استفاده از نشانگرهای اختصاصی در تعیین جنسیت ماهیان خاویاری

امید جعفری*

انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۴۰۰

چکیده

ماهیان خاویاری از گونه های ارزشمند آبزیان دریای خزر و همچنین سایر منابع آبی در دنیا می باشند. این ماهیان نه تنها به دلیل خاویار بلکه به لحاظ گوشت و محصولاتی جانبی مانند تهیه چرم از پوست آن‌ها بسیار حائزاهمیت می باشند. از ۲۷ گونه ماهیان خاویاری، ۱۷ گونه در طبقه به شدت در معرض خطر انقراض قرار گرفته‌اند و در دریای خزر هر ۵ گونه بومی آن در طبقه به شدت در معرض خطر انقراض قرار دارند. از مهم ترین دلایل برای کاهش شدید ذخایر طبیعی ماهیان خاویاری، صید قاچاق جهت استحصال خاویار و گوشت، عوامل زیست محیطی همچون از دست رفتن مکان‌های تخم ریزی و، کاهش ورودی منابع آب شیرین و همچنین آلودگی آب‌ها می باشد. تعیین جنسیت این ماهیان زمان بر و عمدتا تهاجمی بوده و نشانگرهای ژنتیکی که بتوانند تمایز جنسیت ایجاد کند، نیز در روش‌های سنتی کشف نگردید. از اینرو تعیین جنسیت ماهیان خاویاری با استفاده از نشانگر مولکولی کشف شده با استفاده از روش‌های نوین در مراحل ابتدایی قابل انجام بوده که می تواند از نظر مدیریتی اهمیت بسزایی در مزارع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری داشته باشد.

کلمات کلیدی: تعیین جنسیت، فیل‌ماهی، ماهیان خاویاری، نشانگر مولکولی.

* نویسنده مسئول: Jaafari.omid@yahoo.com

مقدمه

از قرن ۱۹به بعد جمعیت ماهیان خاویاری با افت چشمگیری مواجه شد و امروزه همه ماهیان خاویاری جزو گونه های پرخطر انقراض در آبزیان آب شیرین قرار گرفته اند (Wuertz *et al*., 2018). همه ۲۴ گونه ماهیان خاویاری متعلق به خانواده Acipenseridae در لیست قرمز IUCN قرار گرفته و تجارت بین المللی خاویار آن توسط CITES مراقبت می شود. صید بیش از حد برای تولید خاویار، آلودگی آب‌ها و از بین رفتن زیستگاه‌های طبیعی مهم‌ترین عوامل کاهش شدیدی ذخایر طبیعی ماهیان خاویاری محسوب می‌شوند. امروزه صید غیر قانونی ماهیان خاویاری همچنان در حال انجام بوده و تجارت قاچاق خاویار با برچسب گزاری جعلی نیز به انجام رسیده و به ندرت مشخص می‌شوند؛ با این حال اجرای چندین برنامه جهانی امیدواری جهت احیای ذخایر ماهیان خاویاری را افزایش داده است.

بر خلاف میزان صید طبیعی ماهیان خاویاری، تولید حاصل از فعالیت‌های آبزی‌پروری ماهیان خاویاری از دهه ۱۹۹۰ به شدت افزایش پیدا کرده است (Bronzi and Rosenthal, 2014). در حال حاضر کشور چین در مقیاس جهانی، تولید بیش از ۸۵ درصد گوشت ماهیان خاویاری را به خود اختصاص داده است و کشور روسیه و اتحادیه اروپا در رده‌های بعدی قرار دارند (FAO, 2020). تولید خاویار از ذخایر طبیعی ماهیان خاویاری غیر قانونی است در حالیکه تولید خاویار ناشی از آبزی پروری حدود ۴۰۰ تن تا سال ۲۰۱۹ برآورد شده است (FAO, 2020). یادآوری این نکته که خاویار یک محصول گران قیمت است بسیار حائز اهمیت می باشد لذا استاندارهای کیفیت خاویار و همچنین تولید پایدار آن با در نظر گرفتن شکل کنونی مزارع و بدون تغییر رویه‌های عملکردی به دست نخواهد آمد. پیش بینی میزان تولید در چند سال آینده بالغ بر ۷۰۰ تن می‌باشد که این مهم بیانگر رشد چشمگیر بخش آبزی پروری ماهیان خاویاری می باشد.

علیرغم پیشرفت‌های ایجاد شده در تولیدات آبزی پروری، میزان تقاضا بسیار بیشتر از میزانی است که در جهان عرضه می گردد. بلوغ طولانی، چرخه تولید مثلی که معمولا چندین سال به طول می انجامد و همچنین عملکردهای تولید مثلی ناقص که به دفعات مشاهده شده اند، باعث ایجاد یک بحران برای بازده اقتصادی شده و از پیشرفت و تکامل این صنعت جلوگیری می کند. از همین رو، یک سیستم تولیدی تمایل به پرورش ماهی خاویاری با جنسیت ماده داشته تا بتواند هزینه‌ها را کاهش داده تا باعث بهینه سازی و منفعت اقتصادی به ازای هر واحد تولید شود. اگرچه جنسیت ماهیان خاویاری در مراحل اولیه تعیین می‌شود و وجه تمایز با تفاوت‌های سیتولوژیک و بلافاصله پس از آنالیزهای بافتی بیان می گردند، ولی این روش‌ها صرفا برای اهداف تحقیق و توسعه مناسب بوده و قابلیت استفاده در فعالیت های اقتصادی را ندارد.

در ماهیان خاویاری عدم تمایز جنسی به صورت خارجی تنها این اجازه را می‌دهد که تفاوت های آناتومیکی داخلی ماهیان جنس ماده تنها در سنین بالا و با استفاده از روش های تهاجمی و یا غیر تهاجمی تشخیص داده شود. بسته به گونه و روش مورد استفاده، تنها مرحله قابل اعتماد در تشخیص جنسیت ، بعد از مرحله رشد و زمانی که رشد چشمگیر اووسیت ها بر اثر جذب کیسه زرده در مرحله ویتلوژنیک صورت گرفته است می باشد. بر اساس روش-های غربال‌گری موجود، تشخیص و تمایز نرها و ماده‌های نارس (مرحله پیش زرده) چالش برانگیز است (Masoudifard *et al*., 2011).

این مشکل در گونه های با بلوغ دیرهنگام مانند *Acipenser transmontanus* و *Huso huso* در مقایسه با گونه های دارای بلوغ زودرس مانند استرلیاد و تاس ماهی سیبری بیشتر به چشم می آید. به همین دلیل جهت افزایش دقت و صحت انجام کار، تعیین جنسیت چندین بار انجام شده تا ماهی ماده نارس به عنوان ماهی نر اشتباه تشخیص داده نشود. بنابراین، با در نظر گرفتن تنوع زمان بلوغ در ماهیان خاویاری، هزینه‌های نیروی کار، هزینه‌های مربوط به رشد غیرمنتظره و جنسیت‌های چندگانه ممکن است به راحتی سودآوری را در پرورش کاهیان خاویاری تحت تاثیر قرار دهد. سیستم پرورش،

کیفیت آب، شدت تغذیه، رژیم غذایی و دما ممکن است باعث تاخیر در بلوغ و کاهش کارایی و دقت در تعیین جنسیت گردد (Wuertz *et al*., 2018).

طی سالیان گذشته، پیشرفت‌های ایجاد شده در صنعت توالی‌یابی موسوم به توالی یابی نسل جدید (NGS) باعث انقلابی عظیم در علوم زیست شناسی سامانه‌ها و ژنومیکس شده است بطوریکه در مدت زمان نسبتا کوتاهی محتوای اطلاعات ژنومی موجودات مختلف مدل و غیر مدل در اختیار محققین قرار می‌گیرد. از مهم‌ترین کاربرد های بدست آمده با تکیه بر روش‌های NGS در علوم شیلاتی، می توان به شناسایی ژن‌ها و معرفی نشانگرهای مولکولی جدید که در ارتباط با صفات خاص هستند، اشاره کرد (Robledo *et al*., 2018). به عنوان مثال در پژوهش انجام شده بر روی گربه ماهی آمریکا جایگاه‌های ژنتیکی مرتبط با اندازه سر پیدا شد که این موضوع از نظر شاخص پروتئین تولیدی اهمیت بسزایی دارد (Geng *et al*., 2016). همچنین در بررسی انجام شده با استفاده از روش های نوین مولکولی بر روی فیل ماهی، استرلیاد و هیبرید ، نشانگر ژنتیکی تمایز دهنده آن‌ها نیز شناسایی گردید (Havelka *et al*., 2017). بر اساس پژوهش انجام شده بر روی شش گونه از ماهیان خاویاری با استفاده از روش-های نوین مولکولی (WGS)، ناحیه ژنتیکی مرتبط با جنسیت در این ماهیان شناسایی و تأیید شد که این دستاورد می تواند برنامه‌های اقتصادی پرورش دهندگان را بسیار تحت تأثیر قرار دهد. از اینرو با توجه به معرفی نشانگرهای اختصاصی طراحی شده مربوط به جنس ماده درماهیان خاویاری، می توان با استفاده از تکثیر قطعه مربوطه تعیین جنسیت ماهیان از سنین پایین صورت پذیرد (Kuhl *et al*., 2021).

مواد و روش‌ها

نمونه گیری

نمونه گیری جهت استخراج DNA ژنومی می تواند از بافت باله و یا خون ماهی صورت گیرد. به منظور استفاده از بافت باله برشی به ابعاد یک سانتی متر مربع کافی می-باشد. نمونه بافت باله پس از گرفته شدن تا زمان استخراج DNA می تواند درون اتانول مطلق منتقل و جهت ذخیره طولانی مدت در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شود.

استخراج DNA

استخراج DNA می تواند با استفاده از کیت های تجاری و یا روش های مرسوم مانند فنل-کلروفرم با مقداری اصلاحات صورت پذیرد (Jafari *et al*., 2018). به طور خلاصه در روش فنل-کلروفرم؛ نمونه‌ها ابتدا در محلول STE قرار گرفته و پس از افزودن سولفات دودسیل سدیم (SDS) و پروتئیناز K و با سانتریفوژ در ۶۰۰۰ دور در دقیقه به منظور همگن نمودن ، به مدت ۵ تا ۲۴ ساعت درون دستگاه بن ماری و در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد گذاشته تا مراحل هضم شدن صورت پذیرد. نمونه‌ها پس از هموژن شدن، توسط فنل-کلروفرم خالص سازی و DNA توسط الکل مطلق و عمل سانتریفیوژ شدن، ترسیب داده می‌شود. در آخرین مرحله DNA رسوب یافته را پس از خشک کردن الکل آن، در آب مقطر و در دمای ۳۷ به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده تا DNA استخراجی به طور کامل حل شود. به منظور بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراجی از ژل آگارز یک درصد و دستگاه نانودراپ ND1000 استفاده می‌گردد.

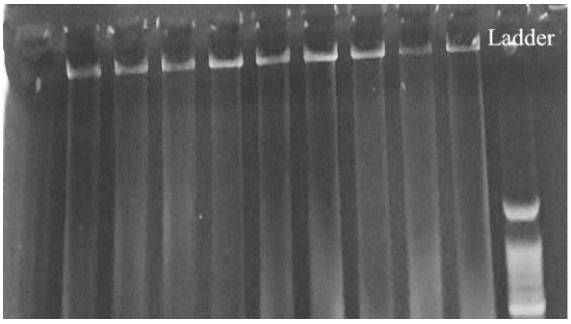
انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز و الکتروفورز

در ادامه جهت تکثیر قطعه مورد نظر، واکنش زنجیره ای پلی مراز در دستگاه ترموسایکلر (BIO-RAD, MJ Mini Thermal Cycler) و درون میکروتیوپ های مخصوص به حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۳۰ نانوگرم DNA استخراجی، ۱ میکرولیتر ازهر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ میکرومولار، چهارصد میکرولیتر از $dNTP_S$ با غلظت ۱۰ میکرومولار، ۰/۲ واحد Taq DNA Polymerase، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X) و اضافه نمودن آب مقطر استریل تا رسیدن به حجم ۲۵ میکرولیتر انجام می‌شود. مراحل انجام واکنش زنجیره پلی مراز در هر آزمایشگاه نیاز به بهینه سازی داشته ولی بطور کلی برنامه زیر می تواند مورد استفاده

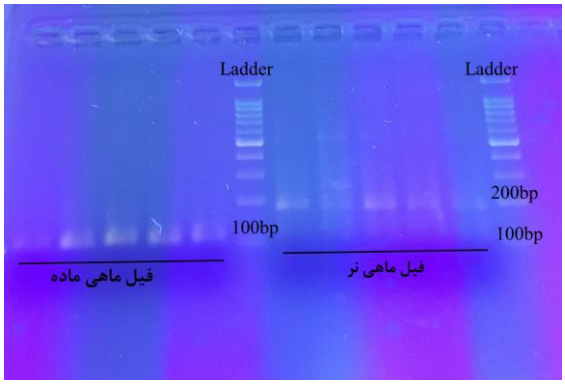
قرار گیرد: واسرشتگی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه، در ادامه ۳۰ چرخه شامل مرحله واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه و به مدت ۳۵ ثانیه، مرحله اتصال ۵۴ درجه و به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه و به مدت ۳۰ ثانیه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و به مدت دو دقیقه صورت پذیرد. جهت تفکیک قطعات تکثیر یافته حاصل از PCR از ژل آگارز ۱/۵ درصد در دستگاه الکتروفورز افقی استفاده می‌شود.

نتایج و بحث

در شکل ۱ نتایج حاصل از بررسی کمیت و کیفیت DNAهای استخراجی مولدین فیل ماهی نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می شود DNA های استخراجی از کمیت و کیفیت بالایی برخوردار بودند. همچنین نتایج حاصل از آزمایش واکنش زنجیره ای پلیمراز جهت تشخیص جنسیت فیل ماهیان نر از ماده در شکل ۲ به تصویر کشیده شده است. بر اساس نتایج حاصل از الکتروفورز محصول TPCR نمونه های ماده از نمونه های نر در محدوده ۱۰۰ تا ۲۰۰ جفت بازی کاملا قابل تفکیک بوده و الگوی باندی متفاوتی را به نمایش گذاشته اند. نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر نیز گزارشات ارایه شده در سایر مطالعات انجام شده بر روی فیل ماهی را تأیید می‌کند (Kuhl *et al*., 2021) در حالیکه پیش از این سایر روش های مولکولی بکار رفته از توانایی کافی جهت تمایز جنسیت ماهیان خاویاری برخوردار نبوده‌اند (Yarmohammadi *et al*., 2011).



شکل ۱: تصویری از DNAهای استخراجی در فیل ماهی



شکل۲: تصویر شماتیک محصول PCR و تشخیص جنس ماده از جنس در ماهیان خاویاری (فیل ماهی)

تعیین جنسیت ماهیان خاویاری به عنوان یکی از چالش های اصلی در پرورش این ماهیان مطرح می باشد. سیستم های تعیین جنسیت این ماهیان زمان بر و به طور عمده تهاجمی بوده و باعث ایجاد جراحات و ایجاد استرس های بسیار بر روی این ماهیان می شود و پیش بینی می شود که اثرات جانبی آن بر روی عملکردهای تولید مثلی و تولیدی این ماهیان تاثیر گذار بوده و البته نیاز به بررسی های تخصصی دارد. از آنجاییکه این ماهیان به لحاظ ظاهری قابلیت تعیین جنسیت ندارند، لذا روش های مولکولی می‌توانند به عنوان رویکردی امن در راستای تعیین جنسیت ماهیان خاویاری مورد استفاده قرار گیرند. بر اساس نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر امکان تعیین جنسیت ماهیان خاویاری ماده با استفاده از اطلاعات ژنتیکی مهیا گردیده و پرورش دهندگان می توانند به منظور مدیریت هرچه بهتر ذخایر ژنتیکی خود در راستای تعیین جنسیت آن‌ها اقدام نمایند.

توصیه ترویجی

بر اساس نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر و پژوهش-های انجام شده در دنیا به تکثیر کنندگان و پرورش دهندگان بخش های دولتی و خصوصی توصیه می گردد که به منظور مدیریت بهتر گله های پرورشی و اخذ تصمیمات مدیریتی جهت تغذیه ماهیان و جداسازی آن ها در مراحل اولیه، با استفاده از روش های مولکولی در

راستای تمایز جنسیت ماهیان خاویاری اقدام نمایند. این رویکرد همچنین از صدمات فیزیکی و استرس های ناشی از دستکاری این ماهیان در روش های سنتی مبتنی بر جراحی جلوگیری کرده و می تواند باعث بهبود عملکرد این ماهیان در شرایط پرورشی گردد.

منابع

Bronzi, P. and Rosenthal, H., 2014. Present and future sturgeon and caviar production and marketing: A global market overview. Journal of Applied Ichthyology, 30(6), pp.1536-1546.

FAO. 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. (also available at http://www.fao.org/3/ca9229en/ca9229en.pdf).

Geng, X., Liu, S., Yao, J., Bao, L., Zhang, J., Li, C., Wang, R., Sha, J., Zeng, P., Zhi, D. and Liu, Z., 2016. A genome-wide association study identifies multiple regions associated with head size in catfish. G3: genes, genomes, genetics, 6(10), pp.3389-3398.

Havelka, M., Fujimoto, T., Hagihara, S., Adachi, S. and Arai, K., 2017. Nuclear DNA markers for identification of Beluga and Sterlet sturgeons and their interspecific Bester hybrid. Scientific reports, 7(1), pp.1-8.

Jafari, O., Fernandes, J.M.D.O., Hedayati, A.A., Shabany, A. and Nasrolahpourmoghadam, M., 2019. Microsatellite analysis of five populations of Alosa braschnikowi (Borodin, 1904) across the southern coast of the Caspian Sea. Frontiers in genetics, p.760.

Kuhl, H., Guiguen, Y., Höhne, C., Kreuz, E., Du, K., Klopp, C., Lopez-Roques, C., Yebra-Pimentel, E.S., Ciorpac, M., Gessner, J. and Holostenco, D., 2021. A 180 Myr-old female-specific genome region in sturgeon reveals the oldest known vertebrate sex determining system with undifferentiated sex chromosomes. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 376(1832), p.20200089.

Masoudifard, M., Vajhi, A.R., Moghim, M., Nazari, R.M., Naghavi, A.R. and Sohrabnejad, M., 2011. High validity sex determination of three years old cultured beluga sturgeon (*Huso huso*) using ultrasonography. Journal of applied ichthyology, 27(2), pp.643-647.

Robledo, D., Palaiokostas, C., Bargelloni, L., Martínez, P. and Houston, R., 2018. Applications of genotyping by sequencing in aquaculture breeding and genetics. *Reviews in aquaculture*, *10*(3), pp.670-682.

Wuertz, S., Güralp, H., Pšenička, M. and Chebanov, M., 2018. Sex determination in sturgeon. Sex Control in Aquaculture, pp.645-668.

Yarmohammadi, M., Pourkazemi, M., Ghasemi, A., HASANZADEH, S.M. and 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(1)*, 55-60.

Usage of specific genetic markers in sex determination of Sturgeons

Jafari O. *
International Sturgeon Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Rasht, Iran

Received: February2022 Accepted: March 2022

Abstract
Sturgeons are known as one of the most valuable fish species in the Caspian Sea and other water bodies across the world. These fishes are highly important both in caviar production and by-products such as leather from the skin. 17 out of 24 sturgeon species are categorized in critically endangered species based on the IUCN red list and all of the five available species in the Caspian Sea have this situation. The most important reasons for the sharp reduction of the sturgeons are illegal haunting for Caviar extraction, loss of nursery grounds, diminishing the water flow from the rivers and water pollution. Sex determination of these fish species is usually time-consuming and invasive, and genetic markers based on traditional methods were not able to solve this problem. Hence, the sex determination of sturgeons in early stages is possible now using the molecular markers obtained from modern techniques, which can be of great importance in terms of aquaculture management in sturgeon farms.

Keywords: Genetic marker, *Huso huso*, Sex determination, Sturgeons.

*Corresponding author: Jaafari.omid@yahoo.com