فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال دهم، شماره چهارم، زمستان ۱۴۰۱

مقاله پژوهشی

آزمودن تعیین جنسیت مولکولی فیل‌ماهی با استفاده از تکثیر ناحیه اختصاصی ژنوم جنس ماده

شیرین جمشیدی[۱]، مریم منصف شکری[۲]*، علی حلاجیان[۳]، علیرضا شناور ماسوله[۴]، ایوب یوسفی جوردهی[۲]، محمد حسن‌زاده صابر[۵]

تاریخ دریافت: دی ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۴۰۰

چکیده

در آبزی‌پروری تاس‌ماهیان تعیین جنسیت یک چالش بزرگ است، زیرا پرورش جنس ماده به عنوان منبعی ارزشمند برای تولید خاویار، به لحاظ اقتصادی اهمیت دارد و بدین جهت افتراق جنس نر و ماده برای کاهش هزینه‌ها ضروری است. شواهد غیرمستقیم حاکی از آن است که سیستم تعیین جنسیت در تاس‌ماهیان به صورت ZW و جنس ماده تعیین کننده جنسیت است. همین وضعیت مبنای کشف لوکوس دخیل در تعیین جنسیت تاس‌ماهیان در بررسی‌های ژنومی بود. هدف از انجام این مطالعه، شناسایی جنس نر و ماده مولدین فیل‌ماهی برای اولین بار در ایران با استفاده از آغازگرهای اختصاصی لوکوس جنس ماده است. بدین منظور نمونه باله دمی از ۲۳ مولد فیل‌ماهی (۱۴ قطعه ماده و ۹ قطعه نر) جمع‌آوری شد. DNA ژنومی به روش آمونیوم استات استخراج شد و پس از ارزیابی کمی و کیفی DNA استخراج شده، از آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر قطعه کوچکی از لوکوس اختصاصی جنس ماده استفاده شد. نتایج نشان داد که یک قطعه با اندازه کمی بزرگ‌تر از ۱۰۰ جفت باز در ۱۴ عدد جنس ماده تکثیر شد و هیچ گونه تکثیر اختصاصی برای جنس نر مشاهده نشد. بنابراین آزمون مولکولی می‌تواند به عنوان روشی مطمئن، کارآمد، نسبتا کم‌هزینه و غیرتهاجمی برای تعیین جنسیت زودهنگام فیل‌ماهی در ایران مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: *تاس‌ماهیان، فیل‌ماهی، روش مولکولی، تعیین جنسیت.*

۱- استادیار بخش ژنتیک و بیوتکنولوژی، انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران.
۲- استادیار بخش فیزیولوژی و بیوشیمی، انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران.
۳- دکتری شیلات، بخش فیزیولوژی و بیوشیمی، انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران.
۴- استادیار بخش بهداشت و بیمارها، انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران.
۵- مربی بخش ژنتیک و بیوتکنولوژی، انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران.
* نویسنده مسئول: monsef_shokri@yahoo.com
DOI: 10.22124/japb.2022.21408.1454

مقدمه

به دلیل بلوغ جنسی دیرهنگام تاس‌ماهیان و بویژه گونه فیل‌ماهی (*Huso huso*)، تشخیص جنسیت آن با استفاده از ویژگی‌های ظاهری از زمان لاروی، ماهی جوان و حتی در زمان پیش‌بلوغ و بلوغ امکان‌پذیر نیست و چون در بیشتر موارد هدف از پرورش این گونه استحصال خاویار است، از این رو تعیین زودهنگام جنسیت در این گونه می‌تواند در بهبود شاخص‌های اقتصادی در مزارع پرورش ماهیان خاویاری از جهت برنامه‌ریزی برای بازگشت سرمایه در تولید خاویار (پرورش تک‌جنس ماده) برای پرورش دهندگان مقرون به صرفه باشد (حلاجیان، ۱۳۸۶)، زیرا که تاس‌ماهیان از نسبت جنسی ۱ به ۱ برخوردار هستند (Chapman et al., 1996)، یعنی نصف جمعیت نر هستند. روش نمونه‌گیری از بافت گناد (Biopsy) یکی از روش‌های دقیق برای تعیین جنسیت است، ولی روشی تهاجمی است (حلاجیان و همکاران، ۱۳۹۰؛ Vecsei et al., 2003). امروزه از روش‌های رایج تعیین جنسیت مانند اولتراسوند و آندوسکوپی در ماهیان خاویاری استفاده می‌شود ولی باید خاطر نشان کرد که روش‌هایی که در حال حاضر برای تعیین جنسیت استفاده می‌شوند از حیث قطعیت تشخیص در درجه بالایی قرار ندارند و در طی غربالگری‌های متداول، تشخیص بین نرها، نابالغین و ماده‌ها در مرحله پیش‌زرده‌سازی با ابهاماتی همراه است (Wuertz et al., 2018). از طرفی روش‌های جراحی و لاپارسکوپی به جهت زخم و جراحت، ممکن است مخاطراتی برای ماهی داشته باشد (Chebanov and Galich, 2013). به واسطه مشکلات یاد شده، تاکنون مطالعات زیادی برای یافتن تفاوت بین جنس نر و ماده در سطح سلولی و مولکولی انجام شده است که موفقیت‌آمیز نبودند مثل یافتن کروموزوم جنسی نامتجانس (Heteromorphic) (Fontana and Colombo, 1974; Van Eenennaam, 1997) یا تلاش در یافتن نشانگرهای مولکولی وابسته به جنس با استفاده از روش‌ها و تکنیک‌های مختلف اشاره کرد که در تشخیص جنسیت ماهیان خاویاری موفقیت‌آمیز نبود (Keyvanshokooh and Gharaei, 2010; Fajkowska et al., 2019). مطالعات در سال‌های اخیر نشان داده است بسیاری از ژن‌های مرتبط با تکامل و تمایز در مهره‌داران در ماهیان خاویاری نیز مشابه است (Fajkowska et al., 2019). به دلیل عدم وجود نشانگر ژنتیکی مشخص

برای تاس‌ماهیان، دانشمندان از تفاوت در الگوی بیان ژن‌ها و پروتئین‌ها برای تشخیص جنسیت در تاس‌ماهیان استفاده کردند (Keyvanshokooh and Vaziri, 2008; Chen et al., 2018; Degani et al., 2021; Xiao et al., 2021). مطالعات بیان ژن، برخی ژن‌های کلیدی را که ممکن است در تعیین جنسیت و تمایز ماهیان خاویاری نقش داشته باشند، معرفی کردند (Degani et al., 2021). Xiao و همکاران در سال ۲۰۲۱ تفاوت در بیان ژن ZP 3.2 در باله شکمی ماهیان خاویاری نر و ماده را به عنوان یک روش غیرتهاجمی برای امکان تعیین جنسیت تاس‌ماهیان چینی (*Acipenser sinensis*) بالای دو سال معرفی کردند. Degani و همکاران در سال ۲۰۲۱ تفاوت در بیان ژن ATP6 را در تاس‌ماهی روسی (*Acipenser gueldenstaedtii*) نر و ماده ۴ ساله گزارش کردند، ولی با این وجود به غیرعملی بودن شناسایی جنسیت بر اساس بیان ژن در بافت غیرگناد و نیاز به شناسایی نشانگر ژنتیکی برای تعیین جنسیت تاکید کردند. مطالعات در سال‌های اخیر نشان داده است که سیستم تعیین جنسیت در بسیاری از تاس‌ماهیان به صورت ZW است و جنس ماده دارای جایگاه تعیین جنسیت (Sex Determining Locus) است (Nace et al., 1970; Van Eenennaam, 1997; Hassanzadeh Saber and Hallajian, 2014). از طرفی با توسعه تکنولوژی‌های توالی‌یابی با توان عملکردی بالا (نسل جدید توالی‌یابی، Next Generation Sequencing) امکان توالی‌یابی هزاران و یا میلیون‌ها توالی به صورت هم زمان ایجاد شده است (مصلایی و همکاران، ۱۳۹۴). به همین دلیل، پژوهشگران این نوید را داده بودند که تکنیک‌های جدید تعیین توالی و انجام پروژه توالی‌یابی کل ژنوم دانش ما را در مورد تعیین جنسیت و تمایز اولیه در ماهیان خاویاری افزایش خواهد داد (Wuertz et al., 2018). در همین راستا، Kuhl و همکاران در سال ۲۰۲۱ با استفاده از توالی‌یابی خزانه ژنی (Pool Sequencing) و استفاده از تکنیک بازسازی در مقیاس کروموزوم (Chromosome Scale Assembly)، یک قطعه ۱۶ کیلو بازی ویژه را در ژنوم جنس ماده ماهیان خاویاری شناسایی کردند (BioProject Accession No. SRX9341541) که در طی روند تکامل واگرا (Divergenic Evolution) از یک جد مشترک بیش از ۱۸۰ میلیون سال قبل منشا گرفته‌اند. این کشف اخیر یک دستاورد برجسته در زیست‌شناسی تکامل است

و می‌تواند برای حفظ ذخایر و در صنعت آبزی‌پروری ماهیان خاویاری برای تشخیص زودهنگام نر و ماده مورد استفاده قرار بگیرد. بنابراین تشخیص و جدا کردن نرها امکان رشد بیشتر ماده‌ها و تولید بیشتر خاویار را در همان مقدار فضا با مدیریت منابع مالی و کاهش هزینه‌ها فراهم می‌آورد. هدف این مطالعه آزمونی سریع برای صحت تعیین جنسیت فیل‌ماهی به روش مولکولی بر اساس نشانگر مختص به جنسیت ماده است. امید است با انجام این مطالعات، روش مولکولی بتواند در آینده نزدیک به عنوان روشی غیرتهاجمی، برای تعیین جنسیت زودهنگام تاس‌ماهیان پرورشی مورد استفاده واقع شود. در نتیجه برنامه‌های مزارع خاویاری را برای تولید خاویار و پرورش جنس نر به منظور تولید گوشت، متمرکز کند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و استخراج DNA از باله مولدین فیل ماهی

در این پژوهش به منظور ارزیابی صحت روش مولکولی از مولدین بالغ با جنسیت مشخص استفاده شد. نمونه‌های باله از مولدین فیل‌ماهی با وضعیت تولیدمثلی قطعی و مشخص که تخمک و اسپرم از آنها در سال‌های مختلف دریافت شده بود، به دست آمد. تعداد ۲۳ قطعه مولد فیل‌ماهی که ۱۴ قطعه از آن‌ها ماده و ۹ قطعه نر بودند برای این مطالعه استفاده شدند. استخراج DNA با استفاده از روش استات آمونیوم (Aljanabi and Martinez, 1997) با اندکی تغییر انجام شد. اساس این روش رسوب‌دهی DNA با نمک استات آمونیوم است. به اختصار، پس از جدا کردن ۵۰ میلی‌گرم از بافت نوک باله فیل‌ماهی، بافت با قیچی و اسکالپل استریل تکه‌تکه و با استفاده از هاون و نیتروژن مایع همگن شد. سپس نمونه‌ها به میکروتیوب منتقل شدند و ۴۰۰ میکرولیتر از بافر استریل لیز کننده (تریس- اسید کلریدریک ۱۰ میلی‌مولار با pH ۸ و حاوی نمک کلرید سدیم ۰/۴ میلی‌مولار و EDTA ۲ میلی‌مولار)، ۲۰ میکرولیتر SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) ۲۰ درصد و ۸ میکرولیتر پروتئیناز K با غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میکرولیتر به آنها اضافه شد. نمونه‌ها در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترمومیکسر (5436، Eppendorf، آلمان) به مدت ۳ ساعت همراه با تکان ملایم انکوبه شدند. سپس ۳۰۰ میکرولیتر از نمک استات آمونیوم ۷/۵ مولار به هر نمونه اضافه شد و بعد از مخلوط شدن به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ (5415D،

Eppendorf، آلمان) شدند. مایع رویی که حاوی DNA بود به تیوب جدید منتقل شد. در مرحله بعد، هم حجم مایع رویی اتانول مطلق به هر نمونه اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. به منظور شستشو پلت‌ها اتاتول ۷۰ درصد اضافه شد و بار دیگر نمونه‌ها به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از خشک شدن کامل، پلت DNA در آب مقطر استریل دوبار تقطیر حل شد.

ارزیابی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از بافت باله مولدین فیل‌ماهی

برای تعیین کمیت DNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ (ND-1000، Thermo Scientific Fisher، امریکا) در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر، استفاده شد. برای سنجش میزان جذب در ۲۶۰ نانومتر (غلظت DNA) پس از کالیبره کردن دستگاه نانودراپ با بافر رقیق کننده، میزان DNA موجود در آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر بر حسب نانوگرم بر میکرولیتر اندازه‌گیری شد. کیفیت DNA استخراج شده بافت باله روی ژل آگارز ۰/۹ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

تکثیر ناحیه اختصاصی ژنوم جنس ماده

انتخاب این ناحیه برای تکثیر، بر اساس مطالعات Kuhl و همکاران در سال ۲۰۲۱ انجام شد که از ناحیه شناخته شده اختصاصی در جنس ماده برخی از تاس‌ماهیان در آنالیزهای ترانسکریپتوم و ژنوم به دست آمده بود. یک جفت آغازگر (جدول ۱) ناحیه کوچکی را در جنس ماده تکثیر می‌کنند (کمی بیشتر از ۱۰۰ جفت باز) که این ناحیه در جنس نر تکثیر نمی‌شود. برای تکثیر ناحیه مورد نظر از تک DNA پلیمراز مسترمیکس ۲X قرمز (Ampliqon، دانمارک) استفاده شد. به منظور تهیه شرایط انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، اجزای واکنش و نسبت‌ها مطابق جدول ۲ تهیه شد. سپس در برنامه حرارتی مطابق با جدول ۳ قرار گرفت، محصول به دست آماده روی ژل آگارز ۲ درصد، رنگ‌آمیزی شده با سیف استین (Safe Stain، سیناکلون، ایران) به مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ ۱۰۰ الکتروفورز (PQlab، چین) شد. در پایان محصول PCR با استفاده از دستگاه UV ترانس ایلو مینیاتور

(Vilber Lourmat، فرانسه) زیر نور UV در کنار نشانگر ۵۰ بازی (سیناکلون، ایران) مشاهده شد. برای اطمینان از تکرارپذیری نتایج، آزمایش‌های برای هر نمونه حداقل سه بار تکرار شد.

جدول ۱: مشخصات آغازگرهای پیشرو و معکوس برای تکثیر یک ناحیه اختصاصی در ژنوم فیل‌ماهی ماده

نام آغازگر	توالی بازی
پیشرو (Forward): AllWSex2-F (Kuhl et al., 2021)	5′-TGATCAACCTCTTCAGCAATGTC-3′
معکوس (Reverse): AllWSex2-R (Kuhl et al., 2021)	5′-TGAGAGCCACTGTACTAACACA-3′

جدول ۲: نوع و غلظت اجزای تشکیل دهنده واکنش PCR

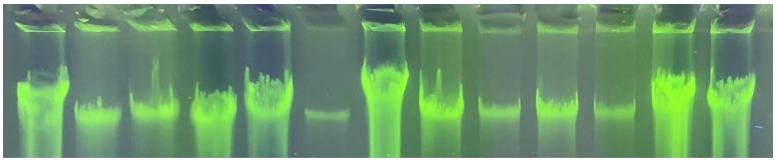
اجزای واکنش	حجم (میکرولیتر)	غلظت نهایی
تک DNA پلیمراز مستر میکس (۲X)	۱۲/۵	X
آغازگر پیشرو (۱۰ میکرومولار)	۱/۲۵	۰/۵ میکرومولار
آغازگر معکوس (۱۰ میکرومولار)	۱/۲۵	۰/۵ میکرومولار
آب دوبار تقطیر عاری از نوکلئاز	X	–
DNA ژنومیک (۱۲۵–۳۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر)	X	۲۰ نانوگرم

جدول ۳: برنامه حرارتی برای تکثیر ناحیه اختصاصی ژنوم فیل‌ماهی ماده

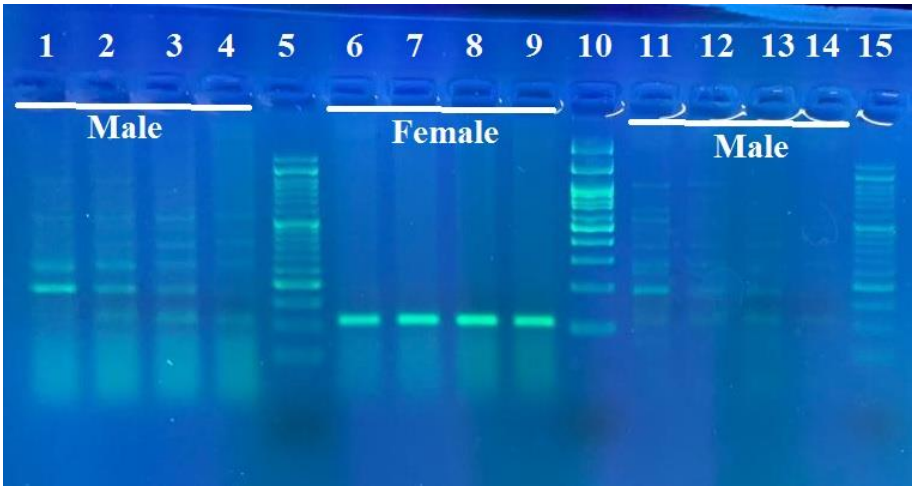
مراحل PCR	درجه حرارت	مدت زمان	تعداد چرخه
واسرشته‌شدن اولیه	۹۴ درجه سانتی‌گراد	۵ دقیقه	۱ چرخه
واسرشته شدن	۹۴ درجه سانتی‌گراد	۳۰ ثانیه	۳۵ چرخه
الحاق	۵۶ درجه سانتی‌گراد	۳۰ ثانیه	
بسط	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۱۵ ثانیه	
بسط نهایی	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۵ دقیقه	۱ چرخه

نتایج

بر اساس نتایج کمی غلظت DNA با استفاده از نانودراپ، همه نمونه‌های باله فیل‌ماهی دارای نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر مناسب در دامنه ۲-۱/۸ بودند و غلظت DNA استخراج شده بین ۱۲۵ تا ۳۰۰ نانوگرم در میکرولیتر بود (شکل۱). در این پژوهش تکثیر ژنوم فیل‌ماهیان ماده با آغازگرهای اختصاصی یک باند واضح کمی بزرگ‌تر از ۱۰۰ جفت باز را در روی ژل آگارز نشان داد، در حالی که مولدین نر هیچ کدام باند واضح با اندازه کمی بزرگ‌تر از ۱۰۰ جفت باز را در روی ژل نشان ندادند. در مولدین نر پروفایل کم رنگی از چند باند دیگر بویژه با اندازه حدود ۲۵۰ و ۳۰۰ جفت بازی روی ژل ۲ درصد دیده شد (شکل ۲ و جدول ۴).



شکل ۱: نتایج DNA استخراج شده بافت باله فیل‌ماهیان نر و ماده با استفاده اززوش استات آمونیوم بر روی ژل آگارز ۰/۹ درصد



شکل ۲: نتایج محصولات PCR بر روی ژل آگارز، رنگ‌آمیزی شده با سیف استین. مولدین نر و ماده فیل‌ماهی با استفاده از نشانگرهای پیشرو و معکوس AllWSex2 مورد آزمون قرار گرفتند. شماره‌های ۱ تا ۴ و همچنین

شماره‌های ۱۱ تا ۱۴: مولدین فیل‌ماهی نر. شماره‌های ۵ و ۱۵: نشانگر ۵۰ جفت بازی. در مولدین فیل‌ماهی ماده یک قطعه با اندازه کمی بزرگ‌تر از ۱۰۰ جفت باز قابل مشاهده است. شماره ۱۰ نشانگر ۱۰۰ جفت بازی است.

جدول ۴: نتایج تکثیر ژنوم مولدین نر و ماده فیل‌ماهی با استفاده از آغازگر اختصاصی پیشرو و معکوس AllWSex2

نوع مولد	نوع تشخیص فنوتیپ جنسی	تعداد مولدین	نتیجه تکثیر با استفاده از نشانگر جنسی	تعیین جنسیت صحیح
ماده	تولیدمثل (استحصال تخمک)	۱۴ قطعه	۱۴ مولد باند واضح با اندازه کمی بزرگ‌تر از ۱۰۰ جفت باز را نشان دادند	۱۴ مولد ماده تشخیص داده شدند
نر	تولیدمثل (استحصال اسپرم)	۹ قطعه	باند واضح با اندازه کمی بزرگتر از ۱۰۰ جفت باز مشاهده نشد	۹ مولد نر تشخیص داده شدند

بحث

تاس‌ماهیان هیچ نشانه ظاهری ندارند که بتوان از روی آن جنسیت را تشخیص داد و حتی در مولدین امکان تشخیص جنسیت از روی ظاهر وجود ندارد، تنها در مراحل نهایی رسیدگی جنسی ممکن است مولدین نر و ماده از لحاظ ظاهری قابل تشخیص باشند (شریعتی، ۱۳۸۹). تعیین جنسیت در تاس‌ماهیان، به وسیله روش‌های همچون جراحی، بیوپسی و آندوسکوپی که تهاجمی و نیمه‌تهاجمی هستند (Feist et al., 2004)، خونگیری و سنجش هورمون‌های جنسی (Doroshov et al., 1997) در فصل مناسب و روش اولتراسونوگرافی که یک روش پر هزینه است (Scribner and Kanefsky, 2021) انجام می‌شود که هر کدام از این روش‌ها مزایا و معایب خود را دارد. چالش تعیین جنسیت تاس‌ماهیان و عدم تشخیص جنسیت آنها تا سنین بالا یکی از نکات بسیار مهم در پرورش ماهیان خاویاری است که مطالعات زیادی را در ده‌های گذشته برای یافتن نشانگر جنسی به خود معطوف کرده است. با در نظر گرفتن نسبت جنسی یک به یک در تاس‌ماهیان (Chapman et al., 1996) و با توجه به نتایج مطالعات ماده‌زایی (Gynogenesis) (Nace et.al., 1970; Van Eenennaam, 1997; Fopp-Bayat et al., 2007; Lebeda et al., 2021) در برخی از گونه‌های تاس‌ماهیان، پژوهشگران به این نتیجه رسیدند که تعیین جنسیت در تاس‌ماهیان ژنتیکی و توسط جنس ماده تعیین می‌شود. استفاده از نسل جدید توالی‌یابی، قسمتی جدید و منحصر به فردی را در جنس ماده تاس‌ماهیان

شناسایی کرد که مبنای انجام این مطالعه قرار گرفت. نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که تمامی فیل‌ماهیان ماده یک باند واضح با اندازه کمی بزرگ‌تر از ۱۰۰جفت بازی را تکثیر کرده‌اند. Kuhl و همکاران در سال ۲۰۲۱ در مطالعه تعیین جنسیت بر روی ۶ گونه از تاس‌ماهیان، تکثیر این قطعه از لوکوس اختصاصی را در تاس‌ماهیان ماده گزارش کرده‌اند. از طرفی مولدین نر هیچ کدام باند واضح حدود ۱۰۰ جفت باز را در روی ژل آگارز نشان ندادند. بنابراین این مطالعه توانست برای تشخیص فیل‌ماهی ماده از نر با تکثیر قسمت کوچکی از لوکوس مختص جنس ماده، به کار رود. تکثیر این لوکوس در فیل‌ماهیان مولد ماده شاهد غیرمستقیمی است که نشان می‌دهد سیستم تعیین جنسیت در فیل‌ماهی هم به مانند دیگر تاس‌ماهیان به شکل ZW است (Keyvanshokooh and Gharaei, 2010; Havelka and Arai, 2018; Fajkowska et al., 2019). ناحیه ژنومی کشف شده توسط Kuhl و همکاران در سال ۲۰۲۱ حداقل در شش گونه از ماهیان خاویاری در دو سطوح پلوئیدی متفاوت مورد مطالعه قرار گرفت. تکثیر ناحیه ژنومی مزبور با استفاده از آغازگرهای AllWSex2 در جنس ماده گونه‌هایی مانند فیل‌ماهی، تاس‌ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*)، تاس‌ماهی اروپایی (*Acipenser sturio*)، تاس‌ماهی آتلانتیک (*Acipenser oxyrinchus*)، همگی با ۱۲۰ عدد کروموزوم و منشا گرفته از یک جد مشترک تتراپلویید نشان داد که لوکوس مزبور حفاظت شده و مختص جنس ماده است، همچنین بررسی لوکوس یاد شده در گونه‌های اکتاپلوئید مانند تاس‌ماهی روسی و تاس‌ماهی سیبری (*Acipenser baerii*)، به حفاظت ناحیه مختص ماده و تایید سیستم تعیین جنسیت هتروگامتیک ماده حداقل در یک دور پلی‌پلویید شدن تاکید دارد (Kuhl et al., 2021). در مطالعه حاضر چندین باند ضعیف با اندازه حدود ۲۵۰ و ۳۰۰ جفت بازی روی ژل آگارز ۲ درصد برای جنس نر دیده شد. در مطالعه Kuhl و همکاران در سال ۲۰۲۱ برای گونه فیل‌ماهی و مطالعه Scribner و Kanefsky در سال ۲۰۲۱ برای گونه تاس‌ماهی دریاچه‌ای (*Acipenser fulvescens*) پروفایل مشابه با مطالعه حاضر برای جنس نر مشاهده شد. Scribner و Kanefsky در سال ۲۰۲۱ با کلون کردن قطعات یاد شده در تاس‌ماهی دریاچه‌ای به این نتیجه رسیدند که این توالی‌ها نقشی در تعیین جنسیت ندارند. پژوهشگران جایگاه لوکوس مختص جنس ماده را در

تاس‌ماهی استرلیاد در روی کروموزوم ۴ گزارش کردند. (Du et al., 2020; Kuhl et al., 2021). ولی از آنجایی که اطلاعات در مورد ژنوم تاس‌ماهیان دیگر اندک است، هنوز جایگاه کروموزومی این لوکوس مشخص نشده است. با توجه به نتایج مطالعات صورت گرفته، Kuhl و همکاران در سال ۲۰۲۱ امکان «پرش لوکوس ژنی» (Jumping Sex Locus) را مشابه آن چیزی که در آزادماهیان (Salmonidae) با سیستم هتروگامتیک نر XX/XY اتفاق می‌افتد، در ماهیان خاویاری محتمل دانستند.

تعیین جنسیت مولکولی فیل‌ماهی با تکثیر اختصاصی قطعه کوچکی از ژنوم ماده، امکان تشخیص زود هنگام را برای تعیین جنسیت فراهم می‌آورد. این روش از نظر صرف هزینه انجام آزمایش نسبتا ارزان است و در ظرف چند روز می‌تواند نتایج قابل اطمینانی را در اختیار پرورش دهنده قرار می‌دهد. از این لحاظ، تحولی در تشخیص زود هنگام جنسیت در مزارع پرورشی فراهم خواهد کرد. از این رو، مطالعه حاضر یک گام اولیه برای شناسایی مولکولی جنس نر و ماده فیل‌ماهیان پرورشی در ایران است. بنابراین، پیشنهاد می‌شود برای گونه‌های دیگر تاس‌ماهیان پرورشی مورد آزمون قرار گیرد تا توانایی آن برای تشخیص جنسیت بررسی و صحه‌گذاری شود.

منابع

حلاجیان ع. ۱۳۸۶. تفکیک ماهیان ماده از ماهیان نر خاویاری پرورشی از طریق جراحی. دنیای آبزیان، ۵(۱۱): ۱۶-۱۴.

حلاجیان ع.، کاظمی ر.، محسنی م.، دژندیان س.، یوسفی جوردهی ا.، بهمنی م.، پوردهقانی م.، یزدانی ساداتی م.ع. و یگانه ه. ۱۳۹۰. تکه‌برداری به روش جراحی و مطالعه بافت‌شناسی گناد تاس‌ماهی ایرانی *Acipenser persicus* پرورشی. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۶۶(۳): ۲۳۳-۲۲۹.

شریعتی ا. ۱۳۸۹. تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری. انتشارات موسسه آموزش عالی علمی کاربردی جهاد کشاورزی. ۲۰۶ص.

مصلایی م.، میرزایی ح.، سیمونیان و.م. و خیراله م. ۱۳۹۴. نسل جدید روش‌های توالی‌یابی و کاربردهای آن، ۳۳: ۲۴۸۰-۲۴۶۹.

Aljanabi M. and Martinez L. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. Nucleic Acids Research, 25: 4692–4693.

Chapman F.A., Van Eenennaam J.P. and Doroshov S.I. 1996. The reproductive condition of white sturgeon, *Acipenser transmontanus*, in San Francisco Bay, California. Fishery Bulletin, 94: 628–634.

Chebanov M.S. and Galich E.V. 2013. Sturgeon hatchery manual. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Fisheries and Aquaculture Technical Paper, Turkey. 297P.

Chen Y., Liu Y., Gong Q., Lai J., Song M., Du J. and Deng X. 2018. Gonadal transcriptome sequencing of the critically endangered *Acipenser dabryanus* to discover candidate sex-related genes. PeerJ Life and Environment Research, 6: 1–24 (e5339).

Degani G., Hajouj A. and Hurvitz A. 2021. Sex-based variation of gene expression in the gonads and fins of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*). Open Journal of Animal Sciences, 11: 1–10.

Doroshov S.I., Moberg G.P. and Van Eenennaam J.P. 1997. Observations on the reproductive cycle of cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. Environmental Biology of Fishes, 48: 265–278.

Du K., Stock M., Kneitz S., Klopp C., Woltering J., Adolfi M., Feron R., Prokopov D., Makunin A., Kichigin I., Schmidt C., Fischer P., Kuhl H., Wuetz S., Gessner J., Werner K., Cabau C., Iampietro C., Parrinello H., Tomlinson C., Journot L., Postlethwait J.H., Braasch I.,

Trifonov V., Warren W.C., Meyer A., Guiguen Y., Schartl M. 2020. The sterlet sturgeon genome sequence and the mechanisms of segmental rediploidization. Nature Ecology and Evolution, 4: 841–852.

Fajkowska M., Ostaszewska T. and Rzepkowska M. 2019. Review: Molecular mechanisms of sex differentiation in sturgeons. Reviews in Aquaculture, 12: 1003–1027.

Feist G., Van Eenennaam J.P., Doroshov S.I., Schreck C.B., Schneider R.P. and Fitzpatrick M.S. 2004. Early identification of sex in cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus*, using plasma steroid levels. Aquaculture, 232: 581–590.

Fontana F. and Colombo G. 1974. Chromosomes of Italian sturgeons. Experientia, 30: 739–742.

Fopp-Bayat D., Kolman R. and Woznicki P. 2007. Induction of meiotic gynogenesis in sterlet (*Acipenser ruthenus*) using UV-irradiated bester sperm. Aquaculture Research, 264: 54–58.

Hassanzadeh Saber M. and Hallajian A. 2014. Study of sex determination system in ship sturgeon (*Acipenser nudiventris*) using meiotic gynogenesis. Aquaculture International, 22: 273–279.

Havelka M. and Arai K. 2018. Hybridization and polyploidization in sturgeon. P: 669–687. In: Wang H.P., Piferrer F., Chen S. and Shen Z.G. (Eds.). Sex Control in Aquaculture. John Wiley and Sons Ltd., UK.

Keyvanshokooh S. and Gharaei A. 2010. A review of sex determination and searches for sex-specific markers in sturgeon. Aquaculture Research, 41(9): 1–7.

Keyvanshokooh S. and Vaziri B. 2008. Proteome analysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) ova. Animal Reproduction Science, 109(1-4): 287–297.

Kuhl H., Guiguen Y., Hohne C., Kreuz E., Du K., Klopp C., Lopez-Roques C., Santidrian Yebra-Pimentel E., Ciorpac M., Jorn Gessner J., Holostenco D., Kleiner W., Klaus Kohlmann K., Lamatsch D.K., Prokopov D., Bestin A., Bonpunt E., Debeuf E., Haffray P., Morvezen R., Patrice P., Suciu R., Dirks R., Wuertz S., Kloas W., Schartl M. and Stock M. 2021. A 180 My-old female-specific genome region in sturgeon reveals the oldest known vertebrate sex determining system with undifferentiated sex chromosomes. Philosophical Transactions (B), 376: 1–10 (20200089).

Lebeda I., Rodina M., Gela D., Sakali S., Shivaramu S. and Flajshans M. 2021. Gonadal histology and concentration of 11-

ketotesterone of meiotic gynogens confirm female heterogametic sex determination in sterlet (*Acipenser ruthenus*). Aquaculture International, 29: 801–811.

Nace G.W., Richards C.M. and Asher Jr. J.H. 1970. Parthenogenesis and genetic variability: I. Linkage and inbreeding estimations in the frog, Rana pipiens. Genetics, 66: 349–368.

Scribner K.T. and Kanefsky J. 2021. Molecular sexing of lake sturgeon. Journal of Great Lakes Research, 47: 934–936.

Van Eenennaam A.L. 1997. Genetic analysis the sex determination of white sturgeon (*Acipenser transmontanus* Richardson). Ph.D. Thesis, University of California, USA. 177P.

Vecsei P., Litvak M.K., Noakesa D.L.G., Rienc T. and Hochleithner M. 2003. A noninvasive technique for determining sex of live North American sturgeon. Environmental Biology of Fishes, 68: 333–338.

Wuertz S., Guralp H., Psenicka M. and Chebanov M. 2018. Sex determination in sturgeon. P: 645–668. In: Wang H.P., Piferrer F., Chen S. and Shen Z.G. (Eds.). Sex Control in Aquaculture. John Wiley and Sons, Ltd., UK.

Xiao K., Du H., Hu Y., Liu X., Wang B., Yang J., Zeng Q., Chen L. and Yao J. 2021. A pioneering approach for non-invasive sex identification of Chinese sturgeon at an early stage. Aquaculture, 538: 736530.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 10, No. 4, Winter 2023

Research Paper

Testing beluga molecular sex determination by amplification of female specific genomic region

Shirin Jamshidi[1], Maryam Monsef Shokri[2]*, Ali Hallajian[3], Alireza Shenavar Masouleh[4], Ayoub Yousefi Jourdehi[2], Mohammad Hasanzadeh Saber[5]

Received: January 2022 Accepted: March 2022

Abstract

In sturgeon aquaculture, sex determination is a major challenge since culture of female sturgeon, as a valuable source of caviar production, is economically important and the differentiation of male and female sturgeons is indeed necessary to reduce costs. Indirect evidence shows that the sex determination system in sturgeon is ZW and the sex of the female determines the sex. The situation which underlies locus discovery involved in sturgeon sex determination in genomic studies. The current study, for the first time in Iran, aimed to determine the beluga sex using the above-mentioned locus specific primers. For this purpose, caudal fins samples were collected from 23 beluga broodstock (14 females and 9 males). Genomic DNA was extracted by the ammonium acetate method. After quantitative and qualitative evaluation of the extracted DNA, specific primers were used to amplify a small fragment of the female beluga locus. Based on the obtained results, the single fragment slightly larger than 100 bp in size was amplified in 14 females while no specific amplification was observed in the male. Therefore, the molecular test can be used as a reliable, efficient, relatively low-cost, and non-invasive method for early sex determination in beluga in Iran.

Key words: *Acipenseridae, Beluga, Molecular Methods, Sex Determination*.

1- Assistant Professor in Department of Genetics and Biotechnology, International Sturgeon Research Institute, Iran Fisheries Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.
2- Assistant Professor in Department of Physiology and Biochemistry, International Sturgeon Research Institute, Iran Fisheries Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.
3- Ph.D. in Fisheries Science, Department of Physiology and Biochemistry, International Sturgeon Research Institute, Iran Fisheries Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.
4- Assistant Professor in Department of Fish Health and Diseases, International Sturgeon Research Institute, Iran Fisheries Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.
5- Scientific Member in Department of Genetics and Biotechnology, International Sturgeon Research Institute, Iran Fisheries Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.
*Corresponding Author: monsef_shokri@yahoo.com
DOI: 10.22124/japb.2022.21408.1454