جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بررسی تعیین مارکر جنسیت در تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

مهتاب یارمحمدی[1*]، محمد پورکاظمی[1]، احمد قاسمی[2] ، محمد حسن زاده صابر[1]، محمد رضا نوروزفشخامی[1] و شهروز برادران نویری[1]

[1] رشت، انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری، بخش ژنتیک

[2] بوشهر، دانشگاه خلیج فارس، مرکز تحقیقات و مطالعات خلیج فارس

تاریخ دریافت: ۸۸/۷/٤ تاریخ پذیرش: ۸۹/٤/۲۷

چکیده

با توجه به طولانی بودن سن بلوغ در تاسماهیان و نیز به دلیل عدم وجود تفاوتهای مورفولوژیک بین ماهیان نر و ماده حتی در ماهیان مولد، تشخیص جنسیت در این گروه از ماهیان با مشکلاتی همراه است. در این تحقیق بر اساس تکنیک AFLP و با استفاده از ۱۰۰ جفت ترکیب پرایمر، ژنوم ۱۰ نمونه ماهی نر و ۱۰ نمونه ماهی ماده تاسماهی ایرانی در حوضه جنوبی دریای خزر مورد بررسی قرار گرفت. بررسی حدود ۳۷۷۱ باند که ۱۱۳۲ باند آن پلی مورفیک بود نشان داد که هیچ کدام از باندهای مذکور مربوط به ژن تعیین جنسیت در این دو جنس نمی باشد. به عبارت دیگر نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که با استفاده از AFLP ، بین ژنوم نر و ماده در این گونه هیچ اختلافی وجود نداشت و الگوی باندی یکسانی در هر دو جنس مشاهده گردید. با توجه به نتایج این تحقیق و تحقیقات مشابه انجام شده در مورد تاسماهیان به نظر می رسد که احتمالاً کروموزومهای جنسی در این گونه وجود ندارد و یا در صورت موجود بودن، در تحقیق حاضر مورد شناسایی قرار نگرفته است.

واژه های کلیدی : تاسماهی ایرانی، مارکر جنسیت، AFLP، دریای خزر، *Acipenser persicus*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۳۲۵۷٤۳۷۲٤، پست الکترونیکی: mahtabyarmohammadi@gmail.com

مقدمه

ذخایر ماهیان خاویاری جهان و دریای خزر به علت صید بی رویه و غیر مجاز، ورود انواع آلودگیها و نیز از بین رفتن زیستگاههای طبیعی آنها کاهش شدیدی یافته است (۳، ۵، ٦ و ۷). بنابراین به منظور جلوگیری از فشار صید روی ذخایر طبیعی و جلوگیری از خطر انقراضشان باید نسبت به پرورش مصنوعی آنها در محیطهای پرورشی اقدام نمود. 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 در آنها بسیار مشکل می باشد. در پرورش تاسماهیان، تعیین جنسیت ماهیان در مراحل اولیه پرورش به منظور تفکیک نر ها جهت تولید گوشت و ماده ها جهت تولید خاویار دارای اهمیت زیادی می باشد. در حال حاضر تشخیص جنسیت ماهیان خاویاری با استفاده از روش تکه برداری از گناد و انجام مطالعات بافت شناختی (۱، ٤ و ۹) و اندازه گیری سطوح هورمونی (۵) امکان پذیر است که استفاده از این روشها علاوه بر وقت گیر بودن می تواند استرس زا بوده و نیز مخاطراتی را برای ماهی مورد نظر به همراه داشته باشد. علاوه بر این در روش بافت شناسی، ماهیان طبیعی و پرورشی مورد نظر باید به ترتیب حداقل چهار ساله (۹) و یکساله باشند (۱).

یکی از راههای تشخیص سریع و آسان جنسیت در مراحل

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

اولیه زندگی، استفاده از مارکرهای DNA، مبتنی بر تکنیکهای PCR می باشد. چنین مارکرهایی در گونه هایی که تعیین جنسیت به صورت ژنتیکی انجام می شود و یک جنس دارای کروموزوم مشخص و یا توالی DNA وابسته به جنس می باشد، وجود دارد (۸). ماهیان خاویاری دارای تعداد زیادی کروموزوم و میکروکروموزوم می باشند و وجود کروموزومهای جنسی هتروموروفیک در آنها تا کنون گزارش نشده است (۱۱، ۱۷ و ۲۸).

تعداد مساوی نرها و ماده ها در شرایط متفاوت پرورشی، وجود مکانیسم تعیین جنسیت ژنتیکی و همچنین مطالعه با استفاده از ماده های ژینوژنز در تاسماهی سفید (*Acipenser transmontanus*) (۲۹)، تاسماهی بستر (فیل ماهی ماده × استرلیاد نر) (۲۵) و تاسماهی پوزه کوتاه (*Acipenser brevirostrum*) (۱۰)، مکانیسم تعیین جنسیت هتروگامتی ماده (ماده WZ و نر ZZ) را مشخص نموده است.

امروزه برخی از روشهای ژنتیک مولکولی به عنوان روشی دقیق و بی خطر در تشخیص جنسیت موجودات استفاده می گردد (۱٤، ۳۱ و ۳۲) از جمله این روشهای مولکولی، روش AFLP (تفاوت طول قطعه های حاصل از تکثیر) است که در سال ۱۹۹۵ توسط Vos و همکاران ابداع و معرفی گردید(۳۰). در مقایسه با مارکرهای مولکولی دیگر، AFLP دارای عملکرد بالایی در ارتباط با تکرارپذیری، قدرت تفکیک بالا و تعداد زیاد مارکرهای قابل آنالیز در واکنش PCR می باشد. AFLP، یک روش بررسی گسترده ژنوم است که محدود به یک منطقه خاص ژنوم نمی شود و توسط پرایمرهایی با نوکلئوتیدهای انتخابی قابل تکثیر است (۳۰).

تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*, Borodin 1897) از جمله ماهیان خاویاری است که بیشترین پراکنش آن در جنوب دریای خزر و در محدوده آبهای ایران می باشد و در یک دهه گذشته حدود ۲۵ درصد خاویار ایران در بین ۵ گونه از تاسماهیان خزر را تولید می کرد، به طوری که در سالهای اخیر به علت فشار صید، تولید گوشت و خاویار آن کاهش قابل ملاحظه ای یافته است (۳ و ۲۷).

هدف از پژوهش حاضر، استفاده از روش DNA-AFLP برای نخستین بار در جداسازی و تفکیک باند DNA به عنوان نشانگر مولکولی جهت تشخیص جنسیت در گونه تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و همچنین یافتن نشانگر مناسب و تعیین حداقل سن مورد نیاز جهت تعیین جنسیت در این گونه می باشد.

مواد و روشها

در این بررسی از انتهای باله دمی ۲۰ نمونه تاسماهی ایرانی (۱۰ نمونه ماده و ۱۰ نمونه نر) با گناد جنسی مشخص در مجتمع تکثیر و پرورش شهید بهشتی و در فصل تکثیر (فصل بهار و زمستان ۱۳۸۵) نمونه برداری انجام شد. نمونه ها در داخل میکروتیوبها به همراه الکل اتانول مطلق قرار گرفت و جهت انجام آزمایشات به بخش ژنتیک انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان رشت منتقل گردید. استخراج DNA با استفاده ازروش فنل کلروفرم انجام پذیرفت (۲٦). به منظور ارزیابی کمی و کیفی DNA از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و اسپکتروفتومتر (CECIL, CE, Italy) استفاده گردید.

مراحل AFLP بر اساس روش Vos و همکاران (۱۹۹۵) با کمی تغییر به شرح ذیل انجام گردید (۳۰):

در مرحله Digestion، هضم ۲۵۰ نانوگرم از DNA ژنومی توسط ۵ U از آنزیمهای برشگر *Eco*RI و *Mse*I (Fermentas, France) به مدت ۹۰ دقیقه و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به انجام رسید. سپس در مرحله Ligation، الحاق آداپتورهای *Eco*RI و *Mse*I (با غلظت ۵۰mM) به همراه آنزیم الحاق دهنده T4 DNA Ligase و بافر الحاق به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد صورت گرفت.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

جدول ۱- توالی آداپتورها و پرایمرهای مورد استفاده در تکنیک DNA-AFLP

*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′
*Mse*I+4 primers	5′-GAT GAG TCC TGA GTA A **CNN N**-3′

جدول ۲- نوع و ترکیب پرایمرهای استفاده شده در DNA-AFLP در این مطالعه (اعدادی که به صورت underline می باشند شماره پرایمر و بقیه اعداد مربوط به تعداد باندهای پلی مورفیک تولید شده توسط هر جفت پرایمر می باشد).

پرایمر	***E*-AAT 1**	***E*-AAG 2**	***E*-ATC 3**	***E*-ATA 4**	***E*-ACG 5**	***E*-AAA 6**	***E*-AAC 7**	***E*-ACC 8**	***E*-ACA 9**	***E*-ATTA 10**
***M*-CACA 1**	۱ ۷	۲ ۱۷	۳ ۱۲	٤ ۱۷	٥ ٦	٦ ۱۲	۷ ۱٥	۸ ۱۰	۹ ٤	
***M*-CGAA 2**	۱۰ ۷	۱۱ ۲٥	۱۲ ۱٤	۱۳ ۸	۱٤ ٦	۱٥ ٥	۱٦ ۱۲	۱۷ ۱۸	۱۸ ۲۳	
***M*-CGAT 3**	۱۹ ۱۰	۲۰ ۹	۲۱ ۱۸	۲۲ ۲	۲۳ ۲۲	۲٤ ۱۷	۲٥ ۱۹	۲٦ ۲۳	۲۷ ۱٥	
***M*-CCTT 4**	۲۸ ۲۹	۲۹ ۳۰	۳۰ ۱۱	۳۱ ٦	۳۲ ۱۹	۳۳ ۱٦	۳٤ ۱٥	۳٥ ۱۳	۳٦ ۸	
***M*-CATA 5**	۳۷ ۸	۳۸ ۱۸	۳۹ ۱۳	٤۰ ۱۲	٤۱ ۱۷	٤۲ ۲	٤۳ ۱۲	٤٤ ۱۳	٤٥ ۱	
***M*-CATT 6**	٤٦ ۲	٤۷ ۱۱	٤۸ ۱٥	٤۹ ۳۲	٥۰ ۹	٥۱ ۲۸	٥۲ ۲	٥۳ ۷	٥٤ ۳	
***M*-CGTC 7**	٥٥ ۷	٥٦ ٥	٥۷ ۱۰	٥۸ ۲	٥۹ ٦	٦۰ ۱۲	٦۱ ۷	٦۲ ۱٦	٦۳ ۱۲	
***M*-CTGC 8**	٦٤ ۸	٦٥ ۱۲	٦٦ ۷	٦۷ ٥	٦۸ ۱۰	٦۹ ٤	۷۰ ۷	۷۱ ۱۱	۷۲ ۹	
***M*-CCGT 9**	۷۳ ٦	۷٤ ٤	۷٥ ٦	۷٦ ٦	۷۷ ٦	۷۸ ۳	۷۹ ۷	۸۰ ۱۹	۸۱ ۱۲	۱۰۰ ٥
***M*-CAAT 10**	۸۲ ۱٥	۸۳ ٥	۸٤ ۱٦	۸٥ ۷	۸٦ ۱۲	۸۷ ۱۰	۸۸ ۸	۸۹ ۲۰	۹۰ ۱۸	
***M*-CTTC 11**	۹۱ ۱۳	۹۲ ۸	۹۳ ۱۰	۹٤ ۱۰	۹٥ ۱۳	۹٦ ۱۰	۹۷ ۳	۹۸ ٦	۹۹ ۱۹	

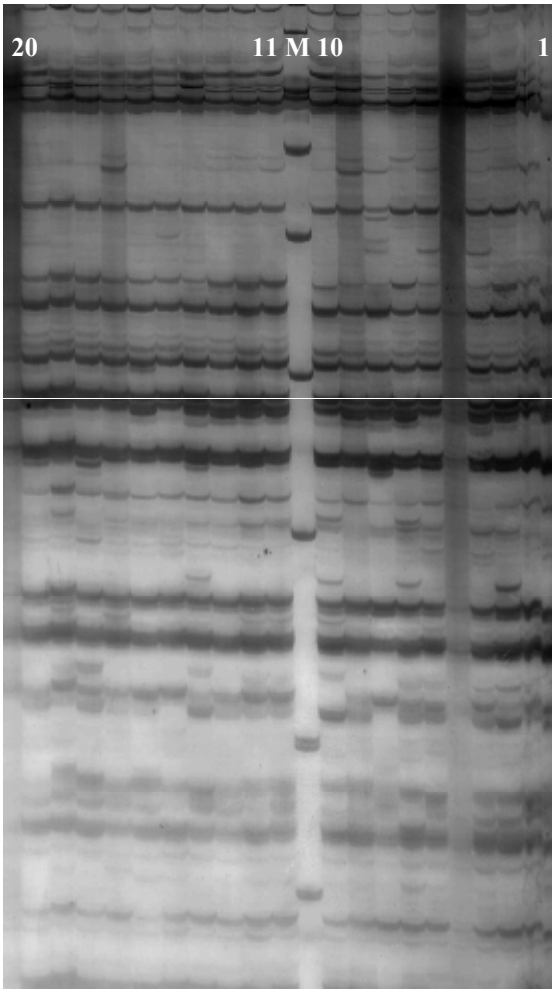
تکثیر قطعات متصل شده به آداپتورها نیز طی دو مرحله، Pre-selective PCR {(محصول مرحله هضم – الحاق به نسبت ۵:۱ رقیق و با آغازگرهای تک نوکلئوتیدی انتخابی در انتهای ´۳ (*Eco*RI+A و *MseI*+C) جهت تکثیر پیش انتخابی (جدول ۱)}) و مرحله Selective PCR (محصولات حاصل مجدداً به نسبت ۱۰:۱ رقیق و با استفاده از ۱۰۰ جفت آغازگر شامل ترکیب پرایمرهای *Mse*+4 و *Eco*+3 تحت چرخه های حرارتی Touchdown تکثیر شدند) انجام گرفت.

در مرحله بعد محصولات PCR با استفاده از ژل پلی آکریل آمید واسرشت ٦ درصد (دستگاه الکتروفورز سکانسر مدل 38×30 -SequiGen ، BIO-RAD) الکتروفورز و رنگ آمیزی به روش نیترات نقره انجام شد. سپس الگوی باندی به دست آمده توسط دستگاه اسکنر (مدل Canon) ثبت گردید.

در ژلهای ثبت شده، اطلاعات به دست آمده در افراد به صورت وجود و عدم وجود باند در هر لوکوس پلی مورفیک به ترتیب به صورت ۱ و ۰ با روش چشمی ثبت گردید. همچنین تعداد آللهای پلی مورف، تعداد آللهای مونومورف و تعداد کل آللها برای هر ترکیب پرایمر در دو گونه مورد مطالعه به صورت دستی شمارش و محاسبه گردید.

نتایج

نتایج حاصل از مشاهده و شمارش الگوهای باندی AFLP با استفاده از ۱۰۰ جفت ترکیب پرایمری نشان داد که در مجموع در تاسماهی ایرانی تعداد ۳۷۷۱ باند در محدوده ٤۰ bp الی ۱۰۰۰ bp حاصل گردید که از این تعداد، ۱۱۳۲ باند (حدود ۳۰ درصد کل باندها) پلی مورف بود. البته هیچیک از باندهای مشاهده شده وابسته به جنس نبودند و اختلاف مشاهده شده فقط در حد تنوع بین افراد داخل گونه بود (شکل ۱ و۲). بیشترین تعداد باند پلی مورفیک مربوط به ترکیب پرایمر *M*-CATT , *E*-ATA با ۳۲ باند پلی مورف و کمترین باند مربوط به ترکیب پرایمر *E*-ACA, *M*-CATA با ۱ باند پلی مورف بود. ترکیب پرایمرهای استفاده شده و تعداد باندهای پلی مورفیک تولید شده در جدول ۲ ارائه شده است.

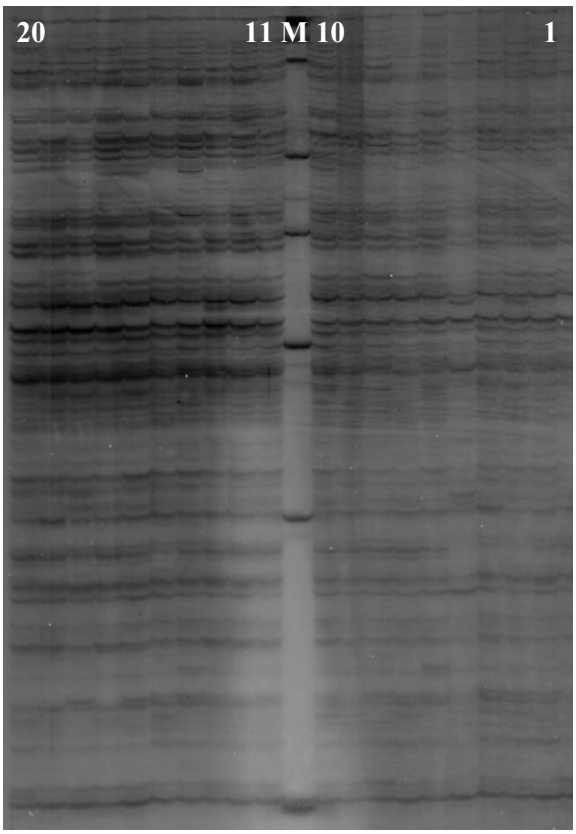


شکل۱- قسمتی از ژل پلی آکریل آمید واسرشت مربوط به ترکیب پرایمر **(E-ATC, M-CAAT)** در تاسماهی ایرانی (شماره های ۱ تا ۱۰ مربوط به تاسماهی ایرانی ماده و ۲۰-۱۱ مربوط به تاسماهی ایرانی نر و **M** مارکر مولکولی **LadderVIII(Roche)** می باشد).

بحث و نتیجه گیری

به طور کلی جداسازی و تشخیص مارکرهای جنسی در DNA ژنومی و گناد تاسماهیان اطلاعات مهمی را برای

درک روند تکامل و همچنین مکانیسم تعیین جنسیت و تمایز گنادی در جنسهای تاسماهیان فراهم می آورد.



شکل۲- قسمتی از ژل پلی آکریل آمید واسرشت مربوط به ترکیب پرایمر **(E-AAA, M-CGTC)** در تاسماهی ایرانی (شماره های ۱ تا ۱۰ مربوط به تاسماهی ایرانی ماده و ۲۰-۱۱ مربوط به تاسماهی ایرانی نر و **M** مارکر مولکولی **LadderVIII (Roche)** می باشد).

در این تحقیق از ۱۰۰ جفت ترکیب پرایمرهای *Mse*+4 و *Eco*+3 نشانگر AFLP جهت مطالعه ژنوم نر و ماده تاسماهی ایرانی استفاده گردید، به طوری که با توجه به نتایج این تحقیق الگوی باندی یکسانی در هر دو جنس مشاهده گردید. به عبارت دیگر بررسی حدود ۳۷۷۱ باند در تاسماهی ایرانی نشان داد که هیچ کدام از باندهای مذکور مربوط به ژن تعیین جنسیت در این دو گونه نبود.

نتایج این تحقیق مشابه تحقیقات قبلی در مورد تاسماهیان و روش مورد استفاده بود، به طوری که Wuertz و همکاران (۲۰۰٦) ، از ۳۹٦ ترکیب پرایمرهای AFLP در تاسماهی ایتالیایی (*A. naccarii*)، ۱۲۸ ترکیب پرایمر در تاسماهی سیبری (*A. baerii*) و ۲۹٦ ترکیب پرایمر در تاسماهی روسی (*A. gueldenstaedtii*)، به ترتیب ۷۷۰۰ ، ٤۹۰۰ و ۹۱۰۰ باند DNA تولید نمودند که حداقل ۵۰ و حداکثر٦۰۰ جفت باز طول داشتند اما هیچ مارکر جنسیتی شناسایی نشد(۳۳). محققین مذکور همچنین در روش RAPD ، از ۲٦۰، ۲٦۰ و ۱۸۰ پرایمر به ترتیب برای نمونه های *A. naccarii*،*A. baerii* و (استرلیاد) *A. ruthenus* استفاده نمودند که در مجموع به ترتیب حدود ۸۰۰ ، ۱۱۰۰ و ۱۰۰ مارکر مولکولی شناسایی شد (طول قطعه تکثیر شده ۱۰۰ تا ۱۵۰ جفت باز بود) و هیچ مارکر جنسیتی شناسایی نشد. همچنین در روش ISSR (استفاده از پرایمرهای دارای لنگر تحلیل رفته) از ۲۸ پرایمر(متناسب با ٦۷ درصد از پرایمرهای ارزیابی شده) در*A. naccarii* ، ۳۹ پرایمر (۷٦ درصد) در *A. baerii* و ۲۷ پرایمر (۵۵ درصد) در *A. gueldenstadtii* حدود ۲۷۰، ۳۰۰ و ۱۳۰ مارکر (۱۰۰ تا ۲۰۰۰ جفت باز) شناسایی شد، اما همانند RAPD و AFLP هیچ مارکر جنسیتی یافت نشد.

پورسیفی و همکاران (۱۳۸۵)، از نشانگر AFLP جهت امکان تعیین جنسیت در ماهی ازون برون استفاده نمودند که نتایج این تحقیق نیز عدم وجود مارکر تعیین جنسیت را مشخص نمود(۲).

در تحقیق دیگری که توسط Keyvanshokooh و همکاران (۲۰۰۷) روی فیل ماهی دریای خزر با استفاده از ۳۱۰ پرایمر RAPD انجام شد، در مجموع از ٤۱٤٦ باند تولید شده، باند اختصاصی جنسیت شناسایی نگردید(۲۰). همچنین در مطالعه دیگری که توسط این محقق و با استفاده از روش پروتئومیکس در تاسماهی ایرانی انجام شد، از مجموع ۵۰ نقطه منحصر به فرد در بیضه و تخمدان تاسماهی ایرانی، هیچ کدام از آنها به طور مستقیم به ژن تعیین جنسیت وابسته نبودند (۲۱).

Hett و همکاران (۲۰۰۵) و Hett و Ludwig (۲۰۰۵) ، ژنهای DMRT1 و SOX9 (با استفاده از این دو ژن،

جنسیت تعداد زیادی از مهره داران از جمله ماهیهای استخوانی شناسایی شده است) را در تاسماهی اروپایی (*Acipenser sturio*) بررسی نمودند، اما حضور اختصاصی این ژنها در جنسی خاص تأیید نشد(۱۵، ۱٦).

Griffiths و همکاران (۲۰۰۰) با استفاده از روش AFLP، دو مارکر اختصاصی جنسیت در ماهی سه خاره *Gasterosteus aculeatus* را شناسایی نمودند(۱٤).

در حالی که روش RAPD برای شناسایی مارکرهای ژنتیکی جنسیت در برخی از گونه های ماهی *Clarias gariepinus* و *Onchorhynchus mykiss* به کار رفته است(۱۸، ۱۹، ۲۲)، اما در سایر ماهیها مانند *Salmo salar* موفقیت آمیز نبود (۲۳).

Mc Gowan و Davidson (۱۹۹۸) نیز اعلام نمودند که با استفاده از ۲۰۰ پرایمر مختلف و بررسی الگوی باندی ماهی آزاد اقیانوس اطلس، تفاوتی در دو جنس نر و ماده مشاهده نشد. آنها بر این عقیده بودند که با توجه به مشخص نبودن کروموزومهای جنسی در کاریوتایپ این ماهی، احتمالاً ژنی که جنسیت این گونه را تعیین می کند دو آللی و جزء ژنهای اتوزومی است (۲٤).

از لحاظ تئوری، نیافتن نشانگرهای جنسی می تواند دلیلی بر عدم وجود سیستمهای تعیین جنسیت ژنتیکی و فعال بودن سیستم تعیین جنسیت محیطی دو گونه مورد مطالعه باشد (۲۳) که در چنین حالتی عوامل متعدد محیطی نظیر درجه حرارت، مدت زمان تابش نور، pH، شوری و سایر متغیرهای فیزیکی، جنسیت یک فرد را تعیین می نماید (۸). بنابراین احتمال عدم وجود سیستم تعیین جنسیت ژنتیکی در تاسماهیان وجود دارد. اما این فرضیه زمانی قطعیت می یابد که با انجام مطالعات دقیق، چگونگی تعیین جنسیت این گونه از نظر ژنتیکی، فیزیولوژیکی و یا محیطی مورد آزمون قرار گیرد. یکی از روشهای سریع جهت بررسی مکانیسم تعیین جنسیت در ماهیان، بررسی کاریوتایپ جنس نر و ماده می باشد(۱۳). در صورتی که کروموزومهای هترومورف در یک جنس مشاهده شود، آن جنس هتروگامت بوده و جنسیت فرزندان را تعیین می نماید. بنابراین آن گونه دارای سیستم تعیین جنسیت ژنتیکی است (۸).

به علت وجود تعداد زیاد کروموزوم در کاریوتایپ ماهیان خاویاری که حدود نیمی از آنها را میکروکروموزومها تشکیل می دهند (۲۹ و ۱۲)، تا کنون وجود کروموزومهای جنسی مشخص در کاریوتایپ این ماهیان گزارش نشده است.

نتایج حاصل از اجرای این پژوهش نشان داد که تفکیک جنسیت تاسماهی ایرانی نر و ماده با استفاده از پرایمرهای به کار رفته در این تحقیق امکانپذیر نمی باشد. با توجه به قابلیت بالای تکنیک AFLP و تعداد ترکیب پرایمرهای نسبتاً بالای مورد استفاده و نیز مشاهده الگوی باندی یکسان در جنس نر و ماده در گونه مذکور، به نظر می رسد که احتمالاً کروموزومهای جنسی در این گونه وجود ندارد و یا در صورت موجود بودن، در تحقیق حاضر مورد شناسایی قرار نگرفته است. نتایج حاضر این نظریه که کروموزومهای هومولوگوس (homologus chromosomes) – که فاکتورهای تعیین جنسیت روی آنها وجود دارد– در گونه های تاسماهیان به طور کامل متمایز نشده اند را حمایت می کند. مطالعه ژنوم تاسماهیان گونه های دیگر به منظور پیدا کردن توالیهای وابسته به جنس بی نتیجه بوده است و در نتیجه نظر فوق را بیشتر تقویت می نماید. گرچه، احتمال یاد شده به طور کامل نمی تواند نتیجه گیری شود و این گمان نیز وجود دارد که ژن جنسی فقط در مراحل اولیه تمایز جنسی عمل نماید. همچنین این احتمال را نیز باید در نظر گرفت که به علت وجود مقدار کم محصولات ژنی وابسته به جنس، حساسیت روشهای مورد استفاده کم می باشد.

تشکر و قدردانی: این تحقیق با حمایت مالی مؤسسه تحقیقات شیلات ایران با کد ۸٤۰۲۹-۰۰۰۰-۰۳-

۲۰۰۰۰۰-۰۲۵-۲ اجرا گردید. بدین وسیله از حمایتهای بی دریغ ریاست محترم مؤسسه آقای دکتر مطلبی و رئیس محترم بخش بیوتکنولوژی آقای دکتر غرقی تشکر و سپاسگزاری می گردد. همچنین از کلیه همکاران محترم در بخش ژنتیک، مسئول محترم بخش فیزیولوژی و بیوشیمی انستیتو آقای مهندس کاظمی، مسئول محترم بخش تکثیر مجتمع شهید بهشتی آقای مهندس حسین محمدی پرشکوه و سایر همکارانی که در طول اجرای این تحقیق همکاری نمودند تشکر و قدردانی می گردد.

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 ۱٦-۱.

۲- پورسیفی. ر. ۱۳۸۵. تعیین جنسیت در تاسماهی ازون برون با استفاده از روش AFLP . پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه فردوسی مشهد. ۷۰ ص .

۳- پورکاظمی، م.، یارمحمدی، م.، برادران نویری، ش.، حسن زاده، م.، چکمه دوز، ف. و رضوانی، س. ۱۳۸٦. ژنتیک مولکولی جمعیت ماهی قره برون و ازون برون حوزه جنوبی دریای خزر با استفاده از مایکروستلایت. وزارت جهاد کشاورزی، سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، گزارش نهایی طرحهای تحقیقاتی. انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری. ٦۳ ص. شماره ثبت ۸٦/۱۲٦۰ .

٤- حلاجیان، ع.؛ کاظمی، ر.، محسنی، م.، بهمنی، م. و یوسفی جور دهی، ا. ۱۳۸٦. 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 ۱٦.

5- Billard, R. 2000. Bilogy and control of reproduction of sturgeon in fish farm. Iranian Journal of Fisheries Science (2) 1-20.

6- Billard, R. and Lecointre, G., 2001. Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. Review. Fish Biol. Fish, Vol. 10, pp. 355-392.

7- Birstein, V.J., 1993. Sturgeon and Paddlefishes: Threaten fishes in need in conservation. Conservation Biology, Vol 7, pp. 773-787.

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

9- 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 Vol. 81, pp. 245 – 252.

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

11- Fontana, F. and Colombo G., 1974. The chromosomes of Italian sturgeons. Experientia, Vol. 30: pp. 739-742.

12- Fontana, F., 1976. Nuclear DNA content and cytometry of erythocytes of *Huso huso* L., *Acipenser naccarii* Bonaparte. Caryologia, Vol. 29, pp. 127-137.

13- Griffith, R. and Tiwari, B., 1993. The isolation of molecular genetic markers for identification of sex. Proc. Natl Acad. Sci. USA 90, 8324-8326.

14- Griffith, R., Orr, K.J., Adam, A., and Barber, I., 2000. DNA sex identification in the three spined stickleback. Journal of Fish biology. Vol. 57, pp. 1331-1334.

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

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

17- Holcik, J., 1986. The freshwater fishes of Europe – General introduction to fishes. Acipenseriformes, vol. I, part II. Wiesbaden, Aula Verlag.

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

19- Ittura, P., Lam, N., de la Fuente, M., Vergara, N. and Medrano, J.F., 2001. Charactrization of sex

chromosomes in rainbow trout and coho salmon using fluorescence in situ hybridization (FISH). Genetica, Vol. 111, pp. 125-131.

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

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

22- Kovacs, B., Egedi, S., Bartfai, R. and Orban, L., 2000. Male – specific DNA markers from African catfish (*Clarias gariepinus*). Genetica, Vol. 110, pp. 267-276.

23- Li, Y.; Hill, J.A., Yue, G.H.; Chen, F. and Orban, L., 2002. Extensive search does not identify genomic sex markers in *Tetradon nigroviridis*, Journal of Fish Biology 61, 1314-1317.

24- McGowan, C., Davidson, W.S., 1998. The RAPD technique fails to detect a male-specific genetic marker in Atlantic salmon. Journal of Fish Biology, Vol. 53, pp. 1134-1136.

25- Omoto, N., Maebayashi, M., Adachi, S., Arai, K. and Yamauchi, K., 2005. Sex ratios of triploids and gynogenetic diploids induced in the hybrid sturgeon, the bester (*Huso huso* female× *Acipenser ruthenus* male). Aquaculture, Vol. 245, pp. 39- 47.

26- Pourkazemi. M., 1996. Molecular and biochemical genetic analysis of sturgeon stocks from the South Caspian Sea. Ph.D. Thesis, University of Wales. Swansea. 266 pp.

27- Pourkazemi M., 2006. Caspian Sea sturgeon conservation and fisheries: past present and future. Journal of Applied Ichthyology, 22, 12–16.

28- Van Eenennam, A.L., 1997. Genetic analysis of sex determination mechanism of white sturgeon (*Acipenser transmontanus* Richardson). PhD dissertation, University of California, Davis.

29- Van Eenennam, A.L., Murray, J.D. and Medrano, J.F., 1998. Miotic analysis of the North American white strgeon, *Acipenser transmontanus* Richarson (Pisces, Acipenseridae), a fish with a very high chromosome number, Genome, Vol. 41, pp. 266-271.

30- Vos P.; Hogers R., Bleeker M.; Reijans M., Van de Lee T. and Hornes M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research, Vol.* 23, pp. 4407-4414.

31- Welsh, J. and Mc Clelland, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, Nucleic Acids Research, Vol. 18, pp. 7213-7218.

32- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, A., 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Research, Vol. 18, pp. 6531-6535.

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

Investigation of sex markers in persian sturgeon (*Acipenser persicus*) with using of AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) markers

Yarmohammadi M.[1], Pourkazemi M.[1], Ghasemi A.[2], Hassanzadeh Saber M.[1], NowrouzFashkhami M.R.[1], Baradaran Noveiri Sh.[1]

[1] International Sturgeon Research Institute, Rasht, I.R. of IRAN

[2] Persian Gulf Research and Studies Center, Persian Gulf University, Boushehr, I.R. of IRAN

Abstract

Considering high age of maturation in sturgeon and with respect to absence of morphological differences in male and female individuals, sex discrimination is always difficult in this group of fishes. In this study we used AFLP technique and 100 primer combinations to screen genome of 10 males and 10 females in Persian sturgeon *(Acipenser persicus)*. Results showed approximately a total of 3771 scorable bands, of which about 1132 bands were polymorphic and were present in both sexes and none of them was specific. According to the results of present study and other studies, it seems that sex chromosomes are not present in both species or maybe the methods utilized couldn't recognize them.

Keywords: Persian sturgeon, Sex determination, AFLP, Caspian Sea, *Acipenser persicus*