ژنتیک نوین
دوره هفتم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱
صفحه ۲۹۲- ۲۸۵

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

محمدحسین ابراهیمی[1*]، علی شعبانی[2]، حسن سلطانلو[3] و بهاره شعبان پور[4]

۱،۲،۳و۴- 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 آن‌که به‌دلیل 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 آن‌که 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.

واژه‌های کلیدی

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

مقدمه

دریای‌خزر اقامتگاهی برای حدود ۱۱۵ گونه و زیرگونه ماهی است که برخی از آن‌ها شامل گونه‌های بی‌نظیر ماهیان خاویاری همچون فیل‌ماهی (*Huso huso*)، قره‌برون (*Acipenser persicus*)، تاسماهی روسی (*Acipenser gueldenstaedtii*)، شیپ (*Acipenser nudiventris*)، 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

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

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.10.9]

هستند (Abdoli 2000). تاسماهی ایرانی (قره‌برون) در خانواده‌ی آسیپنسریده[1] قرار داشته و به جنس آسیپنسر[1] تعلق دارد و نام علمی آن *A. persicus* است. منشا اجدادی این گونه اوایل میوسن و اواخر پولیوسن 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) وفاصله‌ی 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 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 می شوند. امکان وجود جمعیت‌های تک‌جنس از ماده‌های تولید کننده‌ی خاویار، سود اقتصادی سیستم های 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 و۴ 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 آلای رنگین‌کمان (Felip et al. 2005)، ماهی سه‌خاره (Griffiths et al. 2000)، هاف‌موس‌تانگ‌سول (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 پلیمراز 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.

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

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.10.9]

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 Cloride , 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 به‌مدت ۲۰ دقیقه شیکر 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 به‌مدت ۲۰ دقیقه شیک شده و بدنبال 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 استات‌سدیم سه مولار اضافه شده، سپس به آرامی تیوب‌ها را وارونه نموده و بدنبال آن سانتریفیوژ انجام گردید. مایع رویی را خارج کرده و سپس نمونه‌ها را توسط ۱۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درصد شستشو داده و به دنبال 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 *Mse*I و *Pst*I بود و برش با

جدول۱- نام و ترتیب توالی آداپتورهای مورد استفاده در مرحله‌ی اتصال

آنزیم مربوطه	نام توالی	ترتیب بازها (۳′→۵′)
*Pst*I	*Pst*I-topS	CTCGTAGACTGCGTACATGCA
	*Pst*I-botS	TGTACGCAGTCTAC
*Mse*I	*Mse*I-topS	GACGATGAGTCCTGAG
	*Mse*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 ۲۰-۱۶ ساعت قرار گرفت. سپس توالی آداپتورهای مورد استفاده به انتهای برش‌خورده چسبانده شد. برای این منظور از آداپتور *Mse*I، آداپتور *Pst*I (جدول۱)، 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 و۱۶ 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 رقیق سازی محصول

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.10.9]

جدول۲- مراحل، توالی آغازگر و چرخه دمایی مورد استفاده در مراحل پیش-تکثیر

ردیف	نام توالی	ترتیب بازها (′۳→′۵)
۱	*Pst*I-preamp	GACTGCGTACATGCAGA
۲	*Mse*I-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.

جدول۳- مراحل، توالی آغازگر و چرخه دمایی مورد استفاده در مراحل تکثیر انتخابی

ردیف	نام توالی	ترتیب بازها (′۳→′۵)
۱	*Pst*I-AAC	GACTGCGTACATGCAGAAC
۲	*Pst*I-ACA	GACTGCGTACATGCAGACA
۳	*Pst*I-ACC	GACTGCGTACATGCAGACC
۴	*Pst*I-AGG	GACTGCGTACATGCAGAGG
۵	*Mse*I-CAC	GATGAGTCCTGAGTAACAC
۶	*Mse*I-CAG	GATGAGTCCTGAGTAACAG
۷	*Mse*I-CACA	GATGAGTCCTGAGTAACACA
۸	*Mse*I-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-Rad) در اندازه‌ی ۴۰×۲۱ سانتی‌متر و به ضخامت ۰/۴ میلی‌متر به کار رفته و قابلیت تفکیک باندها را در سطح یک نوکلئوتید دارد. همچنین از تکنیک رنگ‌آمیزی نیترات 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 باندها 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. 1991; Iturra et al. 1997; Kovacs et al. 2001) 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

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

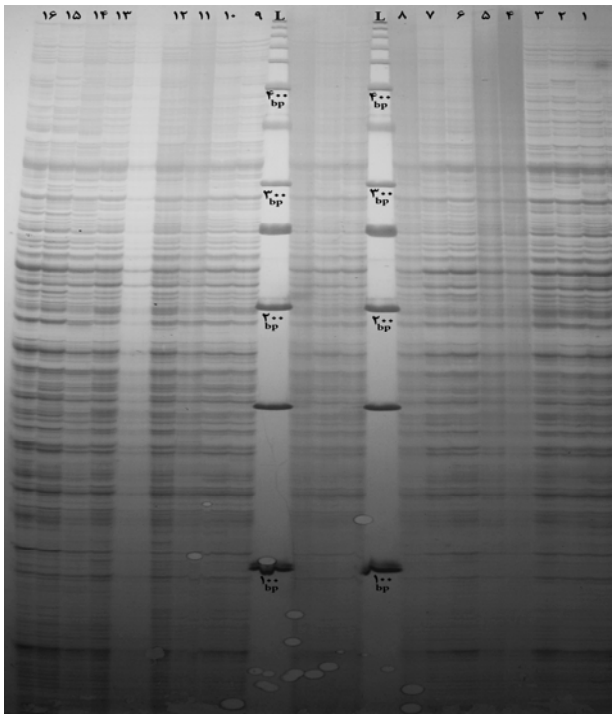
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.10.9]

جدول۴- میانگین تعداد باند تولیدی به وسیله‌ی هر ترکیب آغازگری در نمونه‌های مورد آزمون (M: *MseI*؛ P: *PstI*- 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

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. Keyvanshokooh 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،Keyvanshokooh 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.



شکل۱- 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[1] می‌باشد.

[1] Ladder

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.10.9]

(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 کارآیی 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 به‌دلیل 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 اندونوکلئاز 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 *DMRT*1 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[1] نسبت دادند.

۴) کوچکی اندازه‌ی توالی‌های وابسته به جنس و عدم شناسایی آن ها 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 (۱-۵ kb) می‌باشند. Keyvanshokooh 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. Keyvanshokooh 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 Keyvanshokooh et al. (2007) نیز در مورد فیل‌ماهی بیان داشتند که کروموزوم‌های جنسی چندان متفاوت و هترومورف نمی‌باشد. Li et al. (2002) نیز در مورد گونه‌ی *Tetraodon nigroviridis* به همین نتیجه رسیدند. Keyvanshokooh et al. (2009) 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

[1] Gene dosage effect

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

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.10.9]

وجود کروموزوم‌های هتروموروف جنسی را در این ماهیان رد کرده بودند مطابق بود.) مورد دوم با توجه به نتایج حاصل از مطالعات مختلف و تشخیص هتروگامتی ماده‌ها در چند گونه از ماهیان خاویاری محتمل‌تر است. ضمن آن‌که تنوع زیاد بین فردی در توالی‌های وابسته به جنس نیز دور از ذهن نیست، در این زمینه Keyvanshokooh et al. (2009) این نظریه را نیز مطرح نمودند.

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 systematic, 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.

Kednapat 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.

Keyvanshokooh 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).

Keyvanshokooh 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.

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.

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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.10.9]

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.

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

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.10.9]