ژنتیک نوین
دوره هفتم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۱
صفحه ۳۳۲- ۳۲۵

# امکان سنجی تعیین جنسیت ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*, Kessler, 1877) با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP

# Feasibility analysis of sex determination of caspian trout (*Salmo trutta caspius*, Kessler, 1877) using AFLP markers

انسیه حبیبی[۱]، محمد رضا کلباسی*[۲]، سید جواد حسینی[۳]، سید احمد قاسمی[۴]

۱و۲- کارشناس ارشد و دانشیار، دانشگاه تربیت مدرس، مازندران
۳و۴- استادیار و مربی پژوهشی، دانشگاه خلیج فارس

**Habibi E[1], Kalbassi MR[2*], Hosseini SJ[3], Qasemi SA[4]**

1,2. MSc student, Associate Professor, Tarbiat Modares University, Noor, Mazandaran, Iran.
3,4. Assistant Professor, Instructor, Persian Gulf, Persian Gulf University

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: kalbassi_m@modares.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۸ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۲۳)

## چکیده

**ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* از جمله ماهیان مهاجر بومی دریای خزر است که به ویژه در سال‌های اخیر در معرض خطر انقراض قرار گرفته است. تشخیص زودهنگام جنسیت در ماهی آزاد به منظور تولید جنس ماده از اهمیت بالایی در امر پرورش برخوردار است. با توجه به اینکه در بررسی نشانگرهای تعیین جنسیت برخی آزادماهیان استفاده از نشانگر مولکولی AFLP روشی کارآمد و سریع برای شناسایی نشانگرهای دارای پیوستگی جنسی معرفی شده است، لذا در این تحقیق به منظور امکان سنجی تعیین جنسیت ماهی آزاد دریای خزر، از انتهای باله دمی ۱۰ عدد ماهی ماده و ۱۰عدد ماهی نر نمونه برداری شد و با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP با ۹۶ ترکیب آغازگری مختلف *Eco*RI و *Mse*I، جهت تعیین نشانگر مرتبط با جنسیت استفاده شد. نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از ۹۶ ترکیب مختلف آغازگر، مبین ایجاد باندهای متفاوت در نرها و ماده‌ها در حداقل ۱۵ ترکیب آغازگری در مرحله اول بود، اما باندهای مورد نظر، در تکرار بر روی نمونه‌های دیگر در مراحل دوم و سوم، به طور اختصاصی در یک جنس مشاهده نشدند، که نشان دهنده عدم پیوستگی این نشانگرها به جنسیت و نرخ نوترکیبی بالاتر بوده است. با توجه به نتایج، استفاده از سایر ترکیبات آغازگرها به منظور یافتن نشانگر جنسی اختصاصی در ماهی آزاد دریای خزر توصیه می‌شود.**

واژه‌های کلیدی

ترکیب‌های آغازگر *Eco*RI،
تعیین جنسیت،
ماهی آزاد دریای خزر،
AFLP،
*Mse*I.

[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.2.3 ]

## مقدمه

ماهی آزاد دریای خزر با نام علمی *Salmo trutta caspius* از جمله ماهیان مهاجر (آنادروموس) و بومی دریای خزر است (Kazanchev 1981). این زیر گونه یکی از ۹ زیر گونه قزل‌آلای قهوه‌ای (*Salmo trutta*) در جهان است (Quillet et al. 1992) که در بین تمام زیر گونه‌های قزل‌آلای قهوه‌ای به بیشترین اندازه و وزن رسیده و بالاترین میزان رشد را داشته است (Sedgwick 1995). در حال حاضر این گونه بسیار کمیاب است، اما می توان آنها را به طور عمده در سواحل جنوب غربی دریای خزر و در سواحل ایرانی جایی که به طور تجاری صید می گردند، یافت (Dorafshan et al. 2007). با توجه به آلودگی منابع آبی، موانع موجود بر سر راه مهاجرت و تخم‌ریزی از دریا به رودخانه‌ها و همچنین صید غیرمجاز، بقای برخی از گونه‌های آبزی از جمله ماهی آزاد دریای خزر که از ارزش اقتصادی بالایی برخوردار است، به خطر افتاده است (Kiabi et al. 1999). با توجه به کاهش جمعیت این ماهی در سال‌های اخیر، همه ساله تکثیر و رهاسازی آن به دریا در ایران توسط کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان سرد آبی شهید باهنر کلاردشت انجام می گیرد. از سوی دیگر تکثیر و پرورش مصنوعی این ماهی در آبهای داخلی در سالهای اخیر با موفقیت همراه بوده است. از آنجا که فرایند تکثیر مصنوعی ممکن است بر نسبت جنسی فرزندان ایجاد شده و در نهایت اندازه موثر جمعیت موثر بوده و بقای بلند مدت ماهیان را با مخاطره روبرو نماید لذا آگاهی از نسبت جنسی ماهیان تولید و رها سازی شده می تواند بر مدیریت صحیح بازسازی ذخائر این گونه ارزشمند و منحصر بفرد دریای خزر حائز اهمیت باشد. از سوی دیگر از نظر اقتصادی در ماهیان پرورشی که در بین دو جنس آنها تفاوت رشد زیادی وجود دارد، فرایند تعیین جنسیت به منظور انتخاب جنس پر رشدتر اهمیت زیادی دارد. در این راستا تولید ماهی آزاد ماده به دلیل بلوغ دیرتر آن می تواند در امر پرورش از اهمیت بالاتری برخوردار باشد. بلوغ جنسی دیرتر در آزادماهیان ماده پرورشی پدیده ای مطلوب است چراکه معمولا به همراه وقوع پدیده بلوغ در ماهیان، استرس افزایش یافته، کیفیت ماهی کاهش یافته و بیشتر در معرض بیماری قرار می گیرند (Benfey 2001). از این رو، ایجاد ماده‌زایی در این گونه (Kalbassi and Dorafshan 2010) و در نتیجه تشخیص جنسیت در نتاج تولید شده امری مهم تلقی می شود.

ماهیان دارای بازه‌ای از مکانیسم‌های تعیین جنسیت شامل کاملا ژنتیکی تا تحت تأثیر محیط می باشند (Baroiller and Guiguen 2001). این تنوع، ماهیان را به مدل‌های مناسبی برای مطالعه روند تکامل تعیین جنسیت در مهره‌داران تبدیل نموده است (Brunelli et al. 2008). بمنظور بررسی جنسیت ماهیان از روشهای متفاوتی استفاده می شود (Keyvanshokoh et al. 2009) که یکی از تکنیک‌های مورد استفاده برای تعیین جنسیت ماهیان، بهره‌گیری از نشانگرهای مولکولی است. بسیاری از گونه‌های ماهی، کاهش دی‌مورفیسم جنسی یا فقدان کروموزوم‌های جنسی هترومورف را نشان دادند (Bull 1983). بنابراین تعیین جنسیت برای ماهیان بر اساس کاریوتایپ آنها روش مشکل و پیچیده‌ای است، در نتیجه آزمایش‌ها بر مبنای DNA می‌تواند این مشکل را تا حدودی حل کند. برای این منظور نشانگرهای جنسی اختصاصی بایستی جدا شوند. توالی‌های DNA اختصاصی جنسی در چند گونه از ماهیان با استفاده از روش‌های مختلفی مانند نشانگرهای RAPD، RFLP، AFLP و میکروساتلایت مشخص شده است (Devlin et al. 2001). با این حال، تغییرپذیری در ساختمان کروموزوم‌های جنسی در ماهیان بر این امر دلالت دارد که تعداد و نوع مکان‌های ژنی درگیر در تعیین جنسیت در ماهیان می تواند در بین و درون گونه متفاوت باشد (Iturra et al. 2001; Devin and Nagahama 2002; Volff et al. 2003). بنابراین نشانگرهای جنسی به سختی جداسازی می شوند. اگرچه، آنالیزهای مولکولی و سیتوژنتیکی ابزارهای تکمیلی مناسبی جهت توصیف کروموزوم‌های جنسی در ماهیان محسوب می‌شوند (Felip et al. 2005)، اما در عین حال ممکن است در برخی موارد از کارایی لازم برای تشخیص صحیح جنسیت برخوردار نباشند (Keyvanshokoh et al. 2007; Sriphairoj 2007). در ماهیان آزاد شناسایی نشانگر جنسی DNA، تفاوت های مولکولی در کروموزوم های جنسی را نشان داده است (Devlin et al. 2001; Iturra et al. 2001; Thorgaard et al. 2002; Woram et al. 2003). اولین مکان ژنی مختص جنسی که تعیین جنسیت ژنوتیپی را در آزاد ماهیان مقدور ساخت، در آزادماهی اقیانوس آرام با نام OtY1 بود (Devlin et



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.2.3 ]

al. 1991). با توجه به اینکه در بررسی نشانگرهای تعیین جنسیت آزادماهیانی چون قزل‌آلای رنگین کمان (Felip et al. 2005)، آزادماهی چینوک (Brunelli et al. 2008) و آزادماهی اقیانوس آرام (Brunelli and Thorgaard 2004) از نشانگر مولکولی AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) استفاده شده و آن را روشی کارآمد و سریع برای شناسایی نشانگرهای دارای پیوستگی جنسی معرفی کردند، در این تحقیق از روش AFLP جهت تعیین نشانگرهای پیوسته با ژن‌های تعیین جنسیت در ماهی آزاد دریای خزر استفاده شده است. هدف تحقیق حاضر امکان سنجی قابلیت این روش در بکارگیری ترکیب آغازگرهای *Eco*RI و*Mse*I در جداسازی نشانگر جنسی در ماهی آزاد دریای خزر است.

## مواد و روش‌ها

نمونه برداری از آزادماهیان مولد صید و جمع‌آوری شده از مرکز تکثیر و پرورش شهید باهنر کلاردشت انجام شد. تعداد ۱۰قطعه ماهی نر و ۱۰ قطعه ماهی ماده در این تحقیق استفاده شد. از انتهای باله دمی جهت استخراج DNA استفاده شده و در اتانول ۹۶ درصد نگهداری شد.

استخراج DNA

استخراج DNA به روش استات آمونیوم به شرح زیر انجام شد. ۵۰ میلی گرم از بافت باله ماهی خُرد شده، همراه با ۶۰۰ میکرولیتر STE (Sodium Chloride-Tris-EDTA) و ۶۰ میکرولیتر SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) ۱۰ درصد و ۵ میکرولیتر پروتئیناز K (۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر)، به مدت ۳-۴ ساعت در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا هضم صورت گیرد. سپس به سوسپانسیون حاصل، ۶۰۰ میکرولیتر استات آمونیوم اضافه شد. بعد از این مرحله با اضافه کردن اتانول ۱۰۰ درصد، DNA استخراج شده، رسوب نمود و با اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد، سپس در آب مقطر حل گردید. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده به ترتیب با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۷ درصد و دستگاه UV اسپکتروفتومتر ارزیابی شد.

اجرای مراحل AFLP

آزمایش‌های مربوط به AFLP مطابق با دستورالعمل Vos et al. (1995) با اندکی تغییرات انجام شد. نمونه DNA برای واکنش AFLP با هضم آنزیم محدود کننده و اتصال آداپتورها تولید شدند. ابتدا، ۵۰ نانوگرم از DNA کل با ۱۰ واحد آنزیم *Eco*RI و *Mse*I در بافر هضم آنزیمی 10X در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت و سپس در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت قرار داده شد و واکنش هضم آنزیمی صورت گرفت. پس از آن واکنش اتصال آداپتورها به قطعات حاصل از هضم، با استفاده از DNA هضم شده، ۵ میکرومول *Eco*RI، ۵۰ میکرومول *Mse*I، آنزیم T4 Ligase، ۱۰ میلی‌مول ATP و بافر 10 X T4 Ligase، در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. محصول واکنش به میزان ۴ برابر رقیق شد. واکنش PCR پیش انتخابی با ترکیب آغازگری E01 (5´-´GACTGCGTACCAATTCA-3) و M02 (5´-´GATGAGTCCTGAGTAAC-3) (Sonstebo et al. 2007) که با آداپتورها مکمل بوده و یک نوکلئوتید اضافی در انتهای ´۳ خود داشتند، انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز اولیه با استفاده از ۵ میکرولیتر محصول واکنش اتصال رقیق شده ($H_2O$ ۱:۴)، ۱۰ میکرومول *Eco*RI، ۱۰ میکرومول آغازگر *Mse*I، ۱۰ میلی‌مول $MgCl_2$، بافر PCR 10X، ۲/۵ میلی‌مول dNTPs و ۵ واحد آنزیم Taq polymerase انجام شد. چرخه حرارتی PCR در ۳۰ چرخه به صورت: ۳۰ ثانیه مرحله واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه مرحله اتصال در ۵۶ درجه سانتی گراد و ۱ دقیقه مرحله بسط در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. کیفیت محصول پیش انتخابی روی ژل آگارز ۰/۷ درصد بررسی شد و محصولات به میزان ۱۰ برابر رقیق شدند. به منظور حذف تفاوت های فردی در نمونه‌ها، از ۵ قطعه نر و ۵ قطعه ماده، محصول PCR پیش انتخابی مخلوط تهیه شد، سپس واکنش PCR انتخابی با جفت آغازگرهای مختلفی که ۲ نوکلئوتید انتخابی بیشتر داشتند، انجام شد. واکنش PCR انتخابی با ۹۶ ترکیب از آغازگرهایی که در جدول ۱ آمده، انجام شد.

واکنش زنجیره ای پلیمراز مربوطه در حجم ۱۵ میکرولیتر با واکنش گرهایی شامل ۵ میکرولیتر محصول واکنش PCR پیش انتخابی رقیق شده ($H_2O$ ۱:۱۰)، ۱۰ میکرومول آغازگر *Eco*RI،



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.2.3 ]

جدول ۱- توالی آغازگرهای *Eco*RI و *Mse*I با دو نوکلئوتید انتخابی استفاده شده در مرحله PCR انتخابی واکنش AFLP برگرفته از Sonstebo et al. (2007)

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1*Eco*R I +3 | GACTGCGTACCAATTCA AC | 5*Eco*R I +3 | GACTGCGTACCAATTCA CT |
| 2*Eco*R I +3 | GACTGCGTACCAATTCA AG | 6*Eco*R I +3 | GACTGCGTACCAATTCA GC |
| 3*Eco*R I +3 | GACTGCGTACCAATTCA CC | 7*Eco*R I +3 | GACTGCGTACCAATTCA GG |
| 4*Eco*R I +3 | GACTGCGTACCAATTCA CG | 8*Eco*R I +3 | GACTGCGTACCAATTCA CA |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1*Mse* I +3 | GATGAGTCCTGAGTAAC AA | 7*Mse* I +3 | GATGAGTCCTGAGTAAC TG |
| 2*Mse* I +3 | GATGAGTCCTGAGTAAC AC | 8*Mse* I +3 | GATGAGTCCTGAGTAAC TT |
| 3*Mse* I +3 | GATGAGTCCTGAGTAAC AG | 9*Mse* I +3 | GATGAGTCCTGAGTAAC CT |
| 4*Mse* I +3 | GATGAGTCCTGAGTAAC AT | 10*Mse* I +3 | GATGAGTCCTGAGTAAC GT |
| 5*Mse* I +3 | GATGAGTCCTGAGTAAC TA | 11*Mse* I +3 | GATGAGTCCTGAGTAAC CG |
| 6*Mse* I +3 | GATGAGTCCTGAGTAAC TC | 12*Mse* I +3 | GATGAGTCCTGAGTAAC CC |

۱۰ میکرومول آغازگر *Mse*I، ۱۰ میلی‌مول $MgCl_2$، بافر 10X PCR ، ۲/۵ میلی‌مول dNTPs و ۵ واحد آنزیم Taq polymerase انجام شد. چرخه حرارتی PCR در ۳۰ چرخه به صورت: ۳۰ ثانیه مرحله واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد ، ۳۰ ثانیه مرحله اتصال (دما در چرخه اول ۶۵ درجه سانتی‌گراد بود، سپس دما تا ۱۱ چرخه بعدی به ازای هر یک چرخه، یک درجه سانتی-گراد کاهش یافت و ۱۸ چرخه بعد در دمای ۵۴ درجه سانتی‌گراد ادامه یافت) و یک دقیقه مرحله بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

الکتروفورز عمودی و رنگ آمیزی نیترات نقره

محصول PCR انتخابی با ۸ میکرولیتر رنگ فرمامید (فرم‌آمید ۹۸ درصد، محلول آبی‌رنگ بروموفنل، گزیلن سیانول و ۱۰ میلی‌مول EDTA با pH=8) ترکیب شد. سپس در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۶ دقیقه واسرشت شده و پس از آن به سرعت روی یخ سرد گردید. ژل اکریل آمید ۶ درصد (اکریل آمید ۴۰ درصد، اوره و 10X TBE) در دستگاه الکتروفورز DNA Sequencing gel (38×30)، در ولتاژ w ۷۵ به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز مقدماتی شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از نمونه در چاهک ریخته شد و به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ژل ۵۰ درجه سانتی گراد در ولتاژ w ۷۵ الکتروفورز انجام شد. پس از الکتروفورز، ژل با روش نیترات نقره رنگ آمیزی شد. سپس باندها به صورت وجود (۱) یا عدم وجود (صفر) باند در نرها و ماده‌ها امتیازدهی شده و مورد مقایسه قرار گرفتند.

پس از پایان مرحله اول، جفت آغازگرهایی که در این مرحله، باندهای متفاوتی در نر و ماده ایجاد کردند، در مرحله دوم روی ۳ نر و ۳ ماده تکرار شدند. پس از بررسی نتایج مرحله دوم، جفت آغازگرهایی که باند متفاوت ایجاد نمودند، در مرحله سوم روی ۵ نر و ۵ ماده تکرار شدند.

تصاویر تهیه شده از ژل‌های رنگ‌آمیزی شده، مکان تکثیر شده توسط هر جفت آغازگر را نشان می‌دهند. پس از شناسایی باندهای دارای چندشکلی در نمونه‌ها، وجود باند با (۱) و عدم وجود آن با (صفر) و باندهای غیر قابل تشخیص با (صفر) امتیازدهی شد. داده‌ها پس از ورود به نرم‌افزار اکسل، جهت بررسی حضور نشانگر وابسته به جنس، به صورت وجود (۱) در تمامی نرها و (صفر) در تمامی ماده‌ها و یا برعکس، بررسی شد.

## نتایج و بحث

از میان ۹۶ ترکیب آغازگری که در مرحله اول بر روی مخلوط ۵ نر و ۵ ماده استفاده شدند، ۱۵ جفت آغازگر، باندهای متفاوتی را در نرها و ماده‌ها ایجاد کردند. این جفت آغازگرها عبارتند از: جفت آغازگرهای شماره ۲، ۷، ۸، ۱۳، ۱۴، ۱۹، ۳۳، ۳۸، ۳۹، ۴۱، ۵۰، ۵۸، ۸۳، ۹۳ و ۹۵. توالی انتهای ´۳ این جفت آغازگرها در جدول ۲ آمده است؛ شکل ۱ نمونه ای از الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید واسرشت است که در آن باند متفاوت ایجاد شده در نر و ماده که توسط جفت آغازگر ۵۸ در مرحله اول ایجاد شده است را نشان می دهد. در مرحله دوم به منظور تایید نشانگر جنسی بودن این ترکیبات، آنها روی ۳ نر و ۳ ماده تکرار شدند. از میان این ۱۵ ترکیب، ترکیب آغازگر شماره ۷، باندی در محدوده ۶۰۰ تا ۷۰۰ جفت باز ایجاد نمود که تنها در جنس نر دیده شد و ترکیب آغازگر شماره ۸۳، باندی در محدوده ۲۰۰ تا ۳۰۰ جفت

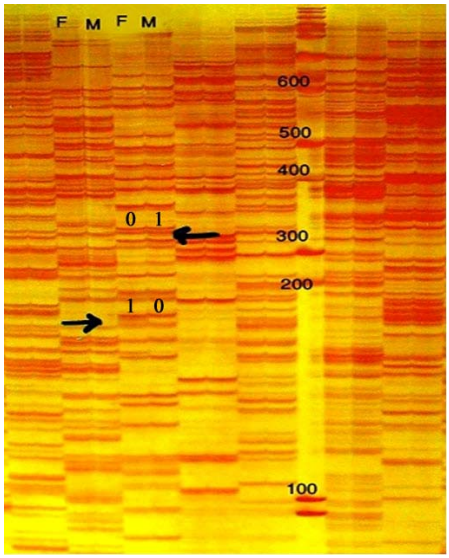


[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02 ]

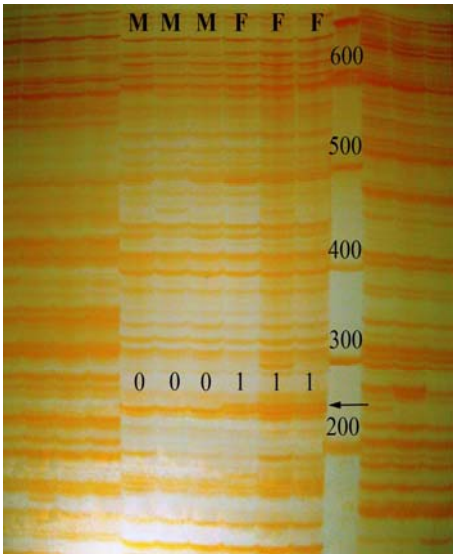
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.2.3 ]

جدول ۲- توالی انتهای ´۳ جفت آغازگرهایی که باندهای متفاوت در نرها و ماده‌ها ایجاد کردند.

| شماره جفت آغازگر | ۹۵ | ۹۳ | ۸۳ | ۵۸ | ۵۰ | ۴۱ | ۳۹ | ۳۸ | ۳۳ | ۱۹ | ۱۴ | ۱۳ | ۸ | ۷ | ۲ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **توالی ۳ نوکلئوتید انتخابی انتهای ´۳** | ACA /CCG | ACA /CCT | AGG /CCG | ACT /CGT | ACT /CAC | ACG /CTA | ACG /CAG | ACG /CAC | ACC /CTT | AAG /CTG | AAG /CAC | AAG /CAA | AAC /CTT | AAC /CTG | AAC /CAC |




شکل ۱- ژل الکتروفورز پلی اکریل آمید دناتوره. در مرحله اول هر جفت آغازگر روی مخلوط ۵ نر و ۵ ماده آزمایش شد. باند متفاوت ایجاد شده در مرحله اول در نر و ماده توسط جفت آغازگر شماره ۵۸، با فلش مشخص شده است. (F= Female, M=Male)



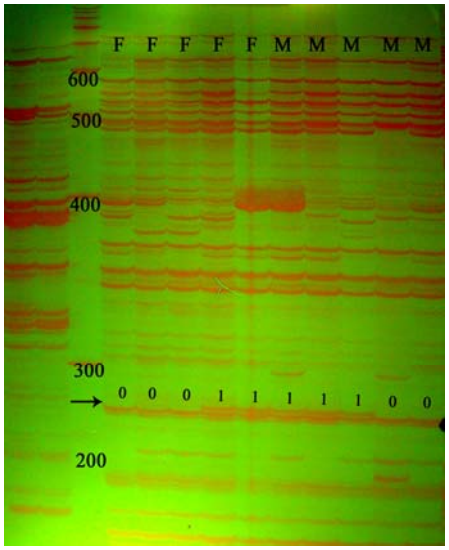

شکل ۲- تکرار جفت آغازگر ۸۳ در مرحله دوم، روی ۳ نر و ۳ ماده. باند میانی که فقط در ماده‌ها مشاهده شد در مرحله بعد مورد آنالیز قرار گرفت. (F= Female, M=Male)

باز ایجاد نمود که تنها در جنس ماده مشاهده شد (شکل۲). در مرحله سوم این جفت آغازگرها ( ۸۳ و ۷ ) روی ۵ نر و ۵ ماده دیگر تکرارشدند، اما باندهای مورد نظر به طور متمایز در یک جنس ظاهر نشدند (شکل۳). به طور کلی، نتایج حاصل از تکرار ۱۵جفت آغازگر، بر روی نرها و ماده‌های دیگر، نشان داد که باندهای مشاهده شده در مرحله قبل، در مراحل بعدی باند اختصاصی نر و ماده تولید نکرده‌اند و از این‌رو نمی توان آنها را نشانگرهای جنسی معرفی نمود.

نشانگرهای مبتنی بر DNA، ابزارهای مناسبی برای بررسی پیوستگی جنسی در ماهیان تلقی می شوند به خصوص با در نظر گرفتن این نکته که ساختار DNA با تغییر شرایط فیزیولوژیک و محیط زیست ماهی تغییر نمی کند (Cui et al. 2006). از این رو بررسی توالی DNA بر روی کروموزوم جنسی علاوه بر اهمیت آن در مطالعات تکاملی، می تواند منجر به بهبود وضعیت تولید گردد (Delvin and Nagahama 2002). در این تحقیق از ۹۶ ترکیب آغازگری AFLP جهت شناسایی نشانگر تعیین جنسیت در ماهی آزاد دریای خزر استفاده شد، اما نشانگرهای DNA که متمایز کننده جنسیت در این ماهی باشند، یافت نشد. در مطالعه نشانگر جنسی در قزل‌آلای رنگین کمان توسط Felip et al. (2004) مشاهده شد که هیچ یک از نشانگرها در این مطالعه بطور کامل با جنسیت در ارتباط نبود، که این موضوع در همه تلاقی‌ها مشهود بود (Iturra et al. 2001). آنها دو احتمال را برای این رویداد طرح کردند: اول اینکه، نوترکیبی ممکن است در کروموزوم Y بین نشانگرهای مرتبط با کروموزوم Y و مکان ژنی جنسی روی داده باشد ( Zhang et al. 2001; Devlin and Nagahama 2002) که البته بیان نمودند این مورد به دلیل اینکه نوترکیبی میوزی بطور چشمگیری در این بخش کروموزوم و



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.2.3 ]




شکل ۳- تکرار آغازگر ۸۳ در مرحله سوم روی ۵ نر و ۵ ماده. باند مزبور در هر دو جنس وجود داشت. (F= Female, M=Male)

بخصوص در نرها کاهش می یابد، غیر محتمل بنظر می رسد. با وجود این، اگرچه نشانگرها بطور وسیعی با هم به نسل بعد انتقال می یابند، اما بطور کامل با کروموزوم Y مرتبط نیستند، به این معنا که آنها در نزدیکی مکان ژنی تعیین جنسیت قرار دارند، اما در ناحیه نوترکیب واقع شده بودند. تعریف دیگر برای این رویداد تغییر خودبخودی جنسیت است، اتفاقی که در هر دو جمعیت وحشی و پرورشی ماهیان قابل توجیه است (Zhang et al. 2001). Felip et al. (2004) در مطالعه خود، بین جنسیت ژنوتیپی و گنادی در ماهیان قزل‌آلای مورد بررسی به‌میزان ۴ درصد اختلاف مشاهده نمودند. آنها نتیجه گرفتند که تغییر جنسیت در قزل‌آلای رنگین کمان اندک نبوده و وقوع این پدیده به صورت تبدیل ماده‌های ژنوتیپی به جنس نر بیشتر از حالت عکس آن می باشد. همچنین Nagahama and Devlin (2002) بیان نمودند که ماهیان ماده و نر تغییر جنسیت یافته در آزادماهیان، هر دو از لحاظ جنسی توانایی باروری را دارند. همچنین، در تحقیقی Brunelli et al. (2008) از تکنیک AFLP برای شناسایی نشانگرهای بیشتر کروموزوم Y در جمعیت های آزاد-ماهی چینوک آلاسکایی استفاده کردند. آنها نمونه های DNA استخراج شده از ماهیانی که آمیزش غیر خویشاوندی داشتند را مخلوط نمودند تا پراکنش آللی خارج از مناطق غیر نوترکیب وابسته به جنسیت در کرومزوم Y حذف گردد. آنها با استفاده از ۴۸۰ ترکیب آغازگری AFLP، مخلوطها را برای یافتن قطعات مختص به جنس نر بررسی نمودند و تنها یک قطعه مختص به جنس نر را بعنوان نشانگر جنسی کروموزوم Y شناسایی نمودند. آنها نتایج خود را این‌چنین توجیه نمودند که تعداد کم نشانگر جنسی بدست آمده در این مقایسه آمیزش بیرون جمعیتی، با استفاده از تکنیک AFLP، می تواند دلیلی بر نقص آن در شناسایی هر نوع نشانگری در مکان‌های ژنی نوترکیب کروموزوم Y باشد. Sriphairoj et al. (2007) نیز برای شناسایی نشانگر اختصاصی جنسی در گونه گربه‌ماهی به وسیله AFLP، از ۱۰۲ و ۵۷۰ ترکیب آغازگری استفاده کردند، اما آنها باند اختصاصی در نرها نیافتند. از لحاظ تئوری نیافتن نشانگرهای جنسی می تواند دلیلی بر عدم وجود سیستم تعیین جنسیت ژنتیکی و فعال بودن سیستم تعیین جنسیت محیطی تحت تاثیر عواملی نظیر درجه حرارت، مدت زمان تابش نور، pH، شوری و سایر متغیرهای فیزیکی باشد (Tave 1993; Devlin and Nagahama 2002). اما در چندین گونه ماهی آزاد، مکانیسم ژنتیکی تعیین جنسیت به وسیله سیستم کروموزومی XY مشخص شده است. اگر چه شواهدی وجود دارد که فاکتورهای محیطی از قبیل دما یا مکان‌های ژنی تنظیم کننده جنسیت ممکن است در بیان فنوتیپ جنسی تاثیرگذار باشند (Davidson et al. 2009). یکی دیگر از عواملی که می تواند در عدم شناسایی نشانگرهای جنسی دخیل باشد، وجود تنوع بیش از حد در میان افراد مورد مطالعه است. Iturra et al. (1998) با استفاده از روش RAPD، نشانگر جنسی در ماهی نر یکی از نژادهای قزل‌آلای رنگین کمان شناسایی نمودند که ماهیان ماده فاقد آن بودند. این نشانگر در تفکیک نژاد دیگر قزل‌آلا نشان داد که توالی مذکور علاوه بر ماهیان نر در ماهیان ماده نیز یافت می شود. ایشان با توجه به نتایج به دست آمده گزارش نمودند که نشانگرهای جنسی قزل‌آلای رنگین کمان تنها در ژنوم نژادهای مورد مطالعه قابل شناسایی بوده است و در سطح جمعیت‌های دیگر قابل استفاده نیست که دلیل آن نیز تفاوت زیاد میان جمعیتهای پرورشی می باشد. از آنجایی که ماهیان آزاد استفاده شده در این تحقیق از رودخانه‌های مختلف صید شده‌اند امکان دارد وجود تنوع ژنتیکی مانع شناسایی یک نشانگر جنسی در آنها شده باشد. هرچند باید به این موضوع توجه داشت که تعیین



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.2.3 ]

جنسیت در آزادماهیان به دلیل مضاعف بودن بیشتر ژنوم آنها امری دشوار است؛ همچنین مکان‌های ژنی تعیین جنسیت در آنها وجود دارد که درون ژنوم، ترانسپوزون (جابه‌جا) می شوند. در نتیجه، این امر باعث قطع پیوستگی جنسی بین گونه‌ها می شود، این مشاهده این فرضیه را که گونه‌های خیلی نزدیک کلید اصلی تعیین جنسیت متفاوت دارند را تایید می کند (Davidson et al. 2009) . Griffiths et al. (2000) بیان نمودند قابلیت دسترسی به نشانگر اختصاصی جنسی با شرکت نسبی ژنوتیپ و محیط در تعیین جنسیت تعیین می شود و به دلیل نسخه‌برداری عناصر ژنتیکی متحرک، توالی تکراری و نواحی شبه آتوزومی در کروموزوم Y، بیشتر DNA های آن بی مانند نیستند.

اما، Flip et al. (2005) در بررسی نشانگرهای وابسته جنسی در قزل‌آلای رنگین کمان از روش (AFLP) استفاده نمودند. آنها ۴۸۶ ترکیب آغازگر مختلف را با استفاده از روش sex-typed pool (مخلوط DNA افراد یک جنس به منظور حذف تفاوت های فردی) بررسی کردند که از این میان ۱۹ ترکیب بسط مرتبط با جنسیت در نمونه های مخلوط شده دی ان ای بروز دادند. از ۱۹ ترکیب بدست آمده، ۱۸ عدد برای تعیین جنسیت افراد و تهیه نقشه ژنتیکی حاوی اطلاعات هستند. نشانگرهای AFLP وابسته به کروموزوم Y نسبتاً وابسته به نژاد هستند، که بیانگر چندشکلی ژنتیکی داخل گونه ای در کروموزوم Y قزل‌آلا می باشند. آنها بیان نمودند روش AFLP سیستم نشانگری مؤثری برای آشکارسازی مکان‌های ژنی چند شکل و تهیه نقشه پیوستگی فراهم می کند. رویکرد AFLP در ترکیب با روش sex-typed pool به آنالیز سریعی برای تعیین مکان‌های ژنی وابسته به جنس در قزل‌آلای رنگین کمان منتهی می گردد. همچنین یک نشانگر ژنتیکی دال بر نقشه پیوستگی کروموزوم Y در ماهی آزاد چینوک، ماهی آزاد چام و ماهی آزاد کوهو در تحقیقی توسط Brunelli and Thorgaard (2004) با استفاده از این نشانگر مولکولی در جنین های هاپلوئید سالمون چینوک که به وسیله آندروژنز تولید شده بودند، بدست آمد. نواحی‌ای که بسط اختصاصی جنسی را نشان دادند، شامل یک ژن کاذب مشخص از یک چارچوب خوانش باز بودند که در همه آزادماهیان اقیانوس آرام مورد بررسی (بصورت غیر وابسته به جنس) وجود داشتند. آزمایش یاد شده هرچند برای استفاده در ماهی آزاد چشم درشت (sockeye) امید بخش بود، اما برای قزل‌آلای رنگین کمان یا ماهی آزاد صورتی (*Oncorhynchus gorbuscha*) موفقیت آمیز نبود. آنها بیان کردند که نتایجشان برای جداسازی توالی اختصاصی جنسی در گونه‌های دیگر ماهی قابل اجراست. این نشانگر جنسی (OtY2-WSU) در پرورش آزادماهیان، در مطالعات تکاملی کروموزوم Y و در بررسی احتمال وقوع تغییر جنسیت در آزادماهیان اقیانوس آرام کاربرد دارد.

بنابراین می توان با به کارگیری ترکیبات آغازگری بیشتر، بدست آوردن توالی کروموزوم جنسی و یا آزمایش نشانگرهای جنسی یافت شده در آزادماهیان دیگر روی گونه بومی، به یافتن نشانگر جنسی در ماهی آزاد دریای خزر پرداخت. همچنین پیشنهاد می گردد بررسی و تعیین نقشه ژنتیکی در گونه مورد مطالعه برای انتخاب یا یافتن مناطقی است که نوترکیبی کمتری داشته باشند و شاید بتوان از آنها به عنوان نشانگر استفاده کرد.

سپاسگذاری

از کلیه عزیزانی که طی مراحل اجرایی پروژه از حمایت‌های بی دریغ آنان بهره‌مند شدیم، بویژه مدیریت‌های محترم مرکز مطالعات و پژوهش‌های خلیج فارس و مرکز تحقیقات و توسعه زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس قدردانی می گردد.

## منابع

Baroiller JF, Guiguen Y (2001) Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in gonochoristic fish. EXS 91:177-201.

Benfey TJ (2001) Use of sterile triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) for aquaculture in New Brunswick, Canada. ICES Journal of Marine Science 58:525-529.

Brunelli JP, Thorgaard GH (2004) A new Y-chromosome-specific marker for Pacific salmon. Transactions of the American Fisheries Society 133:1247-1253.

Brunelli JP, Wertzler KJ, Sundin K, Thorgaard GH (2008) Y-specific sequences and polymorphisms in rainbow trout and Chinook salmon. Genome 51:739-748.

Bull JJ (1983) Evolution of Sex Determining Mechanisms. Benjamin/Cummings. Menlo Park, CA. 316 pp.

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



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.2.3 ]

Davidson WS, Huang TK, Fujiki K, von Schalburg KR, Koop BF (2009) The Sex Determining Loci and Sex Chromosomes in the Family Salmonidae. Sex Development 3:78-87.
Devlin RH, McNeil BK, Groves TDD, Donaldson EM (1991) Isolation of a Y-chromosomal DNA probe capable of determining genetic sex in Chinook salmon (*Onchorhynchus tshawytscha*). Can J Fish Aquat Sci 48:1606-1612.
Devlin RH, Biagi CA, Smailus DE (2001) Genetic mapping of Y-chromosomal DNA markers in Pacific salmon Genetica 111:43-58.
Devlin RH, Nagahama Y (2002) Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture 208: 191-364.
Dorafshan S, Kalbassi MR, Pourkazemi M, Majazi Amiri B, Soltan Karimi S (2007) Effects of triploidy on the Caspian salmon (*Salmo trutta caspius*) haematology. Fish Physiology and Biochemistry 34:195-200.
Felip A, Fujiwara A, Young WP, Wheeler PA, Noakes M, Philips RB, Thorgaard GH (2004) Polymorphism and differentiation of rainbow trout Y chromosomes. Genome 47:1105-1113.
Felip A, Young WP, Wheeler PA, Thorgaard GH (2005) An AFLP based approach for the identification of sex-linked markers in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). Aquaculture 247:35-43.
Griffiths R, Orr KJ, Adam A, Barber I (2000) DNA sex identification in the three-spined stickleback. Fish Biology 57:1331-1334.
Iturra P, Medrano JF, Bagley M, Lam N, Vergara N, Marin JC (1998) Identification of sex chromosome molecular markers using RAPDs and fluorescent in situ hybridization in rainbow trout. Genetica 101:209-213.
Iturra P, Bagley M, Vergara N, Imbert P, Medrano JF (2001) Development and characterization of DNA sequence OmyP9 associated with the sex chromosomes in rainbow trout. Heredity 86:412-419.
Kalbassi MR, Dorafshan S, Pourkazemi M, Amiri (2009) Triploidy induction in the Caspian salmon *salmo trutta caspius* by heat shock. Journal of Applied Ichthyology 25: 104-107.
Kalbassi MR, Dorafshan S (2010) Optimization of UV Irradiation to Induce Gynogenesis in the Endangered Caspian Salmon, Salmo trutta caspius: Emphasising "Hertwig Effect" and Photoreactivation. Journal of Biotechnology 150: 566-566
Kazanchev AN (1981) Fishes of Caspian Sea and its watershed area. Translated by: A. Shariati, 1992. Iranian Fisheries Organization. 171p. (In Farsi).
Keyvanshokooh 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.
Keyvanshokooh S, Kalbassi MR, Hosseinkhani S, Vaziri B Comparative Proteomics Analysis of Male and Female Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) Gonads (2009) Animal Reproduction Science 111: 361-368.
Kiabi BH, Abdoli A, Naderi M (1999) Status of fish fauna in the south Caspian basin of Iran. Zoology in the Middle East 18:57-65.
Liu ZJ, Cordes JF (2004) DNA Marker Technologies and their Application in Aquaculture Genetics: Aquaculture 238:1-37.
Quillet E, Faure A, Chevassus B, Kreig F, Harache Y, Arzel J, Metailler R, Boeuf G (1992) The potential of brown trout (*Salmo trutta L.*) for mariculture in temperate waters. Icelandic Agricualture Science 6:63-76.
Sedgwick SD (1995) Trout farming handbook, 5th edn. Fishing News Books, Alden Press, Oxford.
Sriphairoj K, Na-Nakorn U, Brunelli JP, Thorgaard GH (2007) No AFLP sex specific markers for *Pangasianodon gigas* and *P. hypophthalmus*. Aquaculture 273: 739-743.
Sonstebo JH, Borgstrom R, Heun M (2007) A comparison of AFLPs and microsatellites to identify the population structure of brown trout (*Salmo trutta L.*) populations from Hardangervidda, Norway. Molecular Ecology 16:1427-1438.
Tave D (1993) Genetics for fish hatchery managers, 2nd ed. Van Nostrand-Reinhold, New York pp. 415.
Thorgaard GH, Bailey GS, Williams D, Buhler DR, Kaattari SL, Ristow SS, Hansen JD, Wintow JR, Bartholomew JL, Nagler JJ, Walsh PJ, Vijayan MM, Devlin RH, Hardy RW, Overturf KE, Young WP, Robison BD, Rexroad C, Palti Y (2002) Status and opportunities for genomics research with rainbow trout. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 133:609-646.
Volff JN, Kondo M, Schartl M (2003) Medaka dmY/dmrt1Y is not the universal primary sex-determining gene in fish. Trends in Genetics 19:196-199.
Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee V, Hornes T, Frijters M, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: A New Technique for DNA Fingerprinting, Nucleic Acid Research 23:4407-4414.
Woram RA, Gharbi K, Sakamoto T, Hoyheim B, Holm LE, Naish K, McGowan C, Ferguson MM, Phillips RB, Stein J, Guyomard R, Cairney M, Taggart JB, Powell R, Davidson W, Danzmann RG (2003) Comparative Genome Analysis of the Primary Sex-Determining Locus in Salmonid Fishes. Genome Research 13:272-280.
Zhang Q, Nakayama I, Fujiwara A, Kobayashi T, Oohara I, Masaoka T, Kitamura S, Devlin RH (2001) Sex identification by male-specific growth hormone pseudogene (GH-Ψ) in *Oncorhynchus masou* complex and a related hybrid. Genetica 111:111-118.



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.2.3 ]