بررسی امکان تشخیص جنسیت فیل‌ماهی (Huso huso) با استفاده از روش PCR-RAPD

سید کیوان شکوهی(1)، محمد بورکانی(2) و حمید رضا کلبایی(3)

Keyvan56@yahoo.com

1 - دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر صندوق پستی: 469
2 - انسپیتیو تحقیقات بینالمللی ماهیان خارجی، رشت، صندوق پستی: 43465-43486
3 - گروه شیلات، دانشگاه علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، صندوق پستی: 43414-43415

تاریخ ورود: اسفند ۱۳۸۱
تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۸۲

چکیده

هدف از انجام این تحقیق مقایسه زنون فیل‌ماهی نر و ماده با استفاده از روش PCR و RAPD است. شناسایی نشان‌گرهای جنسی بود. به‌منظور مشاهده و استخراج DNA به روش فنل- کلرuronم، جنسیت DNA هر نمونه از افرادهای انتخابی از DNA نتیجه گرفت. در این تحقیق از ۱۸۰ پایه ۱۰ تولیدنی مورد آزمایش، ۷۴ پایه به اندازه تولید نمونه کردن که می‌تواند به دلیل نامناسب بودن واکنش PCR و یا عدم وجود محل پلیمرهای برای پرداختن ماده DNA چون نمود این تحقیق نمود که در انگلیسی زبان دنیای جنسیت بالای نشان می‌دهد که از افرادهای انتخابی از DNA PCR استفاده از آزمایشات و بررسی الگوی پایه با استفاده از PC و ماده نامناسب یا تحقیقات افرادی از PCR از DNA بررسی اختصاصی بردن این پاژش در جنسیت نمود. در گروه باندی ماده مدل دوم مورد آزمایش قرار گرفته است. هنگام در پیش آن تحقیق نمود که از هم‌بندی کردن و ماده چنین بالای نمودی نمایش را در جنسیت می‌دهد که از افرادهای انتخابی از DNA PCR استفاده از آزمایشات و بررسی الگوی پایه با استفاده از PC و ماده نامناسب یا تحقیقات افرادی از PCR از DNA بررسی اختصاصی بردن این پاژش در جنسیت نمود. در گروه باندی ماده مدل دوم مورد آزمایش قرار گرفته است. هنگام در پیش آن تحقیق نمود که از هم‌بندی کردن و ماده چنین بالای نمودی نمایش را در جنسیت می‌دهد که از افرادهای انتخابی از DNA PCR استفاده از آزمایشات و بررسی الگوی پایه با استفاده از PC و ماده نامناسب یا تحقیقات افرادی از PCR از DNA بررسی اختصاصی بردن این پاژش در جنسیت نمود. در گروه باندی ماده مدل دوم مورد آزمایش قرار گرفته است. هنگام در پیش آن

لفات کلیدی: فیل‌ماهی، DNA، RAPD، PCR، فیل‌ماهی، گروه‌بندی، یکنواختی، فیل‌ماهی دنیای، تحقیقات، آزمایشات، نمایش، یکنواختی
بررسی امکان تشخیص جنسیت فیل ماهی با استفاده از

کیوان مشکو و همکاران

مقدمه

در سالهای اخیر ذخایر ماهیان خاویاری که از ابزاری قدمتی نیمکره شمالی بحر شمار می‌رود (Billard & Lecointre, 2001) به دلایلی نظیر صید بی رو به و فاجعه تجمع اوی‌دنی در آب و رسوبات محیط زیست و مصدود شدن مناظره ماندگی به مناطق تولید مثل طبیعی این ماهیان با کاهش فوق العاده‌ای مواجه گردیده است (Pourkazemi et al., 1999; Bristein, 1993).

فوت نظر سن بالای بلاغ (۵ تا بیش از ۲۰ سال) و فاصله زمانی طولانی بین دو تولید مثل (۲۰ تا بیش از ۱۰ سال) آسیب‌پذیری این گونه‌ها را افزایش داده است (May et al., 1997; DeMeulenaer & Raymakers, 1996; Bristein, 1993). لذا برای حفظ ذخایر این ماهیان تهیه‌داری پاییز در نظر گرفته شود که آن

جمله می‌توان به تک‌نر و پرورش مصنوعی و همچنین تولید خاویاری پرورشی اشاره کرد.

در تک‌نر مصنوعی ماهیان خاویاری تشخیص جنسیت و مرحلة رشدی‌گنجی جنسی ماهی مولد بسیار مهم است. در حال حاضر به دلیل عدم وجود تفاوت‌های مورفولوژیک میان افراد نر و ماده، تشخیص جنسیت مولدین‌ها با مشکلاتی همراه است. بطوریکه گاهی ماهیان ماده نارس که رسیدگی آن‌ها درست تشخیص شده نمی‌شود، به جای مولد نر وارد کارگاه‌های تک‌نر شده و در برنامه‌ریزی تک‌نر مصنوعی اخلال ایجاد می‌نمایند (صمدی و همکاران، ۱۳۸۰). علاوه بر این افراد تولید خاویاری پرورشی مستلزم جداسازی ماهیان نر و ماده قبل از رسیدن به سن بلاغ و ایجاد جمعیت‌های تمام ماده می‌باشد (et al., 1995).

امروزه از برخی روش‌های زننده‌کن مولکولی بهعنوان روش‌های دقیق و بی‌خطر در تشخیص جنسیت & McClelland, 1990; Williams et al., 1990; Vos et al., 1995. (Welsh


از جمله روش‌های متد‌یافته در شناسایی تنشگرهای جنسی بوده که در آن هدف، یافتن قطعاتی از DNA و مقایسه آنها در جنس نر و ماده می‌باشد. اغلب این قطعات در هر دو جنس مشترک بوده ولی قطعاتی که تنها در یک جنس وجود دارد، تنشگرهای جنسی می‌باشند (Griffiths, 2000; Lessells & Mateman, 1998) با وجود اینکه...

مواد و روش‌کار

در این تحقیق از فیل ماهیان صید شده جهت عملیات تکثیر مصنوعی، در اسفند ماه 1380 در مجتمع Tکثیر و بروز ماهیان خاویاری شهید مرحالی واقع در جنوب آق قلا (25 کیلومتری شهر گرگان) نمونه‌برداری شد. در هنگام نمونه‌برداری از انتهای باله، دمی به عده فیل ماهی نر و ده عده فیل ماهی ماده نمونه بافت بردانسته و پس از تغییرات آنها در اندازه 12 درصد به آزمایشگاه منتقل شدند. تحقیقات ارتباطی که در DNA در سال ملی ماهیان خاویاری دکتر دادمان در رشته ملی ایران در روش DNA استخراج که در کلرور هام روی گروه تهیه کرده. (Pourkazemi, 1996) استخراج از بیش از ۴۰ نمونه با استفاده از دستگاه اسکیپ‌فورتومتر برای بررسی پلی‌مرافس پر ایران جفت شده است. نیز ممکن است باندهای بی‌روی افراد دیده شود که دیگر نمونه‌ها نمی‌باشد. برای رفع مشکل، بس از یکسان سازی طول کلیه نمونه‌ها، دو نمونه از DNA زنومی افراد ماده (هر کدام ترکیبی از DNA ینج عدد ماده) و همچنین دو نمونه از DNA زنومی افراد نر (هر کدام ترکیبی از DNA ینج عدد نر) تهیه گردید.

(Iturra et al., 1998)
کیوان شکوه و همکاران

بررسی امکان تشخیص جنسیت فیل ماهی با استفاده از...

(Cinnagen) PCR در هر واکنش PCR با حجم نهایی 25 میکرولیتر از 15 نانوگرم DNA و با فابر Pharmacia Operon Technologies) dNTPs (μM) (Pharmacia) 400 μM و (Cinnagen) 1/50 کلرید متانئم (Cinnagen و Eppendorf) IBA در هر سری از آزمایش‌ها از یک کنترل منفی و مشیت نیز استفاده گردید. کنترل مشیت حاوی یپراذری (یپراذری 36 یوز که در مراحل قبل پاندهای واضح تولید کرده بود. عمل PCR در تیوبهای 70TC (مدل 341) Amersham Pharmac...
به منظور ظاهرسازی محصولات PCR و بررسی الگوی باندی جنس نر و ماده، در حدود ۶۰ زل
پی آکریلامید ۶ درصد تهیه و بس از اتمام الکتروفورز با استفاده از نیترات نقره رنگ آمیزی گردید. کنترل
منفی، عدم آلودگی واکنش‌گرها به DNA را تضمین نموده و کنترل مثبت نجومه کارکرد واکنش‌گرها و
دستگاه PCR را تأیید نمود.

شکل ۱: نمونه‌ای از DNA های رانده شده بر روی زل آغازور زیک درصد
در این تحقیق مشخص گردید که از ۳۱۰ پراپرمر مورد استفاده، ۹ عدد از آنها که شامل پراپرمرهای
شماره ۲۵۵، ۳۲۷، ۲۸۴، ۲۷۳، ۲۷۴ می‌باشد، هیچگونه باندی تولید نکرده‌اند. در نتیجه
آزمایش‌های PCR با استفاده از پراپرمرهای مذکور در سه دمای متفاوت اتصال (Annealing) یعنی ۲۵°C، ۲۸°C و ۳۲°C درجه سانتی‌گراد تکرار گردید که در هیچکدام از شرایط دمایی مورد آزمایش، عمل اتصال
پراپرمرها و تولید باند انجام نشد. در حالیکه نمونه حاوی کنترل مثبت (پراپرمر شماره ۲۴۶) در هر سه دمای
اتصال، باندهای مشخصی تولید نمود.

ساپر پراپرمرهای آزمایش شده باندهای مشخصی را تولید نمودند که اندوزه تقربی باندهای مذکور بین

۱۵۳
بررسی امکان تشخیص جنسیت فیل ماهی با استفاده از...

کشورهای و همکاران

50 تا 1900 جفت باز می‌باشد. هر پرایمر بطور متوسط 13 باند تولید نمود و در مجموع 3146 باند شمارش گردد که پرایمر شماره 66 کمترین تعداد باند (4 باند) و پرایمر شماره 88 بیشترین تعداد باند (31 باند) را تولید نمودند.


c\h

شکل 2: الگوی باندی پرایمر 295 (OPT - 17) را در جنس نر (ستون 2) و ماده (ستون 3) نشان می‌دهد.

ستون 1 مارکر 50 جفت بارزی می‌باشد.

الگوی باندی کلیه پراپرامهای مورد بررسی به جز پراپرامهای مورد بررسی به جز پراپرام شماره 295 (OPT - 17) در دو جنس نر و ماده یکسان بود و هیچگونه تفاوتی مشاهده نگردیدند. این پراپرام باندی با اندازه تقریبی 450 جفت باز را در خزانه DNA زنومی افراد نر تولید گردید که در الگوی باندی جنس

www.SID.ir
مقاله علمی شیلات ایران

ماده مشاهده نمی‌شد (شکل ۲). به منظور اطمینان از اختصاصی و تکراری‌بودن بودن این باند در جنس نر، آزمایش PCR با استفاده از پرایمر مذکور و بر روی DNA غیر ترکیبی پنج عدد ماهی نر و پنج عدد ماده تکرار گردید. سپس از بررسی و مشاهده الگوی باندی افراد مستقل مشخص گردید که باند مذکور در یکی از ماهیان نر و یکی از ماهیان ماده به خوبی قابل تشخیص بوده و مربوط به نوع فردی ماهیان مورد مطالعه می‌باشد (شکل ۳).

شکل ۳: الگوی باندی پرایمر شماره ۲۹۵ را در ماهیان نر (ستون ۱ تا ۵) و ماهیان ماده (ستون ۷ تا ۱۱) و مارکر ۵ جفت بازی (ستون ۶) را نشان می‌دهد.

بحث:

در این تحقیق ۳۳ پرایمر از ۱۱ پرایمر آزمایش شده، باندهای واضح و مشخص تولید نموده وی یک پرایمر دیگر هیچگونه باندی را تولید نکرده‌اند. عدم تولید باند توسط پرایمرها مذکور می‌تواند به دلیل تأثیر بودن شرایط واکنش باشد. اما با توجه به اینکه آزمایش‌های PCR با استفاده از پرایمرها مذکور

www.SID.ir
کووان شکوه و همگران

در سه دمای متفاوت اتصال (۳۴، ۳۶ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد) تکرار گردید و در هر سه دمای مرود از مسایل، عمل اتصال برایم و تولید باند انگ انجام نشد و در هر سه تکرار نمونه احتمالی کنترل مثبت باند تولید نمود، این احتمالات در نظر گرفته شده گردید که در این و همان دستگاه محل و فیلی فیلی فیلی می‌باشد و با احتمال بسیاری از اثربخشی‌های آنها واپسین محدودیت‌ها همگام توسط اکثر و ریاضیات نشان می‌دهد که نمونه‌های DNA استرخراج شده از کیفیت مناسبی به‌کار‌رود بوده و روش مناسبی را استرخراج DNA در آزمایش‌های می‌باشد.

لوی گارد در تیشیکن جنسیت یک موجود BA استفاده از نشانگر های DNA و وجود سیستم نعیم جنسیتی درن شیک، (Griffiths، 2000) به عنوان مثال در گونه‌های که نه رها، (XX) و ماده‌های هم‌گام (XY) (باشند، احتمال یافتن جنسی نشانگر هایی در افراد ن و وجود دارد، چرا که کروموزوم Y تنها در افراد نردیده تکامل می‌باشد. در برخی از گونه‌ها کرومومهای جنسی کاملاً تکامل یافته و متناسب هستند و در برخی دیگر، گرفت از کرومومهای آنتو می‌باشند. (Tave، 1993)، وجود کرومومهای جنسی متجاوز تنها در کارپونائیم یا گونه‌های گزارش گردیده است، در حالیکه تاکنون بیش از ۱۷۰۰ گونه ماهی از نظر سیستمیک مورد مطالعه قرار گرفتند. ۲۰۰۲) از آنجا که سیستم تغییرین Van Eenennaam جنسیت در فیل ماهی و سایر ماهیان غغیرویی و استخوانی شناخته شده نیست (et al., 1999) و همچنین مطالعات سیستمیکی وجود کرومومهای جنسی در ماهیان خاوشاری‌رنگ نشان نداده است. ۲۰۰۴، (Fontana & Colombo، 1۹۷۴؛ Van Eenennaam et al.) نتایج این تحقیق نشان داده است ( americas) و یا شباهت بسیاری کرومومهای جنسی در فیل ماهی (سیستم تغییرین جنسیت انترنی) و با این شایستگی بسیاری زیادی در کرومومهای جنسی آن باشد. چرا که در این تحقیق باکی‌بند بیش از ۲۰۰۰ باند نشان می‌دهد می‌تواند به بسیاری مزکور مربوط به نشای از کرومومهای جنسی نیوست در مطالعات تخیلی جنسیت، چندین نشانگر واپسین به Wardell et al. (1998) در گونه‌های مختلفی از پستانداران و پرندگان شناسایی گردیده است. (Davidson & McGowan، 1993؛ Griffiths & Tiwari، 1993؛ 1993)
اعلام نمودن که با استفاده از 300 پرتابر مختلف و بررسی انگویی باندی ماهی آزاد اقیانوس اطلس، تفاوتی را در دو جنس نر و ماده مشاهده نکرده‌اند. محققین مذکور بر این عقیده‌اند که با دیدن گرگان غیر قابل تشخیص بودن کروموموهای جنسی در کارپوتایپ این ماهی احتمال دارد زنی که جنسیت این گونه را تعیین می‌کند در آلی و جزء زن‌های آنژومی باشد. فا. و همکاران (2002) نیز با استفاده از سه روش مختلف از جمله روش مطالعه گسترده‌ای را با منظور شناسایی نشانگرهای جنسی در زنوم و گفتگوی سازمان دادند. ایشان با استفاده از 300 پرتابر و بررسی بخش قابل توجهی از زنوم پفعماهی احتمال دادند که کروموموهای جنسی در این گونه وجود نداشته و یا اینکه نقاط متمایز بسیاری بر روی این کروموموها وجود دارد.

از لحاظ تنوری، نیافتن نشانگرهای جنسی می‌تواند دلیلی بر عدم وجود سیستم تعیین جنسیت زننیکی و فعال بودن سیستم تعیین جنسیت محیطی در گونه مورد مطالعه نیز باشد (2002،Li et al.). که در جنين حالتی عوامل متعدد محیطی نظر درجه حرارت، مدت زمان تابش نور pH، شوری، و سابیر منجر به خروج زنی می‌شود .(Delvin & Nagahama، 2002;Tave،1993)

بنابراین از نظر تنوری، عدم وجود سیستم تعیین جنسیت زننیکی در فیل ماهی نیز معنی‌دار است. اما این فرضیه نه تنها زمانی قطعیت می‌یابد که با انجام مطالعات دقیق، چگونگی تعیین جنسیت این گونه (زننیکی، فیزیولوژیکی و با محیطی) مورد آزمون قرار گیرد.

یکی دیگر از عواملی که می‌تواند در عدم شناسایی نشانگرهای جنسی دخالت داشته باشد وجود تنوع بیش از حد در میان افراد مورد مطالعه می‌باشد (2002،Li et al.) با استفاده از روش RAPD نشانگرهای ماهیان نر (P9) را در یکی از نژادهای قزل آیل رنگین کمان شناسایی نمودند که ماهیان ماده مورد مطالعه فاقد آن بودند. استفاده از این نشانگر (Mount Lassen) در تفکیک جنسیت ماهیان قزل آیل در نزاد اسکاتلند نشان داد که توالی مذکور علاوه بر ماهیان نر در زنوم در مدت 26 روز از ماهیان ماده نیز یافت می‌شود. ایشان با توجه به نتایج بدست آمده گزارش نمودند که نشانگرهای جنسی قزل آیل رنگین کمان تنها در زنوم نزاده‌ای مورد مطالعه قابل شناسایی بوده و در سطح جمعیت‌های بیگانه قابل استفاده نیستند. که می‌دانند این نتیجه آن است که ماهیان مور مطابق در این تصویر در دو سال منفی‌تر و از مناطق پرورشی می‌باشند. از آنجا که ماهیان مور مطالعه در این تصویر در دو سال منفی‌تر و از مناطق برنامه‌ریزی می‌باشند. از آنجا که ماهیان مور مطالعه در این تصویر در دو سال منفی‌تر و از مناطق برنامه‌ریزی می‌باشند.
کیوان شکوه و همکاران

بررسی امکان تشخیص جنسیت قبل ماهی با استفاده از...

مختلفی صید و به عنوان مولد وارد کارگاه تکثیر شده‌اند، این احتمال نیز وجود دارد که متعلق به جمعیت‌های مختلفی بوده و تنوع زنده‌ککی موجود در آنها امکان شناسایی یک نشانگر جنسی را می‌سر نسخه‌های این تنش فراهم می‌سازد. با توجه به مشاهده الهام‌برنگی باندکی‌های بیشتر در جنس نر و ماده و استفاده از تعداد زیادی برای می‌رسد که احتمال آتروموپررنی باعث جنسی در این گونه وجود نداشته و در صورت موجود بودن، نقاط مناسب بسیار کمی بر روی آنها قرار دارد که در تحقیق حاضر شناسایی فرد نگرفته است.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که تکنیک جنسیت قبل ماهی‌های بررسی‌هایی که با استفاده از برآوردهای بیشتری به منظور شناسایی و شناسایی جنسیات فیل‌های آزمایش گردید، همچنین توصیه می‌گردد با روش ساتورن بی‌پات و استفاده از توالی‌های جنسی شناختی شده در ماهیان و سایر گونه‌های جانوری به (Southern Blot) عناوین کاوشگر (Probe) زنوم فیل‌های ماهی نر و ماده مورد بررسی قرار گیرند. همچنین با توجه به توضیحات ناشناسه‌ها، بودن مکانیسم تعیین جنسیت در فیل‌های ماهی، انجام مطالعات بنیادی در این زمینه ضروری می‌باشد. بررسی مکانیسم تعیین جنسیت در ماهیان با استفاده از روش‌های مختلفی نظر محاسبه شبیه جنسی نتایج حاصل از تلاش‌های مختلفی و انجام دستکاری‌های کروموزومی نظر ماده‌ای امکان بودن است (Delvin & Nagahama, 2002)

که استفاده از روش‌های اولیه با توجه به سابقه ولیدینگ فیل‌های ماهی ماده‌زد در ایران (پورکازمی و همکاران، منتشر نشده) عملیات و کم‌هزینه‌تر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

از مؤسسه تحقیقات شیلات ایران و دانشگاه تربیت مدرس به جهت تأمین اعتبارات مالی این طرح تشکر می‌گردد. همچنین از همکاران آفای مقدسی، رئیس مجمع تکثیر و بررسی ماهیان خاویاری شهید مرگانی در نمونه‌برداری نیز سپاسگزاریم. از کارکنان مجمع استنباط تحقیقات بینالمللی ماهیان خاویاری به خصوص بخش زنده‌ککی که شرايط انجام این بررسی را فراهم نمودند تشکر بعمل می‌آید. همچنین
منابع

کیوان شکووه، س.، ۱۳۸۱. بررسی امکان تشخیص جنسیت فیل‌ماهی با استفاده از روش PCR-RAPD پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده مهندسی طبیعی و علوم دریایی، ۴۲ صفحه.

محمودی، محمددولتی؛ رجبی، ع.؛ شکری، ع.؛ و مسعودی، فرید، م.، ۱۳۸۵. تعیین جنسیت ناساچه‌ماهی ایرانی (Acipenser Persicus) بوشیله‌ای اولتراسونوگرافی. مجله علمی شیلات ایران، شماره ۳، سال دهم، صفحات ۷۱ تا ۷۸.


DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.

Nucleic Acid Research, Vol. 18, pp.6531-6535.