Archive of SID

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1383.13.1.10.6]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2004.113723]

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

سعید کیوان شکوه[۱]، محمد پورکاظمی[۲] و حمید رضا کلباسی[۳]

Keyvan56@Yahoo.com

۱ - دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر صندوق پستی: ۶۶۹

۲ - انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، رشت صندوق پستی: ۶۳۴۶-۴۱۳۶۵

۳ - گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، نور صندوق پستی: ۳۵۶-۴۶۴۱۴

تاریخ ورود: اسفند ۱۳۸۱ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۸۲

چکیده

هدف از انجام این تحقیق مقایسهٔ ژنوم فیل‌ماهی نر و ماده با استفاده از روش RAPD و شناسایی نشانگرهای جنسی بود. به همین منظور پس از استخراج DNA به روش فنل-کلروفرم، دو خزانه از DNA ژنومی افراد نر (ترکیبی از DNA پنج عدد نر) و ماده (ترکیبی از DNA پنج عدد ماده) مهیا گردید. در این تحقیق از ۳۱۰ پرایمر ۱۰ نوکلئوتیدی مورد آزمایش، ۳۰۳ پرایمر باند تولید نموده و ۷ پرایمر دیگر هیچگونه باندی تولید نکردند که می‌تواند به دلیل نامناسب بودن شرایط واکنش PCR و یا عدم وجود محل پهلوگیری برای پرایمرهای مذکور در ژنوم فیل‌ماهی باشد. الگوی باندی کلیه پرایمرهای مورد بررسی به جز پرایمر شماره ۲۹۵ (OPT-۱۷) در جنس نر و ماده یکسان بود و هیچگونه تفاوتی مشاهده نگردید. این پرایمر باندی را در خزانه DNA ژنومی افراد نر تولید نمود که در الگوی باندی جنس ماده مشاهده نمی‌شد. به منظور اطمینان از اختصاصی بودن این باند در جنس نر، آزمایش PCR با استفاده از پرایمر مذکور و بررسی DNA غیر ترکیبی افراد مستقل انجام شد که نتایج نشان داد باند مذکور مربوط به تنوع فردی بوده و در هر دو جنس دیده می‌شود. در مجموع، بررسی ۴۱۴۶ باند شمارش شده بر روی ژل پلی آکریلامید نشان می‌دهد که هیچکدام از باندهای مذکور نشانگر جنسی فیل‌ماهی نمی‌باشد. همچنین نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که احتمالاً کروموزومهای جنسی در فیل‌ماهی وجود نداشته و در صورت موجود بودن، نقاط متمایز بسیار کمی بر روی آنها قرار دارد و یا اصولاً این ماهیان دارای قابلیت ژنتیکی همزمان برای دو جنس هستند.

لغات کلیدی: فیل‌ماهی، *Huso huso*، RAPD، نشانگر جنسی، دریای خزر، ایران

www.SID.ir

Archive of SID

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1383.13.1.10.6]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2004.113723]

مقدمه

در سالهای اخیر ذخایر ماهیان خاویاری که از آبزیان قدیمی نیمکرهٔ شمالی به شمار می‌روند (Billard & Lecointre, 2001)، به دلایلی نظیر صید بی رویه و قاچاق، تجمع آلودگی در آب و رسوبات محیط‌زیست و مسدود شدن مسیرهای منتهی به مناطق تولید مثل طبیعی این ماهیان با کاهش فوق‌العاده‌ای مواجه گردیده است (Bristein, 1993 ;Pourkazemi *et al.*, 1999). همچنین عواملی نظیر سن بالای بلوغ (۵ تا بیش از ۲۰ سال) و فاصله زمانی طولانی بین دو تولید مثل (۲ تا بیش از ۱۰ سال) آسیب‌پذیری این گونه‌ها را افزایش داده است (May *et al.*, 1997)، بطوریکه تقریباً تمامی گونه‌های ماهیان خاویاری دنیا در معرض خطر انقراض قرار گرفته‌اند (DeMeulenaer & Raymakers, 1996; Bristein, 1993). لذا برای حفظ ذخایر این ماهیان تمهیداتی باید در نظر گرفته شود که از آن جمله می‌توان به تکثیر و پرورش مصنوعی و همچنین تولید خاویار پرورشی اشاره کرد.

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

امروزه از برخی روشهای ژنتیک مولکولی بعنوان روشی دقیق و بی‌خطر در تشخیص جنسیت موجودات استفاده می‌گردد (Williams *et al.*, 1990 ; Vos *et al.*, 1995 ; McClelland, 1990 & Welsh).

روش RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) از جمله روشهای متداول در شناسایی نشانگرهای 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 دارند، نشانگرهای جنسی می‌باشند (Griffiths, 2000 ;Lessells & Mateman, 1998). با وجود اینکه

www.SID.ir

Archive of SID

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1383.13.1.10.6]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2004.113723]

استفاده از روش RAPD در کشف نشانگرهای جنسی بسیاری از گونه‌های گیاهی (Martinez *et al.*, 1999) و همچنین جانوری (Griffiths, 2000 ; Lessells & Mateman, 1998) موفقیت‌آمیز بوده است، اما امکان استفاده از این تکنیک تنها در تشخیص جنسیت چند گونه از ماهیان مورد مطالعه قرار گرفته است. Iturra و همکاران (۱۹۹۸) با استفاده از روش RAPD موفق به شناسایی نشانگر مولکولی کروموزوم جنسی قزل‌آلای رنگین‌کمان شدند. Kovacs و همکاران (۲۰۰۱) نیز شناسایی دو نشانگر جنسی در گربه‌ماهی (*Clarias gariepinus*) را گزارش نمودند. اما استفاده از این روش در تشخیص جنسیت ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) (McGowan & Davidson, 1998) و همچنین پف ماهی (*Tetraodon nigroviridis*)(Li *et al.*, 2002) موفقیت‌آمیز نبوده است. تحقیق حاضر برای اولین بار امکان استفاده از روش RAPD در تشخیص جنسیت فیل‌ماهی (*Huso huso*) دریای خزر را مورد بررسی قرار داده است.

مواد و روش کار

در این تحقیق از فیل‌ماهیان صید شده جهت عملیات تکثیر مصنوعی، در اسفند ماه ۱۳۸۰ در مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی واقع در حومه آق‌قلا (۴۵ کیلومتری شهر گرگان) نمونه‌برداری شد. در هنگام نمونه‌برداری از انتهای باله دمی ده عدد فیل‌ماهی نر و ده عدد فیل‌ماهی ماده نمونه بافت برداشته و پس از نگهداری آنها در اتانول ۹۶ درصد به آزمایشگاه ژنتیک انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان در رشت منتقل گردید. استخراج DNA با استفاده از روش فنل-کلروفرم همراه با تغییراتی جزئی انجام شد (Pourkazemi, 1996). ارزیابی کیفیت و کمیت DNA استخراجی با الکتروفورز آن بر روی ژل آگاروز یک درصد و همچنین با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام گردید. از آنجا که روش RAPD برای بررسی پلی‌مورفیسم طراحی شده است، لذا ممکن است باندهایی در برخی افراد دیده شود که دیگر نمونه‌ها فاقد آن باشند. برای رفع این مشکل، پس از یکسان سازی غلظت کلیه نمونه‌ها، دو خزانه از DNA ژنومی افراد ماده (هر کدام ترکیبی از DNA پنج عدد ماده) و همچنین دو خزانه از DNA ژنومی افراد نر (هر کدام ترکیبی از DNA پنج عدد نر) تهیه گردید (Iturra *et al.*, 1998).

www.SID.ir

Archive of SID

در هر واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ ماکرولیتر از ۱۵ نانوگرم DNA، ۱x بافر PCR (Cinnagen)، ۴۰۰μM از هر dNTP (Pharmacia)، ۰/۵μM پرایمر (Pharmcia Operon Technologies و IBA)، ۱ واحد آنزیم تک‌پلی‌مراز (Eppendorf و Cinnagen) و۱/۵ mM کلریدمنیزیم (Cinnagen) استفاده شد. در هر سری از آزمایشها از یک کنترل منفی و مثبت نیز استفاده گردید. کنترل مثبت حاوی پرایمری (پرایمر ۳۶) بود که در مراحل قبل باندهای واضحی تولید کرده بود. عمل PCR در تیوبهای ۰/۲ ماکرولیتری و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Amersham Pharmacia (مدل TC 341)انجام گرفت. تنظیم درجه حرارت دستگاه ترموسایکلر به صورت ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت سه دقیقه برای واسرشته سازی اولیه (Denaturation)، همراه با ۴۰ چرخه حرارتی به صورت ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، ۳۶ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه (Annealing) و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت سه دقیقه (Extension) انجام شد. پس از آن نیز به منظور بسط نهایی واکنش از درجه حرارت ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه استفاده گردید. در این بررسی در مجموع، ۳۱۰ پرایمر ۱۰ نوکلئوتیدی با توالی‌های مختلف آزمایش شد[۱]. به منظور ظاهرسازی و بررسی الگوی باندی نر و ماده ۵μlit از هر محصول PCR بر روی ژل پلی‌آکریلامید ۶ درصد رانده شد و پس از انجام الکتروفورز (۱۵۰V به مدت ۴ ساعت)، ژلهای مورد نظر با استفاده از نیترات نقره رنگ‌آمیزی گردیدند. تصاویر ژلهای بدست آمده نیز با استفاده از دستگاه مستندسازی ژل (ساخت شرکت Vilber Lourmat) ثبت گردید.

نتایج

بررسی باندهای DNA بر روی ژل آگاروز و مشاهدهٔ تیزی و شدت باندهای تولید شده نشان داد که نمونه‌های DNA استخراج شده از کیفیت و کمیت قابل قبولی برای استفاده در آزمایشات PCR برخوردار هستند. شکل شمارهٔ ۱ نمونه‌ای از DNAهای رانده شده بر روی ژل آگاروز یک درصد را نشان می‌دهد. محاسبهٔ میزان جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر به میزان جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر نیز نشان داد که این نسبت در مورد تمام نمونه‌های استخراج شده بالاتر از ۱/۷ و کمتر از ۱/۹ می‌باشد.

---

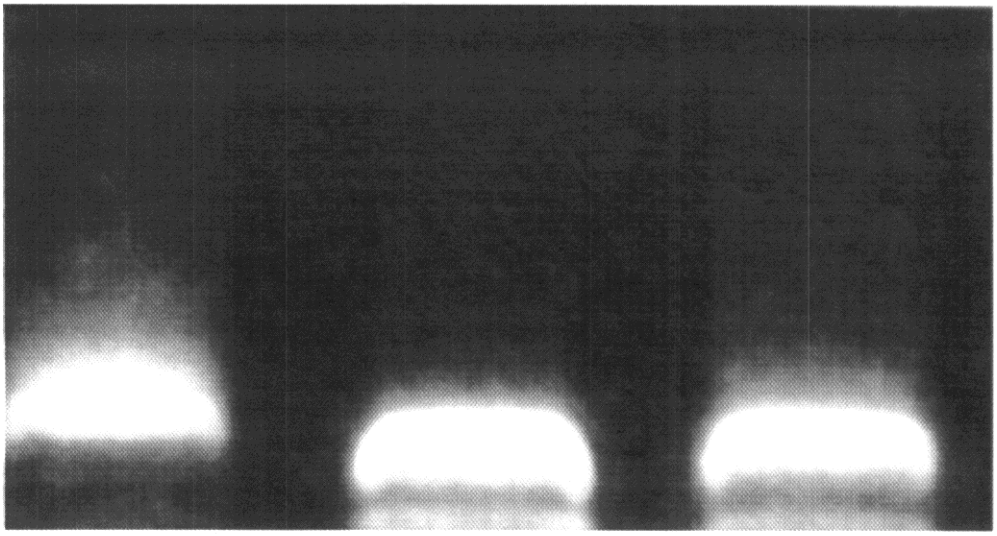
۱ - برای آگاهی از توالی پرایمرها به منبع کیوان شکوه ۱۳۸۱ مراجعه شود.

www.SID.ir

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1383.13.1.10.6]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2004.113723]

Archive of SID

به منظور ظاهرسازی محصولات PCR و بررسی الگوی باندی جنس نر و ماده، در حدود ۶۰ ژل پلی‌آکریلامید ۶ درصد تهیه و پس از اتمام الکتروفورز با استفاده از نیترات نقره رنگ‌آمیزی گردید. کنترل منفی، عدم آلودگی واکنشگرها به DNA را تضمین نموده و کنترل مثبت نحوه کارکرد واکنشگرها و دستگاه PCR را تأیید نمود.



شکل ۱: نمونه‌ای از DNAهای رانده شده بر روی ژل آگاروز یک درصد

در این تحقیق مشخص گردید که از ۳۱۰ پرایمر مورد استفاده، ۷ عدد از آنها که شامل پرایمرهای شماره ۲۵۵، ۲۶۳، ۲۶۷، ۲۶۹، ۲۷۱، ۲۷۶، ۲۷۷ می‌باشد، هیچگونه باندی تولید نکرده‌اند. در نتیجه آزمایشهای PCR با استفاده از پرایمرهای مذکور در سه دمای متفاوت اتصال (Annealing) یعنی ۳۴، ۳۶، و ۳۸ درجه سانتیگراد تکرار گردید که در هیچکدام از شرایط دمایی مورد آزمایش، عمل اتصال پرایمرها و تولید باند انجام نشد، در حالیکه نمونه حاوی کنترل مثبت (پرایمر شماره ۳۶) در هر سه دمای اتصال، باندهای مشخصی تولید نمود.

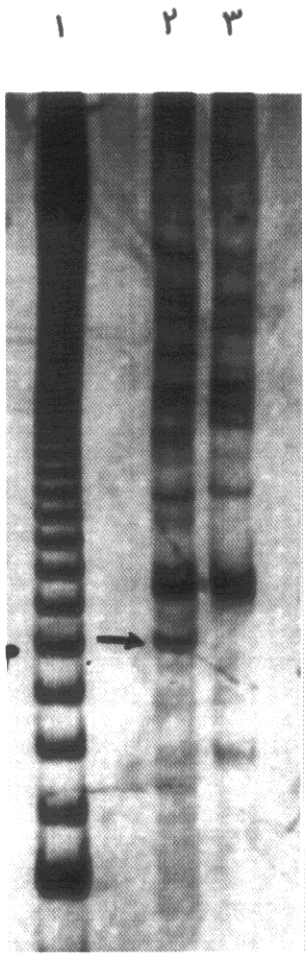
سایر پرایمرهای آزمایش شده باندهای مشخصی را تولید نمودند که اندازه تقریبی باندهای مذکور بین

www.SID.ir

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1383.13.1.10.6]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2004.113723]

Archive of SID

۵۰ تا ۱۹۰۰ جفت باز می‌باشد. هر پرایمر بطور متوسط ۱۳ باند تولید نمود و در مجموع ۴۱۴۶ باند شمارش گردید که پرایمر شماره ۶۶ کمترین تعداد باند (۴ باند) و پرایمر شماره ۲۸۸ بیشترین تعداد باند (۳۱ باند) را تولید نمودند.



شکل ۲: الگوی باندی پرایمر ۲۹۵ (OPT - ۱۷) را در جنس نر (ستون ۲) و ماده (ستون ۳) نشان می‌دهد. ستون ۱ مارکر ۵۰ جفت بازی می‌باشد.

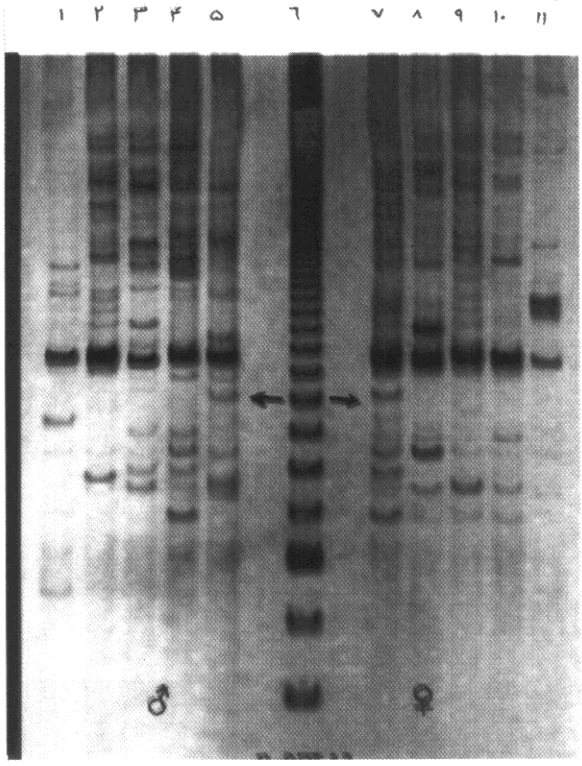
الگوی باندی کلیه پرایمرهای مورد بررسی به جز پرایمرهای مورد بررسی به جز پرایمر شماره ۲۹۵ (OPT - ۱۷) در دو جنس نر و ماده یکسان بود و هیچگونه تفاوتی مشاهده نگردید. این پرایمر باندی با اندازه تقریبی ۴۵۰ جفت باز را در خزانه DNA ژنومی افراد نر تولید کرده بود که در الگوی باندی جنس

www.SID.ir

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1383.13.1.10.6]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2004.113723]

Archive of SID

ماده مشاهده نمی‌شد (شکل ۲). به منظور اطمینان از اختصاصی و تکرارپذیر بودن این باند در جنس نر، آزمایش PCR با استفاده از پرایمر مذکور و بر روی DNA غیر ترکیبی پنج عدد فیل‌ماهی نر و پنج عدد ماده تکرار گردید. پس 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 تنوع 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 ۵۰ جفت بازی (ستون ۶) را نشان می‌دهد.

بحث:

در این تحقیق ۳۳ پرایمر از ۳۱۰ پرایمر آزمایش شده، باندهای واضح و مشخص تولید نموده ولی ۷ پرایمر دیگر هیچگونه باندی را تولید نکردند. عدم تولید باند توسط پرایمرهای مذکور می‌تواند به دلیل نامناسب بودن شرایط واکنش باشد. اما با توجه به اینکه آزمایشهای PCR با استفاده از پرایمرهای مذکور

www.SID.ir

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1383.13.1.10.6]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2004.113723]

Archive of SID

در سه دمای متفاوت اتصال (۳۴، ۳۶، و ۳۸ درجه سانتیگراد) تکرار گردید و در هر سه دمای مورد آزمایش، عمل اتصال پرایمر و تولید باند انجام نشد و در هر سه تکرار نمونه حاوی کنترل مثبت باند تولید نمود، این احتمال نیز وجود دارد که پرایمرهای مذکور بر روی ژنوم فیل‌ماهی دارای محل پهلوگیری نباشد و یا احتمالاً غلظت پرایمرها به اندازه کافی تهیه نشده بود. تولید باندهای واضح توسط اکثر پرایمرها نشان می‌دهد که نمونه‌های DNA استخراج شده از کیفیت مناسبی برخوردار بوده‌اند و روش فنل-کلروفرم روش مناسبی برای استخراج DNA در آزمایشهای RAPD می‌باشد.

اولین گام در تشخیص جنسیت یک موجود با استفاده از نشانگرهای DNA، وجود سیستم تعیین جنسیت ژنتیکی در آن گونه می‌باشد(Griffiths, 2000). به عنوان مثال در گونه‌ای که نرها هتروگامت (XY) و ماده‌ها هموگامت (XX) باشند، احتمال یافتن چنین نشانگرهایی در DNA افراد نر وجود دارد، چرا که کروموزوم Y تنها در افراد نر دیده می‌شود. در برخی از گونه‌ها کروموزومهای جنسی کاملاً تکامل یافته و متمایز هستند و در برخی دیگر یک جفت از کروموزومهای آتوزومی به عنوان کروموزومهای جنسی عمل نموده و از نظر مورفولوژیک یکسان می‌باشند (Tave, 1993). وجود کروموزومهای جنسی متمایز تنها در کاریوتایپ ۱۷۶ گونه از ماهیان گزارش گردیده است، در حالیکه تاکنون بیش از ۱۷۰۰ گونه ماهی از نظر سیتوژنتیکی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Delvin & Nagahama, 2002). از آنجا که سیستم تعیین جنسیت در فیل‌ماهی و سایر ماهیان غضروفی - استخوانی شناخته شده نیست (Van Eenennaam *et al.*, 1999) و همچنین مطالعات سیتوژنتیکی وجود کروموزمهای جنسی در ماهیان خاویاری را نشان نداده است (Fontana & Colombo, 1974 ;Van Eenennaam *et al.*, 1998)، نتایج این تحقیق می‌تواند احتمالاً نشانه‌ای از عدم وجود کروموزومهای جنسی در فیل‌ماهی (سیستم تعیین جنسیت آتوزومی) و یا شباهت بسیار زیاد کروموزومهای جنسی آن باشد. چرا که در این تحقیق با کاربرد بیش از ۳۰۰ پرایمر، الگوی باندی یکسانی در هر دو جنس مشاهده گردید. به عبارت دیگر بررسی حدود ۴۱۵۰ باند نشان می‌دهد که هیچکدام از باندهای مذکور مربوط به ژن تعیین جنسیت فیل‌ماهی نبوده است. در حالی که با استفاده از همین روش (RAPD) در مطالعات تشخیص جنسیت، چندین نشانگر وابسته به کروموزوم Y در گونه‌های مختلفی از پستانداران و پرندگان شناسایی گردیده است (Wardell *et al.*,1993; Griffiths & Tiwari, 1993 ;Levin *et al.*, 1993). Davidson & McGowan (۱۹۹۸) نیز

www.SID.ir

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1383.13.1.10.6]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2004.113723]

Archive of SID

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1383.13.1.10.6]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2004.113723]

اعلام نمودند که با استفاده از ۲۰۰ پرایمر مختلف و بررسی الگوی باندی ماهی آزاد اقیانوس اطلس، تفاوتی را در دو جنس نر و ماده مشاهده نکرده‌اند. محققین مذکور بر این عقیده‌اند که با در نظر گرفتن غیر قابل تشخیص بودن کروموزومهای جنسی در کاریوتایپ این ماهی، احتمال دارد ژنی که جنسیت این گونه را تعیین می‌کند دو آللی و جزء ژنهای آتوزومی باشد. Li و همکاران (۲۰۰۲) نیز با استفاده از سه روش مختلف از جمله روش RAPD، مطالعهٔ گسترده‌ای را به منظور شناسایی نشانگرهای جنسی در ژنوم پفماهی سازمان دادند. ایشان با استفاده از ۲۳۰۰ پرایمر و بررسی بخش قابل توجهی از ژنوم پفماهی احتمال دادند که کروموزومهای جنسی در این گونه وجود نداشته و یا اینکه نقاط متمایز بسیار کمی بر روی این کروموزومها وجود دارد.

از لحاظ تئوری، نیافتن نشانگرهای جنسی می‌تواند دلیلی بر عدم وجود سیستم تعیین جنسیت ژنتیکی و فعال بودن سیستم تعیین جنسیت محیطی در گونه مورد مطالعه نیز باشد (Li *et al* ., 2002)، 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 می‌نماید (Delvin & Nagahama, 2002;Tave, 1993). بنابراین از نظر تئوری، عدم وجود سیستم تعیین جنسیت ژنتیکی در فیل‌ماهی نیز محتمل است. اما این فرضیه تنها زمانی قطعیت می‌یابد که با انجام مطالعات دقیق، چگونگی تعیین جنسیت این گونه (ژنتیکی، فیزیولوژیکی و یا 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 (Li *et al*., 2002). Iturra و همکاران (۱۹۹۸) با استفاده از روش RAPD، نشانگر جنسی ماهیان نر (P9) را در یکی از نژادهای قزل‌آلای رنگین کمان (Mount Lassen) شناسایی نمودند که ماهیان ماده مورد مطالعه فاقد آن بودند. استفاده از این نشانگر در تفکیک جنسیت ماهیان قزل‌آلای نژاد اسکاتلندی نشان داد که توالی مذکور علاوه بر ماهیان نر در ژنوم ۶۲ درصد از ماهیان ماده نیز یافت می‌شود. ایشان با توجه به نتایج بدست آمده گزارش نمودند که نشانگرهای جنسی قزل‌آلای رنگین‌کمان تنها در ژنوم نژادهای مورد مطالعه قابل شناسایی بوده و در سطح جمعیتهای دیگر قابل استفاده نیستند، که دلیل آن نیز تفاوت زیاد میان جمعیتهای مختلف ماهیان پرورشی می‌باشد. از آنجا که فیل‌ماهیان مورد مطالعه در این تحقیق در دو سال متفاوت و از مناطق

www.SID.ir

Archive of SID

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1383.13.1.10.6]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2004.113723]

مختلفی صید و به عنوان مولد وارد کارگاه تکثیر شده‌اند، این احتمال نیز وجود دارد که متعلق به جمعیت‌های مختلفی بوده و تنوع ژنتیکی موجود در آنها امکان شناسایی یک نشانگر جنسی را میسر نساخته است.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که تفکیک جنسیت فیل‌ماهی نر و ماده با استفاده از پرایمرهای بکار رفته در این تحقیق امکان‌پذیر نمی‌باشد. با توجه به مشاهده الگوی باندی یکسان در جنس نر و ماده و استفاده از تعداد زیادی پرایمر در این بررسی، بنظر می‌رسد که احتمالاً کروموزومهای جنسی در این گونه وجود نداشته و در صورت موجود بودن، نقاط متمایز بسیار کمی بر روی آنها قرار دارد که در تحقیق حاضر مورد شناسایی قرار نگرفته است.

با توجه به نتایج این بررسی پیشنهاد می‌گردد که با استفاده از روش RAPD و سایر روشهای مولکولی نظیر AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)، پرایمرهای بیشتری به منظور شناسایی نشانگرهای جنسی فیل‌ماهی آزمایش گردد. همچنین توصیه می‌گردد با روش ساترن بلات (Southern Blot) و استفاده از توالیهای جنسی شناخته شده در ماهیان و سایر گونه‌های جانوری به عنوان کاوشگر (Probe)، ژنوم فیل‌ماهی نر و ماده مورد بررسی قرار گیرد. همچنین با توجه به ناشناخته بودن مکانیسم تعیین جنسیت در فیل‌ماهی، انجام مطالعات بنیادی در این زمینه ضروری می‌باشد. بررسی مکانیسم تعیین جنسیت در ماهیان با استفاده از روشهای مختلفی نظیر محاسبه نسبت جنسی نتاج حاصل از تلاقیهای مختلف و انجام دستکاریهای کروموزومی نظیر ماده‌زایی امکان‌پذیر است (Delvin & Nagahama, 2002)، که استفاده از روش اخیر با توجه به سابقه تولید فیل‌ماهی ماده‌زاد در ایران (پورکاظمی و همکاران، منتشر نشده) عملی‌تر و کم هزینه‌تر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

از مؤسسه تحقیقات شیلات ایران و دانشگاه تربیت مدرس به جهت تأمین اعتبارات مالی این طرح تشکر می‌گردد. همچنین از همکاری آقای مقدسی رئیس مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی در نمونه‌برداری نیز سپاسگزاریم. از کلیهٔ کارکنان محترم انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری بخصوص بخش ژنتیک که شرایط انجام این پروژه را فراهم نمودند تشکر بعمل می‌آید. همچنین

www.SID.ir

Archive of SID

آقایان دکتر L. Orban و دکتر R. Griffiths در تهیه رفرنسهای مرتبط با این موضوع تلاش نمودند که از آنها تشکر می‌گردد.

منابع

کیوان شکوه، س. ، ۱۳۸۱. بررسی امکان تشخیص جنسیت فیل‌ماهی با استفاده از روش PCR-RAPD. پایان نامهٔ کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، ۵۴ صفحه.

مقیم، م. ؛ وجهی، ع. ؛ وشکینی، ع. و مسعودی فرد، م. ، ۱۳۸۰. تعیین جنسیت تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser Persicus*) بوسیلهٔ اولتراسونوگرافی. مجلهٔ علمی شیلات ایران، شمارهٔ ۳، سال دهم، صفحات ۷۱ تا ۸۷.

Billard, R. and Leconintre, G. , 2001. Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. Reviews in Fish Biology and Fisheries, Vol. 10, pp.355-392.

Bristein, V.J. , 1993. Sturgeons and paddlefishes: Threatened fishes in need of conservation. Conserv. Biol., Vol. 7, pp.773-787.

Delvin, R.H. and Nagahama, Y. , 2002. Sex determination and differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture, Vol. 208, pp.197-364.

DeMeulenaer, T. and Raymakers, C. , 1996. Sturgeon of the Caspian Sea and the international trade in Caviar. Cambridge, UK: Traffic International.

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

Griffiths, R. and Tiwari, B. , 1993. The isolation of molecular genetic markers for the identification of sex. Proceedings of the national Academy of Sciences of the USA. Vol. 90, pp.8324-8326.

www.SID.ir

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1383.13.1.10.6]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2004.113723]

Archive of SID

Griffiths, R. , 2000. Sex identification using DNA markers. In Molecular Methods in Ecology (Baker, A.J., ed.). London: Black well Science.

Iturra, P. ; Medrano, J.F. ; Bagley, M. ; Lam, N. ; Vergara, N. and Marin, J.C. , 1998. Identification of sex chromosome molecular, markers using RAPDs and fluorescent in situ hybridization in rainbow trout. Genetica, Vol. 101, pp.209-213.

Kovacs, B. ; Egedi, S. ; Bartfai, R. and Orban, L., 2001. Male-specific DNA markers from African catfish (*Clarias gariepinus*). Genetica, Vol. 110, pp.267-276.

Lessells, C.M. and Mateman, A.C. , 1998. Sexing birds using random amplified ploymorphic DNA (RAPD) markers. Molecular Ecology, Vol. 7, pp.187-195.

Levin, I. ; Crittendex, L.B. and Didgson, J.B. , 1993. Genetic map of the chicken Z chromosome using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Genomics, Vol. 16, pp.224-230.

Li, Y. ; Hill, J.A. ; Yue, G.H. ; Chen, F. and Orban, L. , 2002. Extensive search does not identify genomic sex markers in *Tetraodon nigroviridis*. Journal of Fish Biology. Vol. 60, pp.1-4.

Logan, S.H. ; Johnston, W.E. and Doroshov, S.L. , 1995. Economics of joint production of sturgeon (*Acipenser transmontamus* Richardson) and roe for caviar. Aquaculture, Vol. 130, pp.299-316.

Martinez, E.A. ; Destombe, C. ; Quiller, M.C. and Valero, M. , 1999. Identification of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers higly linked to sex determination in the red alga *Gracilaria gracilis*. Molecular Ecology. Vol. 8, pp.1533-1538.

May, B. ; Krueger, C.C. and Kincaid, H.L. , 1997. Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus*.

www.SID.ir

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1383.13.1.10.6]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2004.113723]

Archive of SID

Can. J. Fish. Aquat. Sci, Vol. 54, pp.1542-1547.

McGowan, C. and 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.

Pourkazemi, M. , 1996. Molecular and biochemical genetic analysis of sturgeon stocks from the south Caspian Sea. Ph.D. Thesis, University of Wales, Swansea. 260P.

Pourkazemi, M. ; Skibinski, D.O.F. and Beardmore, J.A. , 1999. Application of mtDNA d-loop region for the study of russian sturgeon population structure from Iranian coastline of the Caspian Sea. J. App. Ichthyol. Vol. 15, pp.23-28.

Tave, D. , 1993. Genetics for fish hatchary managers. (2nd ed.), New York: Van Nostrand Reinhold. 379 P.

Van Eenennaam, A.L. ; Murray, J.D. and Medrano, J.F. , 1998. Mitotic analysis of the North American white sturgeon, *Acipenser transmontanus* Richardson (Pisces, Acipenseridae), a fish with a very high chromosome number. Genome, Vol. 41, pp.266-267.

Van Eenennaam, A.L. ; Van Eenennaam, J.P. ; Medrano, L.F. and Doroshov, S.L. , 1999. Evidence of female heterogametic genetic sex determination in white sturgeon. Heredity, Vol. 90, pp.231-233.

Vos, P. ; Hogers, R. ; Bleaker, M. ; Reijans, M. ; Van de Lee, T. ; Hornes, M. ; Fritjers, A. ; Pot, J. ; Peleman, J. ; Kuiper, M. and Zabeau, M. , 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucl. Acids Res. Vol. 23, pp.4407-4414.

Wardell. B. ; Sudweeks, J.D. ; Meeker, N.D. ; Estes, S.S. ; Woodward, S.R. and Welsh, J. and McClelland, M. , 1990. Fingerprinting genomes using PCR

www.SID.ir

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1383.13.1.10.6]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2004.113723]

Archive of SID

with arbitrary primers. Nucleic Acids Research, Vol. 18, pp.7213-7218.

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

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-01]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1383.13.1.10.6]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2004.113723]

www.SID.ir