سطح مولکولی، امکان شناسایی انواع مختلف آسیب به DNA را فراهم آورده و سبب پیشرفت و افزایش کارایی بررسی اسپرم به کمک DNA گردیده است (Cabrita et al., 2010). از مهم‌ترین روش‌های تعیین آسیب DNA می‌توان به سنجش دنباله (SCGE) اشاره نمود که بر مبنای اندازه‌گیری شکستگی‌های رشته DNA در سلول می‌باشد (Cabrita et al., 2010) و استفاده از آن در

مطالعات مربوط به تاثیر اشعه‌های یونیزه و غیر یونیزه نظیر UV در اسپرم ماهیان به چند سال اخیر محدود می‌شود (Dietrich et al., 2005).

در بررسی‌های انجام شده در القای گاینوژنیز، از سنجش دنباله فقط برای تعیین درصد تخریب DNA بر اسپرم تاس‌ماهی سبیری استفاده شده است (حسن‌زاده صابر و همکاران، ۱۴۰۰). سنجش دنباله می‌تواند در ارزیابی شکست DNA اسپرم ماهی در هنگام تابش اشعه UV به کار گرفته شود. القای موثر گاینوژنیز نیاز به غیرفعال کردن ژنوم اسپرم و توانایی باروری بالا به‌طور همزمان دارد. بنابراین موفقیت در گاینوژنیز منوط به تعیین دوز مناسب UV جهت غیرفعال‌سازی ژنوم اسپرم است. دوزهای پایین جهت غیرفعال نمودن ژنوم اسپرم با موفقیت همراه نیست زیرا امکان الحاق جزئی DNA پدری به زیگوت وجود دارد. از طرف دیگر دوزهای بالاتر UV، مورفولوژی اسپرم را تغییر داده و تحرک آن را به منظور تکامل جنینی کاهش می‌دهد (Ciereszko et al., 2005; Dietrich et al., 2005). شکست رشته DNA می‌تواند در مونیتورینگ تاثیر اشعه UV بر غیر فعال شدن DNA اسپرم ماهی باشد. بنابراین، سنجش دنباله به همراه آنالیز تحرک اسپرم می‌تواند در بهینه کردن پروتکل‌های گاینوژنیز در ماهیان استفاده شود (Dietrich et al., 2005).

### مروری بر القای گاینوژنیز مصنوعی در تاس‌ماهیان

اولین تحقیق برای تولید تاس‌ماهی گاینوژنتیک از طریق مصنوعی توسط Romashov و همکاران در سال ۱۹۶۳ گزارش شده است. وی برای اشعه‌دهی اسپرم از اشعه ایکس و برای القای دیپلوئیدی از شوک سرمایی

بر روی تاس‌ماهی روسی (*Acipenser gueldenstaedti*) استفاده کرد. حداکثر مدت زنده ماندن لارو تولیدی در تحقیق فوق ۱۹۲ روز بوده و پس از آن تمام لاروهای تولیدی تلف شدند.

Kowtal در سال ۱۹۸۷ گزارشی در خصوص مطالعات اولیه القای پلی‌پلوئیدی، گاینوزنیز و آندروژنیز در تاس‌ماهی سفید (*Acipenser transmontanus*) ارائه نمود. او برای تولید ماهی گاینوزن از اشعه UV برای تخریب DNA اسپرم استفاده کرد. برای این کار اسپرم با ضخامت ۱ میلی‌لیتری را به مدت ۱۵ دقیقه و در فاصله ۱۵ سانتیمتری در معرض اشعه UV قرار داد و برای احتباس دومین گویچه قطبی از شوک گرمایی در دامنه‌های مختلف ۳۷-۳۰ درجه سانتیگراد استفاده کرد. او تعداد بی‌شماری جنین‌های غیرطبیعی مشاهده کرد و تمامی تخم‌های لقاح یافته قبل از هیچ شدن لارو تلف شدند.

VanEenennaam و همکاران در سال ۱۹۹۶ مطالعات کاملی در خصوص تولید تاس‌ماهی سفید گاینوزنتیک و تریپلوئید با موفقیت انجام دادند. برای تولید ماهی گاینوزنتیک، جهت تخریب ساختار DNA اسپرم از اشعه UV استفاده شد و برای این منظور پس از جداسازی مایع سمینال و رقیق کردن اسپرم، به ضخامت ۱ میلی‌متر در پتری دیش و با استفاده از اشعه UV ( $\mu W$ ) ۱۲۰۰ بر هر سانتی‌متر مربع) برای دوره زمانی ۱۸۰، ۱۹۵ و ۲۷۰ ثانیه اشعه‌دهی گردید. برای اثبات گاینوزنتیک از تکنیک RAPD استفاده شد و برای این کار ۱۰۸ لارو تولید شده از ۴ آزمایش مختلف را مورد بررسی قرار گرفت که از این تعداد ۲ عدد لارو گاینوزنتیک واقعی نبودند.

Mims و همکاران در سال ۱۹۹۷ توانستند گاینوزنیز میوزی را در تاس‌ماهی پاروپوزه آمریکایی (*Polyodon spathula*) با استفاده از اسپرم UV داده شده پاروپوزه (*Scaphirhynchus platyrhynchus*) القا نمایند. بالاترین بازده آنها ۱۶٪ ماهیان گاینوزنتیک بود. در تیمار شاهد دورگه آن‌ها، هیچ دورگه‌ای تولید نشد و آن‌ها به این نتیجه رسیدند که تمامی ماهیان موجود در تیمار گاینوزنتیک وراثت‌پذیری مادری دارند. هم‌چنین این کار تنها مطالعه‌ای در تاس‌ماهیان بود که سیستم تعیین جنسیت را در تاس‌ماهی مذکور به صورت هوموگامتی ماده عنوان کرد. ۱۵ سال بعد در تحقیق دیگری از القای گاینوزنیز در ماهی پاروپوزه (*Polyodon spathula*) مشخص گردید که سیستم تعیین جنسیت در این تاس‌ماهی نه تنها هوموگامتی ماده نبوده بلکه هتروگامتی ماده می‌باشد که بر این اساس نویسندگان تحقیق اولیه خود را مردود اعلام کردند (Shelton and Mims, 2012).

VanEenennaam و همکاران در سال ۱۹۹۹ نسبت جنسی نتاج تولید شده از القای گاینوزنیز میوزی را در تاسماهی سفید ۸۲٪ ماده و ۱۸٪ نر اظهار داشتند. Omoto و همکاران در سال ۲۰۰۵ توانستند با استفاده از اسپرم UV داده شده هومولوگ ماهی بستر (دورگه فیل‌ماهی ماده با تاس‌ماهی استرلیاد نر)، گاینوزنیز میوزی را در گونه هم‌نوع ایجاد نمایند. آن‌ها با استفاده از فلوسیتومتری و اندازه‌گیری حجم DNA گلبول‌های قرمز خون ماهیان گاینوزنتیک و بافت‌شناسی غدد جنسی آن‌ها به این نتیجه رسیدند که ۸۰-۷۰ درصد از ماهیان گاینوزنتیک ماده و ۲۰-۳۰ درصد آن‌ها نر می‌باشد. آن‌ها اعلام کردند که سیستم

تعیین جنسیت در این دوره بصورت هتروگامتی ماده می‌باشد.

Flynn و همکاران در سال ۲۰۰۶ با استفاده از القای گاینوژنیز میوزی به بررسی سیستم تعیین جنسیت در تاس‌ماهی کوتاه‌پوزه (*Acipenser brevirostrum*) پرداختند. آن‌ها به ۶۵٪ نتاج ماده و ۳۵٪ نتاج نر دست یافتند و تعیین جنسیت را در این گونه ZW معرفی کردند.

Fopp-Bayat و همکاران در سال ۲۰۰۷ گاینوژنیز میوزی را در استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) با استفاده از اسپرم هترولوگ دوره بستر با موفقیت القا کردند. آنها برای اثبات فرزندان گاینوژنتیک از مارکرهای میکروستلایت و بررسی تعداد کروموزوم‌ها استفاده کردند.

Hassanzadeh Saber و همکاران در سال ۲۰۰۸ توانستند گاینوژنیز میوزی را در ازون برون (*Acipenser stellatus*) ایجاد کنند. مارکرهای میکروستلایت روش اثبات گاینوژنیز در تحقیق آن‌ها بود.

Fopp-Bayat در سال ۲۰۱۰ گاینوژن‌های تاس‌ماهی سبیری (*Acipenser baerii*) لقاح یافته با اسپرم UV داده شده هیبرید تاس‌ماهی سبیری در تاس‌ماهی روسی ایجاد و اعلام داشت که مکانیسم سیستم تعیین جنسیت تاس‌ماهی سبیری بصورت هتروگامتی ماده می‌باشند. او به ۸۰٪ نتاج ماده و ۲۰٪ نتاج نر دست یافت.

القای موفق گاینوژنیز میوزی در ماهی پاروپوزه با استفاده از اسپرم تاس‌ماهی آمور تحقیق دیگری در تاس‌ماهیان می‌باشد (Zou et al., 2011).

Saber و Hallajian (۲۰۱۴) سیستم تعیین جنسیت هتروگامتی ماده را در تاس‌ماهی شپ (*Acipenser nudiventris*) با نسبت ۷۳٪ نتاج ماده و ۲۷٪ نتاج نر اعلام نمودند.

Fopp-Bayat و همکاران (۲۰۱۸) اظهار نموده که تاس‌ماهی استرلیاد نیز دارای سیستم تعیین جنسیت هتروگامتی ماده می‌باشد. در تیمار گاینوژنتیک تاس‌ماهی استرلیاد، ۸۶٪ نتاج ماده، ۷٪ نتاج نر و بقیه ناشناخته ظاهر شدند.

در ایران ماده‌زایی در تاس‌ماهیان با بررسی اثر اشعه گاما بر روی اسپرم تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)، تاس‌ماهی روسی (*Acipenser gueldenstadti*) و ماهی ازون‌برون (*Acipenser stellatus*) و همچنین امکان تولید ماهی گاینوژن گزارش (یوسفیان و نظری، ۱۳۸۲) گردید. مناسب‌ترین مقدار اشعه گاما برای تاس‌ماهی ایرانی و روسی ۹۵ کیلو راد بود در حالیکه برای ماهی ازون‌برون ۱۰۰ کیلو راد از موفقیت بیش‌تری برخوردار بود. تولید ۱۰۰ درصد ماهیان هاپلوئید (N کروموزومی) با استفاده از اسپرم‌های اشعه دیده فوق، مؤثر بودن شدت اشعه در غیرفعال ساختن ژنوم اسپرم را تأیید کرد. برای تولید تاس‌ماهی ایرانی گاینوژنتیک، از شوک گرمایی ۳۸، ۴۰ و ۴۲ درجه سانتیگراد برای ۲ دقیقه و شوک سرمایی ۴ درجه سانتیگراد برای ۴۵ دقیقه استفاده گردید و زمان شوک‌دهی ۳ دقیقه پس از لقاح بوده است. برای تشخیص و اثبات گاینوژنیز از مارکر بیوشیمیایی ترانسفرین و از طریق الکتروفورز سرم خون استفاده شد و طبق گزارش فوق چون ماهی مولد ماده هموزیگوت و ماهی نر هتروزیگوت بودند، از آنجائیکه از ۳۰ عدد لارو بررسی شده نمونه هتروزیگوت مشاهده نگردید

لذا نویسندگان نتیجه‌گیری نمودند که لاروهای تولید شده همگی منشاء ژنوم مادری دارند و گاینوزنتیک هستند.

همچنین پورکاظمی و همکاران (۱۳۸۹) موفق به القای گاینوزنیز و تریپلوئیدی در فیل‌ماهی و تاس‌ماهی ایرانی گردیدند. آنها از اشعه UV برای تخریب ژنوم اسپرم فیل‌ماهی و تاس‌ماهی ایرانی بمدت ۱۰۵ تا ۱۱۰ ثانیه استفاده کردند. به‌منظور احتباس دومین گویچه قطبی از شوک گرمایی ۳۲-۳۷ درجه سانتیگراد و شوک سرمایی ۰-۱ درجه سانتیگراد استفاده گردید. زمان شروع شوک دهی ۱۲-۱۸ دقیقه بعد از فعال شدن تخم با اسپرم UV داده شده و مدت شوک دهی در گرما و در سرما بترتیب ۲/۵ و ۶۰ دقیقه بود. در فیل‌ماهی شوک سرمایی با بازماندگی ۳۰-۳۵ درصد در مقایسه با شوک گرمایی توانست گاینوزنیز را در فیل‌ماهی القا نماید. همچنین در تاس‌ماهی ایرانی شوک سرمایی کارآیی بالاتری نسبت به شوک گرمایی داشت. آنها توانستند با مارکرهای میکروستلایت و شمارش تعداد کروموزوم‌ها به نحوه وراثت‌پذیری ژنوم فرزندان گاینوزن در مقایسه با والدین شان پی ببرند.

تحقیقات در زمینه ماده‌زایی با اسپرم هترولوگ موفقیت دیگری در زمینه تولید ماهیان تمام ماده است. در تاس‌ماهیان، *Scaphirhynchus platyrhynchus* با اسپرم *Polyodon spathula* (Mims and Shelton, 1998)، تاس‌ماهی استرلیاد با اسپرم دورگه بستر (Fopp-Bayat et al., 2007)، تاس‌ماهی سبیری با اسپرم دورگه تاس‌ماهی سبیری × تاس‌ماهی روسی (Fopp-Bayat, 2010)، ماهی پاروپوزه (*Polyodon spathula*) با اسپرم تاس‌ماهی آمور (*A. schrenckii*) (Zou et al., 2011)، تاس‌ماهی سبیری با اسپرم

فیل‌ماهی (Grunina et al., 2011)، ماهی پاروپوزه با اسپرم (*Scaphirhynchus platyrhynchus*) (Shelton and Mims, 2012)، تاس‌ماهی شیب با اسپرم تاس‌ماهی سبیری (Saber et al., 2014)، تاس‌ماهی سبیری با اسپرم استرلیاد (Lebeda et al., 2018)، اشاره کرد.

حسن‌زاده صابر و همکاران (۱۳۹۱) با استفاده از اسپرم غیرفعال ژنتیکی تاس‌ماهی سبیری، موفق به القای گاینوزنیز در تاس‌ماهی شیب گردید. با توجه به قرارگیری تاس‌ماهی شیب در وضعیت به‌شدت در معرض خطر انقراض (CR) در فهرست قرمز IUCN، القای گاینوزنیز با اسپرم هترولوگ غیرفعال شده ژنتیکی می‌تواند در تولید هر دو جنس نر و ماده شیب و حفاظت از آنها تاثیر داشته باشد.

حسن‌زاده صابر (۱۳۹۸) توانست با استفاده از گاینوزنیز در تاس‌ماهی استرلیاد به عنوان یک گونه مدل آسیب‌پذیر (VU)، جبران کمبود جنس نر این گونه را نماید. با توجه به سیستم تعیین جنسیت هتروگامتی ماده، هر دو جنس نر و ماده در این گونه ایجاد شد که نسبت آن ۷۶/۶ درصد ماده و ۲۳/۴ درصد نر بودند.

همچنین حسن‌زاده صابر و همکاران (۱۴۰۱) توانست به‌منظور توسعه آبی‌پروری و تولید نتاج ماده در تاس‌ماهی سبیری که دومین گونه پرورشی ماهیان خاویاری در ایران است را با ماده‌زایی و اسپرم هترولوگ غیرفعال تاس‌ماهی ایرانی تولید کند. او با استفاده از مارکرهای مولکولی میکروستلایت توانست وراثت‌پذیری اللی مادری را در فرزندان نسل اول ثابت کند.

## القای گاینوژنیز در تاس ماهیان

### ۱- رسیدگی جنسی مولدین تاس ماهیان

پس از انتخاب مولدین مناسب از لحاظ میزان رسیدگی جنسی و نگهداری آن‌ها به مدت چند روز در استخرهای آرامش، جهت رسیدگی جنسی مولدین از هورمون‌های متعددی استفاده می‌گردد. به منظور القای رسیدگی جنسی در مولدین فیل ماهی و تاس ماهی ایرانی با توجه به درجه حرارت آب، تزریق عصاره هیپوفیز طبق روش‌های متداول در مراکز تکثیر و پرورش تاس ماهیان صورت می‌گیرد (کهنه شهری و آذری تاکامی، ۱۳۵۳). ابتدا ۲۰۰ میلی گرم عصاره پودر هیپوفیز (برای مولدین ماده) و ۱۲۰ میلی گرم (برای مولدین نر) را با سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد مخلوط کرده و با ۱ قسمت آب بصورت کاملاً محلول درآورده و به ازای هر مولد ۲ میلی لیتر محلول هیپوفیز در داخل عضله پستی ماهی تزریق می‌گردد. زمان رسیدگی جنسی ماهیان مولد متناسب با درجه حرارت آب متفاوت بوده و معمولاً پس از ۲۰ ساعت از تزریق اول مولد ماده، تزریق مولد نر (که یک بار صورت می‌گیرد) انجام می‌پذیرد.

در سال‌های اخیر برای رسیدگی جنسی در مولدین ماده در ازون‌برون (Hassanzadeh Saber *et al.*, 2008)، تاس ماهی شپ (Hassanzadeh Saber *et al.*, 2014)، استرلیاد (حسن‌زاده صابر و همکاران، ۱۳۹۸) و تاس ماهی سبیری (حسن‌زاده صابر و همکاران، ۱۴۰۱) با توجه به درجه حرارت آب از هورمون GnRH ساخته شده در شرکت ثامن به میزان ۱۰ میکروگرم/کیلوگرم در دو مرحله که در مرحله اول ۲۰٪ و بعد از ۶ ساعت، باقی‌مانده هورمون به مولد ماده در داخل عضله پستی تزریق می‌گردد. برای مولدین نر غیرهمسان شامل

تاس ماهی سبیری و تاس ماهی ایرانی، تزریق GnRH در یک مرحله (همزمان با تزریق دوم مولد ماده) به میزان ۲۰ میکروگرم/کیلوگرم صورت می‌گیرد. مولدین آماده استحصال اسپرم و تخمک را در محلول‌های گیاهی (پودر گل میخک) یا سنتتیک (MS-222) بیهوش نموده و سپس اسپرم و تخمک به ترتیب از مولد نر و ماده استحصال می‌گردد (پوردهقانی و همکاران، ۱۳۸۹).

### ۲- تهیه مایع سمینال و رقیق‌سازی اسپرم

معمولاً میزان اسپرم استحصالی از تاس ماهیان نسبت به ماهیان استخوانی کوچک به مراتب بیش‌تر است لذا بسته به میزان تخمک مورد استفاده برای لقاح و القای ماده‌زایی، به میزان ۴ یا ۵ برابر میزان اسپرم استوک، مایع سمینال جداسازی می‌گردد. بسته به وزن تخمک مورد استفاده در دستکاری کروموزومی، مقداری از اسپرم دریافت شده، در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری و از مازاد اسپرم، مایع سمینال، با استفاده از سانتریفوژ با دور ۵۰۰۰ در دقیقه به مدت ۵ دقیقه جدا می‌گردد. از مایع سمینال جهت رقیق‌سازی اسپرم استفاده می‌شود، زیرا اسپرم‌ها در مایع سمینال هیچ‌گونه تحرکی ندارند و در طی مدت تاباندن اشعه بدون تحرک باقی می‌مانند. از آنجائی که غلظت اسپرم دریافتی از تاس ماهیان بسیار زیاد است (به عنوان مثال در تاس ماهی سبیری  $10^9 \times 1/56$  اسپرم در میلی لیتر مکعب)، برای تاباندن اشعه نیاز به اسپرم رقیق شده است بنابراین به میزان ۰/۹ میلی لیتر از مایع سمینال با ۰/۱ میلی لیتر از اسپرم استوک (با غلظت ۱۰٪) در داخل پتری دیش به عمق ۱ میلی متر ریخته می‌شود. ضخامت کم محلول اسپرم و رقت آن سبب می‌گردد تا تاثیر اشعه UV بر روی آن بیش‌تر باشد. به منظور جلوگیری

از کم شدن تحرک ناشی از گرمای حاصل از تابش اشعه به اسپرم، ظرف (پتری دیش) حاوی اسپرم بر روی محلول آب سرد شده قرار می‌گیرد. همچنین به منظور جلوگیری از فعالیت مجدد اسپرم اشعه دیده در نور، بلافاصله اسپرم‌های UV داده‌شده و استوک در ظروف تیره ریخته می‌شود و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری می‌گردد.

### ۳- تخریب DNA اسپرم با تابش اشعه UV

به علت سهل الوصول بودن دستگاه تابش اشعه UV، در غالب مطالعات از لامپ UV مدل UVG-54 با طول موج کوتاه ۲۵۴ نانومتر ساخت شرکت UVP آمریکا (CA-91786-Upland) استفاده گردید. در هنگام اشعه‌دهی، منبع نوری و پتری دیش حاوی اسپرم بر روی یک شیکر اوربیتالی با دور ۹۰ در دقیقه حرکت داده شده تا تابش اشعه به‌طور تقریباً یکسان بر تمامی اسپرم باشد. شدت موثر UV، بر اساس روش Hassanzadeh و همکاران (۲۰۰۸) تعیین شد. سپس یک نمونه اسپرم اشعه داده‌شده با یک نمونه اسپرم شاهد جهت ارزیابی میزان تحرک اسپرم به‌طور هم‌زمان در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار می‌گیرد و منحنی کاهش تحرک اسپرم‌های اشعه‌دیده در مقایسه با اسپرم‌های شاهد رسم می‌گردد. به‌منظور تست باروری و میزان تفریخ تخم، اسپرم‌های اشعه‌دیده و بدون اشعه با مقداری از تخمک ترکیب و میزان لقاح در مراحل جنینی و تعداد لارو تفریخ شده (بازماندگی) مورد ارزیابی قرار می‌گیرد و با تیمار شاهد مقایسه می‌شود.

دوز اشعه UV که متشکل از شدت تابش اشعه در مدت زمان تابش می‌باشد در گونه‌های مختلف تاس ماهیان و بسته به شرایط و کیفیت مولد متفاوت است. در شدت ثابت ۴۷۳ میکرووات/ سانتی متر مربع

(اندازه‌گیری شده در سازمان انرژی اتمی ایران، ۱۳۸۴)، دوز مناسب تابش اشعه UV بر روی اسپرم ازون‌برون ۲۸۳۸ ژول/ مترمربع (Hassanzadeh Saber et al., 2008)، تاس ماهی سیری ۲۸۳۸ تا ۴۲۵۷ ژول/ مترمربع (Hassanzadeh Saber et al., 2014) و تاس ماهی ایرانی ۸۵۱۴ ژول/ مترمربع (حسن‌زاده صابر و همکاران، ۱۴۰۱) بهترین کیفیت را برای القای گاینوژنیز داشته‌اند. همچنین بهترین دوز اشعه UV بر روی اسپرم فیل ماهی ۳۸۱۱ تا ۳۹۹۳ ژول/ مترمربع تعیین گردید (پورکاظمی و همکاران، ۱۳۸۹).

### ۴- بررسی میزان تحرک اسپرم

برای بررسی میزان تحرک اسپرم، ۱۰ میکرولیتر از اسپرم را با ۵۰۰ میکرولیتر محلول فعال کننده (آب)، مخلوط (Aramli et al., 2015) و میزان درصد تحرک اسپرم در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار می‌گیرد.

### ۵- عملیات لقاح و شوک فیزیکی

پس از استحصال تخمک از تاس ماهیان، اسپرم اشعه داده‌شده با ۹۰ درصد حجم خود از آب سالن تکثیر ترکیب و بلافاصله به تخمک اضافه می‌گردد. اگر از اسپرم همسان استفاده گردد تیمارها شامل ۱- گاینوژنتیک (اسپرم اشعه‌دیده همسان و لقاح با تخمک سالم تاس ماهی به‌همراه شوک حرارتی به‌منظور دیپلوئید سازی)، ۲- تریپلوئید (اسپرم سالم همسان تاس ماهی و لقاح با تخمک سالم تاس ماهی به‌همراه شوک حرارتی)، ۳- هاپلوئید (اسپرم اشعه‌دیده همسان تاس ماهی و لقاح با تخمک سالم تاس ماهی بدون شوک حرارتی) و ۴- شاهد (اسپرم و تخمک سالم تاس ماهی) می‌باشد ولی در صورت استفاده از اسپرم غیرهمسان (که از لحاظ ژنتیکی غیرفعال شده)، تیمارها شامل ۱- گاینوژنتیک (اسپرم اشعه‌دیده غیرهمسان و

لقاح با تخمک سالم تاس ماهی به همراه شوک حرارتی (به منظور دیپلوئید سازی)، ۲- هیبرید تریپلوئید (اسپریم سالم غیرهمسان تاس ماهی و لقاح با تخمک سالم تاس ماهی به همراه شوک حرارتی) ۳- هاپلوئید (اسپریم اشعه دیده غیرهمسان تاس ماهی و لقاح با تخمک سالم تاس ماهی بدون شوک حرارتی) و ۴- هیبرید دیپلوئید (اسپریم سالم غیرهمسان و تخمک سالم تاس ماهی) می باشد.

بمنظور احتباس جسم دوم قطبی در زمان تقسیم دوم میوز در تاس ماهی سبیری و تاس ماهی شیپ، از ۱۰ دقیقه بعد از عمل لقاح (افزودن آب به مخلوط تخمک و اسپرم) از شوک سرمایی ۲-۵/۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. در ازون برون همین شرایط ولی به مدت ۶۰ دقیقه القای گاینوژنیز صورت پذیرفت. در تاس ماهی استرلیاد از شوک گرمایی ۳۴ درجه سانتیگراد از ۱۵ دقیقه بعد از لقاح به مدت ۲/۵ دقیقه استفاده (با اندکی تغییر در روش) (Fopp-Bayat et al., 2007) اما در فیل ماهی و تاس ماهی ایرانی از هر دو شوک گرمایی (۳۲، ۳۴ و ۳۷ درجه سانتیگراد از ۱۲، ۱۵ و ۱۸ دقیقه بعد از لقاح به مدت ۲-۴ دقیقه) و شوک سرمایی (صفر درجه سانتیگراد از ۵، ۱۲، ۱۵ و ۱۸ دقیقه بعد از لقاح به مدت ۵۵-۶۰ دقیقه) استفاده شد. برای سهولت در انجام شوک های حرارتی سبدهای ویژه ای از جنس PVC تهیه شده که یک طرف آن توری با چشمه ریز قرار دارد و عمل هم زدن تخم ها بر حسب زمان شوک دهی، در داخل سبدهای فوق و در داخل وان های مخصوص صورت می گیرد. سپس تخم ها بعد از شستشو (کهنه شهری و آذری تاکامی، ۱۳۵۳) به انکوباتورهای ویس به منظور گذراندن مراحل جنینی انتقال می یابند. در تمام این مدت دمای آب سالن

انکوباسیون اندازه گیری شده و بر این اساس درصد لقاح و درصد تفریخ محاسبه می گردد.

#### ۶- ارزیابی ژنتیکی

به منظور استخراج DNA در هر تیمار حداقل به میزان ۳۰ عدد لارو و بچه ماهی به طور تصادفی انتخاب و از روش

Hillis and Moritz (1990) و با کمی تغییر توسط Pourkazemi (1996) برای ماهیان خاویاری صورت می گیرد. برای تایید گاینوژنیز در تاس ماهیان نظیر فیل ماهی و تاس ماهی ایرانی (پورکاظمی و همکاران، ۱۳۸۹)، ازون برون (Hassanzadeh Saber et al., 2008)، تاس ماهی شیپ (Hassanzadeh Saber et al., 2014)، تاس ماهی استرلیاد (حسن زاده صابر و همکاران، ۱۳۹۸) و تاس ماهی سبیری (حسن زاده صابر و همکاران، ۱۴۰۱) از نشانگرهای مولکولی میکروستلایت طراحی شده برای تاس ماهی دریاچه ای (May et al., 1997; Welsh et al., 2003) استفاده شد.

برای تشخیص سطوح پلوئیدی و تعداد کروموزوم ها از طریق تهیه گسترش کروموزومی (نوروزفشخامی و خسروشاهی، ۱۳۷۴) در فیل ماهی و برای تشخیص تریپلوئیدهای فیل ماهی از روش اندازه گیری مساحت، حجم، هسته و سلول (Pandian and Koteeswaran, 1998) استفاده گردید.

اثبات ماهیان گاینوژن از طریق اندازه گیری قطر بزرگ، کوچک و یا مساحت سلول و حجم گلبول های قرمز خون تقریباً غیرممکن است زیرا بسیار بعید به نظر می رسد که بین ماهیان شاهد (۲n) با گاینوژن (۲n) تفاوتی مشاهده گردد. این واقعیت برای بررسی های کروموزومی هم صدق می کند زیرا عدد کروموزومی ماهیان شاهد و گاینوژن تقریباً یکسان است و از طرف

دیگر به علت این که تاکنون کروموزوم‌های جنسی در ماهیان خاویاری گزارش نشده و بیش از نیمی از آن‌ها را میکروکروموزوم تشکیل می‌دهد اثبات ماهیان گاینوژن از روش‌های فوق تقریباً غیرممکن است. با توجه به موارد فوق دو راه برای اثبات ماده‌زایی تاس ماهیان و تفکیک آن‌ها از ماهیان نر وجود دارد که یکی پرورش طولانی‌تر بچه ماهیان تولید شده (حداقل ۲/۵-۲ سال) است تا اندام‌های تناسلی به اندازه مطلوب رشد نماید و از طریق تهیه مقاطع بافتی سلول‌های جنسی نر و ماده می‌توان آن‌ها را از همدیگر تفکیک نمود و سپس با تعیین نسبت ماهیان نر و ماده و مشاهده تفاوت نسبت و درصد ماده‌ها نسبت به نرها، میزان موفقیت گاینوژنیز را تعیین کرد. راه دیگر، مارکرهای تعیین جنسیت که اخیراً در تاس ماهیان گزارش شده و می‌تواند نر و ماده را در مراحل اولیه زندگی جداسازی نماید (Kuhl et al., 2021).

#### ۷- مقایسه مشخصات ظاهری تاس ماهیان گاینوژنتیک در مقایسه با دوره‌های تنی

در مواردی که از اسپرم غیرهمسان غیرفعال شده ژنتیکی برای القای گاینوژنیز استفاده می‌گردد، بایستی در آزمایشات تیمار شاهد دوره در نظر گرفته شود تا شکل ظاهری تاس ماهیان گاینوژنتیک و دوره آن‌ها مورد مقایسه قرار گیرد. هدف از انتخاب این تیمار وجود یا عدم وجود مارکر فنوتیپی در درون نتاج گاینوژنتیک می‌باشد. یعنی اگر در نتاج گاینوژنتیک، به هر دلیلی اسپرم تحت تابش اشعه UV قرار نگیرد و با تخمک لقاح یابد، مشخص می‌گردد که فرزندان تولید شده دوره هستند یا گاینوژنتیک. در مطالعات ماده‌زایی تاس ماهیان انجام شده در کشور، تاس ماهی شپ، تاس ماهی سبیری و استرلیاد دارای تیمار شاهد

دورگه بودند چون که اسپرم مورد استفاده در القای ماده‌زایی غیرهمسان بود.

#### ۸- ارزیابی گناد تاس ماهیان گاینوژنتیک به روش بافت شناسی

نمونه‌برداری از گناد ماهیان از روش بیوپسی (بهمنی و کاظمی، ۱۳۷۷) صورت می‌گیرد. در این روش ابتدا ماهیان مورد مطالعه بیهوش می‌گردند. سپس در ناحیه بین چهارمین و پنجمین صفحه استخوانی شکمی از سمت دم به طرف سر، شکافی به طول ۳ تا ۴ سانتی متر ایجاد و قطعه کوچکی از بافت گناد (به ضخامت چند میلی‌متر و به وسعت کم‌تر از یک سانتی‌متر) از حفره شکمی خارج می‌شود. آزمایش تعیین جنسیت در ماهیان گاینوژنتیک با استفاده از بیوپسی در سن ۲-۳ سالگی انجام می‌شود. برای تعیین جنسیت و مراحل رسیدگی جنسی اقدام به بافت شناسی گناد و رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین می‌گردد.

#### ۹- بازماندگی و رشد تاس ماهیان گاینوژنتیک در اکثر مطالعات گاینوژنیز انجام شده در تاس ماهیان، مقایسه رشد بین شاهدین و ماهیان گاینوژن تا مرحله بلوغ انجام نگرفته که می‌تواند ناشی از بازماندگی پایین‌تر آن‌ها نسبت به شاهد باشد. در تاس ماهی سبیری این مقایسه بین ماهیان گاینوژن و شاهدین دوره صورت گرفته که در آینده نتایج آن منتشر می‌گردد (نقل قول از نویسنده).

#### ۱۰- سیستم تعیین جنسیت و نسبت‌های جنسی در تاس ماهیان گاینوژنتیک

هم‌چنان که در مقدمه توضیح داده شد، یکی از کاربردهای گاینوژنیز، بررسی مکانیزم تعیین جنسیت می‌باشد. بر این اساس جنسیت‌های هوموگامت و هتروگامت مشخص می‌گردد. در آزادماهیان و

کپور ماهیان، نرها هترو گامت (XY) می باشند یعنی مولد نر تعیین کننده جنسیت فرزندان خود می باشند. در این سیستم تعیین جنسیت با القای گاینوژنیز می توان در نسل اول ۱۰۰ درصد نتاج ماده تولید نمود. اگر کروموزوم جنسی در گونه ای از آبریان، مورد مطالعه قرار نگرفته باشد می توان با القای گاینوژنیز مشخص کرد که تعیین کننده جنسیت فرزندان بر عهده مولد مادری است یا پدری. تعداد کروموزوم ها در تاس ماهیان بسیار زیاد بوده و هم چنین مقدار زیادی میکرو کروموزوم دارند و دوشکلی جنسی در کروموزوم های این ماهیان وجود ندارد (Fopp-Bayat, 2018). با مطالعات گاینوژنیز انجام شده تا کنون در تاس ماهیان مشخص گردید که مولد مادری هترو گامت (ZW) و تعیین کننده جنسیت فرزندان خود می باشند که می توان به تاس ماهی سفید (VanEenennaam et al., 1999)، دورگه بستر (Omoto et al., 2005)، تاس ماهی کوتاه پوزه (*Acipenser brevirostrum*) (Flynn et al., 2006)، تاس ماهی سبیری (*Acipense*) (Fopp-Bayat, 2010)، ماهی پاروپوزه (*Polyodon spathula*) (Shelton and Mims, 2012)، تاس ماهی شیپ (Hasanzadeh Saber and Hallajian, 2014) و تاس ماهی استرلیاد (Fopp-Bayat et al., 2018) اشاره کرد.

گونه هایی با سیستم تعیین جنسیت هترو گامتی ماده که در منطقه جغرافیایی خاصی منقرض<sup>۲</sup> (RE) شده باشند، امکان احیای آن ها با گاینوژنیز (Grunina et al., 2011) و اسپرم غیر فعال ژنتیکی غیرهمسان فراهم گردیده است (Hassanzadeh Saber, 2022; ۱۳۹۸). چون در این حالت حسن زاده صابر و همکاران،

هر دو جنس نر خالص و ماده خالص آن گونه ولی با نسبت های متمایل به ماده ایجاد می گردد. در ماده های هترو گامتی، القای گاینوژنیز به نسبت های متفاوت نر های ZZ، ماده های ZW و ماده های برتر WW را ایجاد می کند که بستگی به تبادل کروموزومی (تاثیر نو ترکیبی) بین ژن تعیین جنسیت و سانترومر در طی تقسیم میوز دارد (Arai and Fujimoto, 2018). اگر تبادل کروموزومی بین ژن تعیین جنسیت و سانترومر به وقوع نپیوندد، هیچ فرزند هتروزیگوتی تولید نمی شود. زمانی که ژن تعیین جنسیت به طور مستقل از سانترومر دسته بندی می شود، حدود ۶۷ درصد از نتاج به صورت هتروزیگوت خواهند شد که این مقدار ممکن است به بالای ۸۸ درصد با زایا بودن ماده های برتر برسد (VanEenennaam et al., 1999). به هر صورت در اکثر مطالعات انجام گرفته مشخص شده که در ماهیانی با سیستم تعیین جنسیت هترو گامتی ماده، غالباً دو ماده برای یک نر وجود دارد و اظهار می شود که ژن تعیین جنسیت به طور مستقل از سانترومر دسته بندی می شود (Pandian, 2011; Glennon et al., 2012).

نشانگرهای مولکولی نظیر AFLP و میکروستلایت توانایی تشخیص هتروزیگوسیتی و به دنبال آن سیستم تعیین جنسیت را دارند (Chen et al., 2009; Molina-Luzon et al., 2015; Arai and Fujimoto, 2018; Ma et al., 2018). نشانگرهای میکروستلایت بکار رفته در استرلیاد به صورت هتروزیگوت بوده که بعضی از نتاج گاینوژنتیک در این لکوس ها یک ال و بعضی دیگر هر دو الل مادری را دارند. این موضوع اذعان دارد که دو نوع تخمک در تاس ماهی استرلیاد وجود دارد و سیستم تعیین جنسیت این گونه به صورت هترو گامتی ماده است (حسن زاده صابر، ۱۳۹۷).

Molina-Luzon و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند بسته به این که والد ماده هوموزیگوت یا هتروزیگوت باشد، به ترتیب یک یا دو الل در نتاج گاینوزنتیک به ارث می‌رسد. در مطالعه Grunina و همکاران (۲۰۱۱) بر روی تاس‌ماهی سبیری، نشانگرهای میکروستلایت نشان دادند که نتاج گاینوزنتیک، وراثت اللی مادری را با اشکال مختلف داشتند. Ma و همکاران (۲۰۱۸) در هالیبوت نقطه‌ای با نشانگرهای میکروستلایت توانستند میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در نتاج گاینوزنتیک را به فراوانی بالای نو ترکیبی نسبت دهند. نظریه‌ای که Fopp-Bayat و همکاران (۲۰۱۸) به آن اعتقاد دارند این است که میزان فراوانی تبادل کروموزومی ZZ در نرهای گاینوزن با فراوانی نتاج ماده‌های خالص WW برابر است. بر اساس این نظریه، در مطالعات گاینوزنیز در تاس‌ماهیان، به همان مقدار که لاین نر هوموگامت ایجاد می‌شود، لاین ماده هوموگامت (ماده‌های برتر) هم ایجاد می‌شود که این مهم می‌تواند در تولید انبوه نتاج تمام ماده ZW در نسل دوم از طریق آمیزش نرهای ZZ طبیعی با ماده‌های خالص WW نتیجه بدهد اگرچه تشخیص آن نیاز به آزمایشات بیش‌تری دارد.

### دورنمای تاس‌ماهیان گاینوزنتیک

با دستیابی به دانش فنی غیرفعال‌سازی ژنوم اسپرم تعدادی از گونه‌های تاس‌ماهیان نظیر تاس‌ماهی سبیری و تاس‌ماهی ایرانی در مطالعات القای ماده‌زایی بین‌گونه‌ای یا بین جنسی، می‌توان نسبت به حفاظت گونه‌هایی که تنها دارای تعداد انگشت شماری از آن‌ها در طبیعت وجود دارد حتی بدون جنس نر همسان اقدام نمود.

گاینوزنیز راهی موثر برای تولید تاس‌ماهیان تک جنس می‌باشد زیرا پرورش ماده‌ها در این گونه‌ها دارای ارزش بالاتری نسبت به پرورش هر دو جنس می‌باشد چرا که نگهداری هر دو جنس تا زمان تشخیص جنسیت، هزینه‌های زیادی را تحمیل پرورش‌دهنده کرده و صرفه اقتصادی پرورش تاس‌ماهیان را کاهش می‌دهد. گاینوزنیز و تغییر جنسیت هورمونی می‌توانند در کنار هم، تاس‌ماهیان تمام ماده را در نسل دوم ایجاد نمایند.

تکنولوژی تولید لاین تاس‌ماهیان با گاینوزنیز و اسپرم غیرفعال شده غیر همسان امکان‌پذیر است زیرا آن‌ها با داشتن سیستم تعیین جنسیت هتروگامتی ماده، قادر به ایجاد هر دو جنس ماده و نر خالص اما با تمایل بیش‌تر به ماده خواهند بود.

گاینوزنیز، ژن‌های نهفته مغلوب مفید و مضر را بیان می‌کند لذا با حذف ژن‌های مضر از جمعیت، می‌توان صفات مطلوب را در جمعیت تاس‌ماهیان پرورشی افزایش داد.

با تولید هموزیگوت‌ها می‌توان پارامترهای ژنتیکی یک فرد یا جمعیت را در توسعه نقشه‌ها و نشانگرهای ژنتیکی تعیین کرد و هتروزیگوسیتی را برآورد نمود.

### سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم که از زحمات تمام کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نمایم.

## منابع

۱. بهمنی، م.، کاظمی، ر.، ۱۳۷۷. مطالعه بافت شناسی غدد جنسی در تاس ماهیان جوان پرورشی. مجله علمی شیلات ایران، ۷(۱)، ۱۶-۱.
۲. پوردهقانی، م.، کاظمی، ر.، پورکاظمی، م.، ۱۳۸۹. تکثیر و پرورش ماهی خاویاری استرلیاد به عنوان ماهی زینتی در ایران. مجموعه مقالات نخستین همایش ماهیان زینتی ایران، ۳۰ تا ۳۱ تیر، تهران.
۳. پورکاظمی، م.، محسنی، م.، علیپور، ع. ر.، نوروز فشخامی، م. ر.، حسن زاده صابر، م.، برادران نویری، ش.، بهمنی، م.، رضوانی گیل کلایی، س.، ۱۳۸۹. گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی ژینوژنیز در تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و فیل ماهی (*Huso huso*). موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۷۰ ص.
۴. حسن زاده صابر، م.، ۱۳۹۷. استفاده از اسپرم تخریب شده و القای گاینوژنیز به منظور جلوگیری از خطر انقراض گونه آسیب پذیر (VU) تاس ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*). رساله دکتری، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران. ۱۲۱ ص.
۵. حسن زاده صابر، م.، برادران نویری، ش.، پورکاظمی، م.، یارمحمدی، م.، یگانه راسته کناری، ه.، جلیل پور، ج.، ۱۴۰۱. القای ماده زایی بین گونه ای در تاس ماهی سبیری (*Acipenser baerii*) با استفاده از اسپرم غیرهمسان. نشریه فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، ۱۰(۳)، ۲۳-۴۸.
۶. حسن زاده صابر، م.، پورکاظمی، م.، بهمنی، م.، برادران نویری، ش.، نوروزفشخامی، م. ر.، کاظمی، ر.، چکمه دوز قاسمی، ف.، یارمحمدی، م.، محمدی پرشکوهی، ح.، یزدانی، م. ع.، پوردهقانی، م.، غرقعی، ا.، یگانه ه.، ۱۳۹۱. امکان تولید تاس ماهی شپ نر ماده زاد با استفاده از تغییر جنسیت (Sex Reversal) و القای ماده زایی (Gynogenesis). گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی مصوب موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۹۳ ص.
۷. حسن زاده صابر، م.، ذوالقرنین، ح.، سالاری علی آبادی، م. ع.، یزدانی ساداتی، م. ع. و یارمحمدی، م. ۱۳۹۸. ایجاد جنس نر تاس ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) با به کارگیری اسپرم هترولوگ غیرفعال در القای گاینوژنیز. فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، ۷(۴)، ۱۰۵-۱۳۵.
۸. حسن زاده صابر، م.، ذوالقرنین، ح.، سالاری علی آبادی، م. ع.، یزدانی ساداتی، م. ع.، یارمحمدی، م.، ۱۴۰۰. بهینه سازی روش اشعه دهی UV جهت تخریب DNA اسپرماتوزوای تاس ماهی سبیری (*Acipenser baerii*) در مطالعات گاینوژنیز: سنجش کامت. نشریه علمی توسعه آبزی پروری، ۱۵(۱)، ۱۸-۱.
۹. کهنه شهری، م.، آذری تاکامی، ق.، ۱۳۵۳. تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری. انتشارات دانشگاه تهران. ۲۸۱ ص.
۱۰. نوروزفشخامی، م. ر.، خسروشاهی، م.، ۱۳۷۴. پروژه کاریولوژی (مطالعه کروموزومی) تاس ماهیان بوسیله کشت گلبولهای سفید خون. مجله علمی شیلات ایران، ۴(۲)، ۶۳-۷۱.
۱۱. یوسفیان، م.، نظری، ر. م.، ۱۳۸۲. بررسی اثر اشعه گاما بر روی اسپرم ماهیان خاویاری و ایجاد ماهی ژینوژنیز در تاس ماهیان. مجله علمی شیلات

- Sarasquete, C., Herráez, M.P., Robles, V., 2014. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture*, 432, 389-401.
23. Chebanov, M., Billard, R., 2001. The culture of sturgeons in Russia: production of juveniles for stocking and meat for human consumption. *Aquatic Living Resources*, 14, 375-381.
24. Chen, S.L., Li, J., Deng, S.P., Tian, Y.S., Wang, Q.Y., Zhuang, Z.M., Sha, Z.X., Xu, J.Y., 2007. Isolation of female specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Marine Biotechnology*, 9, 273-280.
25. Chen, S., Ji, X., Shao, C., Li, W., Yang, J., Liang, Z., Liao, X., Xu, G., Xu, Y., Song, W., 2012. Induction of mitogynogenetic diploids and identification of WW super-female using sex-specific SSR markers in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Marine Biotechnology*, 14, 120-128.
26. Chen, S.L., Tian, Y.S., Yang, J.F., Shao, C.W., Ji, X.S., Zhai, J.M., Liao, X.L., Zhuang, Z.M., Su, P.Z., Xu, J.Y., Sha, Z.X., Wu, P.F., Wang, N., 2009. Artificial gynogenesis and sex determination in the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Marine Biotechnology*, 11, 243-251.
27. Cherfas, N.B., 1966. Natural triploidy in the female of the unisexual variety of the goldfish (*Carassius auratus gibelio*). *Soviet genetic (Genetika)*, 2 (5), 9-13.
28. Cherfas, N.B., Gomelsky, B., Ben-Dom, N., Hulata, G., 1994. Assessment of triploid common carp (*Cyprinus carpio* L.) for culture. *Aquaculture*, 127, 11-18.
- Chourrout, D., Tiews, K., 1987. Genetic manipulations in fish: review of methods.
29. Chourrout, D., 1984. Pressure induced retention of 2nd polar body and suppression of 1st cleavage in rainbow trout production of all triploids all tetraploids and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. *Aquaculture*, 36, 111-126.
30. Chourrout, D., 1988. Revue sur le déterminisme génétique du sexe des poissons téléostéens. *Bulletin de la*
- ایران، ویژه نامه اولین سمپوزیوم ملی ماهیان  
خاویاری، ۱۸۹-۱۸۱.
12. Arai, K., 2001. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. *Aquaculture*, 197, 205-228.
13. Arai, K., Fujimoto, T., 2018. Chromosome manipulation techniques and applications to aquaculture. In: Wang, H.P., Piferrer, F., Chen, S.L., Shen, Z.G., (Eds.). *Sex Control in Aquaculture*, Volume I, First Edition. John Wiley & Sons Ltd, UK, pp. 137-162.
14. Aramli, M.S., Azarin, H., Farsi, P., 2015. Motility parameters, adenosine triphosphate content and oxidative stress indices of sterlet (*Acipenser ruthenus*) sperm after 6 days of storage. *Aquaculture Research*, 48, 719-724.
15. Billard, R., Cosson, J., Crim, L.W., 1993. Motility of fresh and aged halibut sperm. *Aquatic Living Resources*, 6(1), 67-75.
16. Birstein, V.J., 1993. Sturgeons & paddlefishes: threatened fishes in need of conservation. *Conservation Biology*, 7, 773-787.
17. Boron, A., 1994. Karyotypes of diploid and triploid silver crucian carp *Carassius auratus gibelio* (Bloch). *Cytobios*, 80, 117-124.
18. Bronzi, P., Rosenthal, H., Gessner, J., 2011. Global sturgeon aquaculture production: an overview. *Journal of Applied Ichthyology*, 27, 169-175.
19. Cabrita, E., Robles, V., Rebordinos, L., Sarasquete, C., Herráez, M.P., 2005. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology*, 50(2), 144-153.
20. Cabrita, E., Robles, V., Herráez, P., 2008. *Methods in reproductive aquaculture: marine and freshwater species*. CRC Press.
21. Cabrita, E., Sarasquete, C., Martínez-Páramo, S., Robles, V., Beirão, J., Pérez-Cereales, S., Herráez, M., 2010. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology*, 26, 623-635.
22. Cabrita, E., Martínez-Páramo, S., Gavaia, P.J., Riesco, M.F., Valcarce, D.G.,

40. Donaldson, E.M., Devlin, R.H., 1996. Uses of biotechnology to enhance production. In: Pennell W, Barton B (Eds.). Principles of Salmonid Culture. Elsevier, pp. 969–1020.
41. Dong, S., Taniguchi, N., Tsuji, S., 1996. Identification of clones of gimbuna *Carassius langsdorfi* by DNA fingerprinting and isozyme pattern. Nippon Suisan Gakkaishi, 62, 747–753.
42. Doroshov, S.I., Moberg, G.P., VanEenennaam, J.P., 1997. Observations on the reproductive cycle of cultured White sturgeon, *Acipenser transmontanus*. Environmental Biology of Fishes, 48, 265–278.
43. Duplinsky, P.D., 1982. Sperm motility of northern pike and chain pickerel at various pH values. Transactions of the American Fisheries Society, 111(6), 768–771.
44. Ezaz, M.T., Myers, J.M., Powell, S.F., McAndrew, B.J., Penman, D.J., 2004. Sex ratios in the progeny of androgenetic and gynogenetic YY male Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. Aquaculture, 232, 205–214.
45. Felip, A., Zanuy, S., Carrilo, M., Piferrer, F., 2001. Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. Genetica, 111, 175–195.
46. Flynn, S.R., Matsuoka, M., Reith, M., Martin-Robichaud, D.J., Benfey, T.J., 2006. Gynogenesis and sex determination in shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum* Lesueur). Aquaculture, 253, 721–727.
47. Fopp-Bayat, D., 2010. Meiotic gynogenesis revealed not homogametic female sex determination system in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt). Aquaculture, 305, 174–177.
48. Fopp-Bayat, D., 2018. Genome manipulation and sex control in the Siberian sturgeon: An updated synthesis with regard to objectives, constraints and findings. In The Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869) Volume 2- Farming (pp. 327–336). Springer, Cham.
49. Fopp-Bayat, D., Kolman, R., Woznicki, P., 2007. Induction of meiotic gynogenesis in sterlet (*Acipenser ruthenus*). Aquaculture, 264, 54–58.
- Société zoologique de France, 113, 123–144.
31. Ciereszko, A., Dabrowski, K., Lin, F., Liu, L., 1999. Protective role of ascorbic acid against damage to male germ cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 56, 178–183.
32. Ciereszko, A., Wolfe, T.D., Dabrowski, K., 2005. Analysis of DNA damage in sea lamprey (*Petromyzon marinus*) spermatozoa by UV, hydrogen peroxide, and the toxicant bisazir. Aquatic Toxicology, 73, 128–138.
33. Cognie, F., Billard, R., Chao, N., 1989. La criopreservation de la laitance de la carpe, *Cyprinus carpio*, Journal of Applied Ichthyology, 5, 165–176.
34. Collins, A.R., 2004. The Comet Assay for DNA Damage and Repair, Molecular Biotechnology, 26 (3), 249–261.
35. Dan, C., Mei, J., Wang, D., Gui, J.F., 2013. Genetic differentiation and efficient sex-specific marker development of a pair of Y- and X-linked markers in yellow catfish. International Journal of Biological Sciences, 9 (10), 1043–1049.
36. Danzmann, R.G., Gharbi, K., 2007. Linkage mapping in aquaculture species. In: Liu, Z., (Ed.). Aquaculture Genome Technologies. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, pp. 139–167.
37. Devlin, R.H., Nagahama, Y., 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture, 208, 191–364.
38. Dietrich, G.J., Szpyrka, A., Wojtczak, M., Dobosz, S., Goryczko, K., Zakowski, Ł., Ciereszko, A., 2005. Effects of UV irradiation and hydrogen peroxide on DNA fragmentation, motility and fertilizing ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. Theriogenology, 64, 1809–1822.
39. Ding, j., Shan, S.X., Ge, W., Jiang, Y.G., 1992. Study on the mode of primary control in the egg of gynogenetic crucian carp for inhibiting the development of 2 types of sperm nuclei. Science in China (Scientia Sinica) Series B, 35(7), 802–810.

- meiotic gynogenesis. *Aquaculture International*, 22, 273–279.
59. Hassanzadeh Saber, M., Noveiri, S.B., Pourkazemi, M., Yazdani, M., Ghoroghi, A., Bahmani, M., Pourdehghani, M., Chakmehdouz, F., Yarmohammadi, M., Nowruzfashkhami, M.R., 2014. Induction of meiotic gynogenesis in ship sturgeon (*Acipenser nudiiventris*) using UV-irradiated heterologous sperm. *Journal of Applied Genetics*, 55, 223–229.
  60. Hassanzadeh Saber, M., 2022. Conservation of vulnerable sterlet sturgeon, *Acipenser ruthenus* using artificial gynogenesis. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 23(1), 1-11.
  61. Herráez, M.P., Carral, J., Alvarez, R., Sáez-Royuela, M., de Paz, P., 1993. Efecto de distintos diluyentes y crioprotectores sobre la fertilidad del semen de la trucha común y la trucha arcoiris. In: Cerviño, A., Landin, A., de Co, A., Guerra, A., Torre, M., (Eds.). *Proc Fourth National Congress on Aquaculture*, Villanova de Arosa, September 1993, 1.
  62. Hertwig, O., 1911. Die radium krankheit tierischer keim zellen, *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 77, 1-97.
  63. Hillis, D.M., Moritz, C., 1990. *Molecular taxonomy*. Sinauer associate, Inc. Publishers. Massachusetts.
  64. Hubbs, C.L., Hubbs, L.C., 1932. Apparent parthenogenesis in nature, in a form of fish of hybrid origin. *Science*, 76, 628–630.
  65. Hurvitz, A., Jackson, K., Degani, G., Levavi-Sivan, B., 2007. Use of endoscopy for gender and ovarian stage determinations in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) grown in aquaculture. *Aquaculture*, 270, 158–166.
  66. Hussain, M.G., Penman, D.J., McAndrew, B.J., 1998. Production of heterozygous and homozygous clones in Nile tilapia. *Aquaculture International*, 6, 197–205.
  67. 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.
  68. Ijiri, K., Egami, N., 1980. Hertwig effect causes by UV irradiation of sperm of
  50. Fopp-Bayat, D., Okalewicz, K., 2015. Activation of the albino Sterlet (*Acipenser ruthenus*) eggs by UV-irradiated better hybrid spermatozoa to provide gynogenetic progeny. *Reproduction in Domestic Animals*, 50, 554-559.
  51. Fopp-Bayat, D., Hliwa, P., Ocalewicz, K., 2018. Presence of gynogenetic males suggests a female heterogamety in sterlet (*Acipenser ruthenus* L.). *Animal Reproduction Science*, 189, 110-118.
  52. Genesca, A., Caballin, M., Miro, R., Benet, J., Germa, J., Egozcue, J., 1992. Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg. *Human genetics*, 89, 181-186.
  53. Glennon, R.P., Gomelsky, B., Schneider, K.J., Kelly, A.M., Haukenes, A., 2012. Evidence of female heterogamety in largemouth bass, based on sex ratio of gynogenetic progeny. *North American Journal of Aquaculture*, 74, 537-540.
  54. Goddard, K.A., Dawley, R.M., 1990. Clonal inheritance of a diploid nuclear genome by a hybrid freshwater minnow (*Phoxinus eos-neogaeus*, Pisces: Cyprinidae). *Evolution*, 44, 1052–1065.
  55. Gomelsky, B.I., Emelyanova, O.V., Recoubratsky, A.V., 1992. Application of the scale cover gene (N) to identification of type of gynogenesis and determination of ploidy in common carp. *Aquaculture*, 106, 233–237.
  56. Grunina, A.S., Skoblina, M.N., Recoubratsky, A.V., Kovalev, K.V., Barmintseva, A.E., Goncharov, B.F., 2011. Obtaining gynogenetic progeny of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) using eggs matured and ovulated in vitro. *Journal of Applied Ichthyology*, 27, 701–705.
  57. Hassanzadeh Saber, M., Baradaran Noveiri, S., Pourkazemi, M., Yarmohammadi, M., 2008. Induction of gynogenesis in stellate sturgeon (*Acipenser stellatus* Pallas 1771) and its verification using microsatellite markers. *Aquaculture Research*, 39, 1183-1187.
  58. Hassanzadeh Saber, M., Hallajian, A., 2014. Study of sex determination system in ship sturgeon (*Acipenser nudiiventris*) using

75. Lebeda, I., Dzyuba, B., Rodina, M., Flajshans, M., 2014. Optimization of sperm irradiation protocol for induced gynogenesis in Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. *Aquaculture International*, 22, 485-495.
76. Lebeda, I., Gazo, I., Flajshans, M., 2014. Chemical induction of haploid gynogenesis in sterlet *Acipenser ruthenus*. *Czech Journal of Animal Science*, 59 (7), 310-318.
77. Lebeda, I., Steinbach, Ch., Flajshans, M., 2018. Flow cytometry for assessing the efficacy of interspecific gynogenesis induction in sturgeon. *Journal of Fish Biology*, 92(6), 1819-1831.
78. Levandusky, M.J., Cloud, J.G., 1988. Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen: effect of non-motile sperm on fertility. *Aquaculture*, 75 (1-2), 171-179.
79. Lewis, S.E., Agbaje, I.M., 2008. Using the alkaline comet assay in prognostic tests for male infertility and assisted reproductive technology outcomes. *Mutagenesis*, 23, 163-170.
80. Li, P., Wei, Q., Liu, L., 2008. DNA integrity of *Polyodon spathula* cryopreserved sperm. *Journal of Applied Ichthyology*, 24, 121-125.
81. Linhart, O., Mims, S.D., Gomelsky, B., Hiott, A.E., Shelton, W.L., Cosson, J., Rodina, M., Gela, D., 2000. Spermiation of paddlefish (*Polyodon spathula*) stimulated with injection of LHRH analogue and carp pituitary extract. *Aquatic Living Resources*, 13(6), 455-460
82. Liu, S.J., Sun, Y.D., Zhang, C., Luo, K.K., Liu, Y., 2004. Production of gynogenetic progeny from allotetraploid hybrids red crucian carp  $\times$  *C. carpio*. *Aquaculture*, 236, 193-200.
83. Liu, S.J., Duan, W., Tao, M., Zhang, C., Sun, Y.D., Shen, J.M., Wang, J., Luo, K.K., Liu, Y., 2007. Establishment of the diploid gynogenetic hybrid clonal line of red crucian carp  $\times$  *C. carpio*. *Science in China. Series C*, 50, 186-193.
84. Lopez-Fernandez, C., Gage, M., Arroyo, F., Gosálbez, A., Larran, A., Fernandez, J., Gosálvez, J., 2008. Rapid rates of sperm DNA damage after activation in tench (*Tinca tinca*: Teleostei, Cyprinidae) *Oryzias latipes* (Teleost) and its photoreactivation. *Mutation Research*, 69, 241-248.
69. Irvine, D., Twigg, J.P., Gordon, E.L., Fulton, N., Milne, P.A., Aitken, R.J., 2000. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *Journal of Andrology*, 21, 33-44.
70. Ji, X.S., Tian, Y.S., Yang, J.F., Wu, P.F., Jiang, Y.L., Chen, S.L., 2010. Artificial gynogenesis in *Cynoglossus semilaevis* with homologous sperm and its verification using microsatellite markers. *Aquaculture Research*, 41, 913-920.
71. Komen, J., Bongers, A.B.J., Richter, C.J.J., Van Muiswinkel, W.B.B., Huisman, E.A., 1991. Gynogenesis in common carp (*Cyprinus carpio*) II: the production of homozygous clones and F1 hybrids. *Aquaculture*, 92, 127-142.
72. Kowtal, G.V., 1987. Preliminary experiments in induction of polyploids, gynogenesis and androgenesis in the white sturgeon (*Acipenser transmontanus* Richardson). In: Tiwes, K., (Ed.). *Proceeding of World Symposium on Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture*. Heenemann verlagsgesellschaft, Berlin, pp. 317-324.
73. Kuhl, H., Guiguen, Y., Höhne, C., Kreuz, E., Du, K., Klopp, C., Lopez-Roques, C., Yebra-Pimentel, E.S., Ciorpac, M., Gessner, J., Holostenco, D., Kleiner, W., Kohlmann, K., Lamatsch, D.K., Prokopov, D., Bestin, A., Bonpunt, E., Debeuf, B., Haffray, P., Morvezen, R., Patrice, P., Suciu, R., Dirks, R., Wuertz, S., Kloas, W., Scharl, M., Stöck, M., 2021. A 180 Myr-old female-specific genome region in sturgeon reveals the oldest known vertebrate sex determining system with undifferentiated sex chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 376(1832), 20200089.
74. Labbé, C., Martoriati, A., Devaux, A., Maisse, G., 2001. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Molecular Reproduction and Development*, 60, 397-404.

- (*Centropristis striata*) sperm. Aquaculture, 259, 290–299.
93. Nagy, A., Csanyi, V., 1984. A new breeding system using gynogenesis and sex reversal for fast inbreeding in carps. Theoretical and Applied Genetics, 67, 485–490.
  94. Nagy, K., Rajki, L., Horvath, L., Csany, V., 1978. Investigation on carp (*Cyprinus carpio* L.) gynogenesis. Journal of Fish Biology, 13, 215–224.
  95. Naruse, K., Ijiri, K., Shima, A., Egami, N., 1985. The production of cloned fish in the mdaka (*Oryzias latipes*). Journal of Experimental Zoology, 236, 335–342.
  96. Nowosad, J., Kucharczyk, D., Targon'ska, K., Kujawa, R., 2015. Comparison of temperature shock timing to induced artificial mitotic gynogenesis and androgenesis in common tench. Aquaculture International, 23, 45–53.
  97. Ohta, H., Shimma, H., Hirose, K., 1995. Relationship between fertility and motility of cryopreserved spermatozoa of the amago salmon *Oncorhynchus masou ishikawae*, Fisheries Science, 61 (5), 886–887.
  98. Omoto, N., Maebayashi, M., Adachi, S., Arai, K., Yamauchi, K., 2005. Sex ratios of triploids and gynogenetic diploids induced in the hybrid sturgeon, the bester (*Huso huso* female × *Acipenser ruthenus* male). Aquaculture, 245, 39–47.
  99. Onozato, H., 1984. Diploidization of gynogenetically activated salmonid eggs using hydrostatic pressure. Aquaculture, 43, 91–97.
  100. Pan, Z.J., Zhu, C.K., Wang, H., Chang, G.L., Ding, H.Y., Qiang, X.G., 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.
  101. Pandian, T.J., Koteeswaran, R., 1998. Ploidy induction and sex control in fish. Hydrobiologia, 384, 167–243.
  102. Pandian, T.J., 2011. Sex determination in fish. CRC Press.
  103. Pérez-Cerezales, S., Martínez-Páramo, S., Cabrita, E., Martínez-Pastor, F., de Paz, P., Herráez, M.P., 2009. Evaluation of measured using a sperm chromatin dispersion test. Reproduction, 138, 257.
  85. Ma, H.Y., Chen, S.L., Ji, X.S., 2018. Sex-specific markers, gynogenesis, and sex control in spotted halibut. In: Wang, H.P., Piferrer, F., Chen, S.L., Shen, Z.G., (Eds.). Sex Control in Aquaculture, Volume I, First Edition. John Wiley & Sons Ltd, UK, pp. 631–643.
  86. May, B., Charles, C., Krueger, C., Kincaid, L., 1997. Genetic variation at Microsatellite loci in sturgeon. Primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science, 54, 1542–1547.
  87. Meng, Z., Liu, X., Liu, B., Hu, P., Ji, Y., Yang, Z., Zhang, H., Liu, X., Lei, J., 2016. Induction of mitotic gynogenesis in turbot *Scophthalmus maximus*. Aquaculture, 451, 429–435.
  88. Mims, S.D., Shelton, W.L., Linhart, O., Wang, C., 1997. Induced meiotic gynogenesis of paddlefish (*Polyodon spathula*). Journal of the World Aquaculture Society, 28, 334–343.
  89. Mims, S.D., Shelton, W.L., 1998. Induced meiotic gynogenesis in shovelnose sturgeon. Aquaculture International, 6, 323–329.
  90. Molina-Luzón, M.J., López, J.R., Robles, F., Navajas-Pérez, R., Ruiz-Rejón, C., De la Herrán, R., Navas, J.I., 2015. Chromosomal manipulation in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858): induction of triploidy and gynogenesis. Journal of Applied Genetics, 56, 77–84.
  91. Monaco, P.J., Rasch, E.M., Balsano, J.S., 1984. Apomictic reproduction in the Amazon Molly, *Poecilia formosa*, and its triploid hybrids. In: Turner, B.J., (Ed.). Evolutionary Genetics of Fishes. Monographs in Evolutionary Biology. Springer, Boston, MA. pp. 311–328.
  92. Morgan, A.J., Murashige, R., Woolridge, C.A., Luckenbach, J.A., Watanabe, W.O., Borski, R.J., Godwin, J., Daniels, H.V., 2006. Effective UV dose and pressure shock for induction of meiotic gynogenesis in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) using black sea bass

114. Rokicki, J., Kulikowski, M., 1994. Occurrence of male *Carassius auratus gibelio* (Bloch, 1783) in Poland. *Przegląd Zoologiczny*, 38, 89–92.
115. Romashov, D.D., Nikolyukin, N.I., Blyaeva, V.N., Timofeeva, N.A., 1963. Possibilities of producing diploid radiation-induced gynogenesis in sturgeons. *Radiobiology*, 3, 145-154. (Translated from *Radiobiologiya*, 3, 104-109).
116. Sarder, M.R.I., Penman, D.J., Myers, J.M., McAndrew, B.J., 1999. Production and propagation of fully inbred clonal lines in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) *Journal of Experimental Zoology*, 284, 675-685.
117. Schultz, R.J., 1971. Special adaptive problems associated with unisexual fish. *American Zoologist*, 11, 351–360.
118. Shelton, W.L., Mims, S.D., 2012. Evidence for female heterogametic sex determination in paddlefish (*Polyodon spathula*) based on gynogenesis. *Aquaculture*, 356-357, 116-118.
119. Simon, L., Castillo, J., Oliva, R., Lewis, S.E., 2011. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reproductive BioMedicine Online*, 23, 724–734.
120. Simon, L., Carrell, D.T., 2013. Sperm DNA damage measured by comet assay. In: Carrell DT, Aston KI (Eds.). *Spermatogenesis: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, Springer Science+Business Media, LLC 2013, 927, 137-146.
121. Singh, N.P., Muller, C.H., Berger, R.E., 2003. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertility and sterility*, 80(6), 1420-1430.
122. Takahashi, S., Officer, F., 2010. Sturgeon conservation and the role of Japan. *The State of Wildlife Trade in Japan*, 10, 42–47.
123. Taniguchi, N., Han, H.S., Tsujimura, A., 1994. Variation in some quantitative traits of clones produced by chromosome manipulation in ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Aquaculture*, 120, 53–60.
- oxidative DNA damage promoted by storage in sperm from sex-reversed rainbow trout. *Theriogenology*, 71, 605-613.
104. Peruzzi, S., Chatain, B., 2003. Induction of tetraploid gynogenesis in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Genetica*, 119, 225–228.
105. Peruzzi, S., Scott, A.G., Domaniewski, J.C.J., Warner, G.F., 1993. Initiation of gynogenesis in *Oreochromis niloticus* following heterologous fertilisation. *Journal of Fish Biology*, 43, 585–591.
106. Piferrer, F., 2001. Endocrine sex control for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, 197, 229–281.
107. Piferrer, F., Cal, R.M., Gomez, C., Alvarez-Blazquez, B., Castroc, J., Martinez, P., 2004. Induction of gynogenesis in the turbot (*Scophthalmus maximus*): effects of UV irradiation on sperm motility, the Hertwig effect and viability during the first 6 months of age. *Aquaculture*, 238, 403–419.
108. Pourkazemi, M., 1996. Molecular and biochemical genetic analysis of sturgeon stocks from the south Caspian Sea. Ph.D. Thesis. University of Wales, Swansea.
109. Price, D.J., 1984. Genetics of sex determination in fishes. A brief review. In: Potts, G.W., Wootton, R.J., (Eds.). *Fish Reproduction, Strategies and Tactics*. Academic Press, London, pp. 75–80.
110. Purdom, C.E., 1969. Radiation induced gynogenesis and androgenesis in fish. *Heredity*, 24, 431-444.
111. Quillet, E., 1994. Survival, growth and reproductive traits of mitotic gynogenetic rainbow trout females. *Aquaculture*, 123, 223–236.
112. Rasch, E., Monaco, P., Balsano, J., 1982. Cytophotometric and autoradiographic evidence for functional apomixes in a gynogenetic fish, *Poecilia formosa* and its related, triploid unisexuals. *Histochemistry*, 73, 515–533.
113. Rastogi, R.P., Richa, K.A., Tyagi, M.B., Sinha, R.P., 2010. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *Journal of Nucleic Acids*, 2010, 1-32.

- medirostris*) .Molecular Ecology Notes, 3, 47–55.
133. Williot, P., Arlati, G., Chebanov, M., Gulyas, T., Kasimov, R., Kirschbaum, F., Patriche, N., Pavlovskaya, L., Poliakova, L., Pourkazemi, M., Kim, Y., Zhuang, P., Zholdasova, I.M., 2002. Status and management of Eurasian sturgeon: an overview. International Review of Hydrobiology, 87, 483–506.
  134. Wu, Q.J., Ye, Y.Z., Cheng, D.R., 1981. Investigation on the carp gynogenesis with reference to establishing a pure line. Acta Genetica Sinica, 8, 50–55.
  135. Wuertz, S., Güralp, H., Pšenička, M., Chebanov, M., 2018. Sex determination in sturgeon. In: Wang, H.P., Piferrer, F., Chen, S.L., Shen, Z.G., (Eds.). Sex Control in Aquaculture, Volume I, First Edition. John Wiley & Sons Ltd, UK, pp.645-668.
  136. Xiao, J., Peng, D.J., Liu, S.J., Sun, Y.D., Long, Y., Shen, J.M., Zhang, C., Tao, M., Liu, Y., 2009. Induction of gynogenesis in goldfish using spermatozoa of *M. amblycephala*. Acta Hydrobiologica Sinica, 1, 76–81.
  137. Xiao, J., Zou, T.M., Chen, L., Liu, S.J., Xiao, J., Zhang, H., Long, Y., Yan, J.P., Zhao, R.R., Tao, M., Zhang, C., You, C.P., Liu, Y., 2011. Microsatellite analysis of different ploidy offspring of artificial gynogenesis in *Cyprinus carpio*. Journal of Fish Biology, 78, 150–165.
  138. Yamasaki, F., 1983. Sex control and manipulation in fish. Aquaculture, 33, 329–354.
  139. Yuan-Dong, S., Zhang, C., Shao-Jun, L., Min, T., Chen, Z., Yun, L., 2006. Induction of gynogenesis in Japanese crucian carp (*Carassius cuvieri*). Acta Genetica Sinica, 33(5), 405-412.
  140. Yuandong, S., Min, T., Shaojun, L., Chun, Z., Wei, D., Jiamin, S., Jing, W., Chen, Z., Yu, L., Yun, L., 2007. Induction of gynogenesis in red crucian carp using spermatozoa of blunt snout bream. Progress in natural science, 17(2), 163-167.
  141. Yuzhen, Y., Qingjiang, W., Rongde, C., 1989. Studies on cytology or crosses between grass carp and carp- asynchronization between nucleus and
  124. Thorgaard, G.H., 1983. Chromosome set manipulation and sex control in fish. In: Hoar, W.S, Randall, D.J., Donaldson, E.M., (Eds.). Fish Physiology. Academic Press, New York, NY, pp.405-434.
  125. Thorgaard, G.H., 1986. Ploidy manipulation and performance. Aquaculture, 57, 57–64.
  126. Tuncer, P., Bucak, M., Büyükleblebici, S., Sarlözkan, S., Yeni, D., Eken, A., Akalın, P., Kinet, H., Avdatek, F., Fidan, A., 2010. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. Cryobiology, 61, 303–307.
  127. Van Eenennaam, A.L., Van Eenennaam, J.P.V., Medrano, J.F., Dorshov, S.I., 1996. Rapid verification of meiotic gynogenesis and polyploidy in with sturgeon (*Acipenser transmontanus* Richardson). Aquaculture, 147, 177-189.
  128. Van Eenennaam, A.L., Van Eenennaam, J.P., Medrano, J.F., Doroshov, S.I., 1999. Evidence of female heterogametic genetic sex determination in white sturgeon. Journal of Heredity, 90, 231–233.
  129. Varadaraj, K., 1990. Production of diploid *Oreochromis mossambicus* gynogenes using heterologous sperm of (*Cyprinus carpio*). Indian Journal of Experimental Biology, 28, 701-705.
  130. Vasil'yev, V.I., Vasil'yeva, E.D., Osinov, A.G., 1991. The problem of reticulate species formation in vertebrates of the diploid– triploid– tetraploid complex in the genus *Cobitis* (Cotibidae): 4. Tetraploid form. Journal of Ichthyology, 31, 21– 35.
  131. Wei, Q.W., Zou, Y., Li, P., Li, L., 2011. Sturgeon aquaculture in China: progress, strategies and prospects assessed on the basis of nation-wide surveys (2007–2009). Journal of Applied Ichthyology, 27, 162–168.
  132. Welsh, A.B., Blumberg, M., May, B., 2003. Identification of microsatellite loci in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*), and their variability in green sturgeon (*A.*

- cytoplasm in distant hybridization of fishes. *Acta Hydrobiologica Sinica* (China).
142. Zhang, H., Liu, S.J., Zhang, C., Tao, M., Peng, L.Y., You, C.P., Xiao, J., Zhou, Y., Zhou, G.J., Luo, K.K., Liu, Y., 2011. Induced gynogenesis in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) using irradiated sperm of allotetraploid hybrids. *Marine Biotechnology*, 13, 1017–1026
  143. Zilli, L., Schiavone, R., Zonno, V., Storelli, C., Vilella, S., 2003. Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. *Cryobiology*, 47, 227–235.
  144. Zou, Y.C., Wei, Q.W., Pan, G.B., 2011. Induction of meiotic gynogenesis in paddlefish (*Polyodon spathula*) and its confirmation using microsatellite markers. *Journal of Applied Ichthyology*, 27, 496–500.