ژنتیک نوین
دوره پنجم، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۹
صفحه ۸۲-۷۵

بررسی امکان تعیین مارکر جنسیت در تاسماهی ایرانی با استفاده از روش cDNA-AFLP

مهتاب یارمحمدی*[۱]، محمد پورکاظمی[۲]، محمد حسن زاده صابر[۳]، فریدون چکمه دوز[۴]، لیلا عزیززاده[۵]

۱،۲،۳،۴و۵- به ترتیب کارشناس ارشد، دانشیار و کارشناسان ارشد
انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت
* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mahtabyarmohammadi@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۸۸/۸/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۸۹/۲/۱۹)

چکیده

به علت بالا بودن سن بلوغ در تاسماهیان و نیز عدم وجود تفاوت‌های مورفولوژیک میان ماهیان نر و ماده حتی در ماهیان مولد، تشخیص جنسیت آنها با مشکلاتی همراه است. با توجه به اهمیت استفاده از تکنیک‌های مولکولی جهت تعیین جنسیت تاسماهیان در سنین پایین جهت تولید خاویار پرورشی، در این پژوهش از تکنیک cDNA-AFLP جهت بررسی بیان ژن در گنادهای ۵ نمونه ماده و ۵ نمونه نر تاسماهی ایرانی با استفاده از ٦٣ جفت ترکیب آغازگرهای AFLP استفاده شد. نتایج این تحقیق وجود ۲ مارکر اختصاصی cDNA (TDF1, TDF2) در گناد جنس ماده را نشان داد و توسط واکنش RT-PCR در گناد نمونه‌های نر و ماده تاسماهی ایرانی تائید گردید. اما آغازگرهای اختصاصی جنسیت در دو قطعهTDF1 و TDF2 در DNA ژنومی این گونه آشکار نشدند و فقط در سطح cDNA گناد ماهیان ماده تاسماهی ایرانی قابل تکثیر بودند. با توجه به نتایج این تحقیق و تحقیقات مشابه انجام شده در مورد تاسماهیان احتمال دارد که ژن‌های تعیین جنسیت فقط در مراحل اولیه تمایز جنسی عمل نمایند و یا ممکن است که حساسیت روش‌های مورد استفاده به اندازه کافی نبوده است.

واژه‌های کلیدی

تاسماهی ایرانی،
مارکر جنسیت،
cDNA-AFLP،
TDF 1،
TDF 2

مقدمه

با توجه به کاهش شدید ذخایر گونه‌های تجاری آبزیان خصوصاً ماهیان خاویاری در طی دو دهه گذشته، انجام فعالیت‌های کاربردی بمنظور ایجاد تعادل و بهره برداری پایدار، ضرورتی اجتناب ناپذیر است. تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*, Borodin 1897) از جمله ماهیان خاویاری است که بیشینه پراکنش آن در جنوب دریای خزر و در محدوده آب‌های ایران می‌باشد. این گونه در یک دهه گذشته حدود ۲۵ درصد خاویار ایران در بین ۵ گونه از تاسماهیان خزر را تولید می‌کرد. در سال‌های اخیر به علت فشار صید روی ذخایر ۴ گونه دیگر در کشورهای تازه استقلال یافته حاشیه دریای خزر از یک طرف و رهاسازی بیش از

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-17]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.2.9.2]

۸۵ درصد بچه تاسماهی ایرانی توسط شیلات ایران از سوی دیگر و همچنین مهاجرت بسیار اندک این گونه به آب‌های میانی و شمال دریای خزر، سبب شده است سهم خاویار تاسماهی ایرانی به بیش از ۵۵ درصد خاویار ایران برسد. بنابراین بمنظور جلوگیری از فشار صید روی ماهیان طبیعی و خطر انقراض آنها، باید نسبت به پرورش آنها در محیط‌های مصنوعی پرورشی اقدام نمود (۳). از جمله گام‌های موثر جهت پرورش و تولید خاویار در محیط‌های پرورشی، تعیین جنسیت این ماهیان در سنین پایین می باشد.

در تکثیر مصنوعی ماهیان خاویاری تشخیص جنسیت و مرحله رسیدگی جنسی بسیار مهم است. در حال حاضر به دلیل عدم وجود تفاوت‌های مورفولوژیک میان ماهیان نر و ماده، تشخیص جنسیت مولدین با مشکلاتی همراه است. بطوریکه گاهی ماهیان ماده نارس که رسیدگی آنها به درستی تشخیص داده نمی‌شود، بجای مولد نر وارد کارگاه‌های تکثیر شده و در برنامه‌ریزی تکثیر مصنوعی اخلال ایجاد می‌نماید (۵).

در بهره‌برداری از ماهیان خاویاری، استحصال خاویار مدنظر می‌باشد و صید ماهیان خاویاری نارس نه تنها بهره‌برداری اقتصادی ندارد، بلکه باعث آسیب به ذخایر ماهیان خاویاری می‌گردد. علاوه بر این افزایش تولید خاویار پرورشی مستلزم جداسازی ماهیان نر و ماده قبل از رسیدن به سن بلوغ و ایجاد جمعیت‌های تمام ماده می‌باشد (۲۱). با توجه به این امر که حداقل ۳۰ درصد هزینه‌های مربوط به پرورش را تغذیه تشکیل می‌دهد (۲۶)، لذا با تعیین جنسیت ماهیان در سنین پایین جهت تولید خاویار، می‌توان کل ماهیان نر را از گله پرورش خارج و هزینه‌های تولید خاویار را تا ۵۰ درصد کاهش داد.

در حال حاضر تشخیص جنسیت ماهیان خاویاری با استفاده از روش تکه‌برداری از گنادها و انجام مطالعات بافت شناختی (۱و ۴) و اندازه‌گیری سطوح هورمونی (۸) امکانپذیر است که استفاده از این روش‌ها علاوه بر وقت‌گیر بودن می‌تواند استرس‌زا بوده و نیز مخاطراتی را برای ماهی مورد نظر به همراه داشته باشد. علاوه بر این استفاده از روش بافت شناسی در تشخیص جنسیت ماهیان خاویاری تنها زمانی امکانپذیر است که ماهیان موردنظر حداقل چهار ساله (۱۱) و در ماهیان پرورشی یکساله باشند (۱). از آنجاییکه استفاده از روش‌های متداول برای ماهیان استرس‌زا می‌باشد، بنابراین بکارگیری روش‌های مولکولی جهت تعیین جنسیت در این ماهیان بسیار مورد توجه می‌باشد.

تاسماهیان دارای تولید مثل دوجنسی می‌باشند و تاکنون وجود کروموزم‌های جنسی هترومورفیک در آنها گزارش نشده است. مطالعات انجام شده با استفاده از ماده‌های ژاینوژن وجود سیستم تعیین جنسیت هتروگامتی ماده را در تاسماهی سفید (*A. transmontanus*) (۲۴)، هیبرید بستر (فیل ماهی ماده × استرلیاد نر) (۲۳) و تاسماهی پوزه کوتاه (*A. brevirostrum*) (۱۲) گزارش نموده‌اند.

تا به امروز تکنیک‌های مولکولی مبتنی بر PCR به منظور شناسایی توالی‌های مختص جنسیت در گونه‌های تاسماهیان (۱۸، ۱۹ و ۲۶) با شکست مواجه شده است. با توجه به شکست روش‌های مبتنی بر PCR، استفاده از روش‌های بیان ژن در تعیین جنسیت می‌تواند گام موثری در حل این مسئله باشد (۲۶).

در این پژوهش روش cDNA-AFLP به منظور بررسی تظاهر ژن در گناد تاسماهی ایرانی برای اولین بار مورد استفاده قرار گرفت. این تکنیک بر خلاف خزانه ژنومی، خزانه cDNA مختص بافت است و برای اولین بار توسط باچم و همکاران **۱۹۹۸** ابداع و معرفی گردید. از جمله مزایای این روش، دستیابی به ژن مورد نظر از طریق مطالعه mRNA تجمع یافته در بافت هدف، حذف اطلاعات غیر کد کننده موجود در DNA (اینترون‌ها) و احتمال وجود مقادیر زیاد mRNA در بافت بیان کننده ژن می‌باشد. هدف از انجام این پژوهش بررسی مقایسه‌ای بیان ژن در گنادهای نر و ماده تاسماهی بالغ با استفاده از تکنیک cDNA-AFLP و تعیین مارکرهای جنسی cDNA در تاسماهی ایرانی و امکان تعمیم آن به سطح DNA ژنومی بود.

مواد و روش‌ها

بمنظور بررسی بیان ژن در تاسماهی ایرانی با استفاده از روش cDNA-AFLP در فصل بهار (۱۳۸۶) از گناد ماهیان نر (بیضه) و ماده (تخمدان) تاسماهیان بالغ تکثیر شده در مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید بهشتی نمونه‌برداری انجام گردید.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-17]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.2.9.2]

نمونه‌ها بلافاصله در مخزن ازت مایع با دمای ۱۹۶- درجه سانتیگراد قرار گرفتند و جهت انجام آزمایشات به بخش ژنتیک انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان منتقل گردیدند.

استخراج RNA کل در ۵ نمونه گناد ماده و ۵ نمونه گناد نر تاسماهی ایرانی بصورت جداگانه با استفاده از محلول TRIZOL Reagent (Invitrogen, USA) و دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده انجام گرفت. همچنین بمنظور اطمینان از عدم وجود DNA در واکنش‌های ساخت cDNA از روی RNA کل، از تیمار *DNase*I (Fermentas, France) استفاده گردید. سپس cDNA دو رشته‌ای با استفاده از کیت CDNA synthesis kit (Roche, Germany) و طی دو مرحله مطابق با دستورالعمل پیشنهادی کیت ساخته شد. جهت ساخت cDNA از آغازگرهای $Oligo(dt)_{15}$ و آنزیم M-*MUL*V Transcriptase و *RNase* Inhibitor موجود در کیت استفاده گردید.

۱- بعد از تهیه cDNA دو رشته‌ای، مراحل روش AFLP مطابق با روش وس و همکاران (۱۹۹۵) با کمی تغییرات، شامل: برش آنزیمی با آنزیم‌های *Mse*I و *Eco*RI، الحاق آداپتورهای مربوطه، PCR دو مرحله‌ای، سپس الکتروفورز و رنگ‌آمیزی انجام شد. واکنش PCR با استفاده از ۶۳ جفت ترکیب آغازگرهای (*M*+3, *E*+4) انجام گردید (جدول۱). جهت الکتروفورز از دستگاه GT Sequi Gen 38 × 30 (BIO-RAD, USA) و ژل پلی اکریل آمید دینیچر ۶ درصد و برای مشاهده باندها از رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده گردید. از آنجاییکه باند یافت شده در سطح cDNA بود و هدف یافتن مارکر تعیین کننده جنسیت در سطح DNA بمنظور سهولت استفاده می‌باشد، بدین منظور ابتدا باند اختصاصی از روی ژل پلی اکریل آمید جدا و سپس شرایط PCR بمنظور خالص‌سازی و تک باند نمودن قطعه جدا شده بهینه گردید. در ادامه محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید و سپس با استفاده از کیت تخلیص DNA از روی ژل آگارز (Fermentas, France)، خالص سازی گردید. غلظت cDNAهای تخلیص شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Nanodrop (ND1000, USA) مورد سنجش قرار گرفت و غلظت مناسب جهت اجرای مرحله کلونینگ تهیه گردید.

با توجه به کوچک بودن اندازه قطعات (حدود ۱۵۰ و ۲۰۰ جفت باز)، قطعات مذکور ابتدا به داخل وکتور pDrive (pDrive Cloning Kit, QIAGEN, Germany) کلون شدند. سپس پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (Miniprep-QIAGEN, Germany) استخراج و با استفاده از آغازگر M-13(Forward) (توسط شرکت فزاپژوه – تهران) تعیین توالی گردیدند. توالی‌های مذکور در بانک اطلاعاتی NCBI (National Center for Biotechnology Information) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) جهت مطابقت‌های همولوگوس‌ها با استفاده از ابزار BLAST مورد بررسی قرار گرفتند. بمنظور تایید قطعات تعیین توالی شده، طراحی آغازگرهای اختصاصی با استفاده از نرم افزار Oligo5 جهت آزمایش در سطح DNA ژنومی افراد نر و ماده تاسماهی ایرانی انجام شد. همچنین آزمایش‌های تکثیر نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR) روی cDNA گناد نمونه‌های نر و ماده تاسماهی ایرانی و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام شد. توالی آغازگرهای RT-PCR در جدول۲ ذکر شده است.

چرخه‌های حرارتی جهت تکثیر به شرح ذیل بود. واسرشته شدن اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل شامل ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد، ۱ دقیقه در ۵۶ درجه سانتیگراد و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد و بسط نهایی به مدت ۷ الی ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد. PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰۰ نانوگرم از cDNA الگو، ۰/۱ mM از هرکدام از آغازگرها، ۰/۲ mM از dNTPs، 1XPCRbuffer، ۱/۵ mM از $Mgcl_2$ و ۱ U از آنزیم Taq DNA polymerase (CinnaGen, Iran) انجام شد. محصولات PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد و مارکر مولکولی اندازه ۵۰ جفت باز (Ladder-50bp) (Fermentas, France) بررسی شدند. همچنین دو مارکر به دست آمده بر روی DNA ژنومی ۱۰ نمونه نر و ۱۰ نمونه ماده تاسماهی ایرانی (*A. persicus*) آزمایش شدند. آغازگرهای PCR و شرایط آنها مشابه آنالیز cDNA در تاسماهی ایرانی بود.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-17]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.2.9.2]

جدول ۱- نوع و ترکیب آغازگرهای مورد استفاده در تاسماهی ایرانی با استفاده از تکنیک cDNA-AFLP

Oligonucleotide	Sequence
*Eco*RI adapter	5′- CTC GTA GAC TGC GTA CC-3′ 5′- AAT TGG TAC GCA GTC TAC-3′
*Mse*I adapter	5′-GAC GAT GAG TCC TGA G-3′ 5′- TAC TCA GGA CTC AT-3′
*Eco*RI+1 primer	5′- GAC TGC GTA CCA ATT C A-3′
*Mse*I+1 primer	5′-GAT GAG TCC TGA GTA A C-3′
*Eco*RI+3 primers	5′- GAC TGC GTA CCA ATT C ANN-3′ *E*-AAT, *E*-AAG, *E*-ATC, *E*-ATA, *E*-ACG, *E*-AAA, *E*-TTA
*Mse*I+4 primers	5′-GAT GAG TCC TGA GTA A CNN N-3′ *M*-CACA, *M*-CGAA, *M*-CGAT, *M*-CCTT, *M*-CATA, *M*-CATT, *M*-CGTC, *M*-CTGC, *M*-CCGT, *M*-CAAT, *M*-CTTC

جدول۲- توالی آغازگرهای RT-PCR، چرخه‌های حرارتی و شرایط PCR دو مارکر جنسی

مارکرها	توالی آغازگرها (′۳-′۵)	$Mgcl_2$ (mM)	$T_m(^oC)$	اندازه محصول PCR(bp)
TDF1	F: TGACTG CGT ACC AAT TCA TAC CTA C R:TGA GTC CTG AGA TAA CAC AAA ATG C	۱/۵	۶۸	۱۰۵
TDF2	F:TGA GTC CTG AGT AAC GAA GCA R: CTG CGT ACC AAT TCA TAC TCC	۱/۵	۶۵	۲۰۷

نتایج

در این پژوهش از ۶۳ ترکیب آغازگر AFLP (*Mse*+4, *Eco*+3) مورد استفاده، تقریباً ۳۰۰۰ باند شمارش گردید که از این تعداد حدود ۱۰۹ باند پلی مورفیک بودند. در دو جفت از آغازگرهای آزمایش شده (ترکیب آغازگرهای *E*-ATC،*M*-CGAA و *M*-CGAA، *E*-ATA) دو باند با اندازه‌های حدود ۱۰۰ و ۲۰۰ جفت باز در سطح cDNA گناد نمونه‌های ماده تاسماهی ایرانی مشاهده گردید که در جنس نر وجود نداشت (شکل ۱و۲). بمنظور اطمینان از تکرار پذیری باند مذکور در ۸ نمونه دیگر RNA (شامل ۴ عدد نر و ۴ عدد ماده تاسماهی ایرانی) مراحل ساخت cDNA و تکنیک AFLP با استفاده از آغازگرهای مورد نظر انجام گرفت که باند مذکور مجدداً در افراد ماده تکرار گردید.

نتایج حاصل از تعیین توالی قطعات ژنی در پلاسمیدهای نوترکیب مارکرهای TDF1[1] و TDF2، به ترتیب منجر به دستیابی به دو توالی ۱۰۵و ۲۰۷ جفت بازی گردید. اطلاعات مربوط در بانک اطلاعاتی EMBL (http://www.ebi.ac.uk/) با شماره‌های AM988672 و AM942751 به ثبت رسید. سپس اطلاعات حاصل از توالی ژنی هر دو مارکر با اطلاعات موجود در بانک ژن NCBI تطبیق (BLAST) داده شد. نتایج جستجوی BLAST در پایگاه اطلاعاتی NCBI نشان داد که مارکر TDF1 فاقد همولوژی با ژن‌های شناخته شده بود، در حالیکه مارکر TDF2 داری حداکثر ۸۴ درصد تشابه در ۱۳۰ جفت باز با ژن *LaminB2* در *Danio rerio* بود.

همچنین با استفاده از نرم افزارهای بانک اطلاعاتی expassy، توالی مارکرها به پروتئین ترجمه گردید. با استفاده از این برنامه

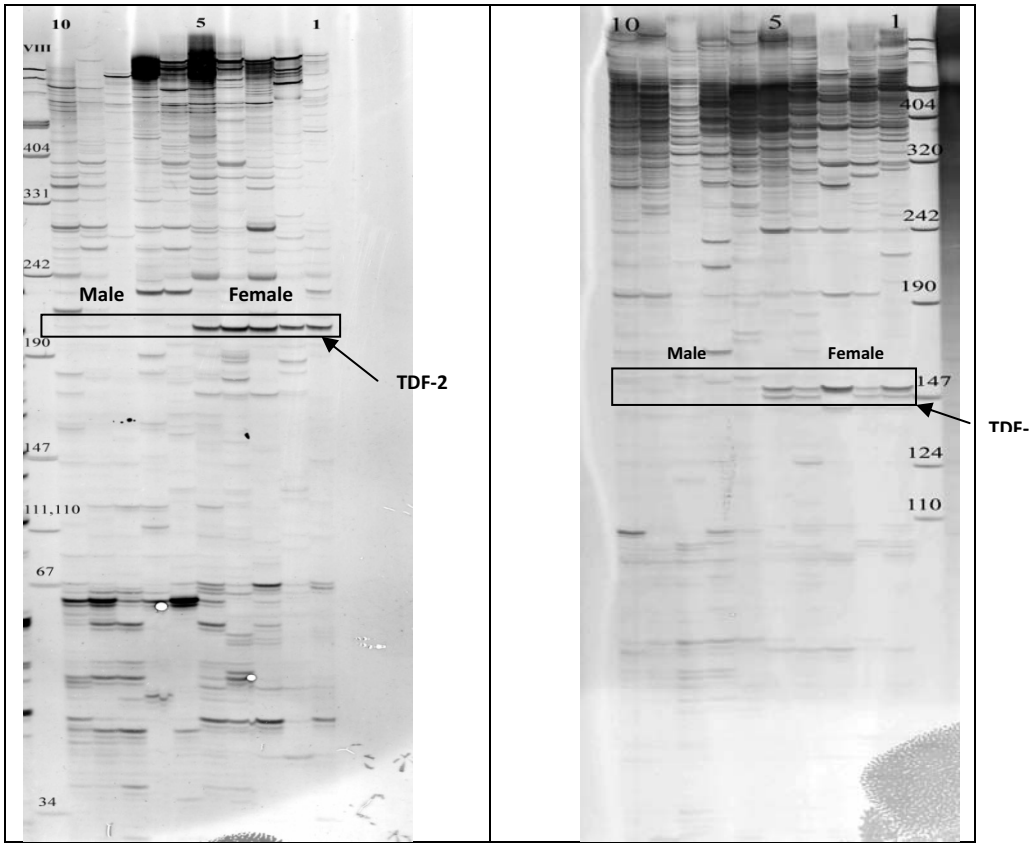
[1] Transcript-Derived Fragments

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-17]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.2.9.2]

شش قالب پروتئین برای هر ژن بدست آمد. سپس درصد تشابه قالب‌های پروتئینی بدست آمده با پروتئین‌های ثبت شده در بانک اطلاعاتی NCBI (Protein BLAST). مقایسه گردید. نتایج Protein BLAST نشان داد که بیشترین شباهت مارکر TDF1 با protein phosphatase C2 (PP2c) با درصد تشابه ۳۶/۶ درصد و مارکر TDF2 با پروتئین laminB2 در *Danio rario* با درصد تشابه ۹۹/۸ درصد بود.

نتایج تائید مارکرهای جنسی در cDNA و DNA ژنومی نمونه-های نر و ماده *A.persicus* نشان داد که TDF1 و TDF2 در cDNA بدست آمده از ۸ نمونه ماده قابل تکثیر بود، در حالیکه در ۸ نمونه نر باندی تکثیر نگردید. اما در سطح DNA ژنومی ۱۰ نر و ۱۰ ماده بالغ تاسماهی ایرانی، هیچ باند اختصاصی از TDF1 و TDF2 ایجاد نگردید (شکل ۳ و۴).

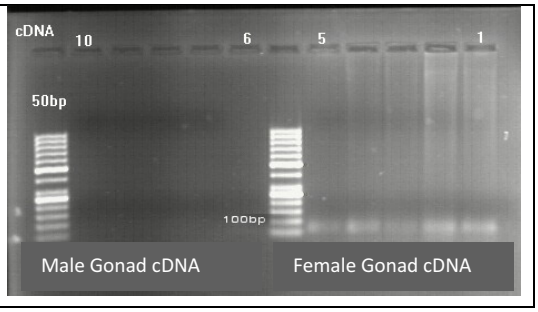


شکل۱- محصول PCR به روش cDNA-AFLP و جفت آغازگر M-CGAA و E-ATC، مربوط به مارکر TDF-1، پس از الکتروفورز با ژل پلی آکریل آمید ۶ درصد دناتوره و رنگ آمیزی با نیترات نقره. نمونه‌های ۱ الی ۵ گناد ماده و ۶ الی ۱۰ گناد نر در تاسماهی ایرانی و Ladder VIII (Roche, Germany) می‌باشند.

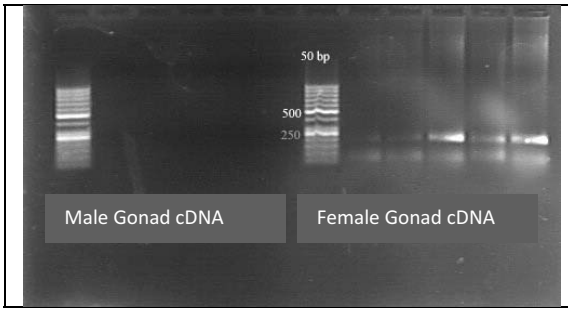
شکل۲- محصول PCR به روش cDNA-AFLP و جفت آغازگر M-CGAA و E-ATA، مربوط به مارکر TDF-1، پس از الکتروفورز با ژل پلی آکریل آمید ۶ درصد دناتوره و رنگ آمیزی با نیترات نقره-نمونه‌های ۱ الی ۵ گناد ماده و ۶ الی ۱۰ گناد نر در تاسماهی ایرانی و pUC Mix Marker,8(Fermentas, France) می‌باشند.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-17]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.2.9.2]



شکل۳- محصول RT-PCR با استفاده از cDNA گناد ماده تاسماهی ایرانی و آغازگر توالی TDF1، الکتروفورز شده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. ستون‌های ۱ الی ۵ مربوط به cDNA گناد ماده، ۶ الی ۱۰ مربوط به cDNA گناد نر تاسماهی ایرانی و M مارکر ۵۰ جفت باز



شکل۴- محصول RT-PCR با استفاده از cDNA گناد ماده تاسماهی ایرانی و آغازگر توالی TDF2، الکتروفورز شده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. ستونهای ۱ الی ۵ مربوط به cDNA گناد ماده، ۶ الی ۱۰ مربوط به cDNA گناد نر تاسماهی ایرانی و M مارکر ۵۰ جفت باز است.

بحث

بطور کلی اولین گام در تشخیص جنسیت یک موجود با استفاده از نشانگرهای DNA، وجود سیستم‌های تعیین جنسیت ژنتیکی در آن می‌باشد (۱۳). شناسایی مارکرهای جنسی دارای اهمیت زیادی هم در تحقیقات کاربردی و هم پژوهش‌های پایه‌ای آبزیان دارد. این مارکرها امکان شناسایی زود هنگام ماهیان دستکاری شده ژنتیکی (نر زادها و ماده زادها) و همچنین ماهیان تغییر جنسیت یافته هورمونی را بدون نیاز به انتظار جهت رسیدگی جنسی فراهم می‌نماید (۱۰). با توجه به اهمیت ماهیان ماده در تولید خاویار در تاسماهیان، تولید ماهیان دستکاری شده با امکان تعیین جنسیت مولکولی در مراحل اولیه پرورشی، از نظر اقتصادی برای آبزی پروری گونه‌های مختلف ماهیان خاویاری بسیار مهم می‌باشد.

تاکنون، همه تکنیک‌های استفاده شده جهت تعیین جنسیت در تاسماهیان از جمله استفاده از تکنیک‌های RAPDs[2]، AFLPs[3]، ISSRs[4]، RDA[5]، هیبریداسیون کاهشی[6]، ژن‌های وابسته به جنس و روش پروتئومیکس، با شکست مواجه شده است (۲۶، ۱۸، ۱۹، ۱۴، ۱۵، ۲، ۲۲، ۶).

با توجه به نتایج مطالعات انجام شده در گونه‌های مختلف تاسماهیان با استفاده از مارکرهای DNA و عدم کارآیی در شناسایی مارکرهای وابسته به جنس در آنها، از تکنیک cDNA-AFLP (۷) بمنظور بررسی بیان ژن در گناد نر و ماده تاسماهی ایرانی بالغ استفاده شد. این روش، از معدود روش‌های بررسی بیان ژن در سراسر ژنوم می‌باشد و قابلیت شناسایی ژن-های ناشناخته و یا دارای فراوانی بسیار کم را نیز دارا می‌باشد (۲۰).

بنابر اطلاعات موجود، این پژوهش برای اولین بار در مورد گونه *A .persicus* انجام شده است. دو مارکر جنسی (TDF1, TDF2) از گنادهای تاسماهی ایرانی ماده توسط آنالیز cDNA-AFLP جدا شد و توسط واکنش RT-PCR در گناد تاسماهیان نر و ماده تائید گردید. دو مارکر بدست آمده در cDNA گناد نمونه‌های تاسماهی ایرانی ماده قابل شناسایی بودند و در گناد جنس نر تکثیر نشدند. اما آغازگرهای طراحی شده بر اساس توالی دو قطعه TDF1 و TDF2 در سطح DNA ژنومی تاسماهی تکثیر نشدند و فقط در سطح cDNA گناد ماهیان ماده تاسماهی ایرانی قابل تکثیر بودند. در یک مطالعه انجام شده جهت تشخیص مارکرهای جنسی در *Takifugu rubripes* با استفاده از روش cDNA-AFLP، ۵ مارکر وابسته به جنس (TDF1-5) شناسایی شد که فقط یکی از مارکرها (TDF-5) در سطح DNA ژنومی قابل تکثیر بود و چهار مارکر دیگر فقط در سطح cDNA ساخته شده از گنادها قابل تکثیر بودند (۹). از نظر علمی می‌توان احتمال داد که اینترون‌های

[2] Random Amplified Polymorphic DNA
[3] Amplified Fragment Length Polymorphisms
[4] Inter Simple Sequence Repeats
[5] Representational Difference Analysis
[6] Subtractive Hybridization

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-17]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.2.9.2]

بزرگی در بین آنها واقع شده باشد و به همین دلیل بر روی DNA ژنومی قابل تکثیر نمی‌باشند.

در دو مارکر بدست آمده، جستجوی BLAST در بانک اطلاعاتی NCBI، در سطح پروتئین مشخص نمود که TDF1 بیشترین شباهت (همولوژی) را با پروتئین Phosphatase C2 (۳۶/۶ درصد) دارد که احتمالاً مشخص می‌کند این مارکر در مکانیسم-های تنظیم سیگنال دهی سلول (Cell signaling) جهت برقراری عملکرد طبیعی فیزیولوژیک سلول دخیل است. مارکر دیگر (TDF2) بیشترین شباهت (۹۹/۸ درصد) را با پروتئین LaminB1 در Zebra fish گونه *Danio rerio* نشان داد که به نظر می‌رسد عملکرد این مارکر احتمالاً مربوط به پروتئین شرکت کننده در اسکلت سلولی (cytoskeleton) است که شبکه‌های سلولی را شکل می‌دهد و در عملکرد نوتروفیلی سلولی دخالت دارد. با توجه به نتایج بدست آمده در این پژوهش می‌توان نتیجه‌گیری نمود که مارکرهای مذکور به ژن‌های تعیین کننده جنسیت وابسته نمی‌باشند.

همچنین در پژوهشی که با استفاده از مقایسه الگوهای پروتئینی روی ژن‌های دو بعدی تخمدان و بیضه با استفاده از پروتئومیکس انجام شد (۱۹)، ۴۸ نقطه ویژه در گناد نر و ۲ نقطه بدون مشابه در تخمدان یافت گردید. پروتئین‌های شناسایی شده در متابولیسم و تولید انرژی، ساختار سلولی، نسخه‌برداری و ترجمه، دفاع سلولی، حمل و نقل، تقسیم سلولی دخالت داشته و هیچ کدام از آنها بطور مستقیم به ژن‌های تعیین جنسیت وابسته نبودند، که با نتایج تحقیق حاضر مبنی بر مرتبط بودن مارکرهای یافت شده با پروتئین‌های غیر جنسی هماهنگ می‌باشد. همچنین مطالعه انجام شده توسط مک کورنیک و همکاران (۲۰۰۸) بر روی تاسماهی دریاچه‌ای (*A. fluvences*) با استفاده از روش‌های بیان ژن، با شکست مواجه شد.

با توجه به پیدا نشدن مارکرهای وابسته به جنسیت، احتمال دارد که ژن‌های تعیین جنسیت فقط در مراحل اولیه تمایز جنسی عمل نمایند و یا ممکن است که حساسیت روش‌های مورد استفاده به اندازه کافی نبوده است (۱۸، ۱۹، ۲۶).

تاکنون تعداد ژن‌ها یا مارکرهای وابسته به جنس یافت شده در ماهیان در مقایسه با گروه‌های دیگر مهره داران بسیار کم می‌باشد و بیشتر مارکرهای معرفی شده بنظر نمی‌رسد که برای بیش از یک گونه یا حتی سویه کاربرد داشته باشد (۱۶و ۱۷). اطلاعات بدست آمده در این پژوهش می‌تواند پایه و مبنایی برای مطالعات بیشتر در زمینه تعیین یا تمایز جنسیت در تاسماهی ایرانی (*A. persicus*) را فراهم آورد.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی موسسه تحقیقات شیلات ایران با کد ۸۴۰۲۹-۰۰۰۰-۰۳-۲۰۰۰۰۰-۰۲۵-۲ اجرا گردید. بدینوسیله از حمایت‌های بی‌دریغ ریاست محترم موسسه جناب آقای دکتر مطلبی و رئیس محترم بخش بیوتکنولوژی جناب آقای دکتر غرقی تشکر و سپاسگزاری می‌گردد. همچنین از کلیه همکاران محترم خصوصا جناب آقای مهندس فشخامی مسئول محترم بخش ژنتیک، مسئول محترم بخش فیزیولوژی و بیوشیمی انستیتو جناب آقای مهندس کاظمی، مسئول محترم بخش تکثیر مجتمع شهید بهشتی جناب آقای مهندس حسین محمدی پرشکوه و سایر همکارانی که ما را در طول اجرای این تحقیق یاری رساندند تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱- بهمنی، م. و کاظمی، ر. ۱۳۷۷. مطالعه بافت شناسی غدد جنسی در تاسماهیان جوان پرورشی. مجله علمی شیلات ایران، شماره ۱، سال هفتم، صفحات ۱۶-۱.

۲- پورسیفی. ر. ۱۳۸۵. تعیین جنسیت در تاسماهی ازون برون با استفاده از روش AFLP . پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه فردوسی مشهد.

۳- پورکاظمی، م.، محسنی، م.، نوروز فشخامی، م.ر.، بهمنی، م.، طاهری، ع. و یارمحمدی، م. ۱۳۸۶. دورگه گیری بین فیلماهی (*Huso huso*) و تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و مقایسه روند رشد آنها. ۱۳۸۶ . وزارت جهاد کشاورزی، سازمان تحقیقات

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-17]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.2.9.2]

و آموزش کشاورزی، گزارش نهایی طرحهای تحقیقاتی. انستیتو تحقیقات ماهیان خاویاری. ۵۸ ص. شماره ثبت۸۵/۱۰۹۲.

۴- حلاجیان، ع.؛ کاظمی، ر.؛ محسنی، م.؛ بهمنی، م. و یوسفی جور دهی، ا. ۱۳۸۶. تعیین جنسیت و مراحل رسیدگی جنسی در تاسماهی شیپ پرورشی (*Acipenser nudiventris*) با استفاده از روش تکه برداری از گناد. مجله علمی شیلات ایران، شماره ۳، سال ۱۶.

۵- مقیم، م.، وجهی، ع.، وشکینی، ع.، و مسعودی فرد، م. ۱۳۸۰. تعیین جنسیت تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) بوسیله اولتراسونوگرافی. مجله علمی شیلات ایران، شماره ۳، سال دهم، صفحات ۷۱ تا ۷۸.

۶- یارمحمدی، م.، پورکاظمی،م.، قلسمی ، ا.، حسن زاده صابر، م.، چکمه دوز، ف.، برادران نویری، ش.، نوروزفشخامی،م.، مردی، م.، ۱۳۸۷. نخستین همایش ملی منابع شیلا تی دریای خزر- ۲۷ و ۲۸ آبان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

7- Bachem, C.W.B, van der Hoeven, R.S., de Bruijin, S.M., Vreugdenhil, D., Zabeau, M., Visser, R.G.F., 1996. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. Plant Journal, 9: 745-753.

8-Billard, R., lecointre G., 2001. Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. Revi. in Fish Biol. and Fishe., 10, 355-392.

9- Cui, J.Z., Shen, X.Y., Gong, Q.L., Yang, G.P., Gu, Q.Q., 2006. Identification of sex markers by cDNA-AFLP in *Takifugu rubripes*. Aquaculture (257) 30-36.

10- Delvin, R.H., Nagahama, Y., 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture (208)191-364.

11- Ferreiro, C., Medrano, J.F., Gall. G. A. E., 1989. Genome analysis of rainbow trout and sturgeon with restriction enzymes and hybridization with a ZFY gene derived probe to identify sex. Aquaculture (81) 245 – 252.

12- Flynn, S.R., Matsuka, M., Martin-Robichaud, D.J., Benefy, T.J., 2006. Gynogenesis and sex determination in shortnose, *Acipenser brevirostrum* Lesuere. Aquaculture 253, 721-727.

13- Griffith, R., Orr, K.J., Adam, A., and Barber, I., 2000. DNA sex identification in the three spined sticklebacks. Journal of Fish Biology (57) 1331-1334.

14- Hett, A.K., Pitra, C., Jenneckens, I., Ludwig, A., 2005. Characterization of sox_9 in European Atlantic sturgeon (*Acipenser sturio*). Journal of Heredity (96) 150-154.

15- Hett, A.K., Ludwig. A., 2005. SRY-related (SOX) genes in the genome of European Atlantic sturgeon (*Acipenser sturio*). Genome (48) 181-186.

16- Ittura, P., Medrano, J.F., Bagley, M., lam, N., Vergara, N., Marin, J.C., 1997. Identification of sex chromosome molecular markers using RAPDs and fluorescent in situ hybridization in rainbow trout. Genetica (101) 209-213.

17- Ittura, P., Lam, N., de la Fuente, M., Vergara, N., Medrano, J.F., 2001. Charactrization of sex chromosomes in rainbow trout and coho salmon using fluorescence in situ hybridization (FISH). Genetica (111) 125-131.

18- Keyvanshokooh, S., pourkazemi, M., Kalbasi, M.R., 2007. The RAPD technique failed to identify sex- specific sequences in beluga (*Huso huso*). Journal of Ichthyology (23) 1-2.

19- Keyvanshokooh , S., Kalbasi, M.R., Hossinkhani, S., vaziri, B., 2009. Comparative proteomics analysis of male and female Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) gonads, Animal Reproductive Science. Animal Reproduction Science (**11)** 361-368

20- Kivioja, T., Arvas, M., Saloheimo, M., Penttila M., Ukkonen, E., 2005. Optimization of cDNA-AFLP experiments using genomic sequence data. Genome analysis (21) 2573-2579.

21- Logan, S.H., Johnston, W.E. and Doroshov, S.I., 1995. Economic of joint production of sturgeon (*Acipenser transmontanus* Richardson) and roe for caviar. Aquaculture (130) 299-316.

22- Mc Cormick, C.R., Bos, D. H., De Woody, J.A., 2008. Multiple molecular approaches yield no evidence for sex-determining genes in Lake Sturgeon (*Acipenser fulvescens*). Journal of Applied Ichthyology. **24**, 643-645.

23- 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.

24- Van Eenennam, A.L., Van Eenennam, J.P., Medrano, J.F., Doroshov, S.L. 1999. Evidence of female heterogametic genetic sex determination in White sturgeon. Journal of Heredity (90) 231-233.

25- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research (23) 4407-4414.

26- Wuertz, S., Gaillard S., Barbisan F., Carle, S., Congiu, L., Forlani, A., Aubert, J., Kirschbaum, F., Tosi, E., Zane, L., Grillasca, J.P., 2006. Extensive screening of sturgeon genome by random screening techniques releaved no sex-specific marker. Aquaculture (258) 685-688

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-17]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.2.9.2]