

بررسی امکان شناسایی نشانگر جنسی در ماهی خاویاری ایرانی *Acipenser persicus* (Borodin, 1897) با استفاده از روش AFLP

محمدحسین ابراهیمی^{۱*}، علی شعبانی^۲، حسن سلطانلو^۳ و بهاره شعبان پور^۴
۱، ۲، ۳ و ۴- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار، استادیار و دانشیار دانشگاه علوم
کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: eh.ebrahimi64@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۴- تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۹)

چکیده

ماهیان خاویاری به خصوص به دلیل تولید خاویار و همچنین گوشت، گونه‌هایی با ارزش هستند. با توجه به دوره‌ی بلوغ طولانی این ماهیان، تعیین جنسیت آنها می‌تواند سود اقتصادی پرورش را چند برابر نماید. ضمن آن که به دلیل ناشناخته ماندن مکانیزم تعیین جنسیت در این ماهی، شناخت قطعات DNA وابسته به جنس ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه ژنوم ماهی خاویاری ایرانی *Acipenser persicus* با استفاده از نشانگر ملکولی AFLP و شانزده جفت آغازگر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان‌دهنده‌ی عدم وجود مارکر وابسته به جنس در آغازگرهای مورد بررسی بود. ضمن آن که ترکیب آغازگری (P-ACA; M-CAG) بالاترین تعداد باند را نشان داده و می‌تواند در بررسی ژنوم این ماهی مورد توجه قرار گیرد. نتیجه کلی به دست آمده نشان دهنده آن است که قطعات وابسته به جنسیت در این ماهی یا وجود ندارد و یا در صورت وجود، تمایز آنها در ژنوم بسیار کم است.

مقدمه

دریای خزر اقامتگاهی برای حدود ۱۱۵ گونه و زیرگونه ماهی است که برخی از آنها شامل گونه‌های بی‌نظیر ماهیان خاویاری همچون فیل ماهی (*Huso huso*)، قره‌برون (*Acipenser persicus*)، تاسماهی روسی (*Acipenser gueldenstaedtii*)، شیپ (*Acipenser nudiiventris*)، همین‌طور ماهیان استخوانی همچون ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*)، سیم (*Abramis brama orientalis*)، کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*)، کپور (*Cyprinus carpio*)، آزاد (*Salmo trutta caspius*) و ماهی کیلکا (*Clupeonella cultiventris*) دارای ارزش تجاری

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی،
ماهی خاویاری،
نشانگر جنسی،
Acipenser persicus،
AFLP

(Lecointre 2001). در پرورش ماهیان خاویاری مهم‌ترین هدف، تولید خاویار بوده و برای این امر، روشی قابل اطمینان جهت جداسازی ماهیان نر و ماده مورد نیاز است. ماهیان نر جهت فروش گوشت فرستاده شده در حالی که ماهیان ماده جهت رسیدن به رشد و شرایط مناسب سال‌های بیش‌تری پرورش داده می‌شوند. امکان وجود جمعیت‌های تک‌جنس از ماده‌های تولید کننده‌ی خاویار، سود اقتصادی سیستم‌های تولید خاویار پرورشی را افزایش خواهد داد (Logan et al. 1995). به هر حال امکان تشخیص جنسیت از طریق ویژگی‌های مورفولوژیکی در مراحل لاروی، جوانی و حتی بلوغ ممکن نیست. اخیراً پرورش‌دهندگان جهت تعیین جنسیت از طریق جراحی بدن و دیدن گناد، ۳ و ۴ سال به پرورش ادامه می‌دهند (Doroshov et al. 1997) و ایجاد روش‌های ملکولی بدون ایجاد آسیب در ماهی مورد توجه بسیار قرار گرفته است.

(Vos et al. 1995)، روش چندشکلی‌های حاصل از تفاوت طول قطعات تکثیر شده (AFLP) را به عنوان یک روش جدید و قدرتمند در ایجاد انگشت‌نگاری ژنی معرفی کردند. این روش جهت تعیین جنسیت در گونه‌های مختلف از جمله: قزل آلا (Griffiths et al. 2000)، ماهی سه‌خاره (Felip et al. 2005)، ماهی‌تانگ‌سول (Chen et al. 2007) مورد استفاده قرار گرفته است. AFLP، یک روش معتبر و سریع برای تولید تعداد زیادی از نشانگرهای DNA می‌باشد. ضمن آنکه در عین تصادفی بودن بزرگترین مزیتی که نسبت به سایر روش‌های تصادفی (DAF, AP-PCR, RAPD) دارد این است که به شرایط واکنش، غلظت DNA و پروفایل دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز حساس نیست (Vos et al. 1995). این روش اولین بار به وسیله Wuertz et al. (2006) و سپس به وسیله Yarmohammadi et al. (2011)، جهت شناسایی نشانگر وابسته به جنس در ماهیان خاویاری مورد استفاده قرار گرفت، با توجه به این مهم، در این تحقیق آنزیم برشگر و توالی آغازگری تکثیر انتخابی، در حد توان نسبت به مطالعات گذشته متفاوت انتخاب شد تا ژنوم گسترده و پیچیده ماهیان خاویاری بیشتر کاوش گردد.

هستند (Abdoli 2000). تاسماهی ایرانی (قره‌برون) در خانواده‌ی آسیپنسریده^۱ قرار داشته و به جنس آسیپنسر^۱ تعلق دارد و نام علمی آن *A. persicus* است. منشا اجدادی این گونه اوایل میوسن و اواخر پلیوسن می‌باشد (Birstein and Desalle 1998). به دلایلی نظیر صید بی‌رویه و قاچاق، تجمع آلودگی در آب و رسوبات محیط زیست و مسدود شدن مسیرهای منتهی به مناطق تولیدمثلی، تولیدمثل طبیعی این ماهیان با کاهش فوق‌العاده‌ای مواجه گردیده (Birstein 1993; Pourkazemi et al. 1999) و در لیست گونه‌های در معرض خطر انقراض معرفی شده‌اند (Billard and Lecointre 2001). همچنین عواملی نظیر سن بالای بلوغ (۵ تا بیش از ۲۰ سال) و فاصله‌ی زمانی طولانی بین دو تولیدمثل (۲ تا بیش از ۱۰ سال) آسیب‌پذیری این گونه را افزایش داده است (May et al. 1997)، به طوری‌که تقریباً تمامی گونه‌های ماهیان خاویاری دنیا در معرض انقراض قرار گرفته‌اند (Birstein 1993). طبق آمار منتشره، صید جهانی ماهیان خاویاری در ۱۹۸۲، ۲۸۰۰۰ تن بوده حال آنکه در ۱۹۹۹ به ۲۰۰۰ تن رسیده است (Billard and Lecointre 2001). به دلیل ذخایر رو به نابودی این ماهیان از یک طرف و ارزش اقتصادی بالای آن‌ها در تجارت جهانی به دلیل تولید خاویار سیاه از طرف دیگر، این گونه‌ها بایستی هدف بسیاری از برنامه‌های بررسی جمعیت و حفظ ذخایر قرار گیرند (Ludwig 2006). به طور مثال در زمینه‌ی بررسی‌های جمعیتی و در جهت شناخت و حفظ ذخایر ژنی، کارهای زیادی صورت گرفته (Birstein et al. 2000; King et al. 2001; Wirgin et al. 1997) اما با وجود تمامی تلاش‌ها در جهت شناخت و بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری، باز هم این گونه‌ها معمولاً در ردیف ماهیان در معرض خطر انقراض قرار دارند. بنابراین تلاش‌ها در جهت پرورش آن‌ها شروع شده تا هم با رهاسازی آن‌ها به دریا، به بازسازی ذخایر کمک نموده و هم با پرورش آن‌ها از منافع بسیار آن‌ها بهره گرفته شود و از طرفی نیاز به صید از طبیعت را کاهش داده و به حفظ ذخایر موجود منجر شود. هم- اکنون پرورش ماهیان خاویاری بیش از ۲۰۰۰ تن در سال محصول داده که با مقدار حاصل از صید تقریباً برابری می‌کند که این مقدار حدود ۱۵ تن خاویار به دست می‌دهد (Billard and

جدول ۱- نام و ترتیب توالی آداپتورهای مورد استفاده در مرحله اتصال

آنزیم مربوطه	نام توالی	ترتیب بازها (۵'→۳')
<i>PstI</i>	<i>PstI</i> -topS	CTCGTAGACTGCGTACATGCA
	<i>PstI</i> -botS	TGTACGCAGTCTAC
<i>MseI</i>	<i>MseI</i> -topS	GACGATGAGTCCTGAG
	<i>MseI</i> -botS	TACTCAGGACTCAT

استفاده از محلول پایه انجام گرفت به این صورت که برای تعداد ۵ نمونه، ۲/۵ میکرولیتر از هر یک از آنزیم‌های برشی با ۲۰ میکرولیتر از RL بافر و ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل مخلوط شده و پس از تهیه، این محلول پایه با حجم کل ۷۵ میکرولیتر، به نسبت‌های ۱۵ میکرولیتری تقسیم شده و به آن ۲۵۰ نانوگرم DNA ژنومی اضافه شد (حجم نهایی واکنش هضمی، ۲۰ میکرولیتر) و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶-۲۰ ساعت قرار گرفت. سپس توالی آداپتورهای مورد استفاده به انتهای برش‌خورده چسبانده شد. برای این منظور از آداپتور *MseI*، آداپتور *PstI* (جدول ۱)، آنزیم T4 DNA Ligase، بافر مربوط به این آنزیم، آب مقطر استریل هر کدام به مقدار یک میکرولیتر برداشته و با محلول حاصل از مرحله‌ی برش مخلوط گردیده (حجم نهایی واکنش، ۲۵ میکرولیتر) و به مدت ۳ ساعت در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. جهت تکثیر پیش‌انتخابی، ابتدا محصول مرحله‌ی قبل رقیق‌سازی شد (به ازای ۲۵ میکرولیتر حاصل، ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل افزوده گردید)، سپس به ازای ۲ میکرولیتر نمونه (حاصل از مرحله قبل)، ۵/۴ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱/۲۵ میکرولیتر بافر، ۰/۶ میلی‌مول dNTPs، ۴ میلی‌مول $MgCl_2$ ، ۸۰۰ نانومول از هر یک از آغازگرها و یک واحد از آنزیم *Taq DNA polymerase*، در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر با یکدیگر مخلوط شده و طبق جدول ۲ و با استفاده از آغازگرهای این جدول، تکثیر گردید. مراحل و چرخه‌های دمایی به این ترتیب تنظیم گردید: ۷۲، ۹۴، ۶۰، ۷۲ (۲۰ چرخه) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد و زمان ۲، ۰/۵، ۱، ۲ و ۵ دقیقه. تکثیر انتخابی نیز طبق برنامه‌ی جدول ۳ و با استفاده از ترکیب توالی‌های آورده شده در جدول و پس از رقیق‌سازی محصول

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۶ نمونه ماهی قره‌برون (۸ نر، ۸ ماده) در هنگام تکثیر مصنوعی از کارگاه شهید مرجانی تهیه گردید. از هر نمونه ۲ گرم بافت باله‌ی دمی جداسازی و درون الکل مطلق نگهداری شد. پس از انتقال به آزمایشگاه ژنتیک و بیوتکنولوژی گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، استخراج DNA با استفاده از روش فنول-کلروفرم، طبق دستورالعمل Hillis and Moritz (1996) انجام گرفت. ۱۰۰ تا ۵۰۰ میلی‌گرم بافت باله در یک ویال ۱/۵ میلی‌لیتری استریل قرار داده شد. ۵۰۰ میکرولیتر بافر STE (Sodium Chloride, Tris, EDTA)، ۳۰-۲۰ میکرولیتر SDS ۲۰ درصد، ۲۰-۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K به نمونه بافت داخل ویال اضافه و بافت با استفاده از قیچی به صورت قطعات کوچک خرد گردید. ویال‌ها درون ترمومیکسر با دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و شیک شدند، در نتیجه این کار، بافت به طور کامل لیز شده، به صورت امولسیون غلیظ درآمد. به هر تیوب ۵۰۰ میکرولیتر فنل اشباع اضافه شده، تیوب‌ها چند بار با دست سروته شده و به مدت ۲۰ دقیقه شیک شده و سپس سانتریفیوژ گردیدند. فاز بالایی به آرامی جدا و در داخل تیوب جدیدی انتقال داده و به آن ۵۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه گردید. سپس به مدت ۲۰ دقیقه شیک شده و بدنال آن سانتریفیوژ گردید. در پایان این مرحله بعد از سانتریفیوژ، جداسازی فاز رویی انجام و انتقال آن به تیوب جدید صورت گرفت. حدود ۷۰۰ الی ۸۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق سرد و ۴۰ میکرولیتر استات سدیم سه مولار اضافه شده، سپس به آرامی تیوب‌ها را وارونه نموده و بدنال آن سانتریفیوژ انجام گردید. مایع رویی را خارج کرده و سپس نمونه‌ها را توسط ۱۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درصد شستشو داده و به بدنال آن سانتریفیوژ انجام گرفت، پس از آن الکل حذف شده و اقدام به خشک کردن تیوب‌ها گردید. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به هر یک از تیوب‌ها اضافه گردید و جهت تسریع در حل شدن DNA در آب و هضم قطعات RNA باقی مانده، تیوب‌ها در ترمومیکسر با دمای ۵۰ الی ۵۵ درجه به مدت ۳۰ دقیقه بدون شیکر قرار گرفت. AFLP بر اساس روش Vos et al. (1995) با اندکی تغییر انجام گرفت. آنزیم‌های برشی مورد استفاده *PstI* و *MseI* بود و برش با

جدول ۲- مراحل، توالی آغازگر و چرخه دمایی مورد استفاده در مراحل پیش-تکثیر

ردیف	نام توالی	ترتیب بازها (۵'→۳')
۱	PstI-preamp	GACTGCGTACATGCAGA
۲	MseI-preamp	GATGAGTCCTGAGTAAC

مرحله‌ی قبل (به ازای ۵ میکرولیتر، ۳۰ میکرولیتر آب مقطر استریل افزوده گردید) انجام شد. جهت این مرحله به ازای هر ۲ میکرولیتر از نمونه، ۵/۴ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱/۲۵ میکرولیتر بافر، ۰/۶ میلی‌مول dNTPs mix، ۴ میلی‌مول $MgCl_2$ ، ۸۰۰ نانومول از هر یک از آغازگرها و یک واحد از آنزیم *Taq*

DNA polymerase با یکدیگر مخلوط و در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر تکثیر شد. چرخه PCR به ترتیب: ۹۴، ۹۴، ۶۳، ۷۲ (۱۵ چرخه)، ۹۴، ۵۴، ۷۲ (۲۳ چرخه) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد و زمان این چرخه‌ها به ترتیب ۲، ۰/۵، ۰/۵، ۲، ۰/۵، ۰/۵، ۲ و ۲ دقیقه بود.

جدول ۳- مراحل، توالی آغازگر و چرخه دمایی مورد استفاده در مراحل تکثیر انتخابی

ردیف	نام توالی	ترتیب بازها (۵'→۳')
۱	PstI-AAC	GACTGCGTACATGCAGAAC
۲	PstI-ACA	GACTGCGTACATGCAGACA
۳	PstI-ACC	GACTGCGTACATGCAGACC
۴	PstI-AGG	GACTGCGTACATGCAGAGG
۵	MseI-CAC	GATGAGTCCTGAGTAACAC
۶	MseI-CAG	GATGAGTCCTGAGTAACAG
۷	MseI-CACA	GATGAGTCCTGAGTAACACA
۸	MseI-CAGG	GATGAGTCCTGAGTAACAGG

برای جداسازی قطعات حاصل از تکثیر انتخابی، از ژل پلی‌اکریل-آمید ۵ درصد و دستگاه الکتروفورز عمودی توالی‌یاب مدل (Sequi-Gen GT Nucleic Acid Electrophoresis Cell Bio- استفاده شد. این دستگاه برای جداسازی قطعات DNA تکثیر شده

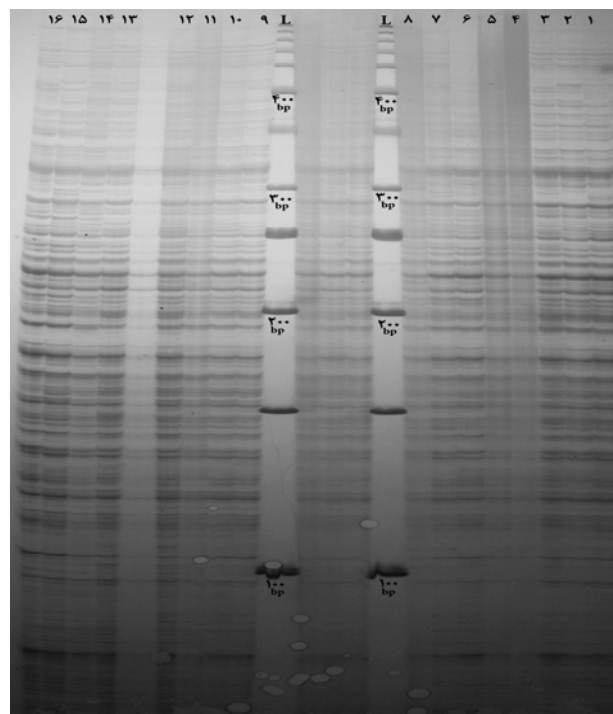
(Rad) در اندازه‌ی ۲۱×۴۰ سانتی‌متر و به ضخامت ۰/۴ میلی‌متر به کار رفته و قابلیت تفکیک باندها را در سطح یک نوکلئوتید دارد. همچنین از تکنیک رنگ‌آمیزی نیترا ت نقره برای ظاهر کردن باندهای DNA استفاده گردید. رنگ‌آمیزی ژل، طبق روش Creste et al. (2001) انجام شد. تصاویر تهیه شده از ژل‌های رنگ‌آمیزی شده، مکان تکثیر شده توسط هر جفت آغازگر را نشان می‌دهند. پس از شناسایی باندهای پلی‌مورف در نمونه‌ها، وجود باند با (۱) و عدم وجود آن با (صفر) و باندهای غیرقابل تشخیص با (نقطه) امتیازدهی شد. داده‌ها پس از ورود به نرم‌افزار اکسل، جهت بررسی حضور نشانگر وابسته به جنس، به صورت وجود یک در تمامی نرها و صفر در تمامی ماده‌ها و یا برعکس، بررسی شد.

نتایج و بحث

میانگین تعداد باندهای مشاهده شده به‌وسیله‌ی هر ترکیب آغازگری در جدول ۴ درج شده است. باندهای مشخص و واضح در محدوده‌ی ۱۰۰۰-۵۰ جفت باز قرار گرفت. ترکیب آغازگری (M-CAG/P-ACA) بیشترین تعداد باندهای تولیدی را نشان داد؛ با توجه به این نتیجه، استفاده از این ترکیب آغازگری جهت انجام مطالعات ژنتیکی در ماهی خاویاری ایرانی (قره‌برون) توصیه می‌شود. ضمن آن‌که در شکل ۱ نمونه‌ای از باندهای روی ژل پلی-اکریل‌آمید واسرشت‌ساز حاصل از تکثیر انتخابی آورده شده است. ضمن آن‌که نتایج نشان‌دهنده‌ی عدم وجود نشانگر وابسته به جنس در ماهی مورد بررسی بود. وابستگی ژن‌ها یا نشانگرها به جنسیت از دو طریق مشخص می‌گردد: (۱) نتیجه‌گیری از اطلاعات حاصل از نقشه‌یابی (May et al. 1989; Allendorf et al. 1994). (۲) جستجوی منظم در ژنوم نر و ماده (Devlin et al. 2001; Kovacs et al. 1997; Iturra et al. 1991) در این مطالعه با استفاده از روش AFLP تعداد حدود ۱۹۵۶/۹۱ باند ایجاد شد. اما در این بین هیچ باند اختصاصی جنسیت در ماهیان نر و ماده یافت نشد. نیافتن چنین نشانگری احتمالاً به دلیل موارد زیر است: (۱) عدم وجود سیستم تعیین جنسیت ژنتیکی و فعال بودن سیستم تعیین جنسیت محیطی. (Devlin and Nagahama 2002) نیز

جدول ۴- میانگین تعداد باند تولیدی به وسیله هر ترکیب آغازگری در نمونه‌های مورد آزمون (P: *PstI*; M: *MseI*) - بازهای نوشته شده، سه یا چهار باز انتخابی مربوط به هر آغازگر می‌باشد).

ردیف	ترکیب آغازگری	میانگین تعداد باند	ردیف	ترکیب آغازگری	میانگین تعداد باند
۱	M-CAC; P-AAC	۱۴۹/۶۸	۹	M-CAGG; P-AGG	۱۱۵/۰۹
۲	M-CACA; P-AAC	۸۸/۷	۱۰	M-CAGG; P-AAC	۵۴/۹۵
۳	M-CACA; P-AGG	۱۲۹/۲۹	۱۱	M-CAGG; P-ACC	۸۵/۳۳
۴	M-CAC; P-AGG	۱۲۶/۱۶	۱۲	M-CAG; P-ACA	۱۶۶/۱۹
۵	M-CACA; P-ACA	۱۳۵/۵۶	۱۳	M-CAG; P-ACC	۱۵۶/۸۱
۶	M-CACA; P-ACC	۹۷/۷۳	۱۴	M-CAG; P-ACC	۱۴۱/۴۸
۷	M-CAC; P-ACC	۱۴۲/۸	۱۵	M-CAG; P-AGG	۱۳۵/۴۸
۸	M-CAC; P-ACA	۱۲۵/۴۷	۱۶	M-CAGG; P-ACA	۱۰۶/۱۹



شکل ۱- باندهای حاصل از ترکیب آغازگری انتخابی M-CAG/P-ACA که بیش‌ترین تعداد باندها را ایجاد نموده است. اعداد شماره ی ۸-۱ مربوط به ماهیان ماده و اعداد ۱۶-۹ مربوط به ماهیان نر می باشد. همچنین حرف L نشان‌دهنده لدر^۱ می‌باشد.

^۱ Ladder

عوامل محیطی مختلفی را در تعیین جنسیت ماهیان دخیل دانستند. این عوامل می‌توانند به عنوان فاکتور درگیر در روند تمایز جنسی ماهیان نقش داشته باشند که تولید یک جنس خاص را باعث شده و یا در مواردی افزایش دهند. هر چند نظر دقیق در مورد تاثیر یا عدم تاثیر این عوامل به شناخت و محرز شدن نقش آن عامل در تعیین جنسیت بستگی دارد. Keyvanshokoo در سال ۲۰۰۳ نیز این نظر را مورد تاکید قرار داد. با این وجود، Yarmohammadi et al. (2011) با توجه به وجود نسبت جنسی ۱:۱ در این ماهیان در شرایط طبیعی و محیط پرورش، این عامل را چندان دخیل ندانستند.

۱) تنوع ژنتیکی بیش از حد بین افراد مورد مطالعه. با توجه به یافته‌های Omoto et al. (2005) که سیستم هتروگامتیک ژنتیکی در ماده‌ها را مسئول تعیین جنسیت فیل‌ماهی تشخیص داده بود، Keyvanshokoo et al. (2007) دلیل احتمالی نیافتن نشانگر اختصاصی جنسی در ماهی خاویاری مورد بررسی را تنوع ژنتیکی بالای ماهیان مورد آزمون عنوان کردند. این مسئله می‌تواند منجر به این شود که به طور مثال باند خاصی احتمالاً در بعضی ماهیان ماده دیده شود، اما در ماهیان نر دیده نشود؛ حال آن‌که این باند در تمامی ماهیان ماده نیز موجود نبوده و هنگام آنالیز به عنوان یک باند اختصاصی جنسی در نظر گرفته نمی‌شود. Kednapat et al.

۴) کوچکی اندازه‌ی توالی‌های وابسته به جنس و عدم شناسایی آن‌ها با توجه به میزان حساسیت روش مورد استفاده در تحقیق حاضر. (Eenennaam (1997 نیز در مورد ماهی خاویاری سفید نتیجه‌گیری کرد که احتمالاً توالی‌های تعیین کننده جنسیت، بخش بسیار کوچکی از ژنوم (۵-۱ kb) می‌باشند. Keyvanshokoo et al. (2007) با توجه به اثبات هتروگامت بودن ماهیان ماده چند گونه‌ی خاویاری، نتیجه‌گیری نمودند که بایستی توالی اختصاصی جنسی در ماهیان ماده موجود باشد؛ آن‌ها پیدا نشدن نشانگر اختصاصی جنسی را در این ماهی در روش RAPD، با توجه به تعداد بالای آغازگرهای مورد استفاده و جستجوی نسبی تمام ژنوم، به کوچکی اندازه‌ی توالی مورد نظر و عدم حساسیت روش RAPD در شناسایی آن نسبت دادند. Keyvanshokoo et al. (2009) نیز با توجه به داده‌های حاصل از پروتئومیکس و نیافتن پروتئینی که به توالی‌های تعیین جنسیت مرتبط باشد، وجود محصول ژن وابسته به جنسیت در مقادیر بسیار کم و عدم تشخیص آن با توجه به میزان حساسیت روش را محتمل دانستند. آنها همچنین احتمال فعالیت توالی‌های تعیین کننده‌ی جنسیت تنها در مراحل ابتدایی حیات را نیز مطرح کردند.

به طور کلی موارد گفته شده را این گونه می‌توان طبقه‌بندی کرد:

- کروموزوم‌های جنسی در این ماهی یا وجود ندارد Kednapat et al. (2007)، دلیل عدم یافتن نشانگر وابسته به جنس را عدم وجود کروموزوم جنسی در *P. gigas* عنوان کردند
- و یا اینکه تمایز آن بسیار کم بوده و بنابراین قابل تشخیص نبوده است Keyvanshokoo et al. (2007) نیز در مورد فیل ماهی بیان داشتند که کروموزوم‌های جنسی چندان متفاوت و هترومورف نمی‌باشد. Li et al. (2002) نیز در مورد گونه‌ی *Tetraodon nigroviridis* به همین نتیجه رسیدند.
- (2009) Keyvanshokoo et al. نیز با توجه به داده‌های حاصل از پروتئومیکس نتیجه گرفتند که کروموزوم‌های جنسی که فاکتور تعیین کننده جنسیت روی آن است، در گونه‌های خاویاری چندان تفاوتی (تفاوت کروموزوم‌های هومولوگ چندان زیاد نیست) ندارد. این نتیجه با نتایج Fontana and Colombo (1974) که

(2007)، دلیل عدم یافتن نشانگر وابسته به جنس را در گروه‌های وابسته‌ی گونه‌ی *P. hypophthalmus* به وجود احتمالی نشانگر وابسته به جنس گروهی در این ماهی عنوان کرده که مختص یک گروه یا سویه بوده و ممکن است با افزایش گستره‌ی نمونه‌برداری کارایی خود را از دست بدهند؛ به همین خاطر این نشانگرها در نمونه‌های غیر وابسته، تشخیص داده نشد. دلیل احتمالی بروز این مسئله آن است که ماهیان مورد تکثیر در ایران، که در اغلب مطالعات نیز از آنها استفاده شده، از صیدگاه‌های متفاوتی به کارگاه تکثیر منتقل می‌شوند. این مسئله باعث آن می‌شود که ماهیان با محتوای ژنتیکی مختلف وارد کارگاه‌ها شوند.

۳) همبستگی ضعیف بین جنسیت ژنوتیپی و فنوتیپی به دلیل ژن‌های تغییر دهنده‌ی اتوزومی و یا وجود سیستم تعیین جنسیت چندژنی. (Eenennaam et al. (1997 نیز با توجه به آن‌که ماده را هتروگامت شناسایی کرده اما نشانگر وابسته به جنس را با استفاده از روش‌های مختلف در ماهی خاویاری سفید نیافته بودند، نتیجه گرفتند که یا: الف) توالی اختصاصی جنسی در ماهی خاویاری موجود نبوده و این مسئله نشان‌دهنده‌ی آن است که این ماهی دارای یک سیستم چندجایگاهی جهت تعیین جنسیت است. و یا ب) DNA اختصاصی جنسی که در ماهی خاویاری موجود است، ممکن است از توالی‌های خاصی ایجاد شده باشد که با ۱۲۰۰ آغازگر مورد استفاده مکمل نشده و یا به وسیله‌ی اندونوکلاز برش‌دهنده‌ای که در مطالعه آن‌ها استفاده شده، تشخیص داده نشده است. (Wuertz et al. (2006 با وجود استفاده از سه روش متفاوت RAPD، AFLP و ISSR در چهار گونه از ماهیان خاویاری (*Acipenser baerii*, *A. naccarii*, *A. gueldenstaedtii*, *A. ruthenus*) نشانگر وابسته به جنسی را در این ماهی شناسایی نکردند. آن‌ها دلیل این مسئله را با توجه به یافتن دو ژن *DMRT1* و *Sox 9* (این ژن‌ها در گونه‌های متفاوتی از مهره‌داران از جمله ماهیان استخوانی در تعیین جنسیت نقش دارند) (Hett and Ludwig 2005; Hett et al. 2005) در ماهیان خاویاری و اختصاصی نبودن آن‌ها در تعیین جنسیت در این ماهیان، به سیستم تعیین جنسیت بر اساس اثر دوز ژن^۱ نسبت دادند.

^۱ Gene dosage effect

توالی‌های وابسته به جنس نیز دور از ذهن نیست، در این زمینه Keyvanshokoo et al. (2009) این نظریه را نیز مطرح نمودند.

وجود کروموزوم‌های هترومورف جنسی را در این ماهیان رد کرده بودند مطابق بود. مورد دوم با توجه به نتایج حاصل از مطالعات مختلف و تشخیص هتروگامی ماده‌ها در چند گونه از ماهیان خاویاری محتمل‌تر است. ضمن آنکه تنوع زیاد بین فردی در

منابع

Abdoli A (2000) Iranian inland water fishes. Publication of Hayaate vahsh museum, Tehran, Iran, 375pp. (In Farsi).
Allendorf FW, Gellman WA, Thorgaard GH (1994) Sex-linkage of two enzyme loci in *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout). *Journal of Heredity* 72:498-507.
Billard R, Lecointre G (2001) Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. *Reviews in fish biology and fisheries* 10:355-392.
Birstein VJ (1993) Sturgeon and paddlefishes: Threatened fishes in need of conservation. *Conservation Biology* 7:773-787.
Birstein VJ, Desalle R (1998) Molecular phylogeny of *Acipenserinae*. *Molecular phylogenetics and evolution* 9(1):141-155.
Birstein VJ, Doukakis P, Desalle R (2000) Polyphyly of lineages in the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*: forensic and evolutionary implications. *Conservation genetics* 1:81-88.
Chen SL, Li J, Deng SP, Tian YS, Wang QY, Zhuang ZM, Sha ZX, Xu JY (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.
Creste S, Tulmann neto A, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter* 19:299-306.
Devlin RH, McNeil BK, Groves TDD, Donaldson EM (1991) Isolation of a Y-Chromosomal DNA probe capable of determining genetic sex in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48:1606-1612.

Devlin RH, Nagahama Y (2002) Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences. *Aquaculture* 208:191-364.

Doroshov SI, Moberg GP, Eenennaam JPV (1997) Observations on the reproductive cycle of cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Environmental Biology of Fish* 48:265-278.

Eenennaam ALV (1997) Genetic analysis of the sex determination of White sturgeon (*Acipenser transmontanus* Richardson). Dissertation, University of California, UMI, 180pp.

Felip A, Young WP, Wheeler PA, Thorgaard GH (2005) An AFLP-based approach for the identification of sex-linked markers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 247:35-43.

Fontana F, Colombo G (1974) The chromosomes of Italian sturgeons. *Experientia* 30:739-742.

Griffiths R, Orr KJ, Adam A, Barbar I (2000) DNA sex identification in the Three-spined stickleback. *Journal of fish biology* 57:1331-1334.

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

Hett AK, Pitra C, Jenneckens I, Ludwig A (2005) Characterization of Sox9 in European Atlantic sturgeon (*Acipenser sturio*). *Journal of Heredity* 96:150-154.

Hillis DM, Moritz C (1996) *Molecular systematics*, 2nd edn. Sinauer Associates Inc. Sunderland.

Iturra P, Medrano JF, Bagley M, Lam N, Vergara N, Marin JC (1997) Identification of sex chromosome molecular markers using RAPDs and fluorescent in situ hybridization in rainbow trout. *Genetica* 101:209-213.

Kednepat S, Na-Nakorn U, Brunelli JP, Thorgaard GH (2007) No AFLP sex-specific markers detected in *Pangasianodon gigas* and *P. hypophthalmus*. *Aquaculture* 273:739-743.

Keyvanshokoo S (2003) Investigation the possibility of sex determination in Beluga (*Huso huso*) by PCR-RAPD method. A thesis for MSc, Tarbiat modares univ., Noor, Iran, 54pp. (In farsi).

Keyvanshokoo S, Kalbassi MR, Hosseinkhani S, Vaziri B (2009) Comparative proteomics analysis of male and female Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) gonads. *Animal Reproduction Science* 111:361-368.

Keyvanshokoo S, Pourkazemi M, Kalbassi MR (2007) The RAPD technique failed to identify sex-specific sequences in beluga (*Huso huso*). *Journal of Applied Ichthyology* 23:1-2.

King TL, Lubinski BA, Spidle AP (2001) Microsatellite DNA variation in Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*) and cross-species amplification in the *Acipenseridae*. *Conservation genetics* 2:103-119.

Kovacs B, Egedi S, Bartfai R, Orban L (2001) Male-specific DNA markers from African catfish (*Clarias gariepinus*). *Genetica* 110:267-276.

Li Y, Hill JA, Yue GH, Chen F, Orban L (2002) Extensive search does not identify genomic sex markers in *Tetraodon nigroviridis*. *Journal of fish biology* 61:1314-1317.

Logan SH, Johnston WE, Doroshov SI (1995) Economics of joint production of sturgeon (*Acipenser transmontanus* Richardson) and Roe for Caviar. *Aquaculture* 130:299-316.

- Ludwig A (2006) A sturgeon view on conservation genetics. *European journal of wildlife Research* 52:3-8.
- May B, Johnson KR, Wright EJJ (1989) Sex linkage in salmonids: evidence from a hybridized genome of Brook trout and Arctic charr. *Biochemical Genetics* 27:291-301.
- May B, Krueger CC, Kincaid HL (1997) Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54:1542-1547.
- 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.
- Pourkazemi M, skibinski DOF, Beardmore JA (1999) Application of mtDNA d-loop region for the study of Russian sturgeon population structure from Iranian coastline of the Caspian Sea. *Journal of Applied Ichthyology* 15:23-28.
- Vos P, Hogers R, Bleaker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Fritjers A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414.
- Wirgin II, Stabile EJ, Waldman RJ (1997) Molecular analysis in the conservation of sturgeons and paddlefish. *Environmental biology of fishes* 48:385-398.
- Wuertz S, Gaillard S, Barbisan F, Carle J, Congiu L, Forlani A, Aubert J, Kirschbaum F, Tosi E, Zane L, Grillasca JP (2006) Extensive screening of sturgeon genomes by random screening techniques revealed no sex-specific marker. *Aquaculture* 258:685-688.
- Yarmohammadi M, Pourkazemi M, Ghasemi A, Saber MH, Chakmehdouz F (2011) AFLP reveals no sex-specific markers in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) or beluga sturgeon (*Huso huso*) from the southern Caspian Sea, Iran. *Progress in Biological sciences* 1:55-60.