

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران - انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان

عنوان :

**بررسی امکان تعیین مارکر جنسیت
در فیل ماهی (*Huso huso*) و
تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)
با استفاده از تکنیک‌های مولکولی**

مجری :

مهتاب یارمحمدی

شماره ثبت

۸۸/۶۱۸

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران - انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان

- عنوان پروژه/ طرح: بررسی امکان تعیین مارکر جنسیت در فیل ماهی (*Huso huso*) و تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) با استفاده از تکنیک‌های مولکولی
 - شماره مصوب: ۸۴۰۲۹-۰۰۰-۰۳-۰۰۰۰-۲۰۰۰۰-۰۲۵-۲
 - نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارنده‌گان: مهتاب یارمحمدی
 - نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه‌ها و طرح‌های ملی و مشترک دارد):
 - نام و نام خانوادگی مجری/ مجریان: مهتاب یارمحمدی
 - نام و نام خانوادگی همکاران: محمد پور کاظمی - محمد حسن زاده صابر - فریدون چکمه‌دوز - شهر روز برادران نویری - محمدرضا نوروز فشخامی - محسن مردی
 - نام و نام خانوادگی مشاور(ان) -
 - محل اجرا: استان گیلان
 - تاریخ شروع: ۸۴/۷/۱
 - مدت اجرا: ۳ سال
 - ناشر: مؤسسه تحقیقات شیلات ایران
 - شمارگان (تیراژ): ۱۵ نسخه
 - تاریخ انتشار: سال ۱۳۸۸
- حق چاپ برای مؤلف محفوظ است - نقل مطالب تصاویر، جداول، منحنی‌ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است.

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION- International Sturgeon Research
Institute

Title:

**Investigation of possibility of identification sex marker in
beluga (*Huso huso*) and Persian sturgeon (*Acipenser
persicus*) by using of molecular techniques**

Executor :

Mahtab Yarmohammadi

Registration Number

2009.618

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION – International Sturgeon
Research Institute

Title : Investigation of possibility of identification sex marker in beluga (*Huso huso*) and Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) by using of molecular techniques

Apprpved Number: 2-025-2000000-03-0000-84029

Author: Mahtab Yarmohammadi

Executor : Mahtab Yarmohammadi

Collaborator : *M. Pourkazemi; M. Hassanzadeh Saber; F. Chakmehdooz; Sh. Baradaran Novairi; M. R. Fashkhami; M. Mardi*

Location of Execution: Guilan province

Date of Beginning : 2006

Period of execution : 3 years

Publisher : *Iranian Fisheries Research Organization*

Circulation : 15

Date of publishing : 2009

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference



طرح / پروژه: بررسی امکان تعیین مارکر جنسیت در فیل ماهی (*Huso huso*) و تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) با استفاده از تکنیک‌های مولکولی

کد مصوب: ۸۴۰۲۹-۰۰۰۰-۰۳-۰۰۰۰۰۰-۲۰۰۲۵-۲

با مسئولیت اجرایی: مهتاب یارمحمدی^۱

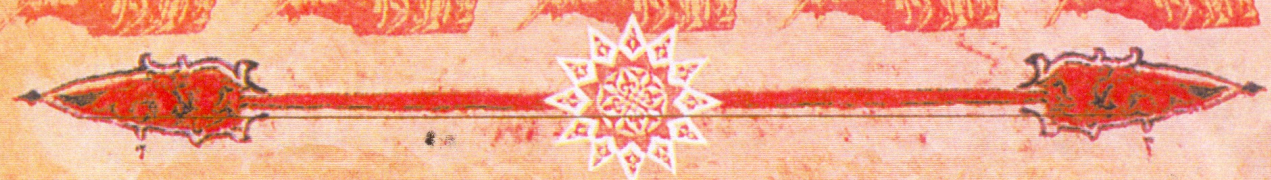
در تاریخ ۸۸/۳/۲۰ در کمیته علمی فنی مؤسسه تحقیقات شیلات ایران مورد تأیید قرار گرفت.

معاون تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات شیلات ایران

^۱ خانم مهتاب یارمحمدی متولد سال ۱۳۵۴ در شهرستان تهران بوده و دارای مدرک تحصیلی کارشناسی ارشد در رشته شیلات می‌باشد و در زمان اجرای پروژه: بررسی امکان تعیین مارکر جنسیت در فیل ماهی (*Huso huso*) و تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) با استفاده از تکنیک‌های مولکولی

در ستاد □ پژوهشکده □ مرکز ■ ایستگاه □

با سمت کارشناس بخش ژنتیک انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان مشغول فعالیت بوده است.



به نام خدا

صفحه	عنوان	«فهرست مندرجات»
۱	چکیده
۲	۱- مقدمه
۳۱	۲- مواد و روشها
۵۳	۳- نتایج
۸۸	۴- بحث و نتیجه گیری
۹۵	پیشنهادها
۹۷	منابع
۱۰۱	پیوست
۱۰۵	چکیده انگلیسی

چکیده

به علت بالا بودن سن بلوغ در تاسماهیان و نیز فقدان تفاوت‌های مورفولوژیک میان ماهیان نر و ماده حتی در ماهیان مولد، تشخیص جنسیت آنها با مشکلاتی همراه است. در این تحقیق با استفاده از تکنیک AFLP و ۱۰۰ جفت ترکیب پرایمر، ژنوم ۱۰ نمونه نر و ۱۰ نمونه ماده در تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و فیل ماهی (*Huso huso*) مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا DNA ژنومی نمونه های نر و ماده در هر دو گونه با استفاده از آنزیم های برشی MseI و EcoRI برش داده شد، سپس آدپتورهای مربوطه به انتهای مناطق برش داده شده با استفاده از آنزیم T₄DNA Ligase ملحق گردید. تکثیر قطعات طی PCR دو مرحله ای صورت گرفت. الکتروفورز با استفاده از ژل پلی آکریل آمید دینیچر و رنگ آمیزی با استفاده از نترات نقره صورت گرفت. اطلاعات بدست آمده از ژل ها در افراد بصورت وجود و فقدان باند در هر لوکوس پلی مورفیک به ترتیب بصورت ۱ و ۰ ثبت و تعداد آلل های پلی مورف، تعداد آلل های مونومورف و تعداد کل آلل ها برای هر ترکیب پرایمر در دو گونه مورد مطالعه محاسبه گردید. با بررسی حدود ۳۷۷۱ باند در تاسماهی ایرانی و ۳۷۷۹ باند در فیل ماهی نشان داد که هیچکدام از باندهای مذکور مربوط به ژن تعیین جنسیت در این دو گونه نبود. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بین ژنوم نر و ماده این دو گونه هیچ اختلافی وجود نداشت و الگوی بانندی یکسانی در هر دو جنس مشاهده گردید به همین منظور از تکنیک cDNA-AFLP جهت بررسی بیان ژن در گنادهای ۸ نمونه ماده و ۸ نمونه تاسماهی ایرانی نر با استفاده از ۶۳ جفت ترکیب پرایمرهای AFLP استفاده شد. نتایج این تحقیق وجود ۲ مارکر اختصاصی cDNA در گناد جنس ماده تاسماهی ایرانی را نشان داد (TDF1, TDF2) و توسط واکنش RT-PCR گناد نمونه های نر و ماده تاسماهی ایرانی تأیید گردید. اما پرایمرهای اختصاصی جنسیت در دو قطعه TDF1 و TDF2 در DNA ژنومی تاسماهی آشکار نشدند و فقط در سطح cDNA گناد ماهیان ماده تاسماهی ایرانی قابل تکثیر بودند. با توجه به نتایج این تحقیق و تحقیقات مشابه انجام شده در مورد تاسماهیان بنظر می رسد که کروموزومهای جنسی در این دو گونه وجود ندارد یا در صورت موجود بودن، مورد شناسایی قرار نگرفته است.

واژگان کلیدی: تاسماهی ایرانی، فیل ماهی، مارکر جنسیت، AFLP، cDNA-AFLP

۱- مقدمه

با توجه به کاهش شدید ذخایر گونه های تجاری آبزیان بخصوص ماهیان خاویاری در طی دو دهه گذشته، انجام فعالیت های کاربردی بمنظور ایجاد تعادل و بهره برداری پایدار، ضرورتی اجتناب ناپذیر است. بطور کلی سه روش برای جبران و جلوگیری از کاهش ذخایر وجود دارد که عبارتند از:

۱- تنظیم مقررات و کنترل تلاش صیادی

۲- بازسازی و احیاء محل های تخم ریزی، پرورش نوزاد و لارو ماهیان

۳- بازسازی ذخایر از طریق تکثیر مصنوعی و رهاسازی بچه ماهیان

میزان بکارگیری هر یک از روشهای سه گانه فوق ارتباط مستقیم به سیاستها و مدیریت شیلاتی هر کشور و همچنین وضعیت بیولوژیک و ذخایر هر گونه دارد (Blankenship Leber, 1995).

از آنجایی که ذخایر ماهیان خاویاری دریای خزر که تامین کننده ۹۰٪ ذخایر جهان است در دو دهه اخیر به شدت کاهش یافته است، بطوریکه میزان صید قانونی ۵ کشور حاشیه دریای خزر از ۲۸۵۰۰ تن در سال ۱۹۸۵ به کمتر از ۲۰۰۰ تن در سال ۲۰۰۴ (پورکاظمی و همکاران، ۱۳۸۶) و ۱۰۰۰ تن در سال ۲۰۰۷ رسیده است.

تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*, Borodin 1897) از جمله ماهیان خاویاری است که بیشینه پراکنش آن در جنوب دریای خزر و در محدوده آبهای ایران می باشد. این گونه در یک دهه گذشته حدود ۲۵٪ خاویار ایران در بین ۵ گونه از تاسماهیان خزر را تولید می کرد. در سالهای اخیر به علت فشار صید روی ذخایر ۴ گونه دیگر در کشورهای تازه استقلال یافته حاشیه دریای خزر از سوئی و رهاسازی بیش از ۸۵٪ بچه تاسماهی ایرانی توسط شیلات ایران از سوی دیگر و همچنین مهاجرت بسیار اندک این گونه به آبهای میانی و شمال دریای خزر، سبب شده است سهم خاویار تاسماهی ایرانی به بیش از ۵۵ درصد خاویار ایران برسد. البته این موضوع بدین معنا نیست که خاویار این گونه افزایش یافته باشد بلکه تولید خاویار این گونه هم به تناسب سایر گونه ها کاهش یافته (پورکاظمی و همکاران، ۱۳۸۶) از ۵۶۴/۶۵۱ تن در سال ۱۳۸۰ به ۵۹/۴۹۰ تن در سال ۱۳۸۶ رسیده است.

فیل ماهی (*Huso huso* Linnaeus, 1758) نیز از دیگر گونه های بسیار باارزش دریای خزر می باشد. به علت فشار صید بیش از حد روی این گونه و کاهش شدید تخم ریزی طبیعی و رهاسازی بچه ماهی، میزان صید و ذخایر این گونه نیز شدیداً کاهش یابد (پورکاظمی و همکاران، ۱۳۸۶) و میزان صید آن از ۸۹/۱۱۵ تن در سال ۱۳۸۰ به

۲۲/۸۴۲ تن در سال ۱۳۸۶ برسد. با توجه به بلوغ دیررس و فشار صید و عدم تکثیر طبیعی و رهاسازی اندک بچه ماهی، در صورت تداوم وضع موجود خطر انقراض این گونه بسیار جدی خواهد بود.

بنابراین بمنظور جلوگیری از فشار صید روی ماهیان طبیعی و خطر انقراض آنها، باید نسبت به پرورش آنها در محیط های مصنوعی پرورشی اقدام نمود. از جمله گامهای موثر جهت پرورش و تولید گله های مولد در محیط های پرورشی، تعیین جنسیت این ماهیان در سنین پایین می باشد.

با در نظر گرفتن وضعیت ذخایر ماهیان خاویاری، نیاز به تکثیر مصنوعی این ماهیان امری اجتناب ناپذیر می باشد. در تکثیر مصنوعی ماهیان خاویاری تشخیص جنسیت و مرحله رسیدگی جنسی بسیار مهم است. در حال حاضر به دلیل عدم وجود تفاوت های مورفولوژیک میان ماهیان نر و ماده، تشخیص جنسیت مولدین با مشکلاتی همراه است. بطوریکه گاهی ماهیان ماده نارس که رسیدگی آنها به درستی تشخیص داده نمی شود، بجای مولد نر وارد کارگاه های تکثیر شده و در برنامه ریزی تکثیر مصنوعی اخلاص ایجاد می نماید (مقیم و همکاران، ۱۳۸۰). در بهره برداری از ماهیان خاویاری، استحصال خاویار مدنظر می باشد و صید ماهیان خاویاری نارس نه تنها بهره برداری اقتصادی ندارد، بلکه باعث آسیب به ذخایر ماهیان خاویاری می گردد.

علاوه بر این افزایش تولید خاویار پرورشی مستلزم جداسازی ماهیان نر و ماده قبل از رسیدن به سن بلوغ و ایجاد جمعیت های تمام ماده می باشد (Logan et al., 1995). با توجه به این امر که حداقل ۳۰٪ هزینه های مربوط به پرورش را تغذیه تشکیل می دهد، لذا با تعیین جنسیت ماهیان در سنین پایین جهت تولید خاویار، می توان کل ماهیان نر را از گله پرورش خارج و هزینه های تولید خاویار را تا ۵۰٪ کاهش داد.

در حال حاضر، تشخیص جنسیت ماهیان خاویاری با استفاده از روش تکه برداری از گنادها (Ferreiro et al., 1989) (بهمنی و کاظمی، ۱۳۷۷، حلاجیان و همکاران، ۱۳۸۶) و انجام مطالعات بافت شناختی (Van Eenennam et al., 1999) و اندازه گیری سطوح هورمونی (Billard, 2000) امکانپذیر 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 استفاده از روش بافت شناسی در تشخیص جنسیت ماهیان خاویاری تنها زمانی امکانپذیر است که ماهیان مورد نظر حداقل چهار ساله (Ferreiro et al., 1989) و در ماهیان پرورشی یکساله باشند (بهمنی و کاظمی، ۱۳۷۷).

امروزه برخی از روشهای ژنتیک مولکولی بعنوان روشی دقیق و بی خطر در تشخیص جنسیت موجودات استفاده می گردد (Williams *et al.*, 1990; Welsh & Mc Clelland, 1990; Griffith *et al.*, 2002) از جمله این روشهای مولکولی، روش (Amplified Fragment Length Polymorphism AFLP) (تفاوت طول قطعه های حاصل از تکثیر) است که در سال ۱۹۹۵ توسط Vos و همکاران ابداع و معرفی گردید که بنظر می رسد این روش بسیاری از محدودیت های نشانگرهای پیشین را نداشته باشد. در این روش نشانگرهایی تولید می شوند که علاوه بر دارا بودن مزایای RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) مانند دقت و تکرارپذیری، ویژگیهای مثبت روش های مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلیمرز را نیز دارد.

۱-۱- مروری بر مطالعات انجام شده

مطالعات متعدد نشان داد که برخی از ژنهای موجود روی کروموزوم Y انسان نظیر ژن تعیین جنسیت پستانداران (sry) و یک ژن پیوسته نزدیک به آن در ژنوم برخی از ماهیان وجود دارد، اما این ژنها روی کروموزومهای غیرجنسی مستقر هستند (Delvin & Nagahama, 2002).

مارکهای وابسته به DNA نزدیک لوکوس Tu وابسته به جنس، مسئول تشکیل ملانوما در Xiphophorus هستند (Schartl, 1988) و همچنین آنالیز آن مشخص نمود که ژن وابسته به جنس Xmrk در ژن جهش یافته ماهیان دو برابر می باشد (Schartl & Adam, 1992, Schartl, 1990, Weis & Schartl, 1998).

همچنین آزمون جنسیت سریع مبتنی بر PCR به کار رفته برای کولوس Xmrk جهت تعیین جنسیت Xiphophorus انجام شد (Coughlan *et al.*, 1999) و لوکوس Xmrk با روش دورگه سازی در محل (insitu hybridization) در ناحیه ساب تلومریک بازوی بلند کروموزوم های جنسی X.maculates به روش سیتوژنتیکی، نقشه یابی گردید (Nanda *et al.*, 2002). در ماهی مداکا که دارای سیستم تعیین جنسیت XY است، یک کلون تصادفی که پیوستگی شدیدی با لوکوس تعیین جنسیت دارد، از یک سویه همخون جداسازی شد. این مارکر در تمامی سویه های مداکا وابسته به جنس نیست. اما به نظر می رسد که در درون این جنس حفاظت شده باشد (Matsuda *et al.*, 1998). این مارکرها از طریق ممانعت از کراسینگ اور در نرها، دارای پیوستگی ژنتیکی شدید با لوکوس تعیین جنسیت می باشند (Matsuda *et al.*, 1999).

در قزل آلاهی رنگین کمان، دو توالی DNA پلی مورفیک واقع بر روی کروموزوم Y توسط آنالیز RAPD شناسایی شد (Iturra *et al.*, 1998). این یافته ها به وضوح تنوع مولکولی را که روی کروموزوم Y قزل آلاهی رنگین کمان وجود دارد آشکار می کند، اما در همه سویه های قزل آلاهی رنگین کمان یافت نمی شود (Thogaad, 1983b).

Iturra و همکاران (۲۰۰۱) با استفاده از کاوشگر P₉ که یک توالی وابسته به جنسیت در نژاد Mount Lassen قزل آلاهی رنگین کمان می باشد، در ماهی آزاد کوهو (*Oncorhynchus Kisutch*) به منظور شناسایی کروموزومهای جنسی آن مورد مطالعه قرار دادند. همچنین توالی های ژن ریوزومی NORS از نظر سیتوژنتیکی روی کروموزومهای جنسی برخی از ماهیان شناسایی شد (Ren *et al.*, 1993, Li & Gold, 1991).

در نقشه لینکاژی قزل آلاهی رنگین کمان با استفاده از مارکرهای مختلف میکروستلایت و DNA-AFLP، کروموزومهای جنسی شناسایی شدند (Sato *et al.*, 2001, Naruse *et al.*, 2000). دو مارکر AFLP وابسته به کروموزوم Y در ماهی سه خاره شناسایی گردید (Griffith *et al.*, 2000) که شناسایی لوکوسهای آیزوزایم وابسته به جنس در این گونه تأیید شده است (Withler *et al.*, 1986). همچنین یک توالی تکرار شونده از GACA و GATA که در ژنوم مار شناسایی شده بود و BKM نامیده می شود به عنوان کاوشگر در تعیین جنسیت چندین گونه از ماهیان مورد استفاده قرار گرفت (Husabye *et al.*, 1994, Patel *et al.*, 1993).

وجود توالی های تکرار شونده دیگری از GACA و GATA در کروموزوم Y در گونه *Poecilia reticulata* و سایر گونه های خانواده گامبوزیا ماهیان (Poeciliidae) گزارش گردیده است (Nanda *et al.*, 1992). از روش هیبریداسیون کاهشی (Subtractive Hybridization) جهت جداسازی توالی های DNA تکرار شونده از کروموزومهای جنسی در خانواده گامبوزیا ماهیان استفاده شد و یک کلون DNA، توالی های یافت شده در هر دو کروموزوم W و Z را مشخص کرد (Nakayama *et al.*, 1994).

Iturra و همکاران (۱۹۹۸) با استفاده از روش (RAPD) موفق به شناسایی نشانگرهای مولکولی کروموزوم جنسی قزل آلاهی رنگین کمان شدند. محققین مذکور اعلام نمودند که نشانگرهای جنسی بدست آمده تنها در تشخیص جنسیت نژادهای مورد مطالعه کاربرد دارد و استفاده از آنها در تفکیک جنسیت سایر نژادهای قزل آلاهی رنگین کمان میسر نیست.

Davidson و Mc Gowan (۱۹۹۸) اعلام نمودند که استفاده از روش RAPD در شناسایی نشانگرهای جنسی ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) موفقیت آمیز نبود. آنها نتیجه گرفتند که احتمالاً ژن تعیین کننده جنسیت در این گونه یک ژن اتوزومی دو آللی می باشد.

Van Eenennaam و همکاران (۱۹۹۹)، شواهدی مبنی بر هتروگامتی بودن ماهیان ماده (WZ) در تاسماهی سفید (*A. transmoutanus*) گزارش دادند. بر اساس بررسی های انجام شده، مشخص گردید که تا کنون کروموزومهای جنسی هترومورف در هیچ یک از گونه های ماهیان خاویاری شناسایی نشده است (Fontana&Colombo, 1974; Holcik, 1986; VanEenenaar, 1977).

Griffiths و Orr (۱۹۹۹) از روش AFLP جهت تعیین جنسیت در پرندگان استفاده نمودند. همچنین Griffiths و همکاران (۲۰۰۰) با استفاده از روش AFLP، موفق به شناسایی دو مارکر اختصاصی جنسیت در ماهی سه خاره *Gasterosteus aculeatus* شدند.

گروهی دیگر از محققین شناسایی دو نشانگر جنسی با استفاده از روش RAPD در گربه ماهی آفریقایی (*Claris gariepinus*) را گزارش نمودند (Kovacs et al., 2001).

Li و همکاران (۲۰۰۲) با مطالعه وسیع روی ژنوم کوچک پف ماهی (*Tetradom nigroviridis*) با استفاده از پرایمرهای RAPD موفق به شناسایی نشانگرهای جنسی در این گونه نشدند. محققین مذکور اعلام نمودند نتایج بررسی آنها می تواند نشانه ای از فقدان کروموزومهای جنسی تمایز یافته در گونه مورد مطالعه باشد.

از روش انگشت نگاری AFLP جهت تعیین و شناسایی مارکرهای وابسته به جنس در قزل آلای رنگین کمان استفاده شد. در مجموع از ۴۸۶ ترکیب پرایمری روی DNA های ادغام شده (pooled) استفاده گردید و نتیجه گیری نمودند که تکنیک AFLP روشی سریع جهت شناسایی لوکوس های وابسته به جنس می باشد (Felip et al., 2005).

ژنهای DMRTI و SOX9 در تعیین جنسیت تعداد زیادی از مهره داران از جمله ماهیان استخوانی حقیقی شناسایی شدند (Hett & Ludwig, 2005, Hett et al., 2005). اما حضور اختصاصی این ژنها در تاسماهی آتلانتیک (*A. sturio*) تأیید نشده است.

Wuertz و همکاران (۲۰۰۶) مطالعه گسترده ای با تکنیک های تصادفی RAPD، AFLP و ISSR به منظور شناسایی مارکرهای جنسیت ژنومی در ژنوم های نر و ماده چهار گونه از ماهیان خاویاری استرلیاد (*A. ruthenus*)، تاسماهی

روسی (*A. guldenstaedtii*)، تاسماهی ایتالیایی (*A. naccarii*) و تاسماهی سیبری (*A. baerii*) انجام دادند و هیچ مارکر جنسیتی شناسایی نکردند. Cui و همکاران (۲۰۰۶) با استفاده از تکنیک cDNA-AFLP به بررسی مارکر جنسی در (*Takifugu rubripes*) پرداختند. نتایج این پژوهش وجود ۵ مارکر در سطح cDNA را مشخص نمود که یکی از مارکرها در گنادر ماهیان ماده، در سطح DNA ژنومی جهت استفاده در تشخیص سریع جنسیت، قابل استفاده بود.

Keyvanshokoo و همکاران (۲۰۰۷)، از ۳۱۰ پرایمر تصادفی RAPD جهت یافتن مارکر اختصاصی جنسیت نمونه های نر و ماده در فیل ماهی (*Huso huso*) استفاده نمودند که نتایج مقایسه ای ۴۱۴۶ باند DNA بدست آمده نشان داد که این تعداد باند در هر دو جنس نر و ماده فیل ماهی مشترک است. کیوان شکوه و همکاران (۲۰۰۸) از روش پروتئومیکس جهت تجزیه و تحلیل بیان پروتئینی متفاوت بین ماهیان نر و ماده تاسماهی ایرانی (*A. persicus*) و جستجوی پروتئین های وابسته به تعیین جنسیت استفاده نمودند ولی هیچکدام از نقاط پروتئینی بطور مستقیم به ژنهای تعیین جنسیت وابسته نبودند.

۲-۱- سوابق مطالعه تفکیک جنسیت در دو گونه تاسماهی ایرانی و فیل ماهی

در مورد مطالعه امکان تفکیک جنسیت در تاسماهی ایرانی و فیل ماهی فقط یک مطالعه صورت گرفته است. در فیل ماهی (*Huso huso*)، Keyvanshokoo و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از روش RAPD و در تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) نیز توسط همین محقق (۲۰۰۸) با استفاده از روش پروتئومیکس انجام شد که در هر دو مورد مارکر وابسته به جنس شناسایی نشدند.

استفاده از روش cDNA-AFLP به منظور بررسی تظاهر ژن در گنادر تاسماهی ایرانی برای اولین بار در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۱- روش های شناسایی و تفکیک جنسیت

امروزه در مورد فرآیند تمایز جنسیت در ماهیان و مکانیسم های در برگیرنده تمایز اولیه جنسیت اطلاعات زیادی بدست آمده است. تعیین جنسیت در ماهیان با توجه به الگوهای تکاملی مشاهده شده در میان جنس ها، خانواه ها

و در داخل افرادی که توسط عوامل خارجی قابل تغییر هستند، یک فرآیند انعطاف پذیری می باشد. این عوامل که شامل عملکرد عوامل ژنتیکی، محیطی (درجه حرارت، ...) رفتار و استروئیدهای جنسی خارجی تجویز شده در زمان تمایز جنسی است، می تواند تاثیر زیادی روی تمایز جنس در ماهیان داشته باشد و بنظر می رسد که نقش عمده ای در تعیین جنسیت و متعاقب آن تمایز جنسیت داشته باشد (Delvin & Nagahama, 2002).

تمایز ژنتیکی جنسیت در ماهیان می تواند شامل سیستم های تک ژنی (Monogenic) یا چند ژنی (Polygenic) که روی کروموزوم های اتوزومی و یا جنسی قرار گرفته اند و شامل سیستم های هتروگامتی در ماهی نر (XY) و ماده (ZW) است، باشد. کروموزومهای جنسی تقریباً در ۱۰٪ گونه های ماهیان مطالعه شده، یافت شده است و ویژگیهای فنوتیپی وابسته به جنس و همچنین کارکردهای ژنتیکی مولکولی و پروتئینی در تعدادی از سیستمهای ماهیان شناسایی گردیده است. بعضی از گونه های ماهیان بصورت ماده زایی (ژینوژنز) تولید مثل می کنند و تولید جمعیت های تمام ماده می کنند. تعدادی از گروه های ژنهای تعیین جنسیت که در مهره داران دیگر دخیل می باشد، در ماهیان نیز مشاهده شده است (Delvin & Nagahama, 2002). بنابراین می توان نتیجه گیری نمود که توالی ژن تعیین کننده جنسیت در بین گونه های مختلف طی دوران تکامل بصورت حفاظت شده باقی مانده است. تغییر پذیری در سیستم های تعیین جنسیت ماهیان سبب می شود که برخی از گونه ها نسبت به آلودگی های محیطی که شبیه هورمونهای جنسی عمل می کند و یا در کار آنها اختلال ایجاد می نماید حساس گردند. اینگونه مشاهدات دیدگاه مهمی را نسبت به اثرات پتانسیلی عوامل ایجاد کننده اختلال در کار هورمونها ایجاد می نماید و می توان از آنها بعنوان ابزارهای مناسبی برای ارزیابی اثرات محیط های آبی استفاده نمود (Delvin & Nagahama, 2002).

۱-۳-۱- سیستم های تعیین جنسیت در ماهیان

گناد ماهیان معمولاً در برابر عوامل تعیین کننده جنسیت بسیار ناپایدار است ولی هنگامی که وضعیت تکاملی خاصی توسط کنترل های غریزی یا عوامل محرک خارجی مانند هورمونرها انتخاب شود، این وضعیت تمایز گنادی در طی توسعه و تکامل های حاصل پایدار می گردد. در ماهیان استثناهایی هم وجود دارد. پایداری تمایز جنسیت در گونه های گونوکوریست (دو جنسی)، مستلزم عملکرد اولیه وقایع تعیین جنسیت در طول تکامل

اولیه به منظور تنظیم دوره های تکاملی گنادی است و بقاء بعدی وضعیت تمایز یافته به وسیله پایداری الگو های بیان ژن و مکانیسم های پس خورد جهت تضمین پروفیل ثابت علائم سلولی و هورمونی همراهی می گردد. به نظر می رسد که سطوح متعدد کنترلی از قبیل مکانیسم های ژنتیکی خود کار سلولی یا علائم هورمونی، رفتاری یا محیطی برای تمایز غدد جنسی در ماهیان امکانپذیر است. به عنوان مثال، عوامل ژنتیکی داخلی ترجمه کننده PGCs (سلول های زاینده اولیه = Prodominal Germ Cells) یا عوامل زیست محیطی خارجی انتقال مستقیم به داخل اسپرماتوگونیا و اووگونیا امکان پذیر است، در عوض سلول های محیطی سوماتیکی ممکن است توسط سلول های جنسی تحت تاثیر تمایز قرار گیرند بطوریکه محیط، هورمون مناسبی برای تمایز بیشتر گناد فراهم آورند. از سوی دیگر، سلول های سوماتیک ممکن است در ابتدا علائم ژنتیکی تعیین جنسیت و غیره را تفسیر نموده، تمایز متعاقب آن در پاسخ به این علائم حاصل سلول های اطراف اتفاق می افتد. در موجوداتی که به عنوان مدل های ژنتیکی مطرح هستند، آزمایش های انتقال و پیوند سلول و تحلیل موزاییکی به محققین این امکان را می دهد که مشخص کنند آیا تعیین جنسیت بر اساس سلول به سلول و یا بر اساس ارتباط متقابل بین انواع سلول های مجاور و یا دور از هم اتفاق می افتد (Delvin & Nagahama, 2002). به عنوان مثال در مگس سرکه کاهش کروموزومی یا تقسیم میتوزی می تواند جانورانی با سلولهای ژنتیکی مختلط نر و ماده ایجاد نماید که نشان می دهد که جنسیت به صورت موزاییکی روی یک پایه تک سلولی تعیین می گردد (Cline & Meyers, 1996). شواهد موجود در سیستم های پستانداران قویاً بیان نموده است که سلول های سوماتیک نسبت به سلول های جنسی، محل تعیین جنسیت اولیه هستند (Capel, 1996, 1998).

ماهیان دارای تنوع زیادی از مکانیسم های کنترل کننده جنسیت هستند. بسیاری از گونه ها از سیستم های ژنتیکی که جنسیت را در زمان لقاح تعیین می کند، استفاده می نمایند. برخی گونه ها از علائم درونی که توسط روابط رفتاری در میان گونه های هم نوع فراهم می شود، بهره می گیرند، در حالی که بعضی از آنها از تغییرات فاکتور های محیطی مانند درجه حرارت، فصل و یا طول سال استفاده می کنند. از نظر تئوری، موجودات ممکن است بین این سیستم های متفاوت تعیین جنسیت، بدون مشکل و بر اساس درجه مرحله ای که انتخاب شده است جا به جا شوند (Bull et al., 1985). در بیشتر موارد نسبت مساوی از نر ها و ماده ها برای جمعیت انتخاب خواهد شد (Fisher et al., 1930).

بعلاوه در مورد ماهیان، اطلاعات آزمایشی این نظریه را حمایت می کند که انتخاب ژنتیکی تمایل به برقراری تعادل در نسبت جنسی در گونه های *Mendia mendia* و *Xiphophorus maculatus* دارد (Basolo, 1994, 2001).

۲-۳-۱- تعیین جنسیت ژنتیکی در ماهیان

مسیر تعیین جنسیت به صورت مجموعه ای از مسیر های پیچیده ارتباط متقابل فرآیند های بیوشیمیایی است که در نهایت به تعیین جنسیت سلولی و تمایز منتهی می گردد. فعالیت هر مرحله در این مسیر برای تعیین جنسیت در میان افراد یک جمعیت متفاوت خواهد بود و از تنوع آلی در جایگاه های ژنتیکی که اجزاء مسیر را کد گذاری می کند و همچنین از اثرات محیطی سرچشمه می گیرد. در سیستم های ژنتیکی، اجزای بخصوص یا ترکیب آنها در داخل یک مسیر ممکن است که در تعیین مسیر تعیین جنسیت غالب شده، در این صورت عوامل محیطی دارای تاثیر کمی می باشند. بعضی ژنها ممکن است توسعه و تکامل تخمدان و بیضه را کنترل کنند و جنسیت یک فرد بخصوص توسط قدرت فاکتور های ژنتیکی که از والدین دریافت می کند تعیین خواهد شد. در ابتدای تکامل سیستم تعیین جنسیت، این فرض وجود دارد که اثرات ژنتیکی بصورت چندژنی (Polygenic) بوده و برآیند مجموع تمامی عوامل ژنتیکی دخیل در تعیین جنسیت ژنوم موجود است (Delvin & Nagahama, 2002).

همچنین ممکن است جنسیت توسط یک سیستم ژنتیکی ساده و تک لوکوسی تعیین شود و کروموزومهای جنسی تکامل یابند. در سیستم های ژنتیکی، مکانیسم ها از کنترل چند ژنی خالص تا مکانیسم های دارای عوامل تعیین جنسیت غالب همراه با کنترل های اتوزومی و همچنین تا کروموزومهای کاملاً تکامل یافته نرهای هترو گامتیک (XY) و یا ماده های هترو گامتیک (ZW) متفاوت است (Bull, 1983). در میان گونه های ماهیان از همه این روشهای متفاوت جهت کنترل تعیین جنسیت استفاده شده است.

ماهیت تنوع ژنتیکی که منتهی به تاثیرات متنوع روی تعیین جنسیت ماهیان می گردد هنوز شناخته شده نیست. آلل های متفاوتی در جمعیت ها وجود دارد که توانایی ترکیبات بیوشیمیایی را جهت انجام وظایف مورد انتظار آنها تغییر می دهد و انتظار می رود که اثرات کوچکی در سطوح مختلف از جمله تغییرات بیوشیمیایی، دریافت و ارسال سیگنال و فعال سازی و سرکوب کردن کمپلکس های ژنی درگیر در آغاز و ادامه مسیر تعیین جنسیت، عمل نماید (Delvin & Nagahama, 2002) به عنوان مثال، کنترل ساخت استرادیول می تواند نقش کلیدی ایفا نماید.

در طول یک دوره رشد طبیعی، سلول های تولید کننده استروئیدها در گنادهای متفاوت ممکن است که تکامل مسیر های تبدیل پرگنولون به تستوسترون را حتی در غیاب تاثیر هر گونه فاکتور تعیین جنسیت، هدایت نماید. در سلولهایی که از نظر ژنتیکی ماده هستند، آنزیم آروماتاز ممکن است که در موازات با آنزیم های دیگر استروئیدوژنیک فعال شود، بطوریکه سلولهایی که از نظر ژنتیکی نر هستند، ژن آروماتاز غیر فعال باقی بماند (هم از طریق مهار شدن و هم از طریق خطا در فعال سازی). در سیستم های پستانداران، تولید لوکوس تعیین کننده جنس نر- sry به طور مستقیم با مناطق تنظیم کننده پروموتور ژن آروماتاز دارای ارتباط متقابل است (Haqq et al., 1993).

اگرچه بنظر می رسد sry عمدتاً در سلولهای سرتولی بیان می شود، اما ممکن است که منحصراً چنین چیزی نباشد و تنوع توالی در پروموتور ژن آروماتاز یا در پروتئین های شبه- sry که قادر به قطع چنین برهمکنشی هستند، می تواند سبب بیان ترکیبی یا باز دارندگی دایمی ژن آروماتاز گردد که منجر به تغییر در تولید استرادیول و رشد غدد جنسی می شود (Delvin & Nagahama, 2002). سایر تنوع های ژنتیکی می توانند بر فعالیتهای آنزیمی کاتالایتیکی آروماتاز برای تعدیل میزان تبدیل استرادیول به تستوسترون اثر گذارد یا تغییرات در گیرنده استروژن می تواند بر ارسال سیگنال هورمونی اثر گذارند. زیرا تعیین جنسیت در گونه های دوجنسی به صورت یک سوئیچ برای شروع مسیر تکاملی که ثابت باقی مانده است عمل می کند، حتی تفاوت های کم ژنتیکی که روی این تصمیم گیری اولیه در فرآیند تاثیر گذار هستند، ممکن است که دارای اثرات قابل توجهی روی تعیین جنسیت باشند (به طوری که ممکن است سبب نسبت های جنسی تغییر یافته، هرمافرودیسیم و یا تغییر جنسیت شوند (Delvin & Nagahama, 2002). چون اثرات دقیق ژنتیکی در داخل یک گونه مورد استفاده قرار می گیرد، بنابراین تنظیمات ژنی سلولهایی با فنوتیپ های تمایز یافته جنسیتی را فراهم می نمایند. پیش بینی می شود که ژن های بالا دست در مسیر های تکاملی و از نظر تکاملی نسبت به آنهایی که در موقعیت های تنظیم کنندگی پایین دست هستند، درای تنوع بیشتری باشند. زیرا موتاسیون ژنهایی که که کنترل کل فرآیند تعیین جنسیت را در ابتدای مسیر دارند نسبت به فعالیت های ژنتیکی جدید که فقط یک قسمت انتهایی تمایز جنسیت را کنترل می کنند، اختلالات کمتری را سبب می شوند (Marin & Baker, 1998).

در مهره داران، عقیده بر این است که آنتی ژن H-Y (محصول لوکوس Smcy) کاندید خوبی برای فاکتور تعیین جنسیت است، زیرا به بافت های جنس هتروگامتیک در پستانداران و سایر مهره داران وابسته است. در ماهیان این آنتی ژن بطور تمایز یافته بین جنس ها وجود ندارد و یا در همه گونه ها بطور مشخص وابسته هتروگامتی نمی باشد و در مقایسه با عوامل ژنتیکی به فنوتیپ گنادی وابسته تر می باشد (این موضوع در ماهیان تغییر جنسیت یافته که به طور طبیعی از هرمافردیت و یا بطور آزمایشگاهی و با تیمار های هورمونی بوجود می آیند، آزمایش شده است) (Pechan *et al.*, 1979).

مشاهدات فوق پیشنهاد می کند که آنتی ژن H-Y احتمالاً در تعیین جنسیت اولیه دارای نقش اولیه را دارد، اما ممکن است جهت تمایز بعدی و یا مجدد خیلی مهم باشد. بعلاوه، بسیاری از ژنها که مختص جنسیت هستند (بعنوان مثال آروماتاز و DMRT) ممکن است که در نتیجه تمایز جنسیت بوجود آمده باشد تا اینکه عامل تعیین کننده ی جنسیت باشد (Delvin & Nagahama, 2002).

در مورد پستانداران، ژن وابسته به کروموزوم Y (sry) طبقه بندی شده و مطمئناً به عنوان لوکوس تعیین کننده جنسیت می باشد. یک آنتی گونیست SRY (Dax1) و تعدادی دیگر از ژنهای اتوزوم [به عنوان مثال SF₁, SOX₉] (Wt₁, Lim1) در تمایز سلول استروئید و نیز در تمایز گنادی پستانداران دخالت دارند. SRY یک پروتئین هسته ای فسفریله شده است که به نظر می رسد به فاکتور نسخه بردار شبه-IEF1 مناطق چسبنده، جهت تغییر انحای DNA واکنش نشان می دهد و ممکن است منتهی به تغییرات ساختار کروماتین و نسخه برداری گردد (Swain & LovellBadge, 1997).

در پستانداران، عدم عملکرد SOX₉ می تواند سبب تغییر جنسیت XY گردد و بیان ژن SOX₉ درست قبل از تمایز جنسیت در اندامهای تناسلی نرها در حد بالا و در ماده ها در حد پایین تنظیم شده است که این موضوع نقش مهمی را برای پروتئین در تکامل بیضه متصور می کند (Koopman, 2001). همولوگ های SF₁ و SOX₉ در ماهیان شناسایی و به عنوان اعضای HMG (High-Mobility Group) خانواده پروتئینهای چسبیده به DNA در نظر گرفته شده است. یک عضو گروه (SOX₉) بیان تمایزی را در بین گنادی های نر و ماده در تیلاپیا مشابه آنچه که در پستانداران و پرندگان مشاهده شده است، نشان می دهد (Nagahama, 1999) و نقش آن جهت تکامل بیضه در همه گروههای مهره داران یکسان است.

در بی مهرگان، خانواده ژنی دیگری در تعیین جنسیت وجود دارد که بنظر می رسد در تعیین جنسیت مهره داران نیز دخیل باشد. پروتئین های این خانواده ژنی، حاوی DM-domains [یک موتیف شناسایی شده توسط همولوژی بین ژنهای دخیل در تعیین جنسیت حشرات (Dsx) و نماتودها (mab3)] با ویژگی های چسبندگی به DNA است (Delvin & Nagahama, 2002).

DMRT₁ که عضوی از گروه فوق است، مشاهده شد که حاوی یک موتیف همولوگوس اختصاصی نر چسبیده به DSX در دروزوفیلای نر می باشد و بطور ابتدایی به صورت اختصاصی در بیضه تعدادی از گروه های مهره داران بیان می گردد (Raymond *et al.*, 1998).

در تیلاپیا، همولوگوس DMRT₁ (DMRT₁t)، شامل موتیف اختصاصی نر یافت شده در CDSX است و بنظر می رسد که بیان اختصاصی آن در بیضه (سلول های سرتولی) باشد، بطوریکه همولوگ دیگر DM (DMO) فاقد این موتیف است و فقط در تخمدان بیان می شود (Guan *et al.*, 2000). جالب توجه است که توالی های بالادست مشخص می نماید که مناطق اتصال SRY در میان DMRT₁ است نه در TDMO و این موضوع ارتباط نزدیک بین SOX و محصولات ژن DMRT₁ را در مسیر های تعیین جنسیت بیان می کنند. همچنین در قزل آلا، DMRT₁t در بیضه نسبت به تخمدان خیلی بیشتر ترشح شود (بیشتر از ۱۰ برابر) (Marchand *et al.*, 2000).

نرسازی (masculinization) توسط هورمونهای نرینگی (آندروژن ها) در ماهیان تیلاپیا که گنادهای آنها از نظر ژنتیکی (XX) هستند سبب بیان DMRT₁ می شود، بطوریکه ماهیان قزل آلابی که از نظر ژنتیکی نر بودند (XY) با استرادیول و ماهیانی که از نظر ژنتیکی ماده بودند (XX) با آندروژن (11β-hydroxyandrostenedion) هر دو سبب کاهش بیان شدند. (Guan *et al.*, 2000, Marchand *et al.*, 2000). این اطلاعات بیان می کند که ژنهای DMRT₁ در پاسخ به تمایز بیضه که توسط فاکتورهای دیگر القاء می گردد (بعنوان مثال استروئیدها) بیان می شوند و در گونه های مذکور مانند موارد Dsx و mab3 در مهره داران در مسیر تعیین جنسیت تا حدود زیادی در قسمت پایین واقع شده اند و همچنین نسبت به مکانیسم های پس خورد (feed back) حساس هستند (Marin & Baker, 1998). در نتیجه بیان DMRT₁ در بیضه XX متناسب با این ژن است و در سه گونه از ماهیان (تیلاپیا، آزادماهی و مداکا) وابسته به این ژن نیست (Guan *et al.*, 2000). اگرچه ممکن است که بقیه اعضای خانواده ژن DM که هنوز شناسایی نشده اند، نقش مهمی در تعیین جنسیت ماهیان داشته باشند.

بر مبنای الگوهای بیان و ارتباط با تعیین جنسیت در گونه های دیگر، ژن های ذکر شده، کاندیداهای خوبی برای شناسایی ژنهای دخیل در این فرآیند هستند. بعلاوه، اخیراً یک ژن تعیین کننده جنسیت روی کروموزوم Y در ماهی مداکا توسط کلونینگ منطقه ای و آنالیز توالی کلون های BAC شناسایی شده است. این ژن (DMY) یک عضو از خانواده ژنی ناحیه DM (DM-domain) است و شواهد ژنتیکی مشخص می کند که فقط روی کروموزوم Y در ناحیه ای که برای توسعه و تکامل سلولهای جنسی زیای ضروری است قرار گرفته است. DMY در سلولهای سوماتیک گنادهای نر در مراحل اولیه جنسیت (مشابه SRY) بیان می شود و اولین مثال از ژن تعیین جنسیت در مهره داران پایین تر است (Matsuda *et al.*, 1998). در آینده، طبقه بندی و شناسایی ژنها مشابه در مهره داران دیگر، همچنین آنالیز مستقیم ژنوم ماهیان بدون شک منبع خوبی جهت تحقیق تعیین جنسیت در ماهیان فراهم خواهد نمود.

۳-۳-۱- تعیین جنسیت با استفاده از روشهای سیتوژنتیکی

تاکنون بیش از ۱۷۰۰ گونه از ماهیان از نظر سیتوژنتیکی طبقه بندی شده اند (Arkhipchuk, 1995)، که در حدود ۱۷۶ گونه یا ۱۰/۴٪ از آنها از نظر سیتوژنتیکی دارای کروموزومهای جنسی مجزا می باشند. وجود کروموزوم های هترومورفیک در بین جنس های حداقل ۷۲ خانواده در غضروف ماهیان (Chondrichthys) و ماهیان استخوانی (Osteichthys) مشاهده شده است. اما تا کنون شواهدی مبنی بر تعیین جنسیت در بی فکان (Aganthis) از طریق روشهای غیر ژنتیکی، شناسایی نشده است. در بعضی موارد، تفاوت های سیتوژنتیکی بین جفت های هترومورفیک ممکن است آنقدر جزئی و کم باشد که به علت کوچک بودن کروموزوم ماهیان با تکنیکهای سیتوژنیک رایج قابل مشاهده نباشد (Gohd *et al.*, 1980).

در حال حاضر تعداد گونه هایی که هتروگامتی نر را در مقایسه با هتروگامتی ماده نشان داده اند، بیشتر از دو برابر است و به نظر می رسد که سیستم تعیین جنسیت XY بیشتر در گونه هایی مشاهده می شود که با اندازه ی جنس نر دارای ارتباط مستقیم است در حالیکه سیستم های ZW با اندازه مفید جنس ماده اتفاق می افتد (Kraak and de Iooze, 1993).

آنالیز کاریوتایپ مشخص می کند که کدام جنس هتروگامتیک و کدام هموگامتیک است. بنابراین اطلاعاتی را در مورد مکانیسم تعیین جنسیت بکار برده شده در گونه فراهم می نماید. تخمین زده می شود که طول متوسط

کروموزوم جنسی در ماهیان تقریباً ۵٪ کل کاربوتایپ باشد که تا حدودی از اندازه متوسط کروموزوم بزرگتر است (Arkhipchuk, 1995).

۴-۳-۱- تعیین جنسیت با استفاده از روشهای مولکولی

۱- مارکرهای فنوتیپی

مطالعات کلاسیک که مارکرهای فنوتیپی جنسیت در ماهیان را مطالعه می کند، مشخص کرده است که جنسیت در بعضی از گونه های جنس Xiphophorus با سیستم XY مشخص شده است (Aida, 1921, Wing 1992, Yamamoto, 1969). همچنین مشخص شد که گونه های مختلف این جنس هم ممکن است دارای سیستم ZW و XY باشند. مطالعات ابتدایی اولیه در مورد تقسیم مارکرهای وابسته به جنس در گونه های انتخاب شده، برای اولین بار ماهیت پیچیده و انعطاف پذیر سیستمهای تعیین جنسیت در ماهیان را مشخص نمودند.

از دیگر مارکرهای مختص فنوتیپ که روی رنگدانه های پوست اثر می گذارد در تعدادی از گونه های ماهیان در شرایطی که فنوتیپ جنس نر جهت گزینش جفتگیری برای ماده ها مهم است، شناسایی شد. به عنوان مثال در ماهی گویی (*P. reticulata*)، وجود مارکرهای فنوتیپی دم سیاه و هم دم قرمز مشاهده شد که صفات غالب وابسته به کروموزوم Y است (Fernando and Pang, 1989, 1990).

۲- مارکرهای پروتئینی

جایگاه آیزوزیم برای شناسایی حالت های وابسته به جنس وراثت در ماهی خیلی مفید هستند، بعنوان مثال در گربه ماهی کانال جایگاه GPI-B در کروموزوم جنسی یافت شد که تقریباً ۱۶ نقشه واحد از جایگاه تعیین جنسیت دور است و در طرف دیگر سانترومر قرار دارد (Liu et al, 1996a).

در قزل آلاهی رنگین کمان، آیزوزیم ها به طور گسترده ای مورد مطالعه قرار گرفتند اما تنها جایگاه HEX-2 و SOD-1 مربوط به جنسیت شناخته شدند (Allenderf et al, 1994). در بعضی جمعیت های ماهی Charr یا Salmon alpinus جایگاه E ST-2، وابسته به جایگاه تعیین جنسیت ظاهر شدند (Nyman et al., 1984) و یک آیزوزیم IDH متفاوت خاص نر برای *G.aculeatus* توضیح داده شدند (Withler, 1986).

۳- نشانگرهای DNA

نشانگرهای DNA ابزار مفیدی جهت تعیین وابستگی به جنس در ماهیان فراهم می آورد. زیرا بیش بینی می شود که ساختار DNA با تغییرات فیزیولوژیک و محیطی تغییر نمی نماید. همچنین آزمایش ساختار توالی DNA روی کروموزومهای جنسی می تواند دیدگاه های مهمی در مورد فرآیندهای تکاملی که در ساختار کروموزوم جنسی تأثیر می گذارد را فراهم آورد و در نهایت می تواند اطلاعاتی در مورد مکانیسم های تعیین جنسیت در گونه های مختلف ارائه نماید. بعنوان مثال در انسان بعضی ژنها وابسته به جنس هستند. از جمله، لوکوس تعیین جنسیت پستانداران SRY و ژن شدت وابسته به آن ZFY. اگرچه لوکوس های فوق در ژنوم ماهیان وجود دارد، اما ارتباطی با کروموزومهای جنسی در قزل آلا (Ferreiro *et al*, 1989)، گربه ماهی کانالی (Tiersch *et al*, 1992)، ماهی مداکا (Fukada *et al*, 1995) و تعدادی دیگر از گونه های ماهیان ندارند.

این یافته ها نشان داد که ژن های SRY و ZFY در ژنوم Piscine وجود دارد و بنابراین در مسیر تعیین جنسیت نقش دارند، اما شاید آنها سیگنالهای اولیه استفاده شده برای کنترل جنسیت در گونه هایی که بطور ژنتیکی تعیین جنسیت شده اند، نباشند. در بعضی موارد، ژن ها و توالیهای به شدت وابسته وجود دارد که مشخص می کنند نشانگرهای DNA به شدت متصل به جایگاه تعیین جنسیت هستند. در قزل آلالی رنگین کمان دو توالی DNA چند شکلی واقع بر روی کروموزوم، توسط آنالیز RAPD شناسایی گردید (Iturra *et al.*, 1998)، بطوریکه یک توالی (P9) در همه نرها وجود داشت ولی در ماده های قزل آلالی Mount Lassen وجود نداشت. اما در سویه (Scottish) دیگر این توالی در ۶۲٪ از ماده ها وجود داشت. توالی شناخته شده دیگر وابسته به جنس تقریباً در ۷۵٪ از نرها یافت گردید در حالیکه در هیچ ماده ای در هر دو سویه مشاهده نگردید. این یافته ها آشکارا مشخص کرد که در کروموزوم Y قزل آلالی رنگین کمان تنوع مولکولی وجود دارد و این یافته ها مرتبط با این مشاهده است که کروموزوم های هترومورفیک می توانند در بعضی و نه همه سویه های قزل آلالی رنگین کمان شناسایی شوند.

همچنین توالی 5S، وابسته به بازوی کوتاه کروموزوم Y در ماهی آزاد Chinook می باشد. همچنین ۲ کروموزوم Y مربوط به نشانگر AFLP در Threespined Sticblack شناسایی شد (Griffiths *et al.*, 2000). در این گونه جایگاه آیزوزیم وابسته به جنسیت مشاهده گردید (Withler *et al.*, 1986).

کروموزوم های جنسی در نقشه پیوستگی قزل آلالی رنگین کمان با استفاده از چندین نشانگر میکروستلایت و AFLP - DNA شناسایی شد که بیانگر وجود جایگاه تعیین جنسیت روی کروموزوم است (Young et al., 1998). بطور مشابه برای ماهی مداکا، کروموزوم جنسی در مطالعات نقشه ای جزئی و چندین نشانگر DNA شناسایی شده است که بسیار نزدیک به جایگاه تعیین جنسیت هستند (Narus et al., 2000).

۴- تعیین جنسیت با استفاده از فاکتورهای متعدد (Polyfactorial)

از آنجائیکه مسیرهای شرکت کننده در تعیین جنسیت خیلی پیچیده هستند، بنابراین جای تعجب نیست که ژنهای زیادی در این فرآیند تأثیرگذار باشند. در بسیاری از گونه های ماهیان، تلاقی ها نسبت های جنسی ۱:۱ را بطور ثابت تولید نمی کنند که این موضوع مشخص می نماید که تفکیک مندلی کروموزومهای جنسی برای تعیین جنسیت مسئول نمی باشند. در این مورد جنسیت (در شرایط محیطی ثابت) با تعادل ژنهای تعیین کننده نر و ماده، فاکتورهایی که ممکن است بطور مساوی بین فرزندان تقسیم نشده باشند، تعیین می شود. به عنوان مثال اگر یک نر که دارای فاکتورهای ژنتیکی کافی برای القاء تکامل نر را داشته باشد و با یک ماده با جایگاه تعیین کنندگی جنسیت ماده بسیار قوی، لقاح داده شود، نتایج حاصل احتمالاً دارای فاکتورهای تعیین کننده ماده خواهند بود و فقط تعدادی نر ممکن است مشاهده گردند (Delvin & Nagahama, 2002).

۵- تلاقی با افراد تغییر جنسیت یافته

ماهیان سیستم های آزمایشی خوبی را برای آنالیز تعیین جنسیت با توجه به توانایی طبیعی این فرآیند و قابلیت دستکاری جنسیتی در بسیاری از گونه ها فراهم می آورند. در بسیاری از موارد، دستکاریها شامل تیمارهای هورمونی یا شوک های حرارتی هستند که قادر به تغییر فنوتیپ جنسی مستقل از ژنوتیپ آن می باشند. این موضوع امکان مطالعه مکانیسم های تعیین جنسیت از طریق انجام تلاقی هایی بین افراد با جنسیت ژنتیکی یکسان و آنالیز ژنوتیپ نتاج حاصل به منظور مطالعه مکانیسم های تعیین جنسیت فراهم می آورد. بطوریکه در شرایط مختلف، نسبت های نر و ماده ثابت هستند که نشان می دهد در صورتی که جنسیت بطور ژنتیکی کنترل شود، فاکتورهای محیطی و پلی ژنتیک دارای تأثیر جزئی می باشند. جهت تشخیص روشهای XY و ZW، ابتدا افراد

تغییر جنسیت یافته با استفاده از تیمارهای هورمونی استروژن و آندروژن تولید می شوند و سپس با ماهیان دارای جنسیت معمولی لقاح صورت می گیرد. از طریق بررسی نسبت جنسی نتاج، جنسی که هتروگامت است قابل تشخیص می باشد. به این منظور از تیمارهای هورمونی مختلفی استفاده می شود، برای ماده سازی از ethynylestradiol و 17 β -estradiol و برای نر سازی از هورمونهای 17 α -methyltestosterone و 17 α -methyl-dihydrotestosterone غیر آروماتازی استفاده می شود - (Delvin & Nagahama, 2002).

۶- تکامل سویه های تک جنسی

در غیاب مارکرهای مولکولی یک روش جایگزین برای شناسایی ژنتیکی جمعیت، شامل تولید سویه های مشخص ژنتیکی تمام نر و تمام ماده می باشد. سویه های تک جنسی می توانند بوسیله ترکیب یک دسته مشخص از تلاقی های ژنتیکی با تکنولوژی تغییر جنسیت تولید شود. در صورتی که سیستم تعیین جنسیت فعال باشد، روش ساده ای می باشد. بعنوان مثال در سیستم های XY، نر زایی سبب تولید ماهیان نر XX به عنوان نرهای عملکردی و نتاج تمام ماده را در تلاقی با ماده های معمولی XX، تولید خواهند نمود. همچنین از روشهای جایگزین می توان بمنظور شناسایی جنسیت ژنتیکی افراد تغییر جنسیت یافته استفاده نمود. بعنوان مثال، فرزندان زاینوزنر گونه های با سیستم XY الزاماً ماهیان XX خواهند بود. بنابراین همه نرهای تغییر جنسیت یافته از گروه های در معرض هورمونهای نرینگی، دارای ژنوتیپ ماده هستند. همچنین تیمارهای هورمونی ممکن است در دوزها و یا زمانهایی که تغییر جنسیت غیر کامل را سبب می شوند، باعث بوجود آمدن موجودات هرmafrodیسم گردد. اما در مورد گونه هایی که سیستم دستگاه تعیین جنسیت آنها ZW می باشد، تلاقی های ماهیان تغییر جنسیت یافته و ماهیان معمولی جهت تکامل سویه های تک جنس مشابه روش سیستم های XY است (Delvin & Nagahama, 2002).

۷- نسبت های جنسی از کراس های منظم

یکی دیگر از راههای مکانیسم تعیین جنسیت محاسبه نسبت جنسی نتایج حاصل از ۵۰ - ۲۰ تلاقی تحت شرایط کنترل شده می باشد. چنانچه نسبت مذکور از نسبت جنسی ۱:۱ انحراف چندانی نداشته باشد می توان تا حدود زیادی

از وجود سیستم تعیین جنسیت کروموزومی اطمینان حاصل نمود. اگر نسبت افراد نر و ماده در میان نتایج حاصل از تلاقی های مختلف از نسبت ۱:۱ انحراف زیادی نشان دهد، می تواند نشانه ای از وجود سیستم تعیین جنسیت محیطی باشد که در اینصورت انجام آزمایش هایی برای بررسی تاثیر متغیرهای فیزیکی مانند درجه حرارت، تراکم، شوری، PH و سایر عوامل محیطی بر نسبت جنسی افراد ضروری است (Nagahama & Delvin, 2002).

۵-۳-۱- تعیین جنسیت محیطی و رفتاری

جنسیت در یک ماهی بخصوص ممکن است توسط یک یا تعدادی عامل صورت پذیرد. دما، PH آب، هورمون های استروئیدی و بعضی عوامل محیطی از عوامل فیزیکی و خارجی هستند که می توانند در تعیین جنسیت دخیل باشند (Nakamura *et al.*, 1998, Pandian *et al.*, 1990).

تاثیر فاکتور دما در نسبت جنسیت نرها و ماده ها فقط در بعضی ماهیها نشان داده شد. یکی از نمونه های قابل توجه مربوط به تاثیر دما بر تعیین جنسیت در فلاندرهای ژاپن (*Paralichthys lethostigma*) اتفاق می افتد. در دوران اولیه رشد دما می تواند روی ژنوتیپ ماده (XX) تاثیر بگذارد. دمای بالا (۲۷/۵ - ۲۵ درجه سانتیگراد) و دمای پایین (۱۵ درجه سانتیگراد) باعث رشد بیشتر نرها نسبت به ماده ها می شود (Yamamoto *et al.*, 1996). انواع دیگری از گونه های موجود در مناطق شمالی ژاپن نیز تاثیر دما بر تعیین جنسیت را نشان داد (Goto *et al.*, 1991). تفاوت میان کروموزوم های جنسی ممکن است کاملاً جزئی باشد و از روش های یاد شده برای شناسایی کروموزوم های جنسی فرضی در جنس نر (XY) گونه هایی از *Tilapia* (*O. niloticus*) و ماده (ZW) در گونه *O. aureus* استفاده شود (Carrasco *et al.*, 1999). این شکل پذیری کروموزوم های جنسی نشان می دهد که در میان بسیاری از گونه های ماهی ژنهای تعیین جنسیت در کروموزوم های W و یا Y متفاوت می باشد، اگرچه درون مسیر کنترل جمعیت ممکن است که بطور مشابه ای عمل نمایند. سیستم های کروموزوم های جنسی در بین گونه ها که چند شکلی بودند بیانگر ماهیت تکاملی و دینامیک این سیستم است. در قزل آلاهی رنگین کمان کروموزوم های هترومورفیک بین جمعیت ها فرق می کنند و در بعضی از جمعیت ها در نرها قابل تشخیص می باشند (Carbon *et al.*, 1987).

۴-۱- کلیاتی در مورد AFLP

در سال ۱۹۹۵ تکنیک جدیدی توسط Vos و همکاران ابداع و معرفی شد که به نظر می رسد بسیاری از محدودیت های نشانگرهای پیشین را نداشته باشد. با روشی که AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) نامیده می شود، نشانگرهایی تولید می شوند که علاوه بر دارا بودن مزایای RFLP مانند دقت و تکرار پذیری، ویژگیهای مثبت روش های مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلیمرز را نیز دارند. پایه این روش تکثیر انتخابی برخی قطعه ها از بین تمام قطعه های هضم شده DNA است و دارای سه مرحله مجزا می باشد (Vos et al., 1995).

الف - هضم DNA. با یک جفت آنزیم محدودگر و الحاق آنها به سازگار سازهای (آداپتورهای الیگونوکلئوتیدی

ب - طراحی و ساخت آغازگر و تکثیر انتخابی دسته ای از قطعه های حاصل از هضم با استفاده از ردیف بازی سازگار سازها (که مشخص است) و نیز ردیف بازی نقاط برشی. اما برای تکثیر انتخابی قطعه های حاصل از هضم دو، سه یا چند نوکلئوتید به انتهای ۳ ردیف آغازگر اضافه می شود که موجب می گردد فقط قطعه هایی تکثیر شوند که ردیف بلافاصل آنها در مجاورت نقطه برش، مکمل نوکلئوتیدهای مذکور باشد (شکل ۱).

ج - جداسازی قطعه های حاصل از تکثیر روی ژل های ردیف یابی (پلی اکریلامید) و استفاده از روش خود پرتونگاری یا رنگ آمیزی نقره برای ثبت نتایج.

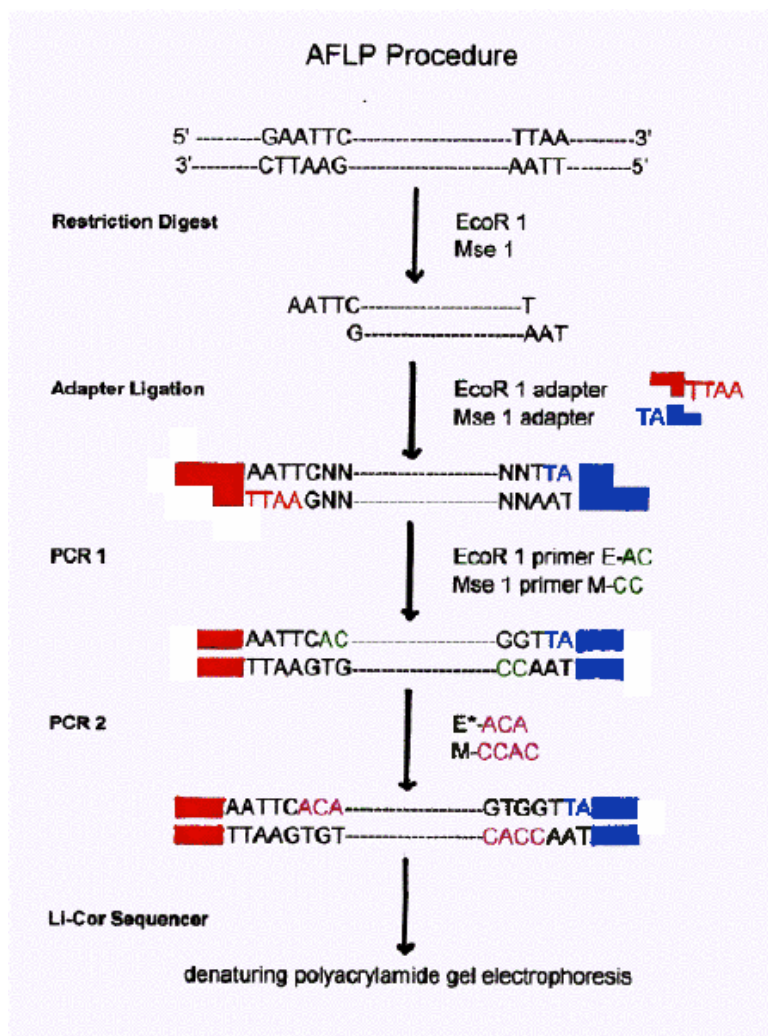
با استفاده از این روش تعداد زیادی از قطعه های حاصل از هضم، تکثیر و قابل رویت می شوند و این در حالی است که نیازی به دانش اولیه در مورد ردیف بازی قطعه هایی که تکثیر می شوند نمی باشد. هر یک از این قطعه ها که به صورت باندهای روی ژل ظاهر می شوند، می توانند به عنوان یک نشانگر ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرند. تعداد قطعه هایی که با این روش تکثیر می شوند بدقت و توانمندی روش های جدا سازی (الکتروفورز) و ثبت نتایج و تعداد نوکلئوتید اضافه شده به انتهای آغازگر بستگی دارد. معمولاً در این روش بین پنجاه تا صد قطعه حاصل از هضم تکثیر و با استفاده از ژل های پلی اکریلامید واسرشته ساز ثبت می شوند. تفاوت و تنوع مشاهده شده به وسیله این نشانگر به صورت حضور یا فقدان باند و به دلایل ذیل است:

الف - اختلاف در جایگاه های برشی

ب - کمبود یا اضافه شدن نوکلئوتید در داخل قطعه های برشی

ج- بروز پدیده حذف و اضافه در محل اتصال آغازگر یا درون قطعه قابل تکثیر (Vos *et al.*, 1995).

۱-۴-۱ - مراحل روش AFLP



شکل ۱ - مراحل روش AFLP، که به طور خلاصه شامل برش DNA ژنومی موجود با دو آنزیم محدودگر (Restriction)، اتصال آداپتورهای اولیگونوکلوئیدی به انتهای قطعه های برشی (Ligation)، تکثیر پیش از مرحله انتخاب با قرار دادن یک نوکلئوتید انتخابی یا بدون نوکلئوتید انتخابی (Preselective-PCR)، تکثیر انتخابی با در نظر گرفتن دو یا سه نوکلئوتید انتخابی در انتهای ۳ (Selective-PCR) و الکتروفورز ژل است. برگرفته از (Vos *et al.*, 1995)

۲-۴-۱- مزایای AFLP

روش AFLP مزایای متعددی نسبت به سایر روشهای مبتنی بر DNA دارد که در ذیل به تعدادی از آنها اشاره می‌گردد:

الف - این روش در مقایسه با سایر روش‌ها بیشترین تعداد نشانگرها به ازای هر ژل را ایجاد می‌کند.

ب- دارای کلیه مزایای روش RAPD از جمله سرعت و عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد ردیف بازی DNA و غیره می‌باشد.

ج- نیازی به تهیه و تدارک و نگهداری کاوشگر نیست.

د - دقت و تکرار پذیری این نشانگر بدلیل انتخاب دمای زیاد هم رشته سازی و اتصال آغازگر به DNA الگو بیشتر از RAPD است.

ه- فراوانی بسیار زیاد این نشانگرها که از طریق تنظیم تعداد و نوع نوکلئوتیدهای اضافی در انتهای ۳ و تغییر آنزیم محدودگر بدست می‌آید (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).

۳-۴-۱- معایب AFLP

مطمئناً هر روش نو مبتنی بر DNA در زمان خود علاوه بر دارا بودن مزایا، معایبی را هم خواهد داشت که می‌توان به موارد ذیل اشاره نمود:

الف - پیچیدگی نسبی این روش در مقایسه با سایر روش‌های مبتنی بر PCR

ب- عدم اطلاع از جایگاه ژنی نشانگرها.

ج- غالب (بارز) بودن این نشانگرها که موجب عدم امکان تشخیص افراد خالص از ناخالص می‌گردد.

د- عدم امکان تشخیص آلل‌های هر نشانگر موجب افت کارایی این نشانگر می‌شود.

ه- تکثیر قطعه‌های غیر واقعی در AFLP موجب کاهش قابلیت اعتماد این روش می‌گردد (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).

بنظر می‌رسد که وجود یا نبود باندهای غیر واقعی در زمان برش و اتصال آداپتورها اتفاق می‌افتد، از این رو باید

مطمئن شد که برش DNA بطور کامل صورت گرفته باشد. به منظور برش کامل DNA باید از DNA با کیفیت

مطلوب و مقدار مناسب آنزیم‌های محدودگر استفاده کرد. همچنین با افزایش درجه حرارت مرحله اتصال و

استفاده از آغازگرهای طویل‌تر، می‌توان قطعه‌های غیر واقعی ایجاد شده را به کمترین حد ممکن کاهش داد.

از طرف دیگر شرایط PCR موجب می شود که آغازگر به طور کامل به DNA الگو بچسبد و در نتیجه مانع جفت شدن ناقص آغازگر و تشکیل باندهای ناخواسته شود (Vos et al., 1995).

۴-۴-۱- ویژگیها و کاربرد نشانگرهای AFLP

AFLP روش جدید انگشت نگاری DNA است که برای DNA هایی با هر منشاء و پیچیدگی قابل استفاده است. همچنین در این روش داشتن اطلاعات اولیه از توالی هدف مورد نیاز نیست و با استفاده از تعداد محدودی آغازگر قابل انجام است. تعداد قطعه هایی که در یک واکنش ایجاد می شود با انتخاب نوع آنزیم های محدودگر، تعداد بازهای انتخابی و حتی طبیعت بازهای انتخابی قابل کنترل است. در ژنوم های پیچیده تعداد بسیار زیادی از قطعه های برشی به وسیله AFLP ایجاد می شود. فقط ترکیبی از یک آنزیم برشی متداول (Frequent cutter) و یک آنزیم برشی نادر (Rare cutter) تکثیر صدها قطعه AFLP منحصر به فرد را فراهم می نماید. از آنجا که بیشتر قطعه های AFLP به جایگاه های ویژه ای در ژنوم اختصاص دارند، بنابراین می تواند به عنوان نشانگرهایی در نقشه های فیزیکی و ژنتیکی استفاده شوند (Vos et al., 1995).

از مزیت های دیگر AFLP مقدار زیاد چند ترکیبی است. یعنی تعداد جایگاه های مختلفی که ممکن است به طور همزمان در هر آزمایش تجزیه شوند

بسیار زیاد است. در حقیقت از آنجا که نشانگرهای AFLP در سراسر ژنوم پراکنده اند، دارای مقدار زیادی چند ترکیبی باشند.

معایب AFLP می تواند مربوط به آغازگرها و آنزیم ها، مشکل تکرار پذیری، غالب بودن نشانگر، همولوژی و هزینه باشد.

عدم تکرار پذیری کامل ممکن است به دلیل عدم برش کامل DNA، به علت کیفیت نامطلوب DNA و یا به دلیل کافی نبودن آنزیم های برشی باشد.

از دیگر مشکلات این روش، همولوژی است. معمولاً چنین فرض می شود که دو باند با مهاجرت یکسان همولوژی دارند. با این وجود ممکن است در یک اندازه خاص باندهای مربوط به نواحی مختلف در موقعیت یکسان قرار گیرند که شناسایی این نوع باندها بسیار مشکل است. البته بنظر می رسد که به دلیل تکثیر بسیار

اختصاصی مرحله انتخاب اصلی و همچنین به علت وضوح زیاد الکتروفورز ژل پلی اکریلامید در تفکیک تمایزها، احتمال اینکه دو قطعه AFLP دارای مهاجرت یکسان باشند ضعیف است. به دلیل کارایی، تکرارپذیری و قابل اعتماد بودن روش AFLP از این نشانگر برای مطالعات ژنتیکی مختلف استفاده شده است (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).

۱-۵- بررسی تظاهر ژن

۱-۵-۱- دستیابی به ژن از طریق RNA پیامبر

در انسان یا برخی دیگر از موجودات پیچیده، ژن مورد نظر در میان توده بزرگی از DNA که دارای ژنهای دیگر و نیز دارای توالی های تکراری که هیچ عملکردی برای آنها شناخته نشده است قرار دارد. بعلاوه اکثر ژنهای یوکاریوت های عالیتر بوسیله اینترون های غیر کد کننده که درون اگزون های کد کننده قرار دارند از هم جدا شده اند. هرچند روش هایی برای شناسایی ژنها وجود دارد اما مهندسی ژنتیک پیشرفتهای کمی در زمینه جداسازی یک ژن در میان توده ای از ژنهای دیگر داشته است. نه تنها مهارت بلکه زیرکی و حتی خوش شانسی نقش مهمی در بدست آوردن نتیجه موفقیت آمیز دارند (امین لاری، ۱۳۸۴).

یکی از راههای دستیابی به ژن مورد نظر از طریق RNA پیامبر آن می باشد. مزیت مهم استفاده از mRNA این است که اطلاعات غیر کد کننده ای که در DNA وجود دارد (اینترون ها) حذف شده اند. از روی mRNA جداسازی شده توسط آنزیم نسخه بردار معکوس، DNA مکمل (cDNA) ساخته می شود. احتمالاً بافت بیان کننده ژن دارای مقادیر زیادی از mRNA مورد نظر می باشد. هر چند جز در موارد نادر مولکولهای mRNA دیگری نیز در بافت تولید می شوند. زمان مناسب برای شروع عمل کلونینگ ژن هنگامی است که مقدار یک نوع mRNA خاص در بافت بیش از بقیه باشد و در چنین موقعیتی mRNA از بافت استخراج می شود. در یک سلول پستاندار حدود ۸۵-۵۰٪ RNA از نوع tRNA (ریبوزومی)، ۱۵-۱۰٪ از نوع tRNA (ناقل) و نیز سایر مولکولهای RNA دارای وزن مولکولی کم و ۵-۱٪ از نوع mRNA (پیامبر) می باشد.

اگر چه مقدار mRNA در یوکاریوتها کم است اما بعلت داشتن دم پلی آدنیلاتی در انتهای ۳ خود قابل تشخیص می باشد. برای مثال در گلبولهای قرمز در حال بلوغ که عمدتاً پروتئین تولید شده در آن در هموگلوبین است،

۹۰-۵۰٪ از RNA های سیتوپلاسمی دارای دم پلی آدنیلاتی را mRNA گلوبولین تشکیل می دهد. با عبور دادن عصاره Poly-T غنی از پلی RNA از ستون کروماتوگرافی دارای قطعات Poly-T (که به بستر سلولزی متصل شده اند) قسمت اعظم RNA پیامبر را می توان در اثر جفت شدن اختصاصی بازهای آدنین و تیمین از بقیه RNA سلولی جدا نمود. پس از آن با جدا کردن RNA از ستون می توان نمونه ای بدست آورد که از لحاظ mRNA بسیار غنی است. پس از جدا کردن mRNA لازم است که اطلاعات به شکل DNA تبدیل شود. برای این منظور از آنزیم نسخه بردار معکوس استفاده می شود. این آنزیم با ارزش که یکی از اجزاء اصلی در همانند سازی رتروویروسها است، اطلاعات RNA را به DNA تبدیل می کنند. این آنزیم برای شروع کار خود نیاز به یک پرایمر دارد (در آلودگی با رتروویروسها، پرایمر یک مولکول tRNA است). در این روش از یک الیگو - dt که مکمل دو پلی A مولکول mRNA است بعنوان پرایمر استفاده می شود. ابتدا پرایمر الیگو dt با mRNA جفت شده و سپس آنزیم نسخه بردار معکوس عمل خود را انجام می دهد، هنگامیکه نسخه برداری از روی mRNA کامل شد، آنزیم شروع به نسخه برداری از روی DNA هایی که تازه ساخته شده است می کند. به همین دلیل این مولکول در انتهای خود واجد یک حلقه سنجاق سری می باشد. این حلقه سنجاق سری که احتمالاً یکی از محصولات واکنش های درون لوله آزمایش است پرایمر مناسبی را برای سنتز رشته دوم DNA فراهم می آورد. سپس مولکول DNA دو رشته ای حاصل که دارای حلقه سنجاق سری سالم می باشد بوسیله نوکلئازی که فقط روی مولکولهای تک رشته ای عمل می کند شکسته می شود و مولکول DNA دو رشته ای که یکی از رشته های آن مکمل مولکول mRNA است بوجود می آید. سپس می توان DNA دو رشته ای (ژن مورد نظر) را در پلاسمید و یا سایر حاملین کلون کرد.

۲-۵-۱- روش های مختلف بررسی تظاهر ژن

تفاوت در تظاهر ژن در تمامی مراحل رشد و نمو موجودات از تولد تا مرگ اتفاق می افتد. شناسایی ژن های تظاهر یافته، در شناخت عمل ژن و نیز در شناخت سازوکارهای مولکولی یک سیستم بیولوژیک به ما کمک خواهد کرد. در دو دهه پیش مطالعه تظاهر ژن بر اساس روش های تجزیه یک ژن (مانند روش های لکه گذاری

نورتن و روش ا. اس. ا) بود. اما امروزه از روشهایی استفاده می شود که می توانند ژن ها را با تظاهر متفاوت در بین نمونه های آزمایشی شناسایی کنند که مهم ترین آنها عبارتند از:

۱- خزانه کاهنده cDNA (Subtractive cDNA Library)

۲- RT-PCR افتراقی (Differential display reverse transcription)

۳- ردیف تظاهر یافته برچسب دار (Expressed sequence tag)

۴- ردیف یابی نقاط هوشمند از توالی تظاهر یافته (Sequencing of expressed sequenced tag)

۵- cDNA-AFLP

به دلیل اهمیت روشهای فوق در مطالعه تظاهر ژن و استفاده زیاد آنها در موجودات مختلف به اختصار شرح داده می شوند.

۱- خزانه کاهنده cDNA (Subtractive cDNA Library)

وجود mRNA های فراوان در یک بافت، mRNA های کمیابی را که ممکن است نقش مهمی در مکانیسم های مورد مطالعه داشته باشد، مخفی می نماید. بمنظور افزایش شانس کلونینگ cDNA های مربوط به mRNA های نادر، mRNA های غالب را می توان با استفاده از تکنیک های متفاوت حذف نمود (Tagu & Moussard, 2006).

۲- افتراقی RT-PCR

این تکنیک مجموعه ای از غربالگری ناهمسان است که جهت شناسایی mRNA های کمیاب استفاده می شود و شامل سه مرحله است:

۱- نسخه برداری معکوس از mRNA که سبب بوجود آوردن cDNA های تک رشته ای می شود.

۲- تکثیر cDNA ها

۳- جداسازی الکتروفورزی قطعات دو رشته ای قبل از اینکه کلون گردند.

این سه مرحله بطور همزمان انجام می شود و به موازات جداسازی mRNA از بافتها و یا تیمارهای مختلف انجام

می گیرد (Tagu & Moussard, 2006).

۳- ردیف تظاهر یافته برچسب دار (Expressed Sequence Tag)

EST ها توالی های DNA موجود در ۵ یا ۳ کلون های cDNA می باشند که اغلب بطور تصادفی از یک خزانه cDNA گرفته شده است و یا بخشی از کلون های جدا شده از یک خزانه ژنی مربوط به مراحل تمایزی که احتمالاً به روش غربالگری تمایزی (differential screening) ساخته شده اند، می باشند. طول این توالی ها معمولاً به حدود ۵۰۰ نوکلئوتید محدود می شود، که در واقع معادل اطلاعات بدست آمده از یک واکنش تعیین توالی می باشد. به همین دلیل برای هر کلون cDNA مورد نظر دو EST وجود دارد، یکی در انتهای ۵' و دیگری در انتهای ۳' ولی در بسیاری از موارد توالی قسمت میانی این دو ناشناخته است. با این وجود همین اطلاعات محدود نیز برای جستجوی بانکهای اطلاعاتی بمنظور تعیین میزان همخوانی با ژنهای شناخته شده و یا نواحی ژنی مربوط کافی است (Tagu & Moussard, 2006).

۴- ردیف یابی نقاط هوشمند از توالی تظاهر یافته (Sequencing of expressed sequenced tag)

اساس این روش بر این اصل است که سطح یک mRNA در یک بافت خاص از طریق فراوانی EST منطبق با آن در یک خزانه cDNA منعکس می شود. همانطوریکه بیان شد این امر از طریق ردیف یابی انتهای ۳' یا ۵' همسانه های cDNA بدست می آید. تفاوت در بیان ژن از طریق شمارش دفعات ظهور یک ردیف خاص در کتابخانه EST ژن های منابع مختلف، مشخص می گردد (Tagu & Moussard, 2006).

۵- cDNA-AFLP

پاسخهای بیولوژیکی و برنامه های تکاملی توسط تنظیم دقیق بیان ژن کنترل می شوند. بمنظور بررسی این فرآیندها، مطالعه الگوهای بیان ژن ضروری است (Bachem *et al.*, 1998). تکنیک AFLP می تواند بمنظور شناسایی توالی های کد کننده بیان شده به روش متفاوت در دو جمعیت mRNA ها استفاده گردد. اختلاف عمده آن با روش AFLP روی DNA ژنومی از این واقعیت منشاء می گیرد که یک جمعیت از cDNA ها که دارای تنوع سکانسهای محدودتر (فقط توالی های کد کننده موجود) می باشند، معرف سطح متنوعی از توالی های وابسته به بیان ژن هستند. به همین علت تکثیر قطعات برش یافته معمولاً در شرایط اختصاصی بسیار کمتری انجام می شود

(Tagu & Moussard, 2006). با استفاده از این تکنیک غربالگری سیستماتیک تقریباً همه نسخه ها (Transcript) در یک سیستم بیولوژیکی با استفاده از مقدار جزئی ماده اولیه امکانپذیر است (Bachem *et al.*, 1998). اغلب PCR مقدماتی انتخابی نیست (پرایمرها بدون نوکلئوتید اضافی می باشند) و تکثیر انتخابی با استفاده از پرایمرهای با دونوکلئوتید انتخابی و یا بیشتر انجام می شوند (Tagu & Moussard, 2006).

ساخت خزانه cDNA

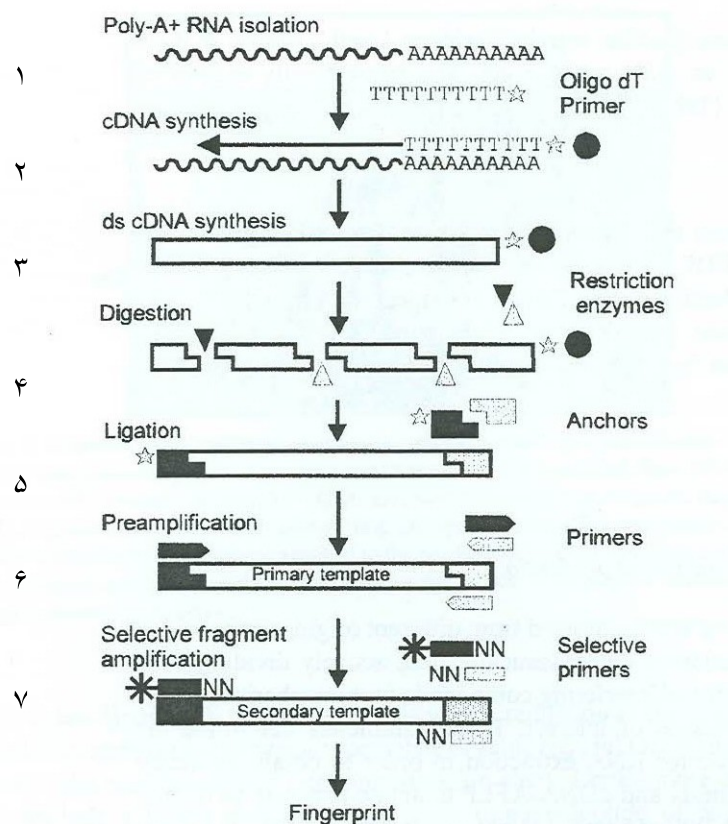
جمعیت mRNA های تجمع یافته در یک بافت معرف آن بافت است. بنابراین برخورداری از قابلیت شناسایی ژنهای بیان شده در یک اندام مشخص بسیار مهم می باشد. اگرچه دستکاری mRNA ها یک فرآیند حساس است (بعلت مقدار کم و حساسیت بالا به آندونوکئازها) که باید به DNA دو رشته ای تبدیل گردند تا بتوان آنها را به سادگی دستکاری و آماده انتقال به وکتور باکتریایی نمود. یک خزانه cDNA (DNA مکمل) معرف دستجاتی از mRNA موجود در یک بافت در یک مرحله خاص تکاملی است. بر خلاف خزانه ژنومی، خزانه cDNA مختص بافت است و آن را می توان بعنوان یک عکس فوری از دستجات mRNA موجود در اندام در نظر گرفت (Tagu & Moussard, 2006) (شکل ۲).

ساخت خزانه cDNA (cDNA Library) در چندین مرحله انجام می شود و اصول آن شامل:

- ۱- استخراج RNA و گاهی اوقات تخلیص mRNA پلی آدنیله در یک اندام
 - ۲- کپی کردن این mRNA ها به یک DNA مکمل تک رشته ای بوسیله عمل آنزیم نسخه بردار معکوس
 - ۳- حذف اختصاصی mRNA بوسیله RNAaseH یا NaOH
 - ۴- ساخت رشته دوم DNA بوسیله یک DNA پلیمراز
 - ۵- الحاق الیگونوکئوتیدها جهت ساخت جایگاه برش
 - ۶- الحاق به یک وکتور کلونینگ (پلاسمید یا فاژ)
 - ۷- وارد کردن وکتورهای نو ترکیب به داخل یک باکتری
- امروزه ساخت رشته دوم DNA و الحاق آدپتورها با استفاده از PCR به سادگی قابل انجام می باشد. ساخت یک رشته cDNA معمولاً با تثبیت یک توالی کوتاه polyT روی انتهای polyA یک رشته mRNA انجام می شود. روش

دیگر استفاده از پرایمر برای ساخت یک رشته cDNA توسط آنزیم نسخه بردار معکوس، ترکیب هگزانوکلئوتیدهای سنتزی مطابق با بسیاری از توالی های متفاوت و هیبریداسیون آنها بطور اتفاقی روی mRNA است (Tagu & Moussard, 2006).

چون برای ساخت cDNA پرایمر به قسمت های داخلی mRNA می چسبد، در نتیجه cDNA های ساخته شده فقط قطعاتی از mRNA هستند و نه کل آن، در مواردی که تخلیص مقادیر زیاد mRNA مشکل است، می توان از کل RNA استفاده نمود. mRNA ها معرف فقط قسمتی از RNA سلولی هستند. تکنیک PCR جهت ساخت خزانه های cDNA از مقادیر بسیار جزئی RNA مناسب می باشد (Tagu & Moussard, 2006).



شکل ۲- مراحل روش cDNA-AFLP بر گرفته از Tagu & Moussard, 2006

با توجه به مطالب ارائه شده و نیز با عنایت به اینکه تا کنون مکانیزم تعیین جنسیت در ماهیان خاویاری بویژه گونه‌های دریای خزر شناسایی نشده است و همچنین با توجه به عدم موفقیت مطالعات قبلی در شناسایی و معرفی مارکرهای مولکولی تعیین جنسیت، این پروژه طراحی و تدوین گردید تا بتواند با استفاده از روش AFLP مطالعات قبلی را تکمیل نماید.

۷-۱- فرضیات و پرسش‌ها

- ۱- با روش AFLP می‌توان مارکر وابسته به جنس را در تاسماهی ایرانی و فیل ماهی شناسایی نمود.
- ۲- از طریق بررسی بیان ژن در گناد با استفاده از AFLP- cDNA می‌توان مارکر وابسته به جنس را در تاسماهی ایرانی شناسایی نمود.

۸-۱- اهداف

- ۱- جدا سازی و تعیین باند DNA بعنوان نشانگر مولکولی جهت تشخیص جنسیت در گونه‌های خاویاری تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و فیل ماهی (*Huso huso*).
- ۲- یافتن نشانگر مناسب و دستیابی به حداقل سن مورد نیاز جهت تعیین جنسیت در فیل ماهی و تاسماهی ایرانی.
- ۳- جداسازی و تفکیک باند DNA بعنوان نشانگر مولکولی با استفاده از روش AFLP-DNA.
- ۴- بیان ژن در mRNA گناد افراد نر و ماده با روش AFLP-cDNA و امکان استفاده از آن در سطح DNA ژنومی.

۲- مواد و روشها

۱- ۲- جمع آوری نمونه ها

در این بررسی از ۲۰ نمونه باله دمی تاسماهی ایرانی و ۲۰ نمونه باله دمی فیل ماهی (۱۰ نمونه نر و ۱۰ نمونه ماده در هر گونه) با گنادهای جنسی مشخص در فصل تکثیر (زمستان و بهار ۱۳۸۵) در مجتمع تکثیر و بازسازی ذخایر ماهی شهید بهشتی سد سنگر شهرستان رشت نمونه برداری شد. نمونه های باله دمی در الکل اتانول مطلق نگهداری و به بخش ژنتیک انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری منتقل گردید. همچنین بمنظور بررسی بیان ژن در تاسماهی ایرانی با استفاده از روش cDNA-AFLP در فصل بهار (۱۳۸۶) از گنادهای نر (بیضه) و ماده (تخمندان) تاسماهیان بالغ تکثیر شده نیز نمونه برداری شد و نمونه ها بلافاصله در مخزن ازت مایع با دمای ۱۹۶- درجه سانتیگراد قرار گرفت.

کلیه بررسی های مولکولی از قبیل استخراج DNA، انجام PCR، الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید، رنگ آمیزی ژل ها، استخراج RNA، ساخت cDNA و کلونینگ در بخش ژنتیک انستیتو انجام پذیرفت که جزئیات آن به شرح ذیل می باشد:

۲-۲- آزمایش های DNA-AFLP

۱- ۲-۲- استخراج DNA

استخراج DNA با استفاده از روش فنل کلروفرم و طی مراحل ذیل انجام پذیرفت (Pourkazemi, 1996).

- ۱- ۵ میلی گرم از بافت باله دمی در میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری قرار داده شد.
- ۲- مقدار ۶۰۰ میکرولیتر از بافر STE روی نمونه ریخته شد و سپس با قیچی بافت باله هموژنیزه گردید.
- ۳- مقدار ۴۰ میکرولیتر بافر SDS ۲۰٪ به نمونه اضافه و کاملاً به هم زده شد.
- ۴- مقدار ۵ میکرولیتر پروتیناز K (۲۰mg/ml) روی نمونه ریخته و بمدت یک شب در حرارت ۵۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت.
- ۵- مقدار ۵۰۰ میکرولیتر فنل کالیبره به کل نمونه افزوده و بمدت ۱۰ دقیقه روی شیکر هم زده شد. سپس نمونه به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید.

- ۶- فاز فوقانی با میکروبییت به میکروتیوب جدید منتقل گردید و میکروتیوب حاوی فاز پایین دور ریخته شد.
- ۷- میزان ۳۰۰ میکرولیتر فنل و ۳۰۰ میکرولیتر کلروفرم و ۱۲ میکرولیتر ایزوآمیل الکل به نمونه ها افزوده شد.
- ۸- نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه روی شیکر قرار گرفتند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شدند. محلول رویی به یک میکروتیوب جدید انتقال داده شد.
- ۹- مقدار ۵۰۰ میکرولیتر کلروفرم و ۲۵ میکرولیتر ایزوآمیل الکل به نمونه اضافه شد.
- ۱۰- مرحله ۸ دوباره تکرار گردید.
- ۱۱- میزان ۸۰۰ میکرولیتر الکل اتانول ۱۰۰ درجه به نمونه اضافه و به آرامی تکان داده شد.
- ۱۲- بمدت ۳ دقیقه نمونه ها با ۶۰۰۰ rpm سانتریفوژ و سپس محلول رویی به آرامی تخلیه گردید.
- ۱۳- میزان ۱۵۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درجه به نمونه افزوده شد و سپس به مدت ۲ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید.
- ۱۴- الکل رویی دور ریخته شد و پلت DNA در هوای آزاد و زیر هود آزمایشگاهی قرار گرفت تا خشک گردد.
- ۱۵- میزان ۱۰۰-۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل روی DNA ریخته شد تا خوب حل شود.
- جهت ارزیابی کیفیت DNA همه نمونه ها با ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز و سپس با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند. از روی شدت وضوح باندها می توان به کیفیت و تا حدودی کمیت آن پی برد. بدین منظور مقدار مشخصی از DNA خالص شده (۵ میکرولیتر) به همراه ۲-۳ میکرولیتر بافر سنگین کننده (Loading buffer) روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید.
- همچنین بمنظور ارزیابی کمیت DNA، از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. نخست به حجم ۱۰ میکرولیتر از DNA ژنومی با استفاده از آب مقطر به ۳۵۰۰ میکرولیتر رسانده شد. پس از کالیبره نمودن دستگاه CECIL (CE2040)، نمونه DNA مورد نظر داخل میکروسول ریخته شد و در نهایت مقدار جذب آن در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و نسبت A260/A280 توسط دستگاه اندازه گیری و ثبت گردید.
- غلظت DNA با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید (اسدی، ۱۳۸۰)

$$\text{غلظت DNA بر حسب نانوگرم/میکرولیتر} = 50 \times d \times A_{260}$$

که در این فرمول d نسبت رقت می باشد.

۲-۲-۲- DNA-AFLP آزمایش های

مراحل AFLP بر اساس روش Vos و همکاران (۱۹۹۵) با اندکی تغییر به شرح ذیل انجام شد.

۱- هضم آنزیمی با آنزیم های برشی

یک جفت ترکیب آنزیمی که شامل آنزیم های EcoRI و Tru9I (MseI) بود مورد استفاده قرار گرفت. انتخاب

آنزیم ها بر اساس یک آنزیم برشی کمیاب (Rare cutter) همراه با یک آنزیم برشی متداول (Frequent cutter)

انجام شد. در اینجا آنزیم MseI آنزیم برشی کمیاب و EcoRI آنزیم برشی متداول بود.

۲- الحاق با آداپتورهای مربوطه

۳- تکثیر اولیه Preselective-PCR

۴- تکثیر انتخابی Selective-PCR

۵- الکتروفورز روی ژل پلی آکریل آمید واسرشت شده

۱-۲-۲-۲- آماده سازی آداپتورها

آداپتورهای مربوط به آنزیم های برشی مورد استفاده (جدول ۱) را می توان پیش از هضم و یا همزمان با آن

آماده نمود. غلظت استوک آداپتورها $100 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ و غلظت نهایی آداپتورهای مورد استفاده $50 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ بود که

بشرح ذیل آماده گردیدند.

MseI-adapter	حجم مورد استفاده (μl)	غلظت نهایی ($\text{pmol}/\mu\text{l}$)
MseI-Forward (100 $\text{pmol}/\mu\text{l}$)	۵۰	۵۰
MseI- Reverse (100 $\text{pmol}/\mu\text{l}$)	۵۰	۵۰
حجم نهایی	۱۰۰	

EcoRI-adapter	حجم مورد استفاده (μl)	غلظت نهایی ($\text{pmol}/\mu\text{l}$)
ECORI-Forward (100 $\text{pmol}/\mu\text{l}$)	۵	۵
ECORI- Reverse (100 $\text{pmol}/\mu\text{l}$)	۵	۵
ddH ₂ O	۹۵	
حجم نهایی	۱۰۰	

سپس آداپتورهای تهیه شده در ترموسایکلر و در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ ثانیه حرارت داده شدند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه تا رسیدن به درجه حرارت اتاق، بتدریج خنک گردیدند.

۱۰S ۹۵ درجه سانتیگراد
 ۱۰Min ۲۵ درجه سانتیگراد
 Ramp ۱۰Min

جدول ۱- نوع آداپتورها و توالی آنها

نوع آداپتورها	توالی آداپتورها (5' → 3')
EcoRI-Forward	CTC GTA GAC TGC GTA CC
EcoRI-Reverse	AAT TGG TAC GCA GTC TAC
MseI- Forward	GAC GAT GAG TCC TGA G
MseI- Reverse	TAC TCA GGA CTC AT

آداپتورهای مربوط به سایر آنزیمهای برشی نادر بجز انتهای چسبنده آنها که مطابق با آن آنزیم هاست، شبیه به آداپتور EcoRI می باشند.

۲-۲-۲-۲- ساخت محلول مخلوط برش آنزیمی (Restriction)

مخلوط هضم طبق جدول ۲ تهیه گردید. ۲۵۰ نانوگرم DNA ژنومی با ۲/۵ واحد از هر کدام از آنزیم های برشی، هضم گردید. بطوریکه ۱۵ میکرولیتر مخلوط واکنش برش آنزیمی به ۵ میکرولیتر DNA ژنومی اضافه گردید. سپس بمدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوباسیون شد. در این مدت نمونه ها هر ساعت یکبار ورتکس شدند (نیازی به سانتریفوژ نبود).

جدول ۲ - مخلوط هضم آنزیمی (Restriction)

غلظت نهایی	حجم مورد استفاده در واکنش (μl)	غلظت استوک	مواد
ng/ μl ۲۵۰	۵	ng/ μl ۵۰	Genomic DNA
U ۲/۵	۰/۲۵	U/ μl ۱۰	EcoRI
U ۲/۵	۰/۲۵	U/ μl ۱۰	MseI
X ۱	۲	X ۱۰	Tango Buffer
-	۱۲/۵	-	ddH ₂ O
	۲۰		حجم نهایی

۳-۲-۲-۲-۳- ساخت محلول مخلوط الحاق (Ligation)

۵ میکرولیتر از مخلوط الحاق به مخلوط برش آنزیمی اضافه شد. ترکیب حاصل ابتدا توسط ورتکس مخلوط گردید و سپس یک spin کوتاه ایجاد شد و در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳ ساعت انکوباسیون گردید. بعد از اتمام زمان فوق، ۵ میکرولیتر از مخلوط برش-الحاق به همراه ۲ میکرولیتر لودینگ بافر روی ژل آگارز ۱٪، با جریان ۳ V/cm به مدت ۱ ساعت الکتروفورز شد. به باقی مانده مخلوط فوق ۶۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه گردید و پس از مخلوط شدن کامل در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد (جدول ۳).

جدول ۳ - مخلوط واکنش الحاق

غلظت نهایی	حجم مورد استفاده در واکنش (μl)	غلظت استوک	مواد
pmol ۱	۰/۵	pmol ۵	EcoRI-Adapter
pmol ۱	۰/۵	pmol ۵۰	MseI-Adapter
mM ۱	۰/۵	mM ۱۰	ATP
X ۱	۰/۵	X ۱۰	T4 DNA Ligase Buffer
U ۱	۱	U/ μl ۱	T4 DNA Ligase
-	۲	-	ddH ₂ O
	۵		حجم نهایی

۴-۲-۲-۲-۲-۴- واکنش تکثیر اولیه (Preselective-PCR)

واکنش های Preselective-PCR بر اساس پرایمرها و مخلوط واکنش و همچنین پروفیل حرارتی زیر انجام گرفت (جدول ۴).

جدول ۴ - توالی پرایمرهای EcoRI و MseI جهت واکنش Preselective-PCR

EcoRI+1 آغازگر	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C N-3'
MseI+1 آغازگر	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A N-3'

Preselective-PCR مخلوط واکنش ۲-۲-۲-۵

مخلوط واکنش میکس - الحاق قبل از استفاده در واکنش تکثیر Preselective-PCR به نسبت ۱:۱۰ رقیق گردید و سپس بعنوان الگو در واکنش تکثیر اولیه مورد استفاده قرار گرفت. در این مرحله از پرایمرهای Eco+1 و Mse+1 در حضور dNTPMix، 10XPCRbuffer و Taq DNAPolymerase (Roche) جهت تکثیر به شرح جدول ۵ استفاده گردید.

جدول ۵ - مخلوط واکنش Preselective-PCR

مواد	غلظت استوک	حجم مورد استفاده در واکنش (μl)
Eco+1	pmol ۱۰	۰/۴۵
Mse+1	pmol ۱۰	۰/۴۵
dNTP	mM ۲/۵	۱/۵
10XPCRbuffer(with Mg ²⁺)	X ۱۰	۱/۵
Taq DNAPolymerase(Roche)	u ۲۵۰	۰/۱
Restricted-Ligated DNA	-	۵
ddH ₂ O	-	۲
حجم نهایی		۵

واکنش تکثیر اولیه با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (اپندورف مدل (astercycle ep gradient, 96 plus, Germany) شرح ذیل انجام شد.

پروفیل حرارتی Preselective-PCR	S ^{۳۰}
۹۴ درجه سانتیگراد	۱ min
۵۶ درجه سانتیگراد	۱ min
۷۲ درجه سانتیگراد	۲۲ سیکل

Preselective-PCR تکثیر انتخابی (Selective-PCR) ۲-۲-۲-۶

محصول Preselective-PCR به نسبت ۱:۱۰ مجدداً رقیق گردید و به عنوان الگو در واکنش Selective-PCR استفاده گردید. از جفت ترکیب پرایمرهای Eco+3 و Mse+4 (جدول ۶ و ۸) در حضور dNTPMix، 10XPCRbuffer و Taq DNAPolymerase (CinnaGen) جهت تکثیر به شرح جدول ۷ استفاده گردید.

جدول ۶- توالی پرایمرهای EcoRI و MseI جهت تکثیر انتخابی

پرایمر	توالی
EcoRI+3	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C NNN-3'
MseI+4	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A NNN N-3'

جدول ۷- مخلوط واکنش تکثیر انتخابی (Selective-PCR)

مواد	غلظت استوک	حجم مورد استفاده در واکنش (μl)
Eco+3	pmol۱۰	۰/۴۵
Mse+3	pmol۱۰	۰/۴۵
dNTP	mM۱۰	۰/۶
Mgcl ₂	mM۵۰	۰/۶
10XPCRbuffer	X۱۰	۱/۵
Taq DNAPolymerase	۵۰۰	۰/۲
Dilluted Preamp	-	۵
ddH ₂ O	-	۶/۲۵
حجم نهایی		۱۵

جدول ۸- نوع و ترکیب پرایمرهای استفاده شده در DNA-AFLP در دو گونه تاسماهی ایرانی و فیل ماهی (شماره هایی که بصورت underline می باشند مورد استفاده قرار گرفتند).

	<u>E-AAT</u> 1	<u>E-AAG</u> 2	<u>E-ATC</u> 3	<u>E-ATA</u> 4	<u>E-ACG</u> 5	<u>E-AAA</u> 6	<u>E-ATTA</u> 7	<u>E-ATCG</u> 8	<u>E-AAC</u> 9	<u>E-ACC</u> 10	<u>E-ACA</u> 11
M-CACA 1	<u>۱</u>	<u>۲</u>	<u>۳</u>	<u>۴</u>	<u>۵</u>	<u>۶</u>	<u>۷</u>	<u>۸</u>	<u>۹</u>	<u>۱۰</u>	<u>۱۱</u>
M-CGAA 2	<u>۱۲</u>	<u>۱۳</u>	<u>۱۴</u>	<u>۱۵</u>	<u>۱۶</u>	<u>۱۷</u>	۱۸	۱۹	<u>۲۰</u>	<u>۲۱</u>	<u>۲۲</u>
M-CGAT 3	<u>۲۳</u>	<u>۲۴</u>	<u>۲۵</u>	<u>۲۶</u>	<u>۲۷</u>	<u>۲۸</u>	۲۹	۳۰	<u>۳۱</u>	<u>۳۲</u>	<u>۳۳</u>
M-CCTT 4	<u>۳۴</u>	<u>۳۵</u>	<u>۳۶</u>	<u>۳۷</u>	<u>۳۸</u>	<u>۳۹</u>	۴۰	۴۱	<u>۴۲</u>	<u>۴۳</u>	<u>۴۴</u>
M-CATA 5	<u>۴۵</u>	<u>۴۶</u>	<u>۴۷</u>	<u>۴۸</u>	<u>۴۹</u>	<u>۵۰</u>	۵۱	۵۲	<u>۵۳</u>	<u>۵۴</u>	<u>۵۵</u>
M-CATT 6	<u>۵۶</u>	<u>۵۷</u>	<u>۵۸</u>	<u>۵۹</u>	<u>۶۰</u>	<u>۶۱</u>	۶۲	۶۳	<u>۶۴</u>	<u>۶۵</u>	<u>۶۶</u>
M-CGTC 7	<u>۶۷</u>	<u>۶۸</u>	<u>۶۹</u>	<u>۷۰</u>	<u>۷۱</u>	<u>۷۲</u>	۷۳	۷۴	<u>۷۵</u>	<u>۷۶</u>	<u>۷۷</u>
M-CTGC 8	<u>۷۸</u>	<u>۷۹</u>	<u>۸۰</u>	<u>۸۱</u>	<u>۸۲</u>	<u>۸۳</u>	۸۴	۸۵	<u>۸۶</u>	<u>۸۷</u>	<u>۸۸</u>
M-CCGT 9	<u>۸۹</u>	<u>۹۰</u>	<u>۹۱</u>	<u>۹۲</u>	<u>۹۳</u>	<u>۹۴</u>	۹۵	۹۶	<u>۹۷</u>	<u>۹۸</u>	<u>۹۹</u>
M-CAAT 10	<u>۱۰۰</u>	<u>۱۰۱</u>	<u>۱۰۲</u>	<u>۱۰۳</u>	<u>۱۰۴</u>	<u>۱۰۵</u>	۱۰۶	۱۰۷	<u>۱۰۸</u>	<u>۱۰۹</u>	<u>۱۱۰</u>
M-CTTC 11	<u>۱۱۱</u>	<u>۱۱۲</u>	<u>۱۱۳</u>	<u>۱۱۴</u>	<u>۱۱۵</u>	<u>۱۱۶</u>	۱۱۷	۱۱۸	<u>۱۱۹</u>	<u>۱۲۰</u>	<u>۱۲۱</u>

شرایط PCR

شرایط PCR بسته به طبیعت دنباله پرایمرهای AFLP متفاوت است. واکنش های حرارتی با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (اپندورف مدل Mastercycle ep gradient,96 plus Germany) و پرایمرهای دارای ۳ و ۴ نوکلئوتید انتخابی به صورت Touchdown طبق شرایط ذیل انجام شد:

$^{\circ}\text{C}_{94}$	min ۲
$^{\circ}\text{C}_{94}$	sec ۳۰
$^{\circ}\text{C}_{72}$	min ۱
Cycle ۱۲	
$^{\circ}\text{C}_{94}$	sec ۳۰
$^{\circ}\text{C}_{56}$	sec ۳۰
$^{\circ}\text{C}_{72}$	min ۱
cycle ۲۳	

پرایمرهای AFLP از یک توالی مرکزی، یک توالی ویژه آنزیم (ENZ) و یک دنباله اختیاری (EXT) تشکیل شده اند که در جدول زیر برای پرایمرهای ECORI و MseI به ترتیب با سه و چهار نوکلئوتید اختیاری (نوکلئوتیدهای اختیاری بصورت NNN و NNNN) نشان داده شده است:

	CORE	ENZ	EXT
EcoRI	5- GACTGCGTACC	AATTC	NNN-3
MseI	5-GATGAGTCCTGAG	TAA	NNNN-3

پرایمرهای AFLP برای آنزیم های برشی نادر مانند پرایمرهای ECORI و برای آنزیم های برشی متداول مانند پرایمرهای MseI است، اما بخش های ویژه آنزیم آنها متناسب با آنزیم های مربوطه است

۲-۲-۲-۷- الکتروفورز و رنگ آمیزی

- الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید واسرشت شده

الکتروفورز با استفاده از دستگاه GT Sequi Gen 38 × 30 (ساخت شرکت BIO-RAD) انجام شد. محصولات تکثیر شده بر روی ژل دینیچر ۶ درصد ژل های سکانسر تجزیه و تحلیل گردیدند.

- آماده نمودن شیشه های الکتروفورز

نکته مهم: بمنظور جلوگیری از آلودگی شیشه پستی با محلول Bind Silane و شیشه بیرونی با محلول Sigma cote، جهت تیمار هر کدام از شیشه ها، دستکش ها تعویض گردیدند.

۱- ابتدا شیشه ها با الکل اتانول و کاغذ صافی بصورت عمودی در جهت بالا به پایین تمیز شدند. از تمیز و بدون پرز بودن شیشه ها اطمینان حاصل گردید.

۲- قبل از هر الکتروفورز، جهت جلوگیری از چسبیدن ژل، صفحه شیشه پستی ژل با ۶۰۰ میکرولیتر محلول Sigmacote در جهت عمودی تیمار گردید.

۳- بمنظور جلوگیری از آلودگی هر بار دستکش ها تعویض شدند.

۴- شیشه بیرونی بعد از تمیز شدن با اتانول، با محلول Bind Silane (شامل: ۹۵μl اتانول، ۳μl اسید استیک و ۲μl محلول 3-(Trimethoxysil)propyl methacrylate, minimum 98%, SIGMA, Germany یا Bind Silane که بلافاصله قبل از مصرف تهیه شد) تیمار گردید.

۵- در حالت افقی، اسپیسرها روی شیشه پستی (شیشه تانک) قرار گرفت و سپس شیشه بیرونی روی آن گذاشته شد.

۶- شیشه ها در حالت عمودی با گیره ها محکم روی پایه قرار داده شدند.

۷- قرار گرفتن شانه به راحتی بین شیشه های بسته شده آزمایش گردید.

۸- APS ۱۰٪ بصورت تازه تهیه گردید.

۹- محلولهای لازم جهت تهیه ژل در یک بشر ریخته شد. واکنش پلیمریزاسیون فقط زمانی رخ می دهد که هر

سه مواد در محلول همراه یکدیگر باشند. ابتدا TEMED و سپس APS اضافه شد. محلول ژل آکریل آمید

شامل ۴۲ گرم اوره، ۱۰ میلی لیتر XTBE، ۱۵ میلی لیتر آکریل آمید ۴۰٪ و آب تا حجم ۱۰۰ میلی لیتر بود.

برای حل شدن اوره از گرما استفاده گردید. حدود ۷۰ میلی لیتر از محلول تهیه شده ابتدا با کاغذ صافی watman فیلتر گردید و سپس به یک بشر ۱۰۰ میلی لیتری انتقال داده شد. مقدار ۵۰ میکرولیتر TEMED و ۵۰۰ میکرولیتر APS ۱۰٪ تازه تهیه شده به محلول اضافه شد.

۱۰- سپس محلول بلافاصله به داخل سرنگ کشیده شد. سرنگ بدون وقفه بمنظور جلوگیری از تشکیل حباب پر گردید. هوای اضافی سرنگ خالی شد و ژل با فشار معتدل تزریق گردید.

۱۱- شانه بر عکس (دندانه ها به سمت بالا) و به اندازه کافی در بین شیشه ها قرار داده شد.

۱۲- پس از پلیمریزه شدن ژل (دست کم یک ساعت بعد) و بعد از بسته شدن ژل، شیشه ها از پایه خارج گردید و محکم در داخل تانک پایین قرار گرفت.

۱۳- تانک پایین با بافر 1XTBE پر شد بطوریکه حداقل ۲/۵ سانتی متر از انتهای دستگاه در داخل آن قرار گرفت.

۱۴- تانک بالایی نیز با بافر 1XTBE پر شد و تا ۱/۵ سانتی متر بالاتر از شیشه کوتاهتر قرار گرفت.

۱۵- با استفاده از سرنگ حاوی بافر داخل چاهک بطور کامل تمیز گردید.

۱۶- دستگاه به مدت ۱ ساعت در ۸۵ W و تا رسیدن به دمای ۵۵ درجه سانتیگراد گرم گردید (مرحله Pre-Run).

۱۷- به اندازه حجم و یا نصف حجم محصول PCR به آن لودینگ بافر اضافه شد و تیوب های حاوی محصول PCR به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد دینیچر و سپس بلافاصله روی یخ قرار داده شدند.

۱۸- قبل از لود کردن ژل، مجدداً چاهکها با استفاده از سرنگ تمیز شدند و شانه از سمت دندانه ها روی ژل قرار گرفت.

۱۹- ۵ میکرولیتر از هر نمونه در داخل چاهک لود گردید.

۲۰- ژل در ۸۰-۹۰ W به مدت ۱۰ دقیقه الکتروفورز شد و سپس شانه از داخل ژل خارج گردید و به مدت ۲ ساعت در شرایط دمایی ۵۰ درجه سانتیگراد و ۷۵ W الکتروفورز شد. در این زمان محلولهای اول و دوم رنگ آمیزی نیز تهیه شدند.

۲۱- بعد از اتمام الکتروفورز، بافر از داخل تانک شیشه خارج شد و سپس ژل بصورت افقی قرار گرفت و گیره های طرفین آن خارج شدند. به آرامی و با فشار یکنواخت شیشه های ژل از هم جدا گردیدند. ژل به شیشه بیرونی چسبیده بود و شیشه کوتاه (شیشه تانک) شسته شد.

- رنگ آمیزی با نیترات نقره

رنگ آمیزی طی سه مرحله انجام و محلولهای رنگ آمیزی به شرح ذیل تهیه گردید:

۱- محلول تثبیت کننده (Fixative)

- اسید استیک ۵٪

- الکل اتانول ۱۰٪

- آب مقطر تا حجم ۱ لیتر

(این محلول تا ۱۰ بار قابل استفاده است)

۲- محلول رنگ آمیزی (Stainer)

- نیترات نقره ۱ گرم / لیتر

- آب مقطر تا حجم ۱ لیتر

(این محلول تا ۱۰ بار قابل استفاده است)

۳- محلول ظهور (Developer)

- سود (NaOH) ۱۵ گرم

- فرمالدئید ۴ میلی لیتر (درست قبل از استفاده اضافه شد)

- آب مقطر تا حجم ۱ لیتر

محلول های رنگ آمیزی یک تا دو ساعت قبل از رنگ آمیزی تهیه و در بطری های سرپوش دار در یخچال

نگهداری شدند. همچنین حدود ۲ لیتر آب مقطر در یخچال جهت استفاده در مراحل آبکشی قرار داده شد.

مراحل رنگ آمیزی:

۱- ژل در حالی که چسبیده به شیشه بود به مدت ۲۰ دقیقه در سینی رنگ آمیزی حاوی محلول فیکساتیو قرار و

به آرامی روی شیکر و در زیر هود آزمایشگاهی تکان داده شد.

۲- ژل به مدت ۲-۳ دقیقه در آب مقطر شستشو شد و سپس ۱۰ تا ۲۰ ثانیه بصورت عمودی به کابینت تکیه داده

شد تا خشک گردید.

۳- محلول رنگ آمیزی در داخل سینی ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر تکان داده شد.

۴- ژل به سینی حاوی آب مقطر منتقل و به مدت ۱ دقیقه با آب مقطر سرد شستشو گردید. محلول نیترات نقره جهت استفاده های بعدی در بطری تیره نگهداری شد. در این مرحله شستشوی طولانی با آب مقطر سبب رنگ آمیزی ضعیف می شود.

۵- محلول ظهور در سینی ریخته شد و سپس ژل در داخل آن قرار گرفت و تا زمان ظهور باندها سینی تکان داده شد.

۶- بعد از کامل شدن رنگ آمیزی، ژل به سینی آب مقطر منتقل گردید تا محلول های اضافی شسته شود. ژل ظهور یافته به حالت ایستاده خشک گردید. سپس ژل چسبیده به شیشه توسط دستگاه اسکنر مدل Cannon تصویر برداری و در کامپیوتر جهت آنالیزهای بعدی ثبت گردید.

۸-۲-۲-۲- محاسبات آماری

در ژل های ثبت شده، اطلاعات بدست آمده در افراد بصورت وجود و عدم وجود باند در هر لوکوس پلی مورفیک به ترتیب بصورت ۱ و ۰ ثبت گردید. سپس این اطلاعات بصورت جداگانه برای هر پرایمر در نرم افزار Excel جهت استفاده در نرم افزار NTSYS ثبت شد.

همچنین تعداد آلل های پلی مورف، تعداد آلل های مونومورف و تعداد کل آلل ها برای هر ترکیب پرایمر در دو گونه مورد مطالعه محاسبه گردید.

۳-۲- آزمایش های cDNA-AFLP

۱-۳-۲- استخراج RNA

به علت حساسیت فوق العاده زیاد کار با RNA و همچنین به دلیل وجود RNase بالا در محیط، ابتدا کلیه وسایل از جمله پنس، قیچی، میکروتیوبها، تیپ، رک ها و کلیه وسایل مربوطه با استفاده از تیمار آب مقطر حاوی DEPC (۱/۰٪) به مدت یک شب، عاری از RNase گردیدند. سپس بمنظور از بین رفتن DEPC باقی مانده، وسایل اتوکلاو شدند و بعد مورد استفاده قرار گرفتند. از آنجاییکه RNA نسبت به شرایط محیطی بسیار حساس می باشد مراحل نمونه برداری، نگهداری بافت و شرایط آزمایشگاهی در شرایط عاری از RNase انجام پذیرفت.

ابتدا استخراج RNA با استفاده از کیت High Pure RNA Isolation (Roche) و دستورالعمل پیشنهادی انجام گردید. متأسفانه در اکثر موارد RNA تخلیص شده تخریب گردید. بمنظور جلوگیری از تخریب RNA تخلیص شده طی هماهنگی های به عمل آمده با محققین خارج از کشور، استفاده از TRIZOL و پیروی از دستورالعمل های لازم در دستور کار قرار گرفت.

- استخراج RNA با استفاده از TRIZOL

جهت استخراج RNA از محلول Trizol Reagent (Invitrogen) و دستورالعمل پیشنهادی کیت برای ۷ نمونه گناد ماده و ۷ نمونه گناد نر تاسماهی ایرانی بصورت جداگانه به شرح ذیل استفاده گردید.

۱- هموژن کردن

۵۰ تا ۱۰۰ میلی گرم از نمونه های بافتی (گناد نر و ماده تاسماهی ایرانی) در ۱ میلی لیتر از محلول TRIZOL هموژن گردید.

۲- جداسازی فازها

بمنظور جداسازی کامل نوکلئوپروتئین ها، نمونه های هموژن شده به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۵ تا ۳۰ درجه سانتیگراد انکوباسیون گردید. به ازای هر میلی لیتر از محلول TRIZOL، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه گردید و بمدت ۱۵ ثانیه با دست بطور محکم تکان داده شد. سپس نمونه ها بترتیب ۲ تا ۳ دقیقه در دمای اتاق و بمدت ۱۵ دقیقه در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه انکوباسیون و سانتریفوژ شدند. بعد از سانتریفوژ، سه فاز پایینی، میانی و شفاف مشاهده گردید. فاز بالایی شفاف که حاوی RNA (حدود ۶۰٪ حجم اولیه TRIZOL) بود به میکروتیوب جدید منتقل شد.

۳- رسوب RNA

۵۰۰ میکرولیتر الکل ایزوپروپانول به فاز بالایی اضافه و بمدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۰-۱۵ درجه سانتی گراد انکوباسیون و بمدت ۱۰ دقیقه در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد و ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. رسوب RNA اغلب قبل از سانتریفوژ بصورت یک پلت ژله ای در کف و دیواره تیوب قابل مشاهده بود.

۴- شستشوی RNA

محللول رویی تخلیه و پلت RNA با ۱ ml اتانول ۷۵ درجه شستشو و سپس بمدت ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد.

۵- خشک کردن پلت

جهت جلوگیری از خشک شدن زیاد پلت RNA، پس از مدت ۵ الی ۱۰ دقیقه ۵۰ میکرولیتر آب RNase-free اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۵ تا ۶۰ درجه سانتی گراد انکوباسیون گردید تا حل شود و سپس در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

۲-۳-۲- تیمار DNaseI

بمنظور اطمینان از عدم وجود DNA در واکنش های ساخت cDNA از روی Total RNA

از تیمار DNaseI (Fermentas) بشرح ذیل استفاده گردید.

۱- مواد زیر به یک تیوب RNase-free اضافه گردید:

RNA	1µg
10X reaction buffer with MgCl ₂	1µl
DEPC-treated water	To 9 µl
DNaseI	1µl

۲- انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد

۳- اضافه نمودن ۱ میکرولیتر EDTA، ۲۵ mM و انکوباسیون در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد بمدت ۱۰ دقیقه

۴- استفاده از RNA آماده بعنوان الگو در واکنشهای (Reverse Transcriptase - PCR)

RT-PCR

۳-۳-۲- ساخت cDNA دو رشته ای

بعد از استفاده از تیمار DNaseI، مراحل ساخت cDNA دو رشته ای از RNA بشرح ذیل انجام گرفت:

۱- ساخت رشته اول (First strand cDNA)

رشته اول cDNA با استفاده از آنزیم M-MULV transcriptase (Roche) و پرایمرهای Oligo-dt و Random Hexamer

در حضور RNase Inhibitor جهت تکثیر mRNA های جنسی در بافت های تولید مثلی بشرح ذیل ساخته شد

مواد	حجم (μl)	غلظت نهایی
Total RNA	X	μg ۱-۲۰
mRNA	X	μg ۰/۳-۲
Oligo (dt) ₁₅	۲	pmol ۲۰۰
Redistiled water	X	
حجم کلی	۲۱	

تمام مواد ذوب و روی یخ قرار داده شدند. بعد از مخلوط نمودن مواد فوق، تیوب ها در حمام آبی ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوباسیون و بلافاصله روی یخ قرار گرفتند. در ادامه مواد زیر اضافه و به آرامی مخلوط و به مدت ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتیگراد انکوباسیون گردید. پس از انکوباسیون مخلوط روی یخ قرار داد شد تا واکنش خاتمه یابد. بلافاصله پس از خاتمه واکنش رشته اول، واکنش رشته دوم آغاز گردید.

مواد	حجم (μl)	غلظت نهایی
RT-buffer, 5X	۸	X۱
DTT	۴	mM ۱۰
AMV, 25U/ μl	۲	U ۵۰
RNase Inhibitor	۱	U ۴۰
dNTP-MIX	۴	mM each ۱

۲- سنتز رشته دوم (Second Strand cDNA)

- ۱- مواد لازم بعد از ذوب روی یخ قرار داده شدند
- ۲- مواد زیر به تیوب های واکنش رشته اول روی یخ اضافه و مخلوط گردید

مواد	حجم (µl)
cDNA from RT-Reaction	۴۰
2 nd strand synthesis buffer	۳۰
dNTP Mix	۱/۵
2 nd strand enzyme blend	۶/۵
Redistilled water	۷۲

- ۳- مخلوط به مدت ۲ ساعت و در دمای ۱۶ درجه سانتیگراد انکوباسیون گردید.
- ۴- مقدار ۲۰ میکرولیتر از T₄ DNA Polymerase به مخلوط فوق اضافه و ۵ دقیقه در دمای ۱۶ درجه سانتیگراد انکوباسیون گردید.
- ۵- واکنش با اضافه کردن ۱۷ میکرولیتر از EDTA, 0.2 M, pH8 خاتمه یافت.
- ۶- حذف RNA موجود در واکنش
زمانیکه از total RNA بعنوان ماده اولیه استفاده می شود، هضم RNA ضروری است. ۱/۵ میکرولیتر از RNaseI به تیوب واکنش اضافه گردید.
- ۷- حذف آنزیم RNaseI
۵ میکرولیتر ProteinaseK به واکنش اضافه و ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوباسیون گردید.
- ۸- استفاده از فنل - کلروفرم بمنظور تخلیص cDNA دو رشته ای طبق پروتکل مربوطه.
- ۹- حل کردن cDNA دو رشته ای در آب مقطر جهت انجام مراحل روش AFLP

۴-۳-۲- آزمایش های cDNA-AFLP

بعد از تهیه cDNA دو رشته ای، مراحل برش آنزیمی با آنزیم های MseI و ECORI، الحاق آداپتورهای مربوطه، PCR دو مرحله ای، سپس الکتروفورز و رنگ آمیزی مطابق روشهای ذکر شده در DNA-AFLP انجام گرفت. برای PCR از ۶۳ جفت ترکیب پرایمرهای AFLP استفاده گردید.

۵-۳-۲- ثبت اطلاعات و مشخص نمودن مارکرهای بدست آمده در افراد نر و ماده

تکنیک cDNA-AFLP با استفاده از ۱۰۰ جفت ترکیب پرایمرهای AFLP با استفاده از cDNA دو رشته ای انجام گرفت. ابتدا روی cDNA ۳ عدد تاسماهی ایرانی نر و ۳ عدد ماده، تکنیک AFLP انجام گردید و سپس PCR با استفاده از ۳۰ جفت از پرایمرهای AFLP انجام شد.

۶-۳-۲- تخلیص باندهای مارکر

با توجه به اینکه باند یافت شده در سطح cDNA است و هدف یافتن مارکر تعیین کننده جنسیت در سطح DNA بمنظور سهولت استفاده می باشد، بدین منظور ابتدا باند اختصاصی از روی ژل پلی اکریل آمید بشرح ذیل تخلیص گردد.

۱- شناسایی باند مورد نظر و جدا کردن آن با استفاده از تیغ جراحی

۲- انتقال باند به یک تیوب استریل و اضافه نمودن ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل و یا بافر TE

۳- قرار دادن در حمام آبی ۶۵ درجه سانتیگراد بمدت ۱۰ دقیقه و سپس قرار دادن در یخچال به مدت حداقل

۴ ساعت یا یک شب

۴- انجام PCR با استفاده از مقدار ۵ میکرولیتر DNA جدا شده از روی ژل

۵- اپتیمم نمودن شرایط PCR بمنظور خالص سازی و تک باند نمودن قطعه جدا شده

شرایط PCR با استفاده از پرایمرهای AFLP

مواد	حجم (μl)
Primer E+3	۱/۲
Primer M+4	۱/۲
10XPCRbuffer(CinnaGen)	۱/۵
Taq DNAPolymerase(CinnaGen)	۰/۳
Mgcl ₂ (CinnaGen)	۰/۶
ddH ₂ O	۶/۶
حجم نهایی	۱۵

در ادامه محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز گردید و سپس با استفاده از کیت تخلیص DNA از روی ژل آگارز (Fermentas, France)، خالص گردید. غلظت cDNA تخلیص شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Nanodrop مورد سنجش قرار گرفت و غلظت مناسب جهت اجرای مرحله کلونینگ تهیه گردید.

۷-۳-۲- کلونینگ و مراحل آن

با توجه به کوچک بودن اندازه قطعات (حدود ۱۵۰ و ۲۰۰ جفت باز)، جهت سکانس آنها نیاز به کلونینگ می‌باشد تا طول قطعه بطور کامل بدست آید.

بعد از تهیه قطعه مناسب اجرای مرحله کلونینگ به شرح ذیل انجام گردید:

۱- مرحله A-addition

این مرحله با استفاده از کیت A-addition (Qia-gen) و دستورالعمل پیشنهادی کیت و همچنین غلظت مناسب قطعه خالص شده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه انجام گردید. هدف از انجام اینکار بالا بردن کیفیت نتایج کلونینگ بود. مراحل کار به شرح ذیل بود:

- ۱- گرم کردن بلوک PCR تا ۳۷ درجه سانتیگراد قبل از شروع کار
- ۲- ذوب و ورتکس کردن مواد و قرار دادن آنها روی یخ
- ۳- مخلوط واکنش چندبار پیپت، سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوباسیون و بلافاصله روی یخ قرار داده شد.

مواد	حجم واکنش (μl)
محصول PCR تخلیص شده (۲۰ng/ μl)	۵
5X QIAgen A-addition Master Mix	۲
Distilled Water	۳
حجم نهایی	۱۰

۲- مرحله Ligation

این مرحله با استفاده از کیت pDrive Cloning Kit (Qia-gen) و دستورالعمل پیشنهادی کیت انجام گردید. جهت انجام این مرحله قطعه آماده شده (insert) به همراه وکتور pDrive در حضور آنزیم Ligation به مدت ۹۰ تا ۱۲۰ دقیقه در دمای ۱۲ درجه سانتیگراد انکوباسیون گردیدند. تمام مراحل دو مرحله فوق روی یخ و در زیر هود لامینار و در شرایط کاملاً استریل و عاری از DNase بشرح ذیل انجام گرفت.

مواد	حجم واکنش (μl)
pDrive Cloning Vector (50ng/μl)	1
PCR Product (A-Addition Product)	3
Distilled water	1
Ligation Master Mix, 2X	5
حجم نهایی	10

محصول فوق بلافاصله بعد از طی مراحل انکوباسیون در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

۳- تهیه محیط های کشت

محیط کشت LB مایع، همراه و بدون آنتی بیوتیک و LB آگار به همراه آنتی بیوتیک مناسب و X-gal و IPTG آماده گردید.

۴- تهیه باکتری Ecoli, competent

با استفاده از پروتکل (Sambrook 2004) بشرح ذیل آماده گردید:

۴-۱- به ۱۰۰ ml از محیط LB مایع، ۱ ml از محیط مایع کشت شبانه باکتری مورد نظر اضافه و در دمای 37°C در حالت شیکر انکوباسیون شد تا به $\text{OD}_{600}=0.5$ برسد (بدلیل موجود نبودن شیکر انکوباتور در انستیتو، مراحل کار در انکوباسیون معمولی انجام گرفت).

۴-۲- قرار دادن سلولها روی یخ بمدت ۱۵ دقیقه و سپس سانتریفوژ آنها در $2000-3000$ rpm بمدت ۱۰ دقیقه در دمای 4°C سانتریگراد.

۴-۳- حل نمودن پلت ها در ۲۵ ml محلول $\text{CaCl}_2, 0.1\text{M}$ سرد و قرار دادن روی یخ بمدت ۳۰ دقیقه و سپس سانتریفوژ آن مانند مرحله قبل

۴-۴- حل نمودن پلت در $1/4$ حجم از $\text{CaCl}_2, 0.1\text{M}$ و قرار دادن آن روی یخ بمدت ۱ شب

۵- مرحله Transformation

۵-۱- اضافه نمودن ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولهای competent به تیوب های $1/5$ سی سی استریل روی یخ و سپس اضافه نمودن ۵۰ نانوگرم پلاسمید نوترکیب

۵-۲- قرار دادن تیوب ها در بن ماری شیکر دار 42°C درجه سانتریگراد به مدت ۹۰ ثانیه

۵-۳- انتقال بلافاصله آنها روی یخ و بمدت ۲-۱ دقیقه

۵-۴- افزودن ۱۰۰۰ میکرولیتر محیط LB مایع به هر تیوب و قرار دادن آنها در بن ماری 37°C درجه سانتریگراد بمدت ۱ ساعت

۵-۵- کشت حجم مناسبی از سلولهای ترانسفورم شده روی محیط کشت LB آگار حاوی آنتی بیوتیک مناسب

۵-۶- انکوباسیون پلیت ها در دمای 37°C درجه سانتریگراد بمدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت تا پدیدار شدن کلونی های سفید و آبی. بعد از ظاهر شدن کلونی ها، پلیت ها به مدت چند ساعت در دمای 4°C درجه سانتریگراد یخچال قرار

داده شد تا کلونی های آبی، پررنگ تر و قابل تشخیص گردند.

۸-۳-۲- استخراج پلاسمید

بعد از طی پروسه کلونینگ تعدادی از کلونی های سفید که بیانگر وجود پلاسمید نوترکیب بودند، روی پلیت از سمت پشت شماره گذاری شدند و با استفاده از پرایمرهای مناسب و کتور (M13R و M13F)، واکنش Clony

PCR انجام گردید، در صورت مثبت بودن نتیجه، کلونی های مربوطه بصورت مجزا روی یک پلیت LB آگار حاوی آنتی بیوتیک بصورت جداگانه کشت داده شدند. پس از کشت آگار، یک کشت مجدد مایع به همراه آنتی بیوتیک مناسب تهیه گردید و بمدت یک شب در انکوباسیون ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت و با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (miniprep-Qiagen)، پلاسمید نوترکیب استخراج گردید.

۹-۳-۲- تعیین توالی پلاسمیدهای نوترکیب

قبل از اقدام جهت تعیین سکانس نمونه ها، بمنظور اطمینان از نوترکیب بودن پلاسمیدهای مورد نظر، بار دیگر PCR با استفاده از پرایمرهای وکتور (M13F, M13R) و پلاسمید انجام شد. تعیین توالی در مورد ۵ نمونه قطعه اول پلاسمید حاوی (F1) و ۳ نمونه پلاسمید حاوی قطعه دوم (F2) (توسط شرکت فزایژوه - تهران) انجام شد.

۱۰-۳-۲- طراحی پرایمر

طراحی پرایمر بر اساس توالی قطعه سکانس شده و با استفاده از نرم افزار طراحی پرایمر oligo5 جهت آزمایش در سطح DNA ژنومی افراد نر و ماده تاسماهی ایرانی انجام شد.

۲-۳-۱۱- تأیید مارکرهای جنسی در cDNA و DNA ژنومی نمونه های نر و ماده A.persicus

بمنظور تایید قطعات سکانس شده، پرایمرهای اختصاصی توسط نرم افزار Oligo5 طراحی شد. آزمایش های تکثیر نسخه برداری معکوس (RT-PCR) روی cDNA گناد نمونه های نر و ماده تاسماهی ایرانی انجام شد. پرایمرهای RT-PCR، شرایط چرخه های حرارتی PCR و واکنش به شرح ذیل بود (جدول ۹). واسرشته شدن اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه، سپس ۲۵ سیکل شامل ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد، ۱ دقیقه در ۵۶ درجه سانتیگراد و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد و بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد.

PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰۰ نانوگرم از cDNA الگو، ۰/۱ mM از هر کدام از پرایمرها، ۰/۲ mM از dNTPs، 1XPCRbuffer، ۱/۵ mM از $MgCl_2$ و ۱ U از آنزیم Taq DNA polymerase (CinnaGen, Iran) انجام شد.

محصولات PCR توسط اکتروفورز ژل آگارز ۱/۵٪ و مارکر مولکولی اندازه ۱۰۰ جفت باز (Ladder 100bp) (Fermentas, France) بررسی شدند.

جدول ۹- توالی پرایمرهای RT-PCR، چرخه های حرارتی و شرایط PCR دو مارکر جنسی

مارکرها	توالی پرایمرها (۵'-۳')	Mgcl ₂ (mM)	T _m (°C)	اندازه محصول PCR(bp)
TDF1	F: TGACTG CGT ACC AAT TCA TAC CTA C R: TGA GTC CTG AGA TAA CAC AAA ATG C	۱/۵	۶۸	۱۰۵
TDF2	F: TGA GTC CTG AGT AAC GAA GCA R: CTG CGT ACC AAT TCA TAC TCC	۱/۵	۶۵	۲۰۷

چرخه های حرارتی دستگاه PCR

°C۹۴	min۳
	۱ سیکل
°C۹۴	sec۳۰
°C۵۶	min۱
°C۷۲	min۱
	۲۵ سیکل
°C۷۲	min۵
	۱ سیکل

شرایط PCR

Template cDNA	ng۱۰۰
Primers	mM۰/۱
dNTP(10mM)	mM۰/۲
10XPCR Buffer	X۱
Mgcl ₂ (50 mM)	mM۲
Taq DNA Polymerase	U۱
حجم کلی	μl۲۵

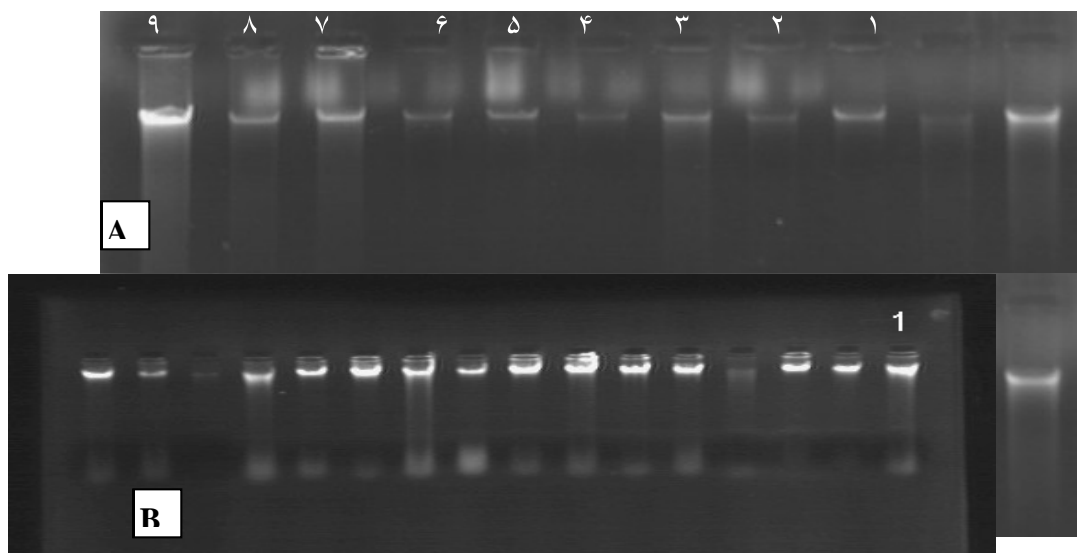
همچنین همه مارکرها (دو مارکر به دست آمده) روی DNA ژنومی ۱۰ نمونه نر و ۱۰ نمونه ماده تاسماهی ایرانی (A. persicus) آزمایش شدند. پرایمرهای PCR و شرایط آنها مشابه آنالیز cDNA در تاسماهی ایرانی بود.

۳- نتایج

۳-۱- نتایج DNA-AFLP

۳-۱-۱- استخراج DNA

در تکنیک AFLP کیفیت و خلوص DNA های استخراج شده دارای اهمیت خاص است و این در مورد آلودگی DNA به پروتئین و RNA باید به حداقل ممکن برسد و DNA های استخراج شده باید دارای کیفیت لازم برای هضم باشند، چون این مرحله جهت تولید الگوهای باندهی AFLP با کیفیت خوب حساس می باشد و وجود ناخالصی ها اغلب در هضم و برش آنزیمی اختلال ایجاد می کند. در شکل ۳ الکتروفورز DNA نمونه های نر و ماده تاسماهی ایرانی و فیل ماهی را روی ژل آگارز ۱٪ ارائه شده است. مطابق شکل آلودگی به RNA و پروتئین مشاهده نمی گردد و DNA ها از کیفیت مناسب برای انجام تکنیک AFLP برخوردارند.

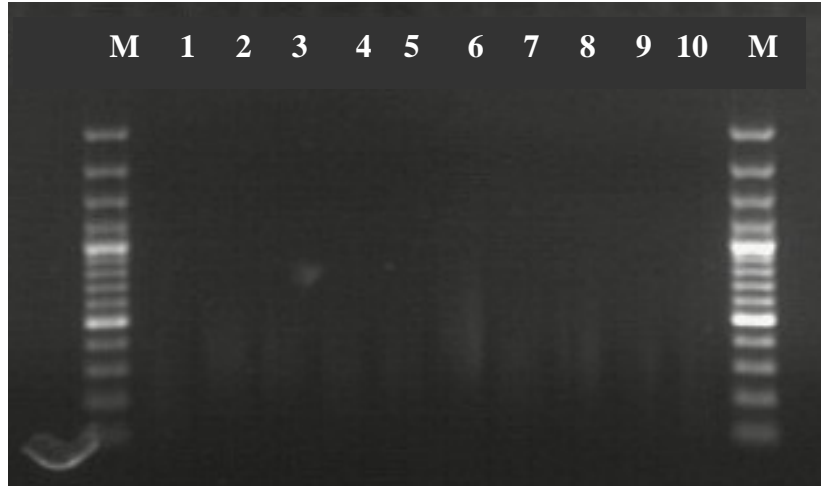


شکل ۳- تصویر الکتروفورز DNA روی ژل آگارز ۱٪ و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید (A: تاسماهی ایرانی و B: فیل ماهی)

۳-۱-۲- هضم آنزیمی و الحاق

هضم آنزیمی با استفاده از دو آنزیم EcoRI و MseI انجام شد و محصولات هضم شده روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند (شکل ۴). نتایج هضم آنزیمی بصورت اسمیر روی ژل آگارز مشاهده گردید که نشان داد

هضم آنزیمی به درستی انجام شده است. همچنین الکتروفورز نتایج الحاق حالت اسمیر را نشان داد که این امر به دلیل وجود تعداد زیاد باندها می باشد و صحت انجام واکنش هضم - الحاق را تاکید نمود.



شکل ۴- تصویر الکتروفورز محصول واکنش برش- الحاق روی ژل آگارز ۱٪ و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید (ستونهای ۱ تا ۱۰ محصول برش-الحاق روی DNA ژنومی تاسماهی ایرانی ماده و M مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت باز)

۳-۱-۳- واکنش های تکثیر

در تکثیر اولیه از پرایمرهایی که منطبق با توالی آدپتور و دارای یک نوکلئوتید اضافی هستند استفاده شد. در این پژوهش از نوکلئوتید A روی پرایمر EcoRI (EcoRI+A) و نوکلئوتید C برای پرایمر MseI (MseI+C) استفاده گردید. نتایج تکثیر اولیه نیز وجود حالت اسمیر در الکتروفورز ژل آگارز و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید نشان داد که بیانگر انجام PCR، تعداد زیاد باندها و تکثیر غیر اختصاصی است. تکثیر انتخابی با استفاده از پرایمرهای Eco+3 و Mse+4 انجام گردید. الگوی باندهای حاصل از PCR تنوع زیادی را بین افراد نشان داد و تعداد زیادی باند در فاصله بین ۵۰ تا ۶۰۰ جفت باز تولید شدند که هیچکدام از آنها در هر دو گونه وابسته به جنس نبودند. تعداد کل باندها و تعداد باندهای پلی مورفیک در دو گونه مورد بررسی به شرح جداول ۱۰ و ۱۱ می باشد.

نتایج حاصل از مشاهده و شمارش الگوهای باندهای AFLP نشان داد که از مجموع ۳۷۷۱ باند شمارش شده در تاسماهی ایرانی فقط تعداد ۱۱۳۲ باند پلی مورف بودند و در فیل ماهی از تعداد ۳۷۷۹ باند شمارش شده، تعداد ۱۰۹۱ باند پلی مورف شمارش گردید که هیچکدام از باندها مختص جنسیت نبودند.

جدول ۱۰- تعداد باندها و باندهای پلی مورف تولید شده
توسط هر ترکیب پرایمر AFLP در تاسماهی ایرانی

شماره ترکیب پرایمر	تعداد باند	تعداد پلی مورف	شماره ترکیب پرایمر	تعداد باند	تعداد پلی مورف
۱	۴۷	۷	۳۰	-	-
۲	۵۸	۱۷	۳۱	۳۹	۱۹
۳	۴۰	۱۲	۳۲	۴۶	۲۳
۴	۴۸	۱۷	۳۳	۱۷	۱۵
۵	۱۸	۶	۳۴	۳۸	۲۹
۶	۲۷	۱۲	۳۵	۴۲	۳۰
۷	-	-	۳۶	۳۸	۱۱
۸	-	-	۳۷	۲۸	۶
۹	۵۲	۱۵	۳۸	۵۶	۱۹
۱۰	۱۸	۱۰	۳۹	۵۰	۱۶
۱۱	۱۶	۴	۴۰	-	-
۱۲	۱۹	۷	۴۱	-	-
۱۳	۳۳	۲۵	۴۲	۳۵	۱۵
۱۴	۲۹	۱۴	۴۳	۳۹	۱۳
۱۵	۱۶	۸	۴۴	۲۲	۸
۱۶	۲۳	۶	۴۵	۳۰	۸
۱۷	۴۶	۵	۴۶	۵۵	۱۸
۱۸	-	-	۴۷	۴۶	۱۳
۱۹	-	-	۴۸	۲۷	۱۲
۲۰	۵۲	۱۲	۴۹	۴۹	۱۷
۲۱	۳۸	۱۸	۵۰	۱۹	۲
۲۲	۳۲	۲۳	۵۱	-	-
۲۳	۱۸	۱۰	۵۲	-	-
۲۴	۲۳	۹	۵۳	۴۷	۱۲
۲۵	۳۸	۱۸	۵۴	۳۸	۱۳
۲۶	۴۸	۲	۵۵	۳۰	۱
۲۷	۴۳	۲۲	۵۶	۴۲	۲
۲۸	۳۴	۱۷	۵۷	۴۳	۱۱
۲۹	-	-	۵۸	۳۴	۱۵

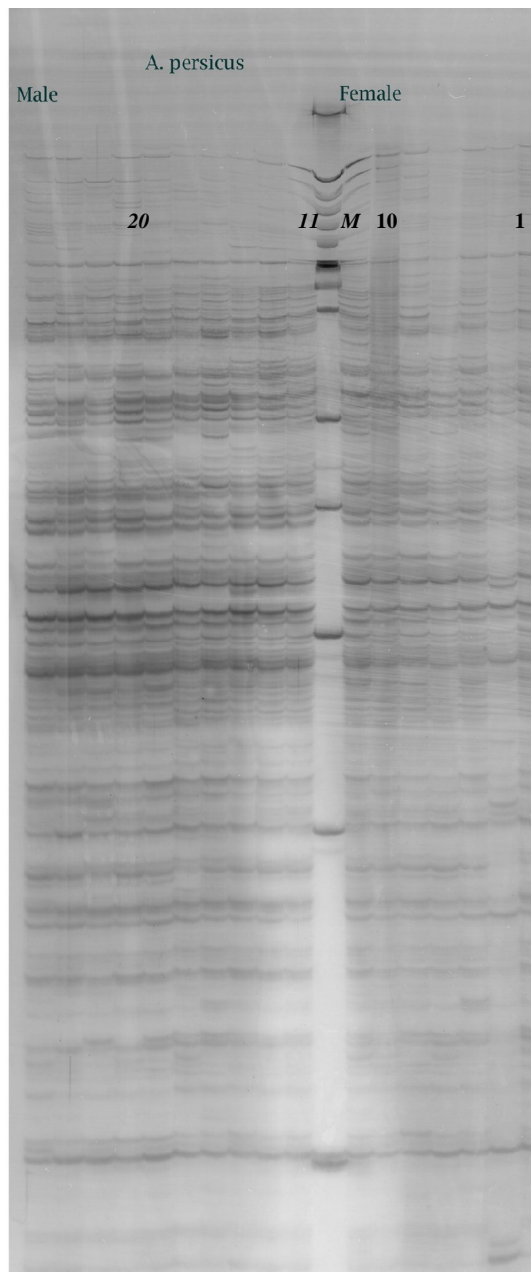
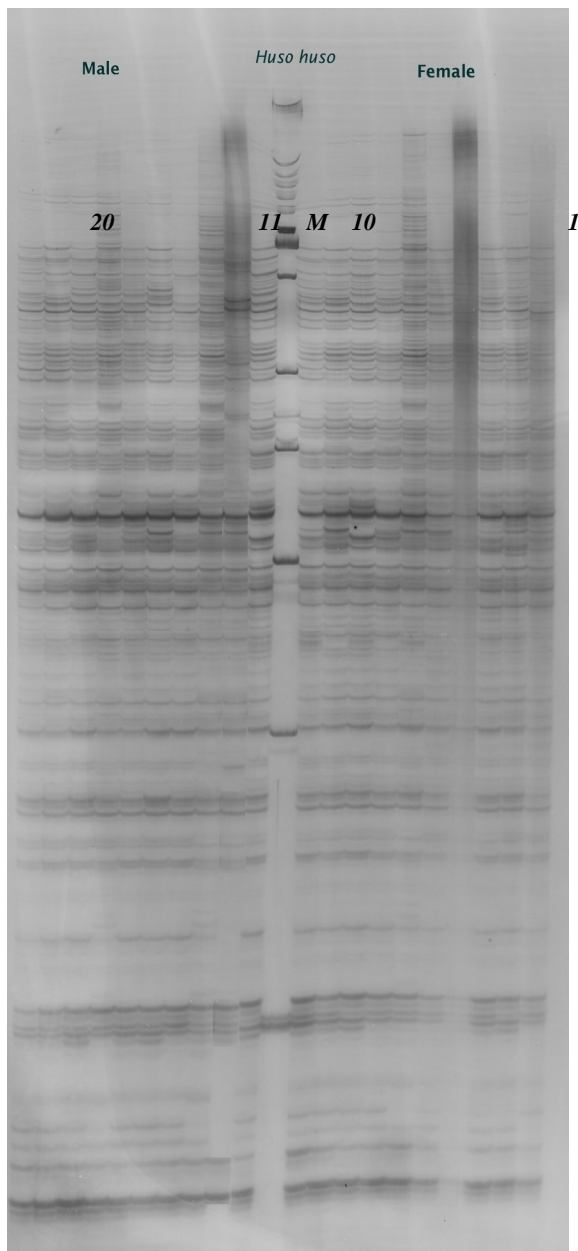
ادامه جدول ۱۰

شماره ترکیب پرایمر	تعداد باند	تعداد پلی مورف	شماره ترکیب پرایمر	تعداد باند	تعداد پلی مورف
۵۹	۴۰	۳۲	۹۲	۵۱	۶
۶۰	۲۲	۹	۹۳	۲۵	۶
۶۱	۳۷	۲۸	۹۴	۶۰	۳
۶۲	-	-	۹۵	۲۵	۵
۶۳	-	-	۹۶	-	-
۶۴	۲۴	۲	۹۷	۷۱	۷
۶۵	۴۰	۷	۹۸	۵۶	۱۹
۶۶	۲۸	۳	۹۹	۳۵	۱۲
۶۷	۲۶	۷	۱۰۰	۴۰	۱۵
۶۸	۵۳	۵	۱۰۱	۵۵	۵
۶۹	۳۵	۱۰	۱۰۲	۴۵	۱۶
۷۰	۲۰	۲	۱۰۳	۵۳	۷
۷۱	۲۸	۶	۱۰۴	۳۲	۱۲
۷۲	۶۰	۱۲	۱۰۵	۲۸	۱۰
۷۳	-	-	۱۰۶	-	-
۷۴	-	-	۱۰۷	-	-
۷۵	۴۷	۷	۱۰۸	۴۶	۸
۷۶	۵۰	۱۶	۱۰۹	۴۲	۲۰
۷۷	۴۸	۱۲	۱۱۰	۵۲	۱۸
۷۸	۳۹	۸	۱۱۱	۳۸	۱۳
۷۹	۳۹	۱۲	۱۱۲	۲۶	۸
۸۰	۴۲	۷	۱۱۳	۴۳	۱۰
۸۱	۳۴	۵	۱۱۴	۴۸	۱۰
۸۲	۴۵	۱۰	۱۱۵	۳۲	۱۳
۸۳	۳۲	۴	۱۱۶	۲۵	۱۰
۸۴	-	-	۱۱۷	-	-
۸۵	-	-	۱۱۸	--	-
۸۶	۲۶	۷	۱۱۹	۲۳	۳
۸۷	۴۰	۱۱	۱۲۰	۳۰	۶
۸۸	۳۶	۹	۱۲۱	۴۰	۱۹
۸۹	۵۶	۶			
۹۰	۴۳	۴			
۹۱	۳۴	۶			

جدول ۱۱- تعداد باندها و باندهای پلی مورف تولید شده
توسط هر ترکیب پرایمر AFLP در فیل ماهی

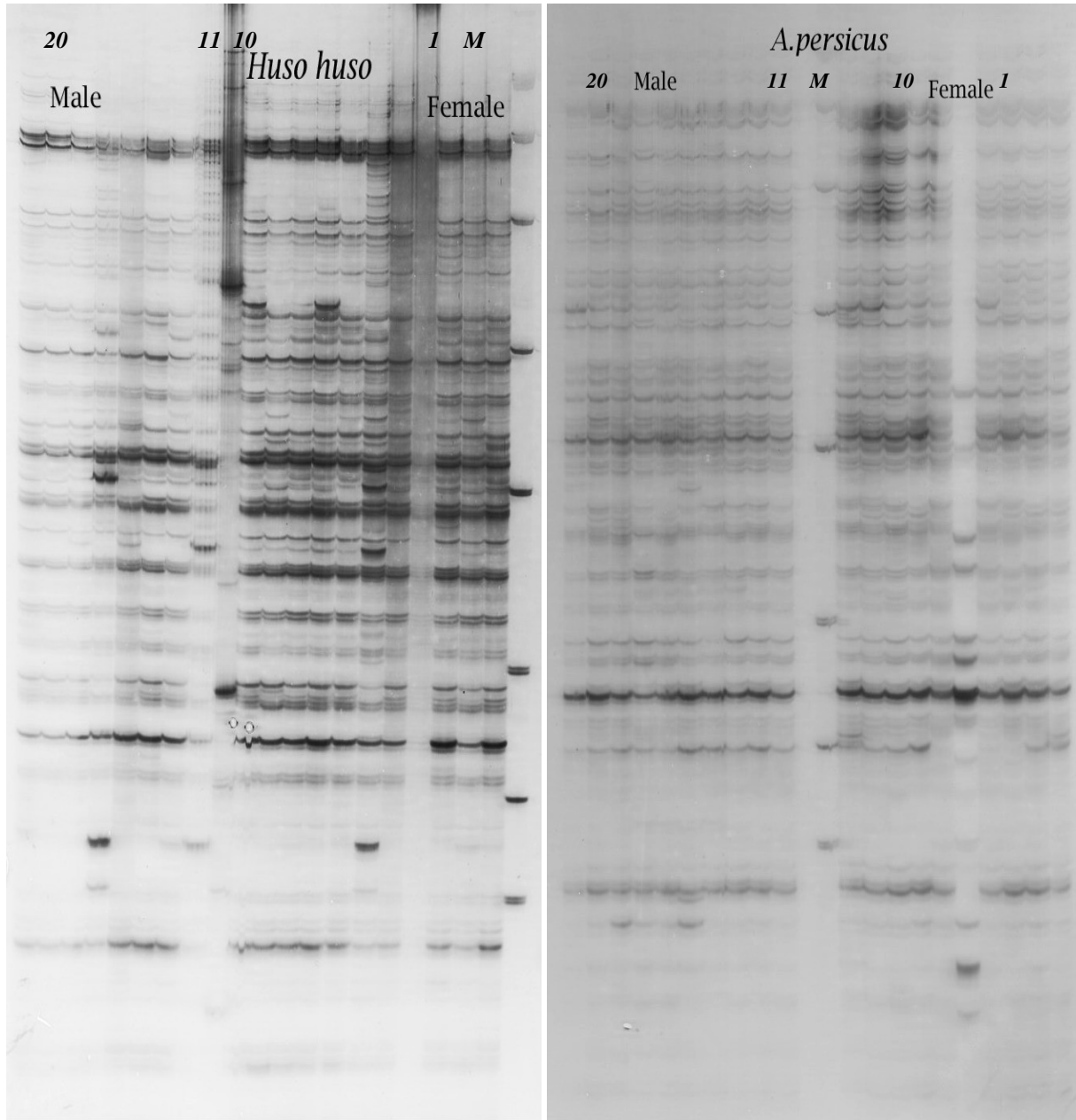
شماره ترکیب پرایمر	تعداد باند	تعداد پلی مورف	شماره ترکیب پرایمر	تعداد باند	تعداد پلی مورف
۱	۴۰	۶	۳۰	-	-
۲	۳۳	۵	۳۱	۳۹	۱۹
۳	۶۴	۱۴	۳۲	۴۶	۲۳
۴	۳۹	۳	۳۳	۱۷	۱۵
۵	۴۵	۹	۳۴	۳۸	۲۹
۶	۳۶	۸	۳۵	۴۲	۳۰
۷	-	-	۳۶	۳۸	۱۱
۸	-	-	۳۷	۲۸	۶
۹	۲۵	۸	۳۸	۵۶	۱۹
۱۰	۱۲	۵	۳۹	۵۰	۱۶
۱۱	۲۶	۶	۴۰	-	-
۱۲	۳۰	۴	۴۱	-	-
۱۳	۳۶	۱۰	۴۲	۴۰	۹
۱۴	۳۳	۵	۴۳	۳۹	۱۳
۱۵	۲۸	۴	۴۴	۲۰	۱۰
۱۶	۲۴	۶	۴۵	۳۰	۸
۱۷	۱۹	۵	۴۶	۵۵	۱۸
۱۸	-	-	۴۷	۴۶	۱۳
۱۹	-	-	۴۸	۲۷	۱۲
۲۰	۵۳	۹	۴۹	۴۹	۱۷
۲۱	۳۵	۲۲	۵۰	۱۹	۲
۲۲	۳۶	۱۷	۵۱	-	-
۲۳	۱۶	۸	۵۲	-	-
۲۴	۳۳	۱۲	۵۳	۴۴	۱۳
۲۵	۴۹	۱۷	۵۴	۲۶	۱۴
۲۶	۵۰	۲۲	۵۵	۲۵	۲
۲۷	۲۳	۹	۵۶	۳۸	۵
۲۸	۳۴	۱۷	۵۷	۳۰	۶
۲۹	-	-	۵۸	۴۶	۱۱

شماره ترکیب پرایمر	تعداد باند	تعداد پلی مورف	شماره ترکیب پرایمر	تعداد باند	تعداد پلی مورف
۵۹	۲۹	۶	۹۲	۵۲	۷
۶۰	۲۰	۸	۹۳	۱۱	۵
۶۱	۱۸	۴	۹۴	۴۵	۷
۶۲	-	-	۹۵	۱۴	۳
۶۳	-	-	۹۶	۱۷	۹
۶۴	۲۳	۶	۹۷	۷۳	۱۴
۶۵	۴۲	۸	۹۸	۴۲	۹
۶۶	۲۹	۵	۹۹	۳۴	۴
۶۷	۲۷	۹	۱۰۰	۳۸	۱۳
۶۸	۴۲	۹	۱۰۱	۴۵	۱۲
۶۹	۲۹	۱۰	۱۰۲	۵۰	۸
۷۰	۲۳	۵	۱۰۳	۴۷	۱۳
۷۱	۲۱	۸	۱۰۴	۴۲	۸
۷۲	۵۸	۸	۱۰۵	۳۹	۷
۷۳	-	-	۱۰۶	۲۴	۶
۷۴	-	-	۱۰۷	۴۸	۱۲
۷۵	۴۸	۷	۱۰۸	۴۰	۸
۷۶	۴۶	۱۶	۱۰۹	۴۳	۱۱
۷۷	۴۰	۱۹	۱۱۰	۳۲	۱۴
۷۸	۲۳	۶	۱۱۱	۳۷	۱۶
۷۹	۳۶	۲۰	۱۱۲	۳۰	۴
۸۰	۳۱	۶	۱۱۳	۲۵	۱۱
۸۱	۳۸	۵	۱۱۴	۲۸	۶
۸۲	۴۸	۱۴	۱۱۵	۳۸	۹
۸۳	۳۴	۷	۱۱۶	۳۵	۱۲
۸۴	-	-	۱۱۷	۴۲	۱۶
۸۵	-	-	۱۱۸	۴۸	۱۰
۸۶	۳۳	۸	۱۱۹	۲۷	۴
۸۷	۲۳	۹	۱۲۰	۲۵	۶
۸۸	۲۰	۷	۱۲۱	۳۸	۲۴
۸۹	۶۰	۹	۱۲۲	۴۰	۱۲
۹۰	۴۶	۱۲			
۹۱	۳۶	۸			



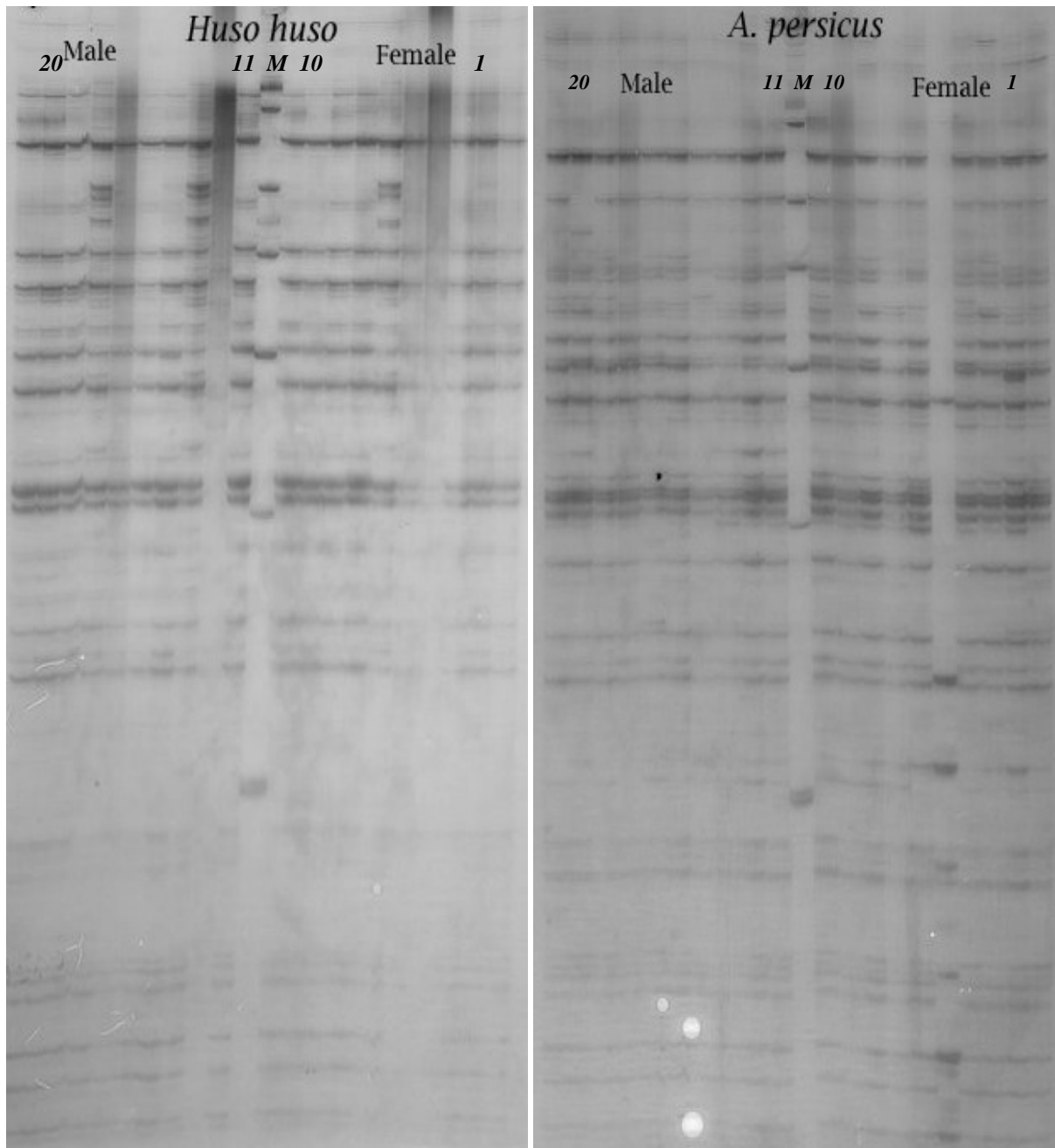
شکل ۶- ترکیب پرایمر (E-AAA, M-CGTC) در فیل ماهی (شماره های ۱ تا ۱۰ مربوط به فیل ماهی ماده و ۱۱-۲۰ مربوط به فیل ماهی نر و M مارکر مولکولی Ladder VIII(Roche) می باشد).

شکل ۵- ترکیب پرایمر (E-AAA, M-CGTC) در تاسماهی ایرانی (شماره های ۱ تا ۱۰ مربوط به تاسماهی ایرانی ماده و ۱۱-۲۰ مربوط به تاسماهی ایرانی نر و M مارکر مولکولی Ladder VIII(Roche) می باشد).



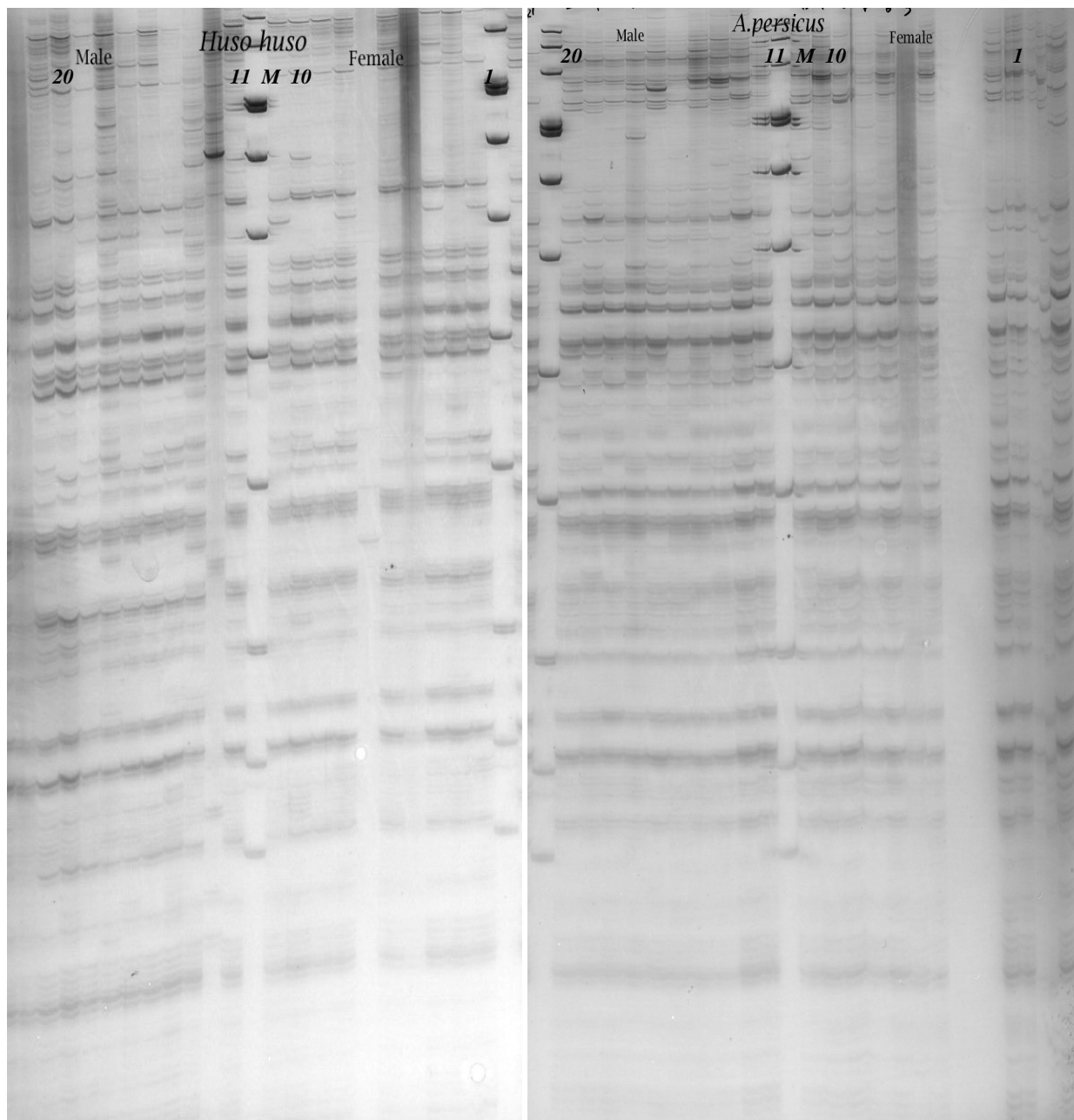
شکل ۸- ترکیب پرایمر (E-AAC, M-CGTC) در فیل ماهی (شماره های ۱ تا ۱۰ مربوط به فیل ماهی ماده و ۲۰-۱۱ مربوط به فیل ماهی نر و M مارکر مولکولی Ladder VIII (Roche) می باشد).

شکل ۷- ترکیب پرایمر (E-AAC, 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 Ladder VIII (Roche) می باشد).



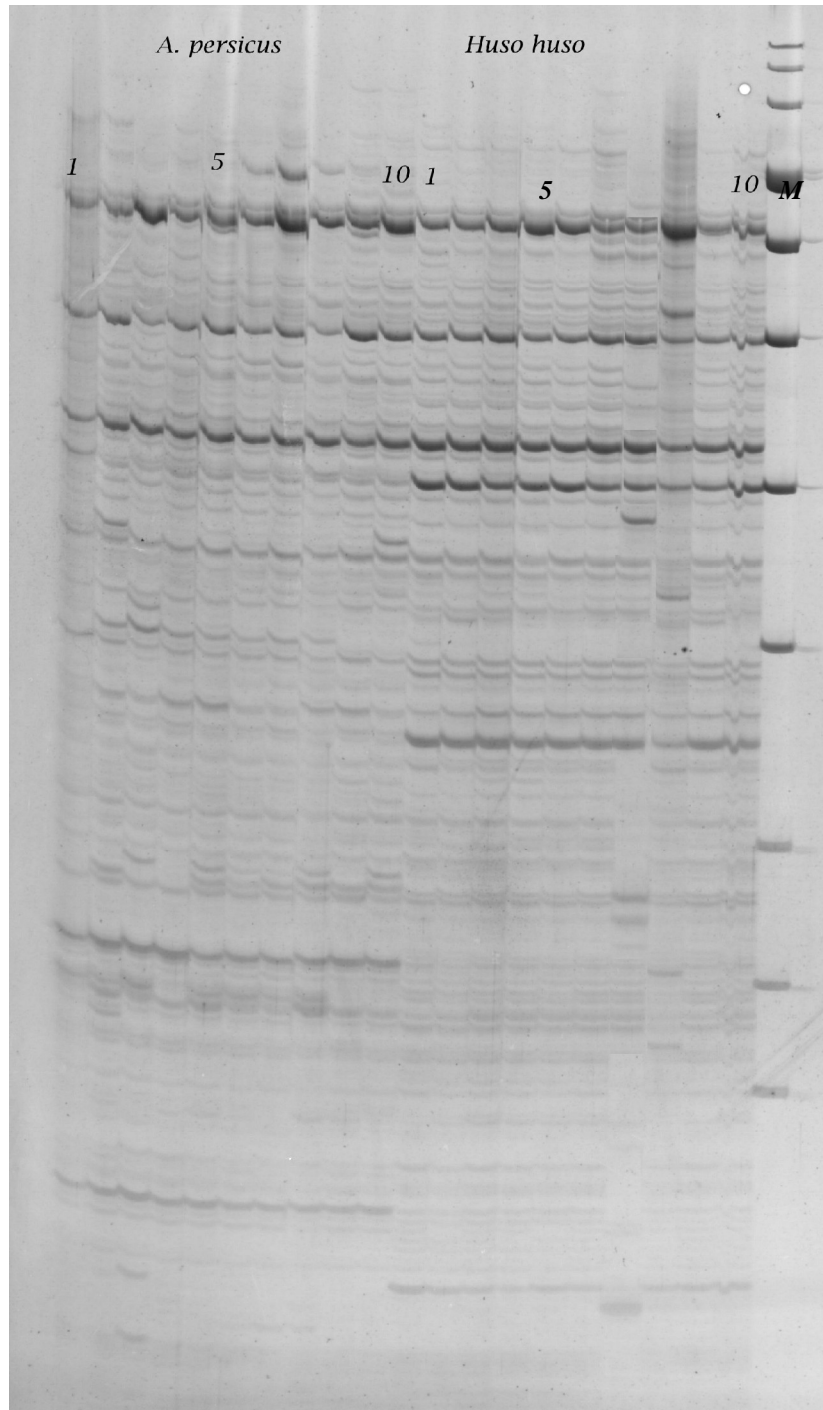
شکل ۱۰- ترکیب پرایمر (E-ATC, M-CTGC) در فیل ماهی (شماره های ۱ تا ۱۰ مربوط به فیل ماهی ماده و ۱۱-۲۰ مربوط به فیل ماهی نر و M مارکر مولکولی LadderVIII(Roche) می باشد).

شکل ۹- ترکیب پرایمر (E-ATC, M-CTGC) در تاسماهی ایرانی (شماره های ۱ تا ۱۰ مربوط به تاسماهی ایرانی ماده و ۱۱-۲۰ مربوط به تاسماهی ایرانی نر و M مارکر مولکولی LadderVIII(Roche) می باشد).

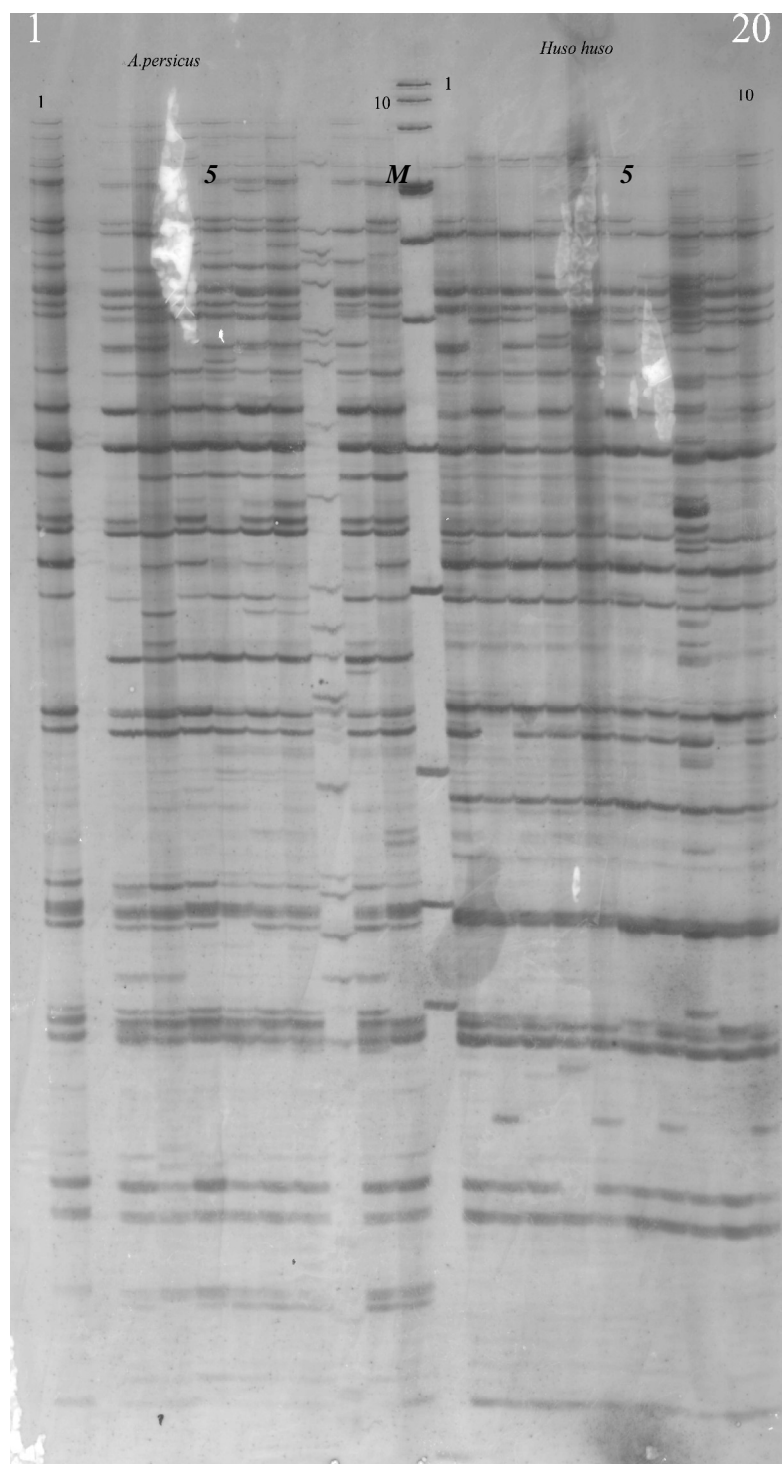


شکل ۱۲- ترکیب پرایمر (E-ATA, M-CAAT) در فیل ماهی (شماره های ۱ تا ۱۰ مربوط به فیل ماهی ماده و ۱۱-۲۰ مربوط به فیل ماهی نر و M مارکر مولکولی Ladder VIII (Roche) می باشد).

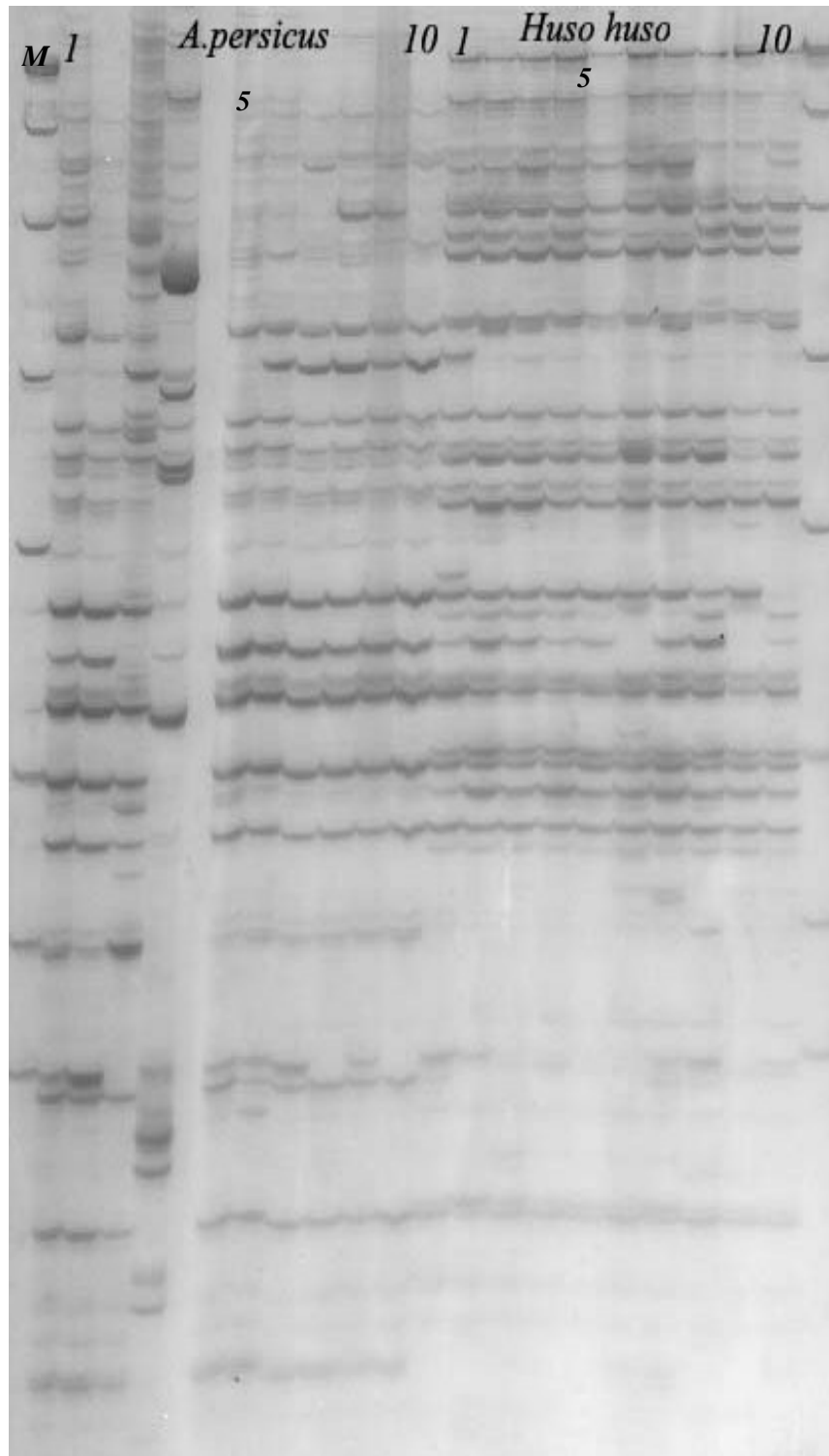
شکل ۱۱- ترکیب پرایمر (E-ATA, M-CAAT) در تاسماهی ایرانی (شماره های ۱ تا ۱۰ مربوط به تاسماهی ایرانی ماده و ۱۱-۲۰ مربوط به تاسماهی ایرانی نر و M مارکر مولکولی Ladder VIII (Roche) می باشد).



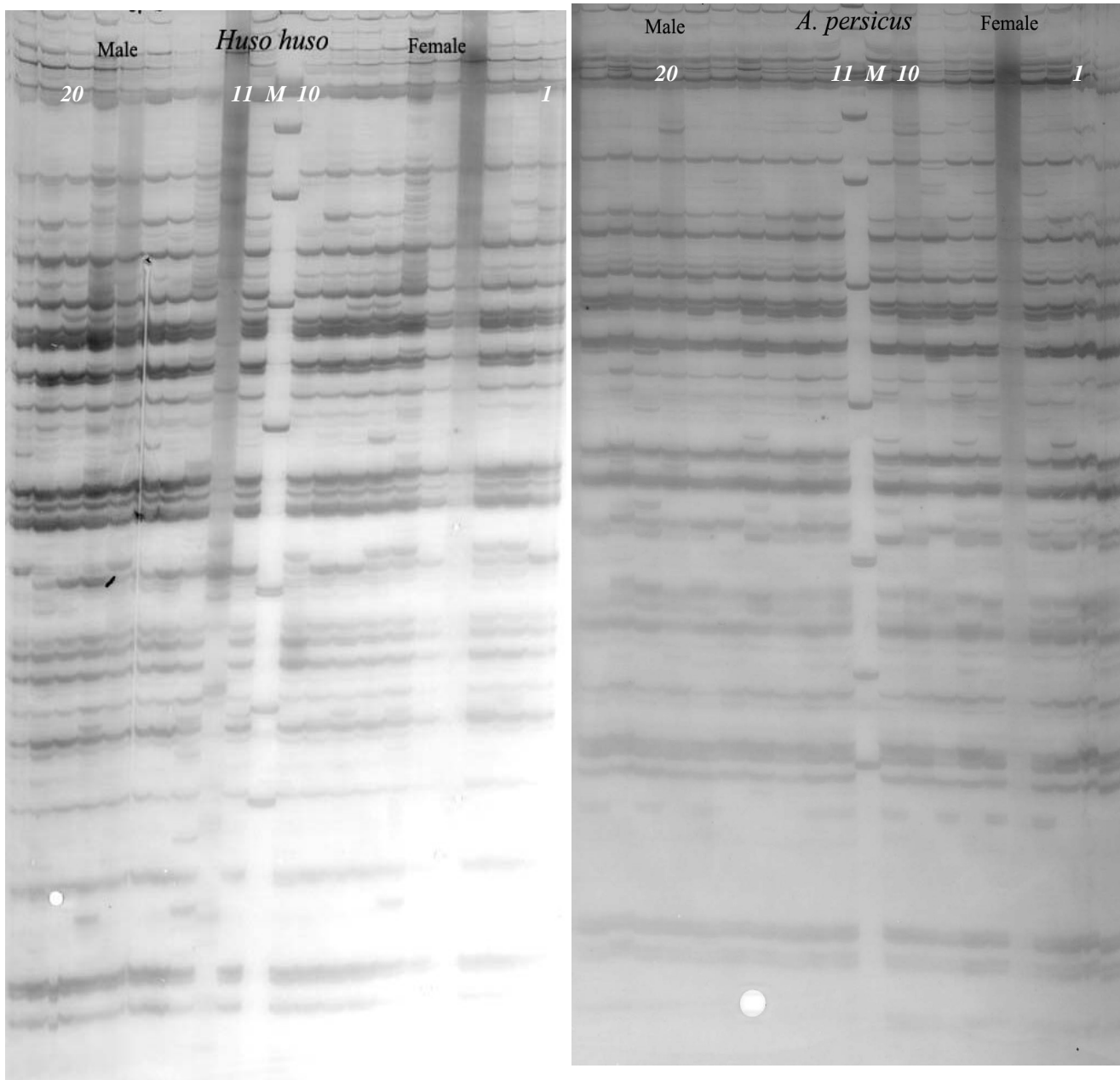
شکل ۱۳- ترکیب پرایمر (E-ACA, M-CCGT) در تاسماهی ایرانی و فیل ماهی (شماره های ۱ تا ۵ مربوط به نمونه های ماده و ۱۰-۶ مربوط به نمونه های نر و M مارکر مولکولی Ladder VIII (Roche) می باشد).



شکل ۱۴- ترکیب پرایمر (E-ACA, M-CGAA) در تاسماهی ایرانی و فیل ماهی (شماره های ۱ تا ۵ مربوط به نمونه های ماده و ۶-۱۰ مربوط به نمونه های نر و M مارکر مولکولی Ladder VIII (Roche) می باشد).

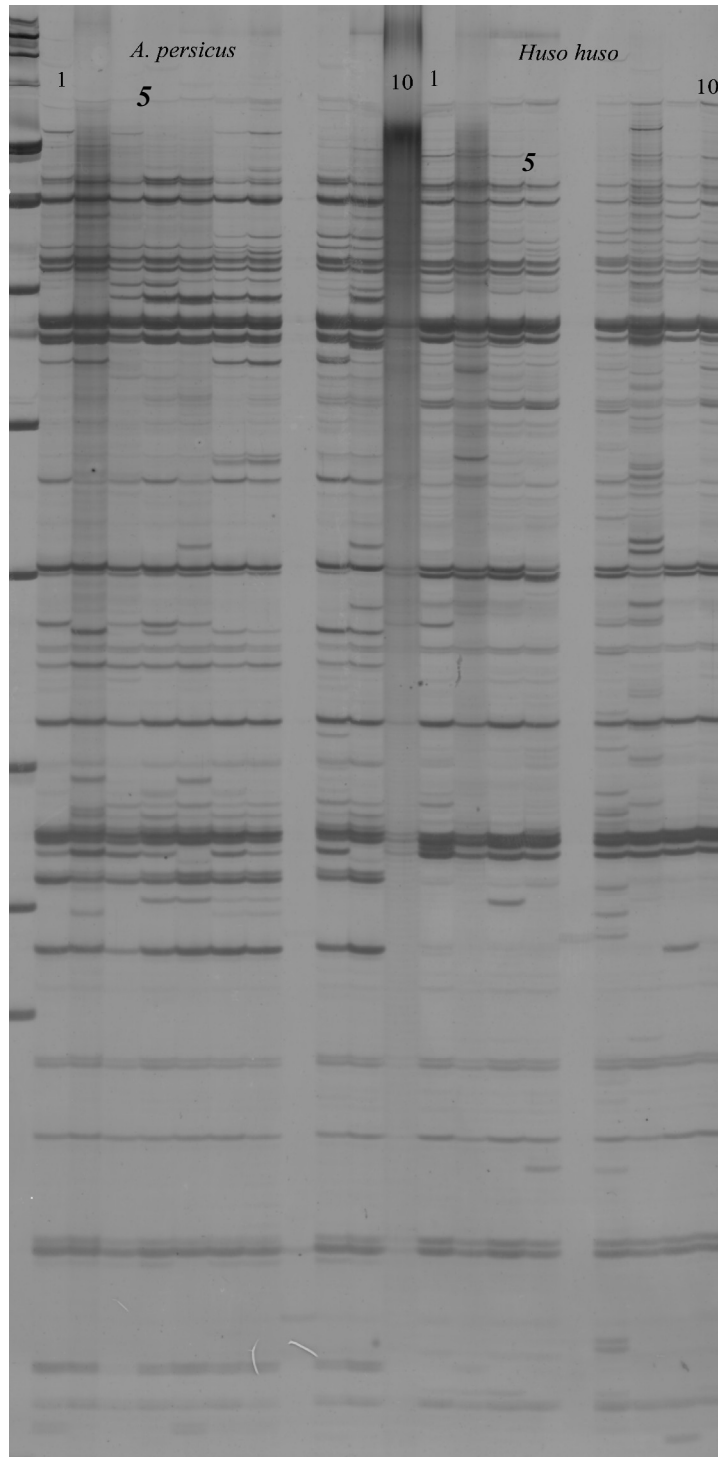


شکل ۱۵- ترکیب پرایمر (E-AAG, M-CAAT) در تاسماهی ایرانی و فیل ماهی (شماره های ۱ تا ۵ مربوط به نمونه های ماده و ۱۰-۶ مربوط به نمونه های نر و M مارکر مولکولی Ladder VIII (Roche) می باشد).



شکل ۱۷- ترکیب پرایمر (E-ATC, M-CAAT) در فیل ماهی (شماره های ۱ تا ۱۰ مربوط به فیل ماهی ماده و ۲۰-۱۱ مربوط به فیل ماهی نر و M مارکر مولکولی Ladder VIII (Roche) می باشد).

شکل ۱۶- 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 Ladder VIII (Roche) می باشد).

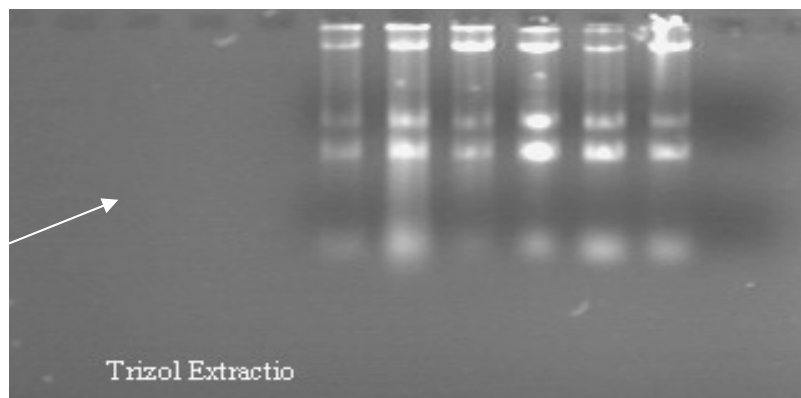


شکل ۱۸- ترکیب پرایمر (E-ACA, M-CTTC) در تاسماهی ایرانی و فیل ماهی (شماره های ۱ تا ۵ مربوط به نمونه های ماده و ۶-۱۰ مربوط به نمونه های نر و M مارکر مولکولی (Ladder VIII(Roche می باشد).

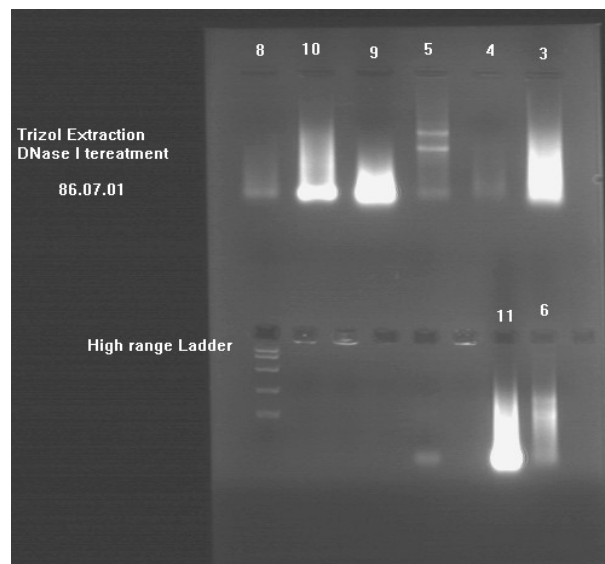
۳-۲- نتایج cDNA-AFLP

۳-۲-۱- استخراج RNA

استخراج RNA با استفاده از کیت High Pure RNA Isolation (Roche) و دستورالعمل پیشنهادی انجام گردید. متأسفانه در اکثر موارد RNA تخلیص شده تخریب گردید. طی چندین استخراج، تعداد ۷ نمونه RNA از گناد ماده و ۷ نمونه از گناد نر تهیه گردید. بعلت احتمال وجود DNA (شکل ۱۹) به همراه RNA استخراج شده از تیمار DNaseI، استفاده گردید و سپس روی ژل آگارز ۱٪ تهیه شده با آب DEPC الکتروفورز شدند (شکل ۲۰).



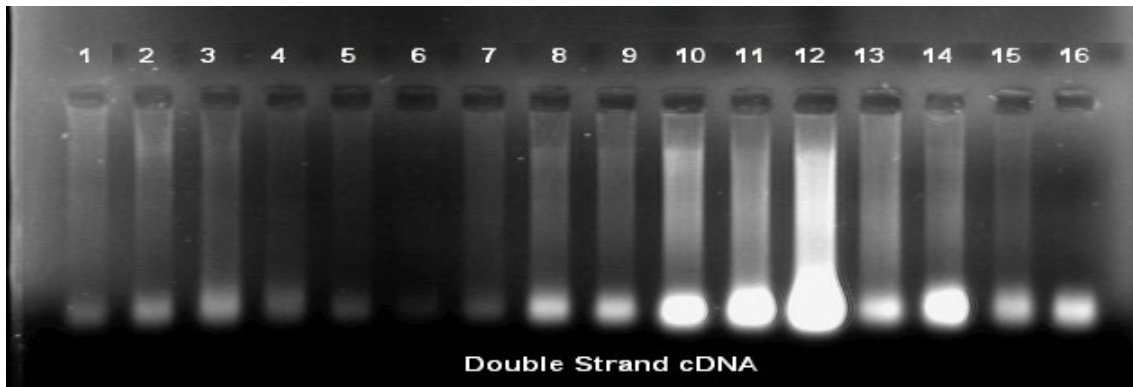
شکل ۱۹- تصویر Total RNA تخلیص شده بدون استفاده از تیمار DNaseI



شکل ۲۰- Total RNA تخلیص شده روی ژل آگارز ۱٪ بعد از تیمار DNaseI و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید

۳-۲-۲- ساخت cDNA

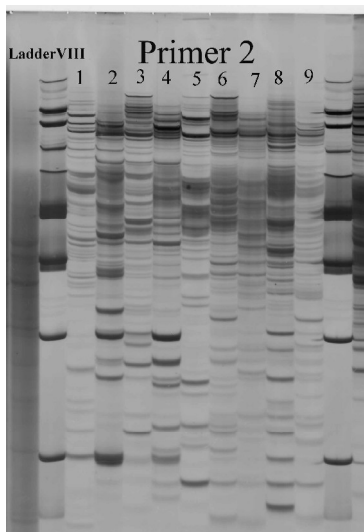
بعد از تهیه cDNA، محصول روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید. از آنجائیکه cDNA دو رشته ای (dscDNA) مجموعه ای از رشته های کوتاه است بعد از الکتروفورز بصورت اسمیر قابل مشاهده بود (شکل ۲۱).



شکل ۲۱- cDNA دو رشته ای الکتروفورز شده روی ژل آگارز ۱٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید - نمونه های ۱ الی ۸ مربوط به گناد ماده و ۹ الی ۱۶ مربوط به گناد نر تاسماهی ایرانی

۳-۲-۳- واکنش های cDNA-AFLP

cDNA دو رشته ای با استفاده از پرایمرهای Random Hexamer و Oligodt تهیه گردید. واکنش های تکثیر با استفاده از ۲۰ جفت پرایمر (Mse+4, Eco+3) روی ۱۱ نمونه و الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید دینیچر و رنگ آمیزی



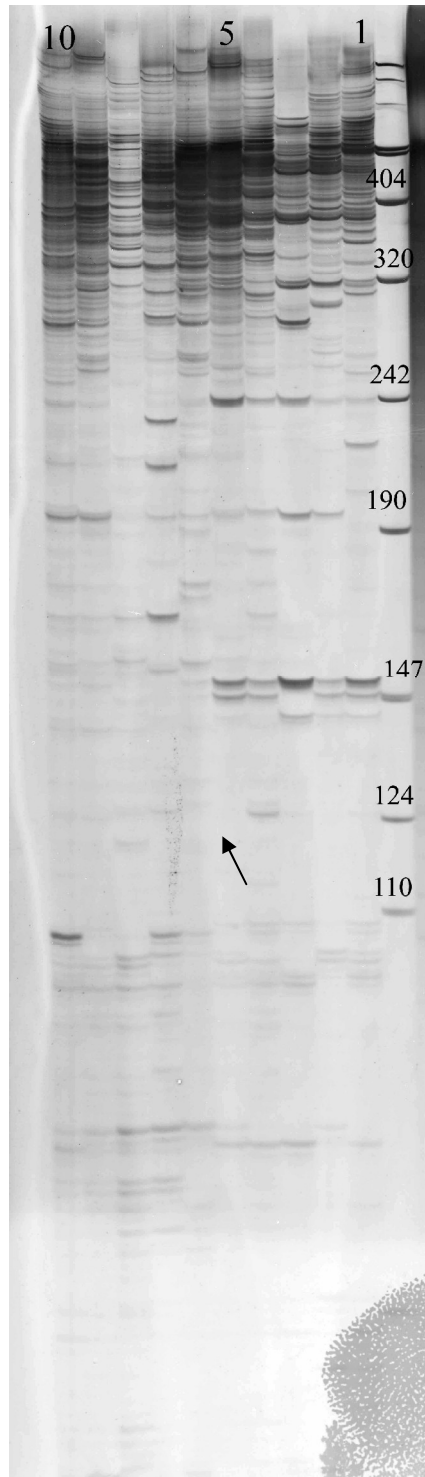
نیترا ت نقره به منظور بررسی بیان ژن در افراد نر و ماده انجام شد. بعد از بررسی محصول PCR در ۲۰ جفت از ترکیب پرایمرهای استفاده شده، نمونه ها در افراد یک جنس از الگوی یکسانی پیروی نمی کردند (شکل ۲۲)، که علت این امر می توانست بعلت استفاده از پرایمر Random Hexamer در تهیه cDNA و ساخته شدن قطعات مختلف cDNA باشد، بهمین علت آزمایشات با استفاده از cDNA های تهیه شده با Oligodt انجام شد.

شکل ۲۲- محصول PCR به روش cDNA-AFLP ساخته شده با Random Hexamer و یک جفت پرایمر M+4 و E+3، نمونه های ۱ الی ۴ گناد ماده و ۵ الی ۹ گناد نر در

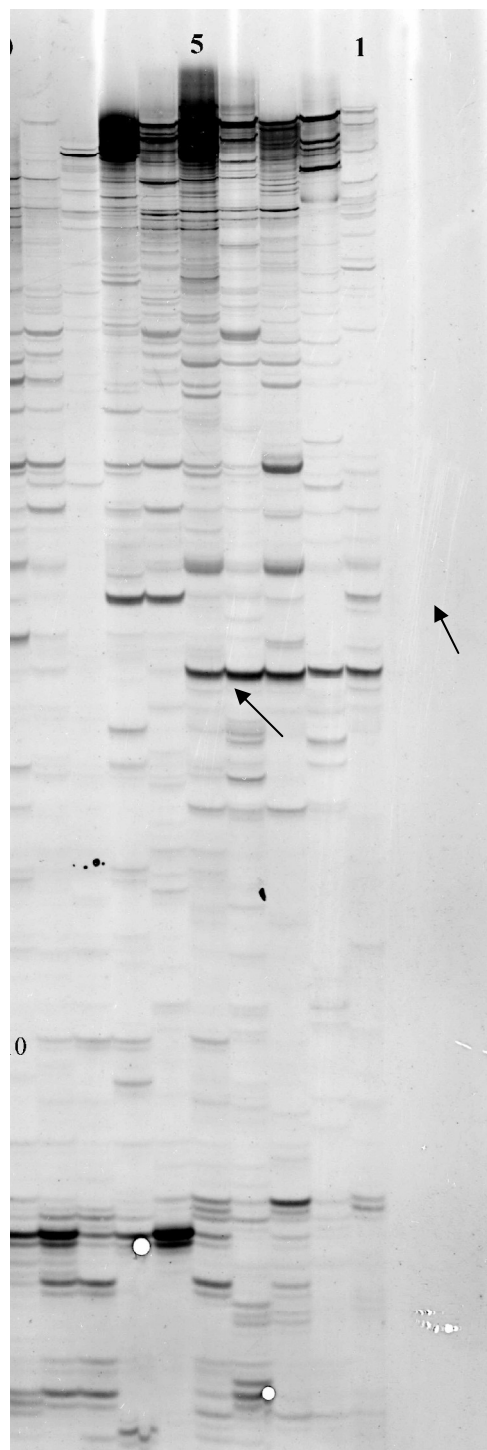
در این پژوهش از ۶۳ ترکیب پرایمر AFLP (Mse+4, Eco+3) مورد استفاده (جدول ۱۲)، تعداد تقریباً ۳۰۰۰ باندها شمارش گردید که از این تعداد حدود ۱۰۹ باندها پلی مورفیک بودند. خوشبختانه در ۲ جفت از پرایمرهای آزمایش شده مارکر اختصاصی جنسیت در سطح cDNA گناد در نمونه های ماده تاسماهی ایرانی مشاهده گردید (شکل ۲۳ و ۲۴). بمنظور اطمینان از تکرار پذیری باندها مذکور در ۸ نمونه دیگر RNA (شامل ۴ عدد نر و ۴ عدد ماده تاسماهی ایرانی) مراحل ساخت cDNA و AFLP با استفاده از پرایمرهای مورد نظر انجام گرفت که باندها مذکور مجدداً در افراد ماده تکرار گردید.

جدول ۱۲ - نوع و ترکیب پرایمرهای cDNA-AFLP استفاده شده در تاسماهی ایرانی

	E-AAT 1	E-AAG 2	E-ATC 3	E-ATA 4	E-ACG 5	E-AAA 6	E-TTA 7
M-CACA 1	۱	۲	۳	۴	۵		
M-CGAA 2	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶		
M-CGAT 3	۲۳	۲۴	۲۵	۲۶	۲۷		
M-CCTT 4	۳۴	۳۵	۳۶	۳۷	۳۸		
M-CATA 5	۴۵	۴۶	۴۷	۴۸	۴۹		
M-CATT 6	۵۶	۵۷	۵۸	۵۹	۶۰		
M-CGTC 7	۶۷	۶۸	۶۹	۷۰	۷۱		
M-CTGC 8	۷۸	۷۹	۸۰	۸۱	۸۲	۸۳	۸۴
M-CCGT 9	۸۹	۹۰	۹۱	۹۲	۹۳	۹۴	۹۵
M-CAAT 10	۱۰۰	۱۰۱	۱۰۲	۱۰۳	۱۰۴	۱۰۵	۱۰۶
M-CTTC 11	۱۱۱	۱۱۲	۱۱۳	۱۱۴	۱۱۵	۱۱۶	۱۱۷



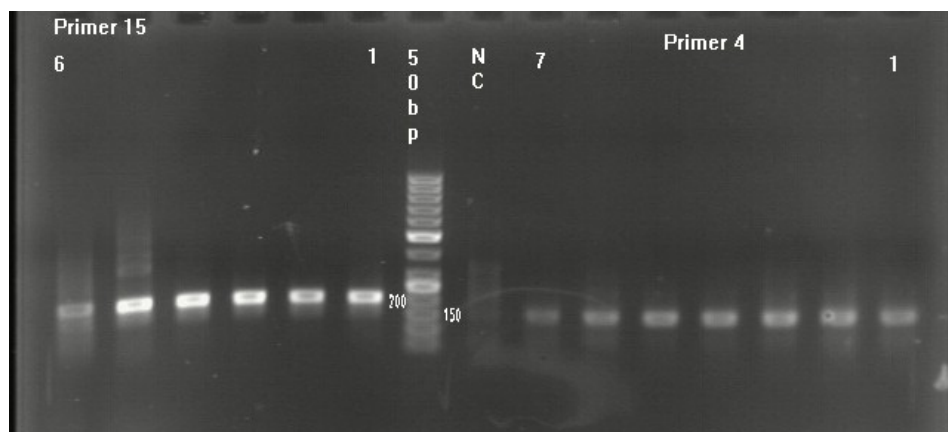
شکل ۲۳- محصول PCR به روش cDNA-AFLP و جفت پرایمر M-CGAA و E-ATC، پس از الکتروفورز با ژل پلی آکریل آمید ۶٪ دناتوره و رنگ آمیزی با نیترات نقره. نمونه های ۱ الی ۴ گناده ماده و ۵ الی ۹ گناده نر در تاسماهی ایرانی می باشند.



شکل ۲۴- محصول PCR به روش cDNA-AFLP و جفت پرایمر E-ATA و M-CGAA، پس از الکتروفورز با ژل پلی آکریل آمید ۶٪ دناتوره و رنگ آمیزی با نیترات نقره-نمونه های ۱ الی ۴ گناد ماده و ۵ الی ۹ گناد نر در تاسماهی ایرانی می باشند.

۴-۲-۳- تخلیص باندهای مارکر

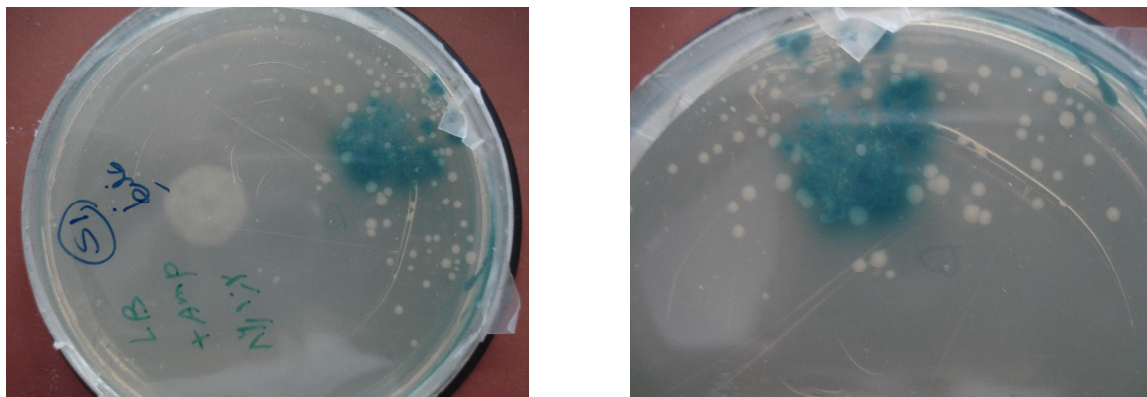
بمنظور خالص سازی و تک باند نمودن قطعات cDNA، تعداد زیادی واکنش PCR انجام گردید و نتیجه مورد نظر که ایجاد تک باند و اختصاصی نمودن قطعه مورد نظر بود، حاصل گردید (شکل ۲۵).



شکل ۲۵- محصول PCR قطعات تخلیص شده cDNA (باندهای مارکر) روی ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. نمونه های شماره ۱ الی ۷ سمت راست تصویر مربوط به مارکر TDF1 و ۱ الی ۶ سمت چپ تصویر مربوط به مارکر TDF2 - NC: کنترل منفی و M: مارکر ۵۰ جفت باز

۵-۲-۳- کلونینگ و استخراج پلاسمید

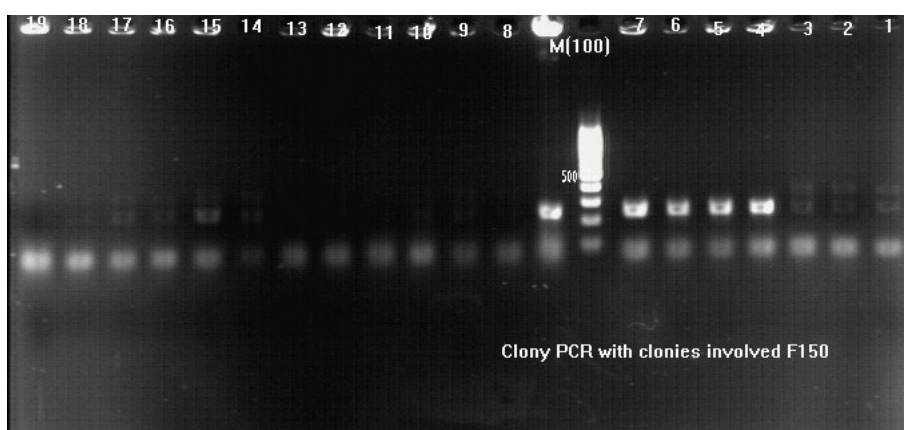
از آنجاییکه اندازه مارکرهای cDNA بسیار کوچک (حدود ۱۵۰ و ۲۰۰ جفت باز) بودن و امکان توالی یابی مستقیم آنها وجود نداشت، جهت توالی یابی آنها انجام آزمایش های کلونینگ ضروری گردید تا طول قطعه بطور کامل توالی یابی شود. در مجموع طی چهار مرحله تکرار، کلونینگ و استخراج پلاسمید در مورد هر دو قطعه اختصاصی cDNA نمونه جنس ماده تاسماهی ایرانی با موفقیت انجام شد. کلونینگ های مثبت بعد از ۲۴ الی ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بصورت کلونی های سفید و آبی مشاهده شدند (شکل ۲۶).



شکل ۲۶- پلیت های آگار حاوی پلاسمیدهای نو ترکیب (کلونی های سفید: پلاسمید دارای قطعه و کلونی های آبی پلاسمید بدون قطعه)

نتایج الکتروفورز محصول clonyPCR در کلونی های سفید با استفاده از پرایمرهای M13F و M13R روی ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، مثبت بودن آزمایش های کلونینگ و حضور قطعه مارکر (insert) را در پلاسمید تأیید نمود (شکل ۲۷ و ۲۸).

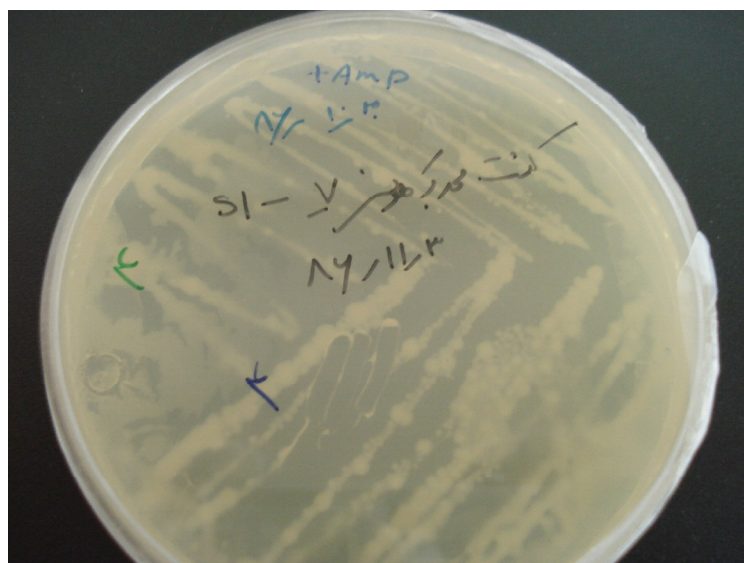
کلونی های دارای پلاسمیدهای نو ترکیب بصورت مجزا روی پلیت LB آگار به همراه آمپی سیلین، مجدداً کشت داده شدند (شکل ۲۹).



شکل ۲۷- محصول clony PCR مربوط به پلاسمید نو ترکیب قطعه ۱۵۰ جفت باز (TDF1) الکتروفورز شده بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، ستونهای ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ پلاسمیدهای شامل قطعه مارکر (insert) می باشند.

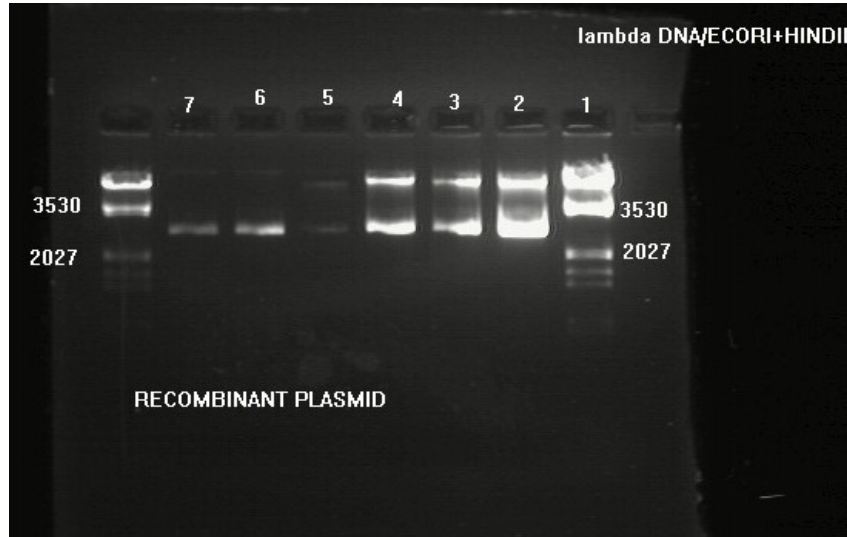


شکل ۲۸- محصول clony PCR مربوط به پلاسمید نوترکیب قطعه ۲۰۰ جفت باز (TDF2) الکتروفورز شده روی ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، ستونهای ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ پلاسمیدهای شامل قطعه مارکر (insert) می باشند.



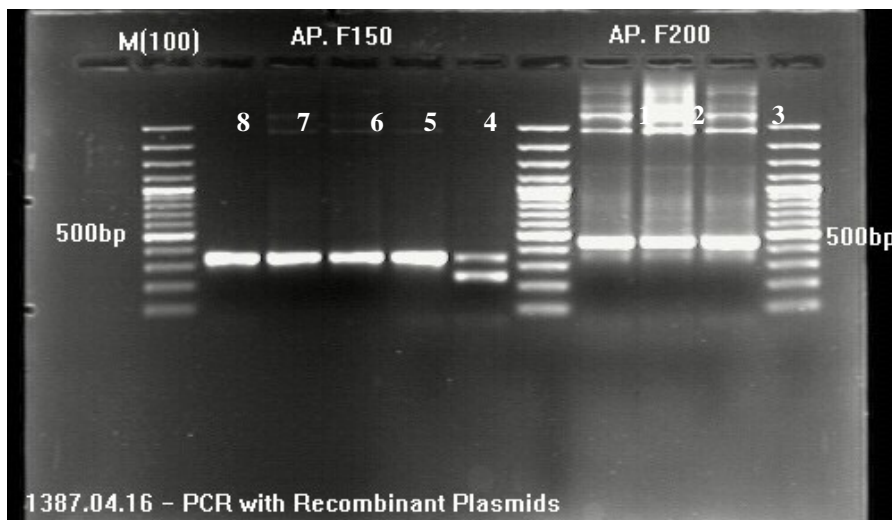
شکل ۲۹- پلیت آگار کشت مجدد کلونی حاوی پلاسمید نوترکیب

نتایج الکتروفورز پلاسمیدهای استخراج شده روی ژل آگارز ۱٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید نیز، وجود پلاسمیدهای نوترکیب و کلونینگ مثبت را تأیید نمود (شکل ۳۰).



شکل ۳۰- پلاسمیدهای نو ترکیب تخایص شده و الکتروفورز شده روی ژل آگارز ۱٪ و رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید

جهت اطمینان از نو ترکیب بودن پلاسمیدهای مورد نظر، PCR با استفاده از پرایمرهای وکتور (M13F, M13R) و پلاسمیدهای نو ترکیب استخراج شده انجام شد. نتایج الکتروفورز محصول PCR با پلاسمیدهای نو ترکیب، به ترتیب حضور باندهایی با وزن تقریبی ۳۰۰ و ۵۰۰ bp را نشان داد (شکل ۳۱).



شکل ۳۱- محصول PCR پلاسمیدهای نو ترکیب با استفاده از پرایمرهای وکتور M13R و M13F و الکتروفورز شده روی ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. ستونهای ۱ و ۲ و ۳ مربوط به TDF2 (قطعه ۲۰۰ bp) و ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ مربوط به TDF1 (قطعه ۱۵۰ bp) است.

۶-۲-۳- تعیین توالی پلاسمیدهای نوترکیب

نتایج حاصل از توالی قطعات ژنی در پلاسمیدهای نوترکیب (۲ قطعه مارکر cDNA کلون شده که ۵ نمونه پلاسمید مربوط به قطعه TDF1 و ۳ نمونه پلاسمید مربوط به قطعه مارکر TDF2 بود)، به ترتیب منجر به دستیابی به دو توالی ۱۰۵ و ۲۰۷ جفت بازی گردید.

توالی پلاسمید نوترکیب شامل قطعه TDF1

P150-PV150F sequence exported from P150-PV150F.ab1

```
CCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGGAAACAGCTATGACCAT  
GATTACGCCAAGCTCTAATACGACTCACTATAGGGAAAGCTCGGTACCACGCATGCTGCAGACGCG  
TTACGTATCGGATCCAGAATTCGTGATTGACTGCGTACCAATTCATACCTACCGCTTCCTCTGAATG  
TGTA AAAAATTGTAGTTACA ACTGAGAACACTATA CATG CATT TTTGTGTTATCTCAGGACTCATCAAT  
CTGAATTCGTGCAACAAGCTTCTCGAGCCTAGGCTAGCTCTAGACCAACAACGTGTGGGGGCCCGA  
GCTTCGCGGCCGCTGTATTCNTAGTCCCCNAAGCCC
```

توالی پلاسمید نوترکیب شامل قطعه TDF2

P2001-M13F sequence exported from P2001-M13F.ab1

```
AACAATTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAATACGACTCACTATAGG  
GAAAGCTCGGTACCACGCATGCTGCAGACGCGTTACGTATCGGATCCAGAATTCGTGATTGACTGC  
GTACCAATTCATACTCCATCTGACGACCAGAATCCACCTCCACCAACCGGGCCTCGAGATTTCTGC  
GAGTATCCTTGACCTCCTCTTCAAACATGTTCTTTTCGGA ACTCTAGCTCCTCGCTGAGGCTCTGGCA  
GCGGTTCTCCAGGTCCACTCTCAGGAGGGTCTCCTCTTCCAGCTGCTTCGTTACTCAGGACTCATCA  
ATCTGAATTCGTGACAAGCTTCTCGAGCCTAGGCTAGCTCTAGACCACACGTGTGGGGGCCCGAG  
CTCGCGGCCGCTGTATCATAGTNCC
```

در کلیه نمونه هایی که تعیین توالی گردیدند، تمامی ۱۰۵ و ۲۰۷ جفت باز با استفاده از پرایمر M13-F بطور کامل توالی یابی شدند (اطلاعات مربوط در بانک اطلاعاتی EMBL با شماره های AM942751 و AM988672 به ثبت رسید) (جدول ۱۳ و ۱۴).

جدول ۱۳ - مشخصات توالی cDNA گناد ماده تاسماهی ایرانی ثبت شده
در بانک اطلاعاتی EMBL با کد دستیابی AM942751

General Information			
Primary Accession #	AM942751		
Accession #	AM942751		
SRS Entry ID	EMBL:AM942751		
Molecule Type	linear mRNA		
Sequence Length	105		
Entry Division	VRT (Other Vertebrates)		
Entry Data Class	STD (Standard)		
Sequence Version	AM942751.1		
Creation Date	20-FEB-2008		
Modification Date	12-MAR-2008		
EMBL-SVA	AM942751		
Description			
Description	<i>Acipenser persicus</i> cDNA-AFLP fragment, isolated from ovary		
Keywords	.		
Organism	<i>Acipenser persicus</i> (Persian sturgeon)		
Organism Classification	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Actinopterygii; Chondrostei; Acipenseriformes; Acipenseridae; Acipenser.		
References			
	1.	Yarmohammadi,M.; Submitted (18-FEB-2008) to the EMBL/GenBank/DBJ databases. Yarmohammadi M., Genetic, International Sturgeon Research Institute, PO BOX 41635-3464, +980131, IRAN.	
		Position	1-105
	2.	Yarmohammadi,M.; Pourkazemi,M.; Chakmehduz,F.; Azizzadeh Pormehr,L.; Investigation for gene expression of sex-determining genes in male and female Persian sturgeon (<i>Acipenser persicus</i>) using cDNA-AFLP Unpublished.	
Features			
Key	Location	Qualifier	Value
source	1..105	organism	<i>Acipenser persicus</i>
		mol_type	mRNA
		country	Iran:Guilan Province
		collected_by	Mahtab Yarmohammadi
		collection_date	10-Apr-2007
		identified_by	Mahtab Yarmohammadi
		sex	female
		tissue_type	ovary
		PCR_primers	fwd_name: M13 For, fwd_seq: gtaaacgacgccagt, rev_name: M13 Rev, rev_seq: aacagctatgacatg
		db_xref	taxon:61968
misc_feature	<1..>105	note	cDNA-AFLP fragment
Sequence			
Characteristics	Length: 105 BP, A Count:31, C Count:24, G Count:16, T Count:34, Others Count:0		
Sequence	<pre>>embl AM942751 AM942751 Acipenser persicus cDNA-AFLP fragment, is tgactgctaccaattcatacctaccgctcctctgaatgtgtaaaaattgtagtcaaa ctgagaacactatacatgcatcttggttatctcaggactcatca</pre>		

جدول ۱۴- مشخصات توالی cDNA گنناد ماده تاسماهی ایرانی
 ثبت شده در بانک اطلاعاتی EMBL با کد دستیابی AM988672

General Information			
Primary Accession #	AM988672		
Accession #	AM988672		
SRS Entry ID	EMBL:AM988672		
Molecule Type	linear mRNA		
Sequence Length	207		
Entry Division	VRT (Other Vertebrates)		
Entry Data Class	STD (Standard)		
Sequence Version	AM988672.1		
Creation Date	29-APR-2008		
Modification Date	29-APR-2008		
EMBL-SVA	AM988672		
Description			
Description	Acipenser persicus partial cDNA-AFLP fragment, isolated from ovary		
Keywords	.;		
Organism	Acipenser persicus (Persian sturgeon)		
Organism Classification	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Actinopterygii; Chondrostei; Acipenseriformes; Acipenseridae; Acipenser.		
References			
	1. Yarmohammadi,M.; Submitted (20-APR-2008) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases. Yarmohammadi M., International Sturgeon Research Institute, Sade Sangar-Rasht, Guilan, P.O.BOX 41635-3464, IRAN.		
	Position	1-207	
	2. Yarmohammadi,M.; Pourkazemi,M.; Chakmehduz,F.; Investigation for gene expression of sex-determining genes in male and female Persian sturgeon (Acipenser persicus) using cDNA-AFLP Unpublished.		
Features			
Key	Location	Qualifier	Value
source	1..207	organism	Acipenser persicus
		mol_type	mRNA
		country	Iran:Guilan province
		isolation_source	Caspian sea
		collected_by	Mahtab Yarmohammadi
		collection_date	10-Apr-2007
		sex	female

	tissue_type	ovary
	PCR_primers	fwd_name: M13 For, fwd_seq: gtaaaacgacggccagt, rev_name: M13 Rev, rev_seq: aacagctatgaccatg
	db_xref	taxon:61968
misc feature	<1..>207	note cDNA-AFLP fragment
Sequence		
Characteristics	Length: 207 BP, A Count:40, C Count:71, G Count:40, T Count:56, Others Count:0	
Sequence	<pre>>emb AM988672 AM988672 Acipencer persicus partial cDNA-AFLP frag tgactgctaccaattcatactccatctgacgaccagaatccacctccaccaaccgggcc tcgagattctgcgagatccttgacctccttcaaacatgtcttcggaactctagc tcctcgctgaggctctggcagcgggtctccaggctcactctcaggagggtctcctctcc agctgcttctgactcaggactcatca</pre>	

بعد از ثبت توالی ها در بانک اطلاعاتی (http://www.ebi.ac.uk/) EMBL اطلاعات حاصل از توالی ژنی هر دو مارکر با اطلاعات موجود در بانک ژن NCBI تطبیق (BLAST) داده شد و نتایج حاصل از آن بشرح ذیل می باشد (جداول ۱۵ و ۱۶).

جستجوی BLAST در پایگاه اطلاعاتی NCBI نشان داد که مارکرهای یافت شده دارای همولوژی بالایی با ژنهای شناخته شده هستند، بطوریکه در مورد TDF1، حداکثر تشابه ۹۳٪ در ۹۱۳ جفت باز در مورد 211881 Tomato MboI BAC Library *Lycopersicon esculentum* genomic clone SL_MboI0119P19 5, genomic survey sequence. بود (جدول ۱۵).

اما در مورد مارکر TDF2، حداکثر تشابه ۸۴٪ در ۱۳۰ جفت باز در مورد Danio rerio mRNA for LaminB2 بود (جدول ۱۶).

جدول ۱۵- نتایج درصد تشابه قطعه TDF1 (ژن ۱۰۵ bp (AM942751))

با توالی های دیگر در بانک اطلاعاتی NCBI با استفاده از BLAST

Alignment	DB:ID	Source	Length	Score	Identity%
۱	EM_OV:AM942751	Acipenser persicus cDNA-AFLP fragment, isolated from ovary	105	210	100
۲	EM_PL:AC153460	Medicago truncatula clone mth2-76i7, complete sequence.	127094	46	87
۳	EM_PL:AC137837	Medicago truncatula clone mth2-30e7, complete sequence.	79015	46	87
۴	EM_HUM:AL451054	Human DNA sequence from clone RP11-275O4 on chromosome 1 Contains two tubulin beta pseudogenes, a novel gene, the 5' end of a novel protein (MGC42493) and four CpG islands.	147567	46	88
۵	EM_HTG:AL512842	Human DNA sequence *** SEQUENCING CANCELLED *** from clone RP11-276J4	154889	46	88
۶	EM_GSS:DU952788	211881 Tomato MboI BAC Library Lycopersicon esculentum genomic clone SL_MboI0119P19 5, genomic survey sequence.	913	46	93
۷	EM_GSS:CR307399	mte1-28G20FM1 BAC end, cultivar Jemalong A17 of Medicago truncatula.	913	46	87
۸	EM_EST:CV847722	ID0AEE3CE03RM1 ID0AEE Acyrthosiphon pisum cDNA clone ID0AEE3CE03 5', mRNA sequence.	809	46	83
۹	EM_TPA:BL000002	TPA: Homo sapiens chromosome 7.	158409401	44	82
۱۰	EM_TPA:BL000001	TPA: Homo sapiens chromosome 7.	157953789	44	82
۱۱	EM_INV:AY879053	Ciona intestinalis AFLP marker B0521b, partial sequence.	172	44	92
۱۲	EM_HUM:AC073073	Homo sapiens BAC clone RP11-251G23 from 7, complete sequence.	114414	44	82
۱۳	EM_HTG:AC094180	Rattus norvegicus clone CH230-2P22, *** SEQUENCING IN PROGRESS *** , 2 unordered pieces.	243868	44	90
۱۴	EM_HTG:AC224052	Bos taurus clone CH240-451C22, WORKING DRAFT SEQUENCE, 9 unordered pieces.	196308	44	92
۱۵	EM_HTG:AC221787	Bos taurus clone CH240-385E14, WORKING DRAFT SEQUENCE, 37 unordered pieces.	208575	44	92
۱۶	EM_HTG:AC051655	Homo sapiens chromosome 7 clone RP11-76B18 map 7, WORKING DRAFT SEQUENCE, 29 unordered pieces.	162996	44	82
۱۷	EM_EST:FL646037	sTaPST26 Transcript derived fragments (TDFs) from wheat leaves challenged with stripe rust fungus (CY32) Triticum aestivum cDNA 5', mRNA sequence	188	44	93
۱۸	EM_EST:EY827775	PT11-C2-300-001-G06-CT.F Poncirus trifoliata bark, greenhouse plant Poncirus trifoliata cDNA, mRNA sequence.	681	44	87
۱۹	EM_EST:CX302564	C08003C12SK PhyRootSw1 Citrus sinensis cDNA clone C08003C12, mRNA sequence.	662	44	87
۲۰	EM_EST:DB350618	Homo sapiens cDNA clone TRACH3038163, 3' end, mRNA sequence.	554	44	82
۲۱	EM_EST:CB999538	AGENCOURT_13631667 NIH_MGC_186 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:30323448 5', mRNA sequence.	861	44	82

جدول ۱۶- نتایج درصد تشابه قطعه TDF2 (ژن ۲۰۷ bp (AM988672))

با توالی های دیگر در بانک اطلاعاتی NCBI

Alignment	DB:ID	Source	Length	Score	Identity%
1.	EM_OV:AM988672	Acipenser persicus partial cDNA-AFLP fragment, isolated from ovary	414	207	100
2.	EM_EST:CV991630	IpcCGFr1_58_A10_23 IpcCGFr1 Ictalurus punctatus cDNA clone IpcCGFr1_58_A10 5', mRNA sequence.	184	758	80
3.	EM_OV:BC165769	Danio rerio lamin B1, mRNA (cDNA clone MGC:192857 IMAGE:100061336), complete cds.	176	1834	80
4.	EM_OV:BC068414	Danio rerio lamin B1, mRNA (cDNA clone IMAGE:6966523), partial cds.	176	2861	80
5.	EM_OV:BC044402	Danio rerio lamin B1, mRNA (cDNA clone MGC:55459 IMAGE:2639886), complete cds.	176	2994	80
6.	EM_OV:AJ250201	Danio rerio mRNA for lamin B1 protein (lamin B1 gene)	176	1921	80
7.	EM_EST:EH583736	FDR306-P00015-DEPE-F_J15 FDR306 Danio rerio cDNA clone FDR306-P00015-BR_J15 5', mRNA sequence.	176	1015	80
8.	EM_EST:DR720687	AGENCOURT_55158768 NIH_ZGC_7 Danio rerio cDNA clone IMAGE:7993293 5', mRNA sequence.	176	786	80
9.	EM_EST:CT705248	Danio rerio EST, clone ZF_mu_205d17 5'	176	782	80
10.	EM_EST:CT696525	Danio rerio EST, clone ZF_mu_265m16 5'	176	767	80
11.	EM_EST:CT662927	Danio rerio EST, clone ZF_mu_8c19 5'	176	848	80
12.	EM_EST:CT641861	Danio rerio EST, clone ZF_mu_116c18 5'	176	708	80
13.	EM_EST:CT615322	Danio rerio EST, clone ZF_mu_73i22 5'	176	806	80
14.	EM_EST:CO808651	AGENCOURT_30362937 NIH_ZGC_14 Danio rerio cDNA clone IMAGE:7403999 5', mRNA sequence.	176	784	80
15.	EM_EST:CN506216	AGENCOURT_22438278 NIH_ZGC_7 Danio rerio cDNA clone IMAGE:7268989 5', mRNA sequence.	176	880	80
16.	EM_EST:CK675537	ZF101-P00005-DEPE-F_G17 GISZF001_ra Danio rerio cDNA clone IMAGE:7136107 5', mRNA sequence.	176	394	80
17.	EM_EST:CK027417	AGENCOURT_16624095 NIH_ZGC_7 Danio rerio cDNA clone IMAGE:7054095 5', mRNA sequence.	176	1130	80
18.	EM_EST:CD751178	AGENCOURT_14692446 NCI_CGAP_ZEmb2 Danio rerio cDNA clone IMAGE:6966523 5', mRNA sequence.	176	762	80
19.	EM_EST:EB799084	5253338 ZF02 Danio rerio cDNA clone 2232819, mRNA sequence.	172	223	79
20.	EM_EST:DT307489	JGI_CAAW14318.fwd CAAW Pimephales promelas testis 7-8 month adults, males and females pooled (M) Pimephales promelas cDNA clone CAAW14318 5', mRNA sequence.	170	862	80
21.	EM_EST:DT181831	JGI_ANNO48682.fwd ANNO Pimephales promelas Whole (M) Pimephales promelas cDNA clone ANNO48682 5', mRNA sequence.	170	859	80
22.	EM_EST:DT162922	JGI_ANNO37722.fwd ANNO Pimephales promelas Whole (M) Pimephales promelas cDNA clone ANNO37722 5', mRNA sequence.	170	868	80
23.	EM_EST:BQ263065	fz93f08.y1 Sugano SJD adult male Danio rerio cDNA clone 5916062 5' similar to TR:Q9PU57 Q9PU57 LAMIN B1 PROTEIN. ;, mRNA sequence.	170	586	79
24.	EM_EST:CT675790	Danio rerio EST, clone ZF_mu_192f07 5'	168	803	78
25.	EM_EST:CT708792	Danio rerio EST, clone ZF_mu_196b15 5'	162	864	79
26.	EM_EST:DW558151	EST_ssal_rgb2_22570 rgb2 Salmo salar cDNA clone ssal_rgb2_536_268_rev 5', mRNA sequence.	158	776	77
27.	EM_EST:CX028349	1340089 NCCWA 10RT#3 Oncorhynchus mykiss cDNA clone 10RT#3_111J07 5', mRNA sequence.	154	622	77
28.	EM_EST:CD373073	UI-R-GO0-csi-g-23-0-UI.r1 UI-R-GO0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-GO0-csi-g-23-0-UI 5', mRNA sequence.	150	753	77
29.	EM_RO:U72353	Rattus norvegicus lamin B1 mRNA, complete cds.	146	2154	76

30.	EM_EST:EB845646	5834049 KZ58 Danio rerio cDNA clone 2315778, mRNA sequence.	146	557	78
31.	EM_EST:DT877083	AGENCOURT_58674694 NIH_ZGC_5 Danio rerio cDNA clone IMAGE:8099706 5', mRNA sequence.	146	775	78
32.	EM_EST:CV112074	AGENCOURT_31572521 NIH_ZGC_15 Danio rerio cDNA clone IMAGE:7441230 5', mRNA sequence.	146	760	78
33.	EM_EST:CK148510	AGENCOURT_16918015 NCI_CGAP_ZEmb2 Danio rerio cDNA clone IMAGE:7062197 5', mRNA sequence.	146	800	78
34.	EM_EST:EV780398	AGENCOURT_114822990 NIH_MGC_433 Rattus norvegicus cDNA clone IMAGE:9100839 5', mRNA sequence.	146	952	76
35.	EM_EST:EV777292	AGENCOURT_114823192 NIH_MGC_433 Rattus norvegicus cDNA clone IMAGE:9100765 5', mRNA sequence.	146	940	76
36.	EM_EST:EV774497	AGENCOURT_112412864 NIH_MGC_429 Rattus norvegicus cDNA clone IMAGE:9029174 5', mRNA sequence.	146	891	76
37.	EM_EST:EV762183	AGENCOURT_111275319 NIH_MGC_420 Rattus norvegicus cDNA clone IMAGE:9034264 5', mRNA sequence.	146	929	76
38.	EM_EST:DR724724	AGENCOURT_55090354 NIH_ZGC_7 Danio rerio cDNA clone IMAGE:7992616 5', mRNA sequence.	138	713	78
39.	EM_EST:FD702895	CAAA11646.fwd CAAA Petromyzon marinus Petromyzon marinus cDNA clone CAAA11646 5', mRNA sequence.	136	846	76
40.	EM_EST:DN404288	LIB4005-014-Q1-K1-A12 LIB4005 Canis familiaris cDNA clone CLN9359986, mRNA sequence.	136	576	75
41.	EM_OV:BC162105	Danio rerio lamin B2, mRNA (cDNA clone MGC:193572 IMAGE:9037655), complete cds.	134	2044	75
42.	EM_EST:CT673618	Danio rerio EST, clone ZF_mu_169114 5'	134	893	75
43.	EM_OV:AB034198	Carassius auratus mRNA for lamin B2, complete cds.	132	3551	76
44.	EM_EST:DT169689	JGI_ANNO41599.fwd ANNO Pimephales promelas Whole (M) Pimephales promelas cDNA clone ANNO41599 5', mRNA sequence.	132	722	76
45.	EM_EST:BF544143	UI-R-E0-df-b-01-0-UI.r1 UI-R-E0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-E0-df-b-01-0-UI 5', mRNA sequence.	132	277	75
46.	EM_OV:AJ005936	Danio rerio mRNA for lamin B2	130	2208	84
47.	EM_EST:EB987951	16053315 ZF42 Danio rerio cDNA clone 4278967, mRNA sequence.	130	635	84
48.	EM_EST:AI943361	fc79b11.y1 Zebrafish WashU MPIMG EST Danio rerio cDNA clone IMAGE:3727581 5' similar to gb:M94362 LAMIN B2 (HUMAN);, mRNA sequence.	130	535	84
49.	EM_EST:EE748763	020709OAPP1075020HT OAPP Ovis aries cDNA, mRNA sequence.	124	699	74
50.	EM_OV:CU550710	Zebrafish DNA sequence from clone CH1073-361A1 in linkage group 22	122	41497	84

نتایج درصد تشابه در BLAST بانک اطلاعاتی NCBI برای ۱۰۵ جفت باز در مارکر TDF1 نشان داد که حداکثر

تشابه ۹۳٪ در ۹۱۳ جفت باز در مورد 211881 Tomato MboI BAC Library Lycopersicon esculentum genomic

clone SL_MboI0119P19 5, genomic survey sequence. اما در تجزیه و تحلیل سکانس مارکر TDF2، حداکثر

تشابه ۸۴٪ در ۱۳۰ جفت باز در مورد Danio rerio mRNA for LaminB2 بود.

۷-۲-۳- نتایج ترجمه توالی به پروتئین با استفاده از برنامه Expasy

با استفاده از نرم افزارهای بانک اطلاعاتی expasy، توالی مارکرها به پروتئین ترجمه گردید. با استفاده از این

برنامه ۶ قالب پروتئین برای هر ژن بدست آمد که بشرح ذیل بود:

- ترجمه توالی TDF1 (مارکر ۱۰۵ bp) به پروتئین

5'3' Frame 1

Stop L R T N S Y L P L P L N V Stop K L Stop L Q L R T L Y Met H F V L S Q D S S

5'3' Frame 2

D C V P I H T Y R F L Stop Met C K N C S Y N Stop E H Y T C I L C Y L R T H

5'3' Frame 3

T A Y Q F I P T A S S E C V K I V V T T E N T I H A F C V I S G L I

3'5' Frame 1

Stop Stop V L R Stop H K Met H V Stop C S Q L Stop L Q F L H I Q R K R Stop V Stop I G T Q S

3'5' Frame 2

D E S Stop D N T K C Met Y S V L S C N Y N F Y T F R G S G R Y E L V R S

3'5' Frame 3

Met S P E I T Q N A C I V F S V V T T I F T H S E E A V G Met N W Y A V

- ترجمه توالی TDF2 (مارکر ۲۰۷ bp) به پروتئین

5'3' Frame 1

Stop L R T N S Y S I Stop R P E S T S T N R A S R F L R V S L T S S S N Met F F R N S S S S L R L W Q R
F S R S T L R R V S S S S C F V T Q D S S

5'3' Frame 2

D C V P I H T P S D D Q N P P P T G P R D F C E Y P Stop P P L Q T C S F G T L A P R Stop G S G S G S
P G P L S G G S P L P A A S L L R T H

5'3' Frame 3

T A Y Q F I L H L T T R I H L H Q P G L E I S A S I L D L L F K H V L S E L Stop L L A E A L A A V L Q
V H S Q E G L L F Q L L R Y S G L I

3'5' Frame 1

Stop Stop V L S N E A A G R G D P P E S G P G E P L P E P Q R G A R V P K E H V Stop R G G Q G Y S Q
K S R G P V G G G G F W S S D G V Stop I G T Q S

3'5' Frame 2

D E S Stop V T K Q L E E T L L R V D L E N R C Q S L S E E L F R K N Met F E E E V K D T R R N L
E A R L V E V D S G R Q Met E Y E L V R S

3'5' Frame 3

Met S P E Stop R S S W K R R P S Stop E W T W R T A A R A S A R S Stop S S E R T C L K R R S R I L A
E I S R P G W W R W I L V V R W S Met N W Y A V



درصد تشابه قالب های پروتئینی بدست آمده با پروتئین های ثبت شده در بانک اطلاعاتی NCBI مقایسه گردید

(Protein BLAST). نتایج بدست آمده برای هر قالب ترجمه سکانس به پروتئین بشرح ذیل بود (جدول ۱۷ و ۱۸).

نتایج Protein BLAST نشان داد که بیشترین شباهت مارکر TDF1 با protein phosphatase C2 (PP2c) با درصد

تشابه ۳۶/۶٪ و مارکر TDF2 با پروتئین laminB2 در Danio rario با درصد تشابه ۹۹/۸٪ بود.

جدول ۱۷- نتایج Protein BLAST مارکر TDF1 در بانک اطلاعاتی NCBI

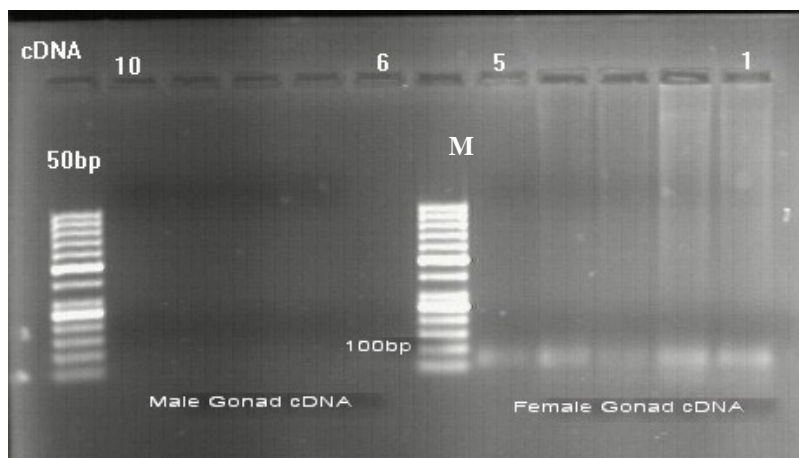
ترجمه پروتئین مارکر API bp در expasy	نتایج Protein BLAST در پایگاه اطلاعاتی NCBI	Score (Bits)	E Value
5'3' Frame 1-Stop L R T N S Y L P L P L N V Stop K L Stop L Q L R T L Y Met H F V L S Q D S S	No significant similarity found		
5'3' Frame 2 D C V P I H T Y R F L Stop Met C K N C S Y N Stop E H Y T C I L C Y L R T H	ref[XP_626226.1] protein phosphatase C2 (PP2c) domain contain... ref[XP_666083.1] hypothetical protein Chro.50083 [Cryptospori...	36.6 36.6	0.52   0.55
5'3' Frame 3 T A Y Q F I P T A S S E C V K I V V T T E N T I H A F C V I S G L I	No significant similarity found		
3'5' Frame 1 Stop Stop V L R Stop H K Met H V Stop C S Q L Stop L Q F L H I Q R K R Stop V Stop I G T Q S	emb[CAO00730.1] putative cellulosomal scaffoldin protein prec...	34.7	2.5
3'5' Frame 2 D E S Stop D N T K C Met Y S V L S C N Y N F Y T F R G S G R Y E L V R S	No significant similarity found		
3'5' Frame 3 Met S P E I T Q N A C I V F S V V T T I F T H S E E A V G Met N W Y A V	No significant similarity found		

جدول ۱۸ - نتایج Protein BLAST مارکر TDF2 در بانک اطلاعاتی NCBI

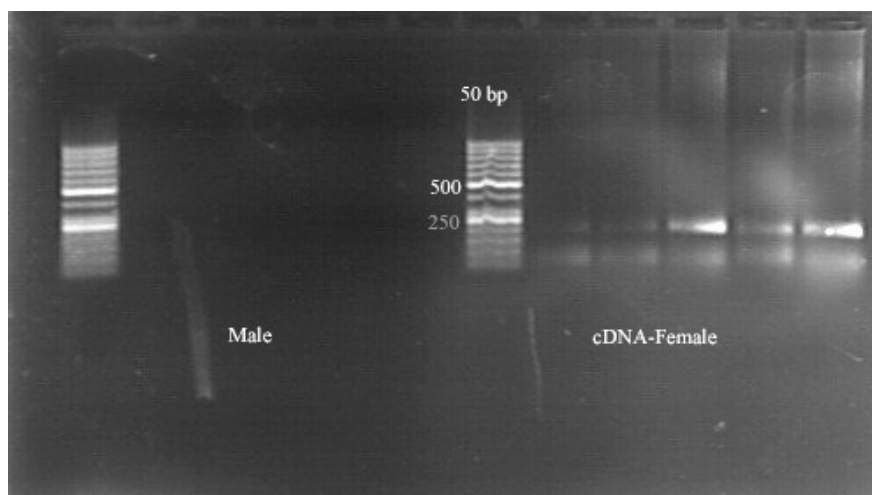
ترجمه پروتئین مارکر API bp در expasy	نتایج Protein BLAST	Score (Bits)	E Value
5'3' Frame 1 Stop L R T N S Y S I Stop R P E S T S T N R A S R F L R V S L T S S S N Met F F R N S S S L R L W Q R F S R S T L R R V S S S S C F V T Q D S S	No significant similarity found		
5'3' Frame 2 D C V P I H T P S D D Q N P P P T G P R D F C E Y P Stop P P L Q T C S F G T L A P R Stop G S G S G S P G P L S G G S P L P A A S L L R T H	ref XP_001924041.1 PREDICTED: myosin X-like 1 [Danio rerio]	33.1	6.2
5'3' Frame 3 T A Y Q F I L H L T T R I H L H Q P G L E I S A S I L D L L F K H V L S E L Stop L L A E A L A A V L Q V H S Q E G L L F Q L L R Y S G L I	ref XP_001937732.1 exosome-associated family protein [Pyreno...	32.7	8.0
3'5' Frame 1 Stop Stop V L S N E A A G R G D P P E S G P G E P L P E P Q R G A R V P K E H V Stop R G G Q G Y S Q K S R G P V G G G G F W S S D G V Stop I G T Q S	replicase [Hosta virus X] emb CAF04078.1	34.3	2.8
3'5' Frame 2 D E S Stop V T K Q L E E E T L L R V D L E N R C Q S L S E E L E F R K N Met F E E E V K D T R R N L E A R L V E V D S G R Q Met E Y E L V R S	emb CAB58234.1 lamin B1 protein [Danio rerio] Lmnb1 protein [Danio gb AAH68414.1 rerio] lamin B1 [Danio rerio] ref NP_694504.2 >gb AAH44402.1 Lamin. ادامه در ضمیمه .	99.8 99.8 99.8	6e-20 6e-20 6e-20
3'5' Frame 3 Met S P E Stop R S S W K R R P S Stop E W T W R T A A R A S A R S Stop S S E R T C L K R R S R I L A E I S R P G W W R W I L V V R W S Met N W Y A V	ref ZP_00415894.1 Putative peptidoglycan binding domain 1 [[Azotobacter vinelandii AvOP] ref XP_001837876.1 hypothetical protein CC1G_09858 Coprinopsis cinerea okayama7#130] ...	33.9 33.5	3.4 4.7

۸-۲-۳- نتایج تأیید مارکرهای جنسی در cDNA و DNA ژنومی نمونه های نر و ماده A.persicus

آزمایش روی cDNA نمونه های تاسماهی ایرانی توسط آزمایش RT-PCR تأیید گردید. ابتدا ۲ مارکر بدست آمده روی cDNA نمونه های نر و ماده بالغ آزمایش گردید. نتایج نشان داد که TDF1 و TDF2 در cDNA بدست آمده از ۸ نمونه ماده قابل تکثیر است در حالیکه در ۸ نمونه نر باندی تکثیر نمی شود (شکل ۳۲). اما در سطح DNA ژنومی ۱۰ نر و ۱۰ ماده بالغ تاسماهی ایرانی، هیچ باند اختصاصی از TDF1 و TDF2 ایجاد نگردید (شکل ۳۳).



شکل ۳۲- محصول RT-PCR با استفاده از cDNA گناده تاسماهی ایرانی و پرایمر توالی TDF1، الکتروفورز شده روی ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. ستونهای ۱ الی ۵ مربوط به cDNA گناده ماده، ۶ الی ۱۰ مربوط به cDNA گناده نر تاسماهی ایرانی و M مارکر ۵۰ جفت باز است.



شکل ۳۳- محصول RT-PCR با استفاده از cDNA گناده تاسماهی ایرانی و پرایمر توالی TDF2، الکتروفورز شده روی ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. ستونهای ۱ الی ۵ مربوط به cDNA گناده ماده، ۶ الی ۱۰ مربوط به cDNA گناده نر تاسماهی ایرانی و M مارکر ۵۰ جفت باز است.

۴- بحث و نتیجه گیری

اولین گام در تشخیص جنسیت یک موجود با استفاده از نشانگرهای DNA، وجود سیستم های تعیین جنسیت ژنتیکی در آن می باشد. تشخیص جنسیت را در بسیاری از گونه ها می توان با استفاده از آزمایش مبتنی بر DNA انجام داد. به رغم قدرت آن، یک آزمایش DNA را تنها زمانی می توان بکار برد که مارکر وابسته به جنس شناسایی گردد (Griffiths, 2000). به عنوان مثال در گونه هایی که نرها هتروگامت (XY) و ماده ها هموگامت (XX) باشند، احتمال یافتن چنین مارکری در DNA افراد نر وجود دارد، چرا که کروموزوم Y تنها در افراد نر دیده می شود. در برخی از گونه ها کروموزومهای جنسی کاملاً تکامل یافته و متمایز هستند و در برخی دیگر ژن های مرتبط با جنسیت روی کروموزوم های اتوزومی قرار دارند که از نظر مورفولوژیک یکسان می باشند (Tave, 1993). وجود کروموزومهای جنسی تمایز یافته تنها در کاریوتایپ ۱۷۶ گونه از ماهیان گزارش شده است، در حالیکه تا کنون بیش از ۱۷۰۰ گونه ماهی از نظر سیتوژنتیکی مورد مطالعه قرار گرفته اند (Delvin & Nagahama, 2002).

همچنین شناسایی مارکریهای جنسی دارای اهمیت زیادی هم در تحقیقات کاربردی و هم پژوهش های پایه ای آبریان دارد. در تحقیقات کاربردی جهت پرورش تاسماهیان، شناسایی جنسیت در ماهیان نر و ماده با توجه به گونه مورد مطالعه، حداقل به ۵ تا ۱۲ سال زمان جهت رسیدگی جنسی نیاز دارد. مارکریهای مولکولی، امکان شناسایی زود هنگام ماهیان دستکاری شده ژنتیکی (نرزادها و ماده زادها) و همچنین ماهیان تغییر جنسیت یافته هورمونی را بدون نیاز به انتظار جهت رسیدگی جنسی فراهم می نماید (Delvin and Nagama, 2002). با توجه به اهمیت ماهیان ماده در تولید خاویار در تاسماهیان، تولید ماهیان دستکاری شده با امکان تعیین جنسیت مولکولی در مراحل اولیه پرورشی، از نظر اقتصادی برای آبرزی پروری این گونه مهم می باشد.

در مطالعات پایه ای، جداسازی و تشخیص مارکریهای جنسی در DNA ژنومی و گناد تاسماهیان اطلاعات مهمی را برای درک تکامل مکانیسم های تعیین جنسیت و تمایز گنادی در جنس های تاسماهیان فراهم می آورد.

در این تحقیق از ۱۰۰ جفت ترکیب پرایمرهای Mse+4 و Eco+3 نشانگر AFLP جهت مطالعه ژنوم نر و ماده تاسماهی ایرانی و فیل ماهی استفاده گردید. با بررسی حدود ۳۷۷۱ بانده در تاسماهی ایرانی و ۳۷۷۹ بانده در فیل ماهی و مشاهده الگوی باندهای یکسان در هر دو جنس نشان داد که هیچکدام از باندهای مذکور مربوط به ژن تعیین جنسیت در این دو گونه نبوده است.

نتایج این تحقیق مشابه تحقیقات قبلی در مورد تاسماهیان بود، بطوریکه Wuertz و همکاران (۲۰۰۶)، از ۳۹۶ ترکیب پرایمرهای AFLP در تاسماهی ایتالیایی (A.naccarii)، ۱۲۸ ترکیب در تاسماهی سیری (A.baerii) و ۲۹۶ ترکیب در تاسماهی روسی (A.gueldenstaedii)، تقریباً به ترتیب ۷۷۰۰، ۴۹۰۰ و ۹۱۰۰ عدد باند تولید نمود که از ۵۰ تا ۶۰۰ جفت باز طول داشتند اما هیچ مارکر جنسیتی شناسایی نشد.

همچنین Wuertz و همکاران (۲۰۰۶) در روش RAPD، از ۲۶۰، ۲۶۰ و ۱۸۰ پرایمر به ترتیب برای نمونه های A.naccarii، A.baerii و A.ruthenus استفاده نمود که در مجموع به ترتیب حدود ۸۰۰، ۱۱۰۰ و ۱۰۰ مارکر شناسایی شد (طول قطعه تکثیر شده ۱۰۰ تا ۱۵۰ جفت باز بود) اما هیچ مارکر جنسیتی شناسایی نشد. همچنین در روش ISSR (استفاده از پرایمرهای دارای لنگر تحلیل رفته) از ۲۸ پرایمر (متناسب با ۶۷٪ از پرایمرهای ارزیابی شده) در A.naccarii، ۳۹

پرایمر (۷۶٪) در A.baerii و ۲۷ پرایمر (۵۵٪) 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.

در مطالعه دیگری پورسینی و همکاران (۱۳۸۵)، از نشانگر AFLP جهت امکان تعیین جنسیت در ماهی ازون برون استفاده نمودند که نتایج این تحقیق نیز فقدان مارکر تعیین جنسیت را مشخص نمود.

کیوان شکوه و همکاران (۲۰۰۷) روی فیل ماهی با استفاده از ۳۱۰ پرایمر RAPD تحقیقی را انجام دادند و بیان داشتند که از مجموع ۴۱۴۶ باند تولید شده، باند اختصاصی جنسیت مشخص نگردید. همچنین در تحقیق دیگری که توسط این محقق و با استفاده از روش پروتئومیکس از مجموع ۵۰ نقطه منحصر بفرد در بیضه و تخمدان تاسماهی ایرانی انجام گرفت، هیچکدام از آنها بطور مستقیم به ژن تعیین جنسیت وابسته نبود (Keyvanshokoo et al., 2008).

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

در حالیکه روش RAPD برای شناسایی مارکرهای ژنتیکی جنسیت در برخی از گونه های ماهی از جمله *Clarias gariepinus* (Kovacs et al., 2000) و *Onchorhynchus mykiss* (Iturra et al., 1997, 2001) موفقیت آمیز بود، اما در سایر ماهی ها مانند *Salmo salar* موفقیتی را به دنبال نداشت (Li et al., 2002).

McGowan و Davidson (۱۹۹۸) نیز اعلام نمودند که با استفاده از ۲۰۰ پرایمر مختلف RAPD و بررسی الگوی بانندی 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.

Hett و همکاران (۲۰۰۵)، Hett & Ludwig (۲۰۰۵)، ژنهای DMRT1 و SOX9 (هر دو ژن جنسیت تعداد زیادی از مهره داران از جمله ماهی های استخوانی را تعیین نمودند) را در تاسماهی اروپایی (*Acipenser sturio*) بررسی نمودند، اما حضور اختصاصی این ژنها بطور اختصاصی در جنس نر و ماده تأیید نشد.

از لحاظ تئوری، نیافتن نشانگرهای جنسی می تواند دلیلی بر عدم وجود سیستم های تعیین جنسیت ژنتیکی و فعال بودن سیستم تعیین جنسیت محیطی دو گونه مورد مطالعه 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 می نماید (Delvin & Nagahama, 2002; Tave, 1993).

بنابراین از نظر تئوری، احتمال فقدان 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 ها 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. در صورتیکه 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 خواهد بود (Delvin & Nagahama, 2002).

به علت وجود تعداد زیادی کروموزوم در کاریوتایپ ماهیان خاویاری که در حدود نیمی از آنها را میکروکروموزومها تشکیل می دهند (Fontana & Colombo, 1974; Van Eenennaam *et al.*, 1998a,b; NowruzFashkhami *et al.*, 1996, 2000). تا کنون وجود کروموزومهای جنسی مشخص در کاریوتایپ این ماهیان گزارش نشده است.

از دیگر راههای بررسی مکانیسم تعیین جنسیت، محاسبه نسبت جنسی نتاج حاصل از ۲۰ الی ۵۰ تلاقی در شرایط کنترل شده می باشد. چنانچه نسبت مذکور از نسبت جنسی ۱:۱ انحراف چندانی نداشته باشد، می توان تا

حدودی از وجود سیستم تعیین جنسیت کروموزومی اطمینان حاصل نمود. در صورتیکه این نسبت، در تلاقی های مختلف از نسبت ۱:۱ انحراف زیادی را نشان دهد، احتمال وجود سیستم تعیین جنسیت محیطی وجود دارد که در این صورت انجام آزمایش هایی به منظور بررسی تأثیر متغیرهای فیزیکی از جمله درجه حرارت، تراکم، شوری، pH و نیز سایر عوامل محیطی بر نسبت جنسی افراد ضروری می باشد (Delvin & Nagahama, 2002).

در مورد تاسماهیان، استفاده از دستکاریهای کروموزومی نظیر ماده زایی (ژاینوژنز) و تغییر جنسیت (sex reversal) جهت مطالعه مکانیسم تعیین جنسیت، مورد استفاده قرار می گیرد. در گونه هایی که هتروگامت (XY) می باشند، ماده زایی منجر به تولید افراد تمام ماده خواهد شد ولی در گونه هایی که جنس ماده هتروگامت (ZW) است، ماده زایی علاوه بر تولید ماده (های ZW با نسبت بیشتر) منجر به تولید افرادی با ژنوتیپ (ZZ) و ماده های برتر (WW) می گردد (Van Eenennaam *et al.*, 1999).

بر اساس نسبت جنسی مورد انتظار و تفسیر نتایج بدست آمده، مکانیسم تعیین جنسیت مشخص می گردد. در تاسماهی سفید (*A. transmontanus*) در اثر القاء پلی پلوئیدی و ژاینوژنز میوزی و بر اساس نسبت نتاج، سیستم تعیین جنسیت در این گونه بصورت هتروگامتی ماده (ZW) معرفی شد (Van Eenennaam *et al.*, 1999).

Omoto و همکاران (۲۰۰۵) ژاینوژنز را در هیبرید فیل ماهی ماده × استرلیاد نر (بستر) القاء کردند که درصد نتاج ماده زاد بین ۷۰-۸۰٪ بود و از این طریق به سیستم تعیین جنسیت هتروگامتی ماده پی بردند.

Flynn و همکاران (۲۰۰۶) نیز با کمک ژاینوژنز در تاسماهی کوتاه پوزه *A. brevirostrum* موفق به تولید ۶۵٪ نتاج ماده زاد شدند و سیستم تعیین جنسیت را ZW معرفی کردند.

پورکاظمی و همکاران (۱۳۸۰) موفق به القای ژاینوژنز در فیل ماهی و تاسماهی ایرانی گردیدند. در این بررسی که تأیید ژاینوژنز با استفاده از مارکرهای میکروستلایت انجام شد بین ۷۰-۱۰۰٪ نتاج ماده زاد دیپلوئید حاصل گردید (گزارش منتشر نشده است).

همچنین Maturano و Holchleithner (۲۰۰۵) اقدام به تولید تاسماهی سبیری (*A. baerii*) تمام ماده در نسل دوم بمنظور تولید خاویار از طریق ژاینوژنز و تغییر جنسیت به نر نمودند. آنها در این بررسی پی بردند که سیستم تعیین جنسیت در این گونه هموگامتی ماده (XX) است.

از سوی دیگر در یکی از گونه های پاروپوزه (Polyodontid)، پاروپوزه شمال آمریکا (*Polyodon spatula*) سیستم هموگامتی ماده (ماده XX و نر XY) که مشابه سیستم تعیین جنسیت پستانداران است، به اثبات رسید (Mims et al., 1997). با توجه به تنوع و تعداد مارکرهای بررسی شده ماهیان خاویاری، وجود کروموزومهای جنسی در ماهیان خاویاری مورد تردید است (Wuertz et al., 2006). سیستم های ژنتیکی تعیین جنسیت در ماهی می تواند شامل کنترل چندژنی، فاکتورهای تعیین جنسیتی که تحت تأثیر ژنهای اتوزومی قرار می گیرند و نیز کروموزومهای جنسی کاملاً توسعه یافته باشد که بیانگر وجود مکانیسم های XX/XY و WZ/ZZ (Delvin & Nagahama, 2002) و یا حتی یک ژن اصلی تعیین جنسیت (Carter, 2004) است. از این گذشته جهت توضیح عدم شناسایی مارکرهای جنسیت، سیستم تعیین جنسیت مبتنی بر یک اثر دوزاژ ژنی با توجه به سطوح پلوئیدی در گونه های تاسماهیان باید مورد توجه قرار گیرد (Wuertz et al., 2006).

نتایج حاصل از اجرای این پژوهش نشان داد که تفکیک جنسیت تاسماهی ایرانی و فیل ماهی نر و ماده با استفاده از پرایمرهای بکار 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 بانندی یکسان در جنس نر و ماده در دو گونه مورد بررسی، به نظر می رسد که احتمالاً کروموزومهای جنسی در این دو گونه وجود ندارد و یا در صورت موجود بودن، در تحقیق حاضر مورد شناسایی قرار نگرفته است. نتایج ما این نظریه را که کروموزومهای مشابه یا همولوگ (homologous chromosomes) - که فاکتورهای تعیین جنسیت روی آنها وجود دارد- در گونه های تاسماهیان بطور کامل متمایز نشده اند، حمایت می کند.

گرچه، احتمال فوق بطور کامل نمی تواند نتیجه گیری شود و این احتمال وجود دارد که ژن جنسی فقط در مراحل اولیه تمایز جنسی عمل نماید. همچنین این احتمال را نیز باید در نظر گرفت که بعلت وجود مقدار کم محصول ژنی وابسته به جنس، حساسیت روشهای مورد استفاده کم می باشد.

با توجه به نتایج این تحقیق در دو گونه *A. persicus* و *H. huso* و پژوهش های مشابه و عدم کارآیی مارکرهای DNA از جمله AFLP، RAPD، ISSR و ... در شناسایی مارکرهای وابسته به جنس در دیگر گونه های تاسماهیان، از تکنیک cDNA-AFLP (Bachem et al., 1996) بمنظور بررسی بیان ژن در گناد نر و ماده تاسماهی ایرانی بالغ استفاده شد. این روش مؤثر، حساس و تکرارپذیر بوده، می تواند شناسایی سریع و ساده باندها را امکانپذیر سازد

و در آنالیزهای بیان ژن مفید واقع شود. بعلاوه با استفاده از این روش، غربالگری سیستماتیک تقریباً همه نسخه‌های یک ژن در یک سیستم بیولوژیکی با استفاده از مقادیر جزئی بافت اولیه، امکانپذیر است. cDNA-AFLP یکی از محدود روشهای بررسی بیان در سراسر ژنوم می باشد که قادر به یافتن ژنهایی است که تا بحال کلون نشده اند و یا حتی توالی آنها پیش بینی نشده است. این روش توانایی آشکار سازی نسخه هایی با فراوانی کم که شناسایی آنها حتی با استفاده از روش ریزآرایه (microarrays) مشکل است را نیز دارا می باشد (Kivioja *et al.*, 2005).

در پژوهش حاضر، از تکنیک cDNA-AFLP جهت شناسایی مارکرهای جنسی در گنادهای ماهیان بالغ تاسماهی ایرانی (*A. persicus*) استفاده شد. بنابر اطلاعات موجود، این پژوهش برای اولین بار در مورد گونه *A. persicus* انجام شده است. ۲ مارکر جنسی (TDF1, TDF2) از گنادهای تاسماهی ایرانی ماده توسط آنالیز cDNA-AFLP جدا شد و توسط واکنش RT-PCR در گنادهای تاسماهیان نر و ماده تأیید گردید. دو مارکر بدست آمده، اختصاصی جنس ماده بوده و در cDNA گنادهای تاسماهی ایرانی ماده قابل شناسایی بودند. اما پرایمرهای اختصاصی جنسیت در دو قطعه TDF1 و TDF2 در DNA ژنومی تاسماهی آشکار نشدند و فقط در سطح cDNA گنادهای تاسماهی ایرانی قابل تکثیر بودند. از میان ۲ مارکر پیدا شده، جستجوی BLAST در بانک اطلاعاتی NCBI، در سطح پروتئین مشخص نمود که TDF1 بیشترین شباهت (همولوژی) را با پروتئین Phosphatase C2 (۳۶/۶٪) دارد که احتمالاً مشخص می کند این مارکر در مکانیسم های تنظیم سیگنال دهی سلول (Cell signaling) جهت برقراری عملکرد طبیعی فیزیولوژیک سلول دخیل است.

مارکر دیگر (TDF2) بیشترین شباهت (۹۹/۸٪) را با پروتئین LaminB1 در Zebra fish گونه *Danio rerio* نشان داد که به نظر می رسد عملکرد این مارکر احتمالاً مربوط به پروتئین شرکت کننده در اسکلت سلولی (cytoskeleton) است که شبکه های سلولی را شکل می دهد و در عملکرد نوتروفیلی سلولی دخالت دارد (Malhas *et al.*, 2007).

همچنین در پژوهشی که با استفاده از مقایسه الگوهای پروتئینی روی ژن های دو بعدی تخمدان و بیضه با استفاده از پروتئومیکس انجام شد (Keyvanshokouh *et al.*, 2008)، ۴۸ نقطه ویژه در گنادهای نر و ۲ نقطه بدون مشابه در تخمدان پیدا شد. نقاط پروتئینی با استفاده از روش MALDI – TOF / TOF شناسایی شدند. پروتئینهای شناسایی شده در متابولیسم و تولید انرژی، ساختار سلولی، نسخه برداری و ترجمه، دفاع سلولی، حمل و نقل، تقسیم

سلولی دخالت داشته و هیچ کدام از آنها بطور مستقیم به ژنهای تعیین جنسیت وابسته نبودند که با نتایج تحقیق حاضر مبنی بر مرتبط بودن مارکرهای یافت شده با پروتئین های غیر جنسی هماهنگ می باشد.

اطلاعات بدست آمده در این پژوهش می تواند پایه و مبنایی برای مطالعات بیشتر در زمینه تعیین یا تمایز جنسیت در تاسماهی ایرانی (*A. persicus*) را فراهم آورد. تعداد ژنها یا مارکرهای مختص جنسیت در ماهیان تا به امروز در مقایسه با گروههای دیگر مهره داران بسیار کم است. به نظر می رسد بیشتر مارکرهای معرفی شده برای بیش از یک گونه یا حتی یک سویه کاربرد نداشته باشد (Iturra *et al.*, 1997).

پیشنهادها

پیشنهاد می گردد:

۱- جهت شناسایی مارکر وابسته به جنس با تاکید بر DNA ژنومی، از پرایمرهای بیشتر و آنزیم های متفاوت در تکنیک AFLP استفاده شود.

۲- با توجه به نتایج این پژوهش، بررسی cDNA موفقیت بیشتری دارا می باشد، بنابراین مطالعه تعیین جنسیت با استفاده از روش cDNA-AFLP استفاده از پرایمرهای متفاوت و با تعداد بیشتر و در مراحل مختلف تکاملی توصیه می گردد.

۳- از روشهای دیگر مطالعه بیان ژن از جمله EST Expressed sequence tag، Serial analysis of gene expression (SAGE) و RNA arbitrary primed PCR در سنین مختلف در افراد نر و ماده استفاده شود.

۴- بمنظور مشخص نمودن سیستم تعیین جنسیت در گونه های مختلف تاسماهیان، از آزمون نتاج با استفاده از مولدین تغییر جنسیت یافته به نر و ماده بصورت رفت و برگشت و یا با استفاده از دستگاریهای کروموزومی ماده زایی و نر زایی استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

نخست سپاس یزدان را که تنها او شایسته ستایش است و پرستش. وبعد از همه همکاران و همراهانی که در مراحل تصویب و اجرایی این پژوهش مرا یاری نمودند. سپاسگزارم.

- جناب آقای دکتر مطلبی ریاست محترم موسسه تحقیقات شیلات ایران
- جناب آقای دکتر پور کاظمی ریاست محترم انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری و مشاور پروژه
- جناب آقای دکتر بهمنی معاونت محترم پژوهشی انستیتو
- جناب آقای دکتر غرقی مدیریت محترم بخش زیست فناوری و فرآوری آبزیان
- جناب آقای مهندس شعبانی معاونت محترم اداری و مالی انستیتو
- جناب آقای مهندس نوروز فشخامی ریاست محترم بخش ژنتیک انستیتو
- جناب آقای مهندس کاظمی ریاست محترم بخش فیزیولوژی و بیوشیمی انستیتو
- جناب آقای مهندس محمدی پرشکوه مسوول محترم بخش تکثیر مجتمع تکثیر و بازسازی ماهی شهید بهشتی
- سرکار خانم مهندس عزیززاده و جناب آقای مهندس جلیل پور
- همکاران گرامی در بخش های ژنتیک، تکثیر و پرورش، فیزیولوژی و بیوشیمی و واحدهای مرتبط پشتیبانی در انستیتو
- داوران ارجمند پروژه به جهت ارائه نقطه نظرات ارزشمندشان

منابع

- ۱- اسدی، ف. ۱۳۸۰. تنوع ژنتیکی و ساختار آن در درون و بین جوامع گیاهی از گونه های مختلف صنوبر و تلاقی پذیری بین ارقام بومی و غیر بومی آن. رساله دکتری رشته جنگلداری- دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس. صفحه ۲۴۱.
- ۲- امین لاری، م. ۱۳۸۴. پیش درآمدی بر مهندسی ژنتیک. انتشارات دانشگاه شیراز. صفحات ۲۸۵-۲۱۳
- ۳- بهمنی، م. و کاظمی، ر. ۱۳۷۷. مطالعه بافت شناسی غدد جنسی در تاسماهیان جوان پرورشی. مجله علمی شیلات ایران، شماره ۱، سال هفتم، صفحات ۱۶-۱.
- ۴- پورسیفی. ر. ۱۳۸۵. تعیین جنسیت در تاسماهی ازون برون با استفاده از روش AFLP. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه فردوسی مشهد.
- ۵- پور کاظمی، م.، محسنی، م.، نوروز فشخامی، م.، بهمنی، م.، طاهری، ع. و یارمحمدی، م. ۱۳۸۶. دورگه گیری بین فیلماهی (*Huso huso*) و تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و مقایسه روند رشد آنها. ۱۳۸۶. وزارت جهاد کشاورزی، سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، گزارش نهایی طرحهای تحقیقاتی. انستیتو تحقیقات ماهیان خاویاری. ۵۸ ص. شماره ثبت ۸۵/۱۰۹۲.
- ۶- پور کاظمی، م.، یارمحمدی، م.، برادران نویری، ش.، حسن زاده، م.، چکمه دوز، ف. و رضوانی، س. ۱۳۸۶. 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 گزارش نهایی طرحهای تحقیقاتی. انستیتو تحقیقات ماهیان خاویاری. ۶۳ ص. شماره ثبت ۸۶/۱۲۶۰.
- ۷- حلاجیان، ع.؛ کاظمی، ر.؛ محسنی، م.؛ بهمنی، م. و یوسفی جور دهی، ا. ۱۳۸۶. 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 ۱۶.
- ۸- مقیم، م.، وجهی، ع.، وشکینی، ع.، و مسعودی فرد، م. ۱۳۸۰. تعیین جنسیت تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) بوسیله اولتراسونوگرافی. مجله علمی شیلات ایران، شماره ۳، سال دهم، صفحات ۷۱ تا ۷۸.
- ۹- نقوی، م.، قره یاضی، ب. و حسینی سالکده، ق. ۱۳۸۶. نشانگرهای مولکولی. انتشارات دانشگاه تهران. چاپ دوم.

- Aida, T., 1921 . on the inheritance of colour in fresh-water fish *Aplocheilichthys latipes* temminck and *Acipenser*. with special reference to sex – linked inheritance. *Cenetics* 6.55 H – 573.
- Allendorf, F. W., Galleman, W. A., Thorgaard, G. H., 1994. Sex-linkage of two enzyme loci in *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout). *Heredity* (72) 498-507.
- Arkhipchuk, V. V., 1995. Role of chromosomal and genome mutation in the evolution of bony fishes. *J. Hydrobiol.* (31), 55-65.
- Bachem, C. W. B., Oomen, R. J. F. J., Visser, R. G. F., 1998. Transcript Imaging with cDNA-AFLP: A Step-by-Step Protocol. *Plant Molecular Biology Reporter* (16) 157-173.
- Billard, R. 2000. Biology and control of reproduction of sturgeon in fish farm. *Iranian Journal of Fisheries Science* (2) 1-20.
- Blankenship, H. L., Leber, U. M., 1995. A responsible approach to marine stock enhancement. *American Fisheries Society Symposium* (15) 167-175.
- Bull, J. J. 1985. sex determining mechanisms : an evolutionary perspective. *Experientia* (41) 1285-1296.
- Capel, B. 1998. sex in the 905 : SRY and the switch to the male pathway *Anna. Rev. Physiology*. 60 – 497 – 523. capriglione . T . morescal
- Carbone, P., vittari, R., catalano, E., Maculoso, 1987 . chromosome sex determination and Y. autosom fusion in *blennius tentacularis* Brannich . 1765 (Pisces, Blennidae) *J. Fish biology* (31) 597- 602.
- Cline, T., W. Meyers, B. J., 1996. Vivala difference. males and females in fish worms. *Annu. Rev. Genet.* (30) 637-702.
- Carrascol, L. A. P., Penman, D. J., Bromage, N., 1999. Evidence for the presence of sex chromosomes in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from synaptonemal complex analysis of xx , yy And yy genotypes. *Aquaculture* (173) 207-218.
- Cui, J. Z., Shen, X. Y., Gong, Q. L., Yang, G. P., Gu, Q. Q., 2006. Identification of sex markers by cDNA-AFLP in *Takifugu rubripes*. *Aquaculture* (257) 30-36.
- Delvin, R. H., Nagahama, Y., 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* (208) 191-364.
- Felip, A., Young, W. P., Wheeler, P. A., Thorgaard, G. H., 2005. An AFLP- based approach for the identification of sex-linked markers in Rainbow Trout (*Onchorynchus mykiss*). *Aquaculture* (247) 35-43.
- Fernando, A. A., Phang, V. P. E., 1989. Inheritance of the tuxedo and blond tuxedo color pattern phenotypes of guppy, *Poecilia reticulata*. *Proceedings of The Second Asian Fisheries Forum, Tokyo, Japan, The Second Asian Fisheries Forum, Tokyo, Japan*, pp .487-490.
- Ferreira, 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* (81) 245 – 252.
- Fontana, F., 1976. Nuclear DNA content and cytometry of erythrocytes of *Huso huso* L., *Acipenser naccarii* Bonaparte. *Caryologia* (29) 127-137.
- Fernando, A. A., Phang, V. P. E., 1990. Colour pattern inheritance in three domesticated varieties of guppy, *Poecilia reticulata*. *Genet. Aquaculture. III* 85 - 320.
- Fukada, S., Tanaka, M., Iwaya, M., Nakajima, M., Nagahama, Y., 1995. The Sox gene family and its expression during embryogenesis in the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*). *Dey., Growth Differ.* (37) 379-385.
- Gold. J. R. Karel, W. J. Stran. M. R. 1980. chromosome formula of North American fishes. *Prog. Fish. Cult.* (42) 10 – 23.
- Griffith, R., Orr, K. J., Adam, A., and Barber, I., 2000. DNA sex identification in the three spined stickleback. *Journal of Fish Biology* (57) 1331-1334.
- Guan Kobayash, T., Nagahama, Y., 2000. Sexually dimorphic expression of two types of DM (Doublesex Mab – 3) – domain genes in a teleost fish. The tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biochemistry Biophysics* (272) 662 – 666.
- Husabye, H., Lund, S., Moller, M., Sunde, A., and Krokan, H. E., 1994. A Bkm-related DNA sequences gives individual DNA fingerprints in turbot (*Scophthalmus maximus*), but neither Bkm-related, human SRY or human ZFY probes detect genetic sex differences. *Comp. Biochemistry Physiology* (B1078) 69-73.
- Hett, A. K., Pitra, C., Jenneckens, I., Ludwig, A., 2005. Characterization of *sox9* in European Atlantic sturgeon (*Acipenser sturio*). *Journal of Heredity* (96) 150-154.
- Hett, A. K., Ludwig, A., 2005. SRY-related (SOX) genes in the genome of European Atlantic sturgeon (*Acipenser sturio*). *Genome* (48) 181-186.

- Ittura, P., Medrano, J.F., Bagley, M., lam, N., Vergara, N., Marin, J.C., 1997. Identification of sex chromosome molecular markers using RAPDs and fluorescent in situ hybridization in rainbow trout. *Genetica* (101) 209-213.
- Ittura, P., Lam, N., de la Fuente, M., Vergara, N., Medrano, J.F., 2001. Charactrization of sex chromosomes in rainbow trout and coho salmon using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Genetica* (111) 125-131.
- Keyvanshokoo, S., pourkazemi, M., Kalbasi, M.R., 2007. The RAPD technique failed to identify sex-specific sequences in beluga (*Huso huso*). *Journal of Ichthyology* (23) 1-2.
- Keyvanshokoo, S., Kalbasi, M.R., Hossinkhani, S., vaziri, B., 2009. Comparative proteomics analysis of male and female Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) gonads, *Animal Reproductive Science*, in press.
- Kivioja, T., Arvas, M., Saloheimo, M., Penttila M., Ukkonen, E., 2005. Optimization of cDNA-AFLP experiments using genomic sequence data. *Genome analysis* (21) 2573-2579.
- Koopman, P., 2001. Sry, Sox₉ and mammalian sex determination. *EXS* (91) 25-56.
- Malhas, A., Lee, C., Sanders, R., Saunders, N., Vaux, D., 2007. Defects in lamin B1 expression or processing affect interphase chromosome position and gene expression. *The Journal of Cell Biology*, 176 (5) 593-603
- Marchand, O., Govoroun, M., D'Cotta, H., McMeel, O., Lareyre, J.-J., Bernot, A., Laudet, V., Guiguen, Y., 2000. DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochim. Biophys. Acta* (1493) 180-187.
- Kovacs, B., Egedi, S., Bartfai, R., Orban, L., 2001. Male – specific DNA markers from African catfish (*Clarias gariepinus*). *Genetica* (110) 267-276.
- Kraak, S. B. M. de 1002e. E. M. A. 1993. A new hypothesis on the evolution of sex determination in vertebrates big females ZW. Big males xy. *Nethj Zool.* (43) 260- 273.
- Laudet, V., Guiguen, Y., 2000. DMRT 1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochim. Biophys. Acta* (1493) 180-187.
- Logan, S.H., Johnston, W.E. and Doroshov, S.I., 1995. Economic of joint production of sturgeon (*Acipenser transmontanus* Richardson) and roe for caviar. *Aquaculture* (130) 299-316.
- Liu, Q., coudie, C.A., Simco, B.A., Davis, K.B., 1996. Sex linlage of glucose phosphate isomerase – band mapping of the sex determining gene in channel catfish. *Cytogenet cell Genet*, 282 – 285
- Li, Y., Gold, J.R. 1991. Cytogenetic studies in North American minnows (Cyprinidae): 22. Chromosomal nucleolar organizer regions in the genus Pimephales. *Canadian Journal Zoology* (69) 2826-2830.
- Li, Y., Hill, J.A., Yue, G.H., Chen, F., Orban, L., 2002. Extensive search does not identify genomic sex markers in Tetradon nigroviridis. *Journal of Fish Biology* (61) 1314-1317.
- Martin, I., Baker, B.S., 1998. The evolutionary dynamics of sex determination. *Science* (281) 1990-1994.
- Marchand, O., Govoroun, M., D'Cotta, H., McMeel, O., Lareyre, J.-J., Bernot, A., Laudet, V., Guiguen, Y., 2000. DMRT 1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochim. Biophys. Acta* (1493) 180-187.
- Matsuda, M., 1998. Sex determination in the telost medaka *oryzias latipes*. *Annu Rev Genet* 2 – 05 – 293 – 307
- Matsuda, M., Sotoyama, S., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M., 1999. Male-specific restriction of recombination frequency in the sex chromosomes of the medaka, *Oryzias latipes*. *Genetic Research* (73) 225-231.
- Maturano, S. and Hochleithner, M., 2005. All-female momosex Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*) for caviar production. *Proceeding of 4th International sturgeon Symposium*. Ramsar. Iran.
- McGowan, C., Davidson, W.S., 1998. The RAPD technique fails to detect a male-specific genetic marker in Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology* (53) 1134-1136.
- Mims, S., Shelton, W., Linhart, O., Wang, C., 1997. Induced meiotic gynogenesis of Paddlefish, *Plyodon spatula*. *Journal of Word Aquaculture Society*. 28(4), 334-343.
- Nagahama, Y., 1999. Gonadal steroid hormones: major regulators of gonadal sex differentiation and gameto-genesis in fish. *Sixth Int. Symp. on the Reproductive Physiology of Fish*, Bergen, Norway.
- Nakamura, M., Kobayashi, T., chang, X., Nagahama, Y., 1998. gonadal sex differentiation in teleost fish. 362 – 372
- Nakayama, I., Foresti, F., Tewari, R., Schartl, M., Chourrout, D., 1994. Sex chromosome polymorphism and heterogametic males revealed by two cloned DNA probes in the ZW/ZZ fish *Leporinus elongatus*. *Chromosoma* (103) 31-39.

- Nanda, I., Volff, J., N., Weis, S., Koerting, C., Froschauer, A., Schmid, M., Scharlt, M., 2002. Amplification of a long terminal repeat-like element on the Y chromosome of platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *Chromosoma* (109) 173-180.
- Naruse, K., Fukamachi, S., Mitani, H., Kondo, Matsuoka, T., Kondo, S., Hanamura, N., Morita, Y., Hasegawa, K., Nishigaki, R., Shimada, A., Wada, H., Kusakabe, T., Suzuki, N., Kinoshita, M., Kanamori, A., Shima, A., 2000. A detailed linkage map of medaka, *Oryzias latipes*: comparative genomics and genome evolution. *Genetics* (154) 1773-1784.
- NowruzFashkhami, M.R., 1996. On the karyotypes of *Acipenser persicus*, *A. stellatus* and *Huso huso* from Iranian waters of the Caspian sea. *Stug. Quart.* 4, p.7.
- NowruzFashkhami, M.R., Pourkazemi, M., Baradarannoveiri, S., 2000. Chromosome study of Persian sturgeon *Acipenser persicus* B. *Cytologia* (65) 197-202.
- Nyman Hammar, J., Gydemo, R., 1984. Lethol, sex linked genes associated with homozygosity at the esterase – Z locus in Arctic char proceeding of the third. *ISACF. PD.* 125-130
- Patel, P.G., Angus, R.A., Bej, K., 1993. Simple repetitive DNA sequences associated with heterogametic sex in mosquitofish. *Journal Ala. Academic Science.* 64- 93.
- Pandian, T.J., Varadaraja, K., 1990. Development of monosex female *Oreochromis mossambicus* broodstock by integrating gynogenetic technique with endocrine sex reversal. *J. Exp. Zool.* (255) 88-96.
- Pourkazemi, M., Skibinski, D.O.F., 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. *Journal of Applied Ichthyology.* Vol. (15) 23-28.
- Pourseifi, Gh. R., Nasiri, M.R., Pourkazemi, M., Eftekhari Shahroudi, F., 2006. Investigation of sex marker in *Acipenser stellatus* with using of AFLP markers. MSc thesis, Mashhad Universities. pp 105.
- Ren, X., Yu, Q., Cui, J., Chang, Z., 1993. Fluorescence banding studies in fish chromosomes. *Acta Genetic Science* (20) 116-121.
- Scharlt, M., 1990, Homology of melanoma-inducing loci in the genus *Xiphophorus*. *Genetics* (126) 1083-1091.
- Scharlt, M., Adam, D., 1992, Molecular cloning, structural characterization, and analysis of transcription of the melanoma oncogene of *Xiphophorus*. *Pigm. Cell Res.*, 173-180.
- Tagu, D., & Maussard, C., 2006. *Techniques for Molecular Biology.* Science Publisher. pp 226.
- Thorgaard, G.H., 1983b. Chromosomal differences among rainbow trout populations. *Copeia*, 650-662.
- Tiersch, T.R., Simco, B.A., Davis, K.B. Wachtel, S.S., 1992. Molecular genetics of sex determination in channel catfish: studies on SRY, ZFY, Bkm, and human telomeric repeats. *Biological Reproduction* (47) 185-192.
- Van Eenennam, A.L., Van Eenennam, J.P., Medrano, J.F., Doroshov, S.L. 1999. Evidence of female heterogametic genetic sex determination in White sturgeon. *Journal of Heredity* (90) 231-233.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* (23) 4407-4414.
- Welsh, J. and Mc Clelland, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, *Nucleic Acids Research* (18) 7213-7218.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K., J., Rafalski, J.A., 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* (18) 6531-6535.
- Weis, S., Scharlt, M., 1998. The macromelanophore locus and the melanophore oncogene *xmrk* are separate genetic entities in the genome of *Xiphophorus*. *Genetics* (149) 1909-1920.
- Withler, R.E., McPhail, J.D., Devlin, R.H., 1986. Electrophoretic polymorphism and sexual dimorphism in the fresh water and anadromous threespine sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) of the Little Campbell River, British Columbia. *Biochem. Genet.* (24) 701-713.
- Wing, O., 1922. One-sided masculine and sex-linked inheritance in *Lebistes reticulatus*. *J. Genet.* (12) 137-144.
- Wuertz, S., Gaillard S., Barbisan F., Carle, S., Congiu, L., Forlani, A., Aubert, J., Kirschbaum, F., Tosi, E., Zane, L., Grillasca, J.P., 2006. Extensive screening of sturgeon genome by random screening techniques revealed no sex-specific marker. *Aquaculture* (258) 685-688.
- Yamamoto, E., 1999. Studies on sex manipulation and production of cloned populations in hiram. *Paralichthys olivaceus*. 235 – 246.
- Yamamoto, T., 1969. Sex differentiation. In: Hoar, W., Randall, D. (Eds.), *Fish Physiology.* Academic Press, pp. 117-175.
- Young, W.P., Wheeler, P.A., Coryell, V.H., Keim, P., Thorgaard, G.H., 1998. A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids. *Genetics* (148) 839-850.

پیوست

نتایج تعیین توالی پلاسمیدهای نوترکیب توسط شرکت فرا پژوه

P150-1-PV150F sequence exported from P150-PV150F.ab1

AGGGTTTCGGAACAGGAGANCCGACGNGGGAGCTTCCAGGGGGAAAACGCCCTGGTATCTTTAT
 AGTCCTGTTCGGGTTTCGCCACCTNTGACTTGAGCGTCNATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGA
 GCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGGCCTTTTGTCA
 CATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGAT
 ACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCC
 CAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCAGCAGAGTTTC
 CCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGAATTAATGTGAGTTAGCTACTCATTAGGCACCCC
 AGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACAC
 AGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAATACGACTACTATAGGGAAAGCTCGGTAC
 CACGCATGCTGCAGACGCGTTACGTATCGGATCCAGAATTCGTGATTGACTGCGTACCAATTCATA
 CCTACCGCTTCTCTGAATGTGTAATAAATTGTAGTTACAACACTATAACATGCATTTTGTG
 TTATCTCAGGACTCATCAATCTGAATTCGTGCAACAAGCTTCTCGAGCCTAGGCTAGCTCTAGACCA
 ACAACGTGTGGGGGCCCGAGCTTCGCGGCCGCTGTATTCTAGTCCCCNAAGCCC

P150-2-M13F

GTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAAACGCCT
 GGTATCTTTATAGTCCTGTTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCA
 GGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGG
 CCTTTTGTCTACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGA
 GTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGG
 AAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCAG
 ACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGAATTAATGTGAGTTAGCTACTCATT
 AGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACA
 ATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAATACGACTACTATAGGGAAA
 GCTCGGTACCACGCATGCTGCAGACGCGTTACGTATCGGATCCAGAATTCGTGATTGACTGCGTAC
 CAATTCATACCTACCGCTTCTCTGAATGTGTAATAAATTGTAGTTACAACACTATAACATGC
 CATTTTGTGTTACTCAGGACTCATCAATCTGAATTCGTGCAACAAGCTTCTCGAGCCTAGGCTAGCTC
 TAGACCACACGTGTGGGGGCCCGAGCTTCGCGGCCGCTGTATCATAGTCCCNAN

<P150-3-M13F

TCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAANCAGGAGAGCGCACGAGGGGAGCTTCCAGGGGGAAAACGCCT
 GGTATCTTTATAGTCCTGTTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCA
 GGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGG
 CCTTTTGTCTACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGA
 GTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGG
 AAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCAG
 ACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGAATTAATGTGAGTTAGCTACTCATT
 AGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACA
 ATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAATACGACTACTATAGGGAAA
 GCTCGGTACCACGCATGCTGCAGACGCGTTACGTATCGGATCCAGAATTCGTGATTGACTGCGTAC
 CAATTCATACCTACCGCTTCTCTGAATGTGTAATAAATTGTAGTTACAACACTATAACATGC
 CATTTTGTGTTACTCAGGACTCATCAATCTGAATTCGTGCAACAAGCTTCTCGAGCCTAGGCTAGCTC
 TAGACCACACGTGTGGGGGCCCGAGCTTCGCGGCCGCTGTATCATAGTCCCNAN P150-4-M13F
 CCAAGGGGGGTA AAAACCGCCNNGGGGAATNNNTNNNATTANNTCCNNGGTNNGGGGGTTTNCGCC
 NACCTTCTTGAACTTTNAAGGCGTNNGAATNNNTTNGTGTGCTNCGTTCANGGGGGGCNGGAGG
 CNTNTGGNAAAAANCGCCCAGCAACGCGGCCCTTTTTTANGGTTCTNTGGCTNTTTGCTGGCCCTTT
 TGCTCGCATGTTCTNTTCTGCGTTATCNCCNGATTNNGTGGGATAACCGTATTACCGCCTTTGA
 GTGAGCTGATTGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTNAGCGAGGAAGCGGA
 AGAGCGNCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGNGTTGGCCGATTCATTAATGCAGNNGGCACG
 ACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGAATTAATGTGAGTTAGCTACTCATT
 AGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACA
 ATTTACACAGGAAACAGCTATGNCCATGATTACGCCAAGCTCTAATACGACTCNCATAGGGAAA
 GCTCGGTACCACGCATGCTGCAGACGCGTTACGTATCGGATCCAGAATTCGTGATTGACTGCGTAC
 CAATTCATACCTACCGCTTCTCTGAATGTGTAATAAATTGTAGTTACAACACTATAACATGC
 CATTTTGTGTTACTCAGGACTCATCAATCTGAATTCGTAGACAAGCTTCTCGAGCCNNGGCTAGCTC
 TAGACCACACGTGTGGGGGCCCGAGCTTCGCGGCCGCTGTATCATAGNCCCANN CNNT

P150-5-M13F

GGCGGCAGGGTTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTA
TAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGG
AGCCTATGGAAAACGCCAGCAACCGCGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTC
ACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGA
TACCGCTCGCCGACGCCAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCC
CAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTC
CCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCC
AGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACAC
AGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAATACGACTCACTATAGGGAAAGCTCGGTAC
CACGCATGCTGCAGACGCGTTACGTATCGGATCCAGAATTCGTGATTGACTGCGTACCAATTCATA
CCTACCGCTTCTCTGAATGTGTAATAAATTGTAGTTACAACGACTATAACATGCATTTTGTG
TACTCAGGACTCATCAATCTGAATTCGTGACAAGCTTCTCGAGCCTAGGCTAGCTCTAGACCAC
ACGTGTGGGGGCCCGAGCTCGCGGCCGCTGTATTCATAGTCCCNAN

P2001-M13F sequence exported from P2001-M13F.ab1

TGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACCGCGCCTTTTTACGGTTCCTGGCC
TTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTAC
CGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCG
AGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCA
GCTGGCACGACAGGTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAG
CTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGA
GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAATACGACTCAC
TATAGGGAAAGCTCGGTACCACGCATGCTGCAGACGCGTTACGTATCGGATCCAGAATTCGTGATT
GACTGCGTACCAATTCATACTCCATCTGACGACCAGAATCCACCTCCACCAACCGGGCCTCGAGAT
TTCTGCGAGTATCCTTGACCTCCTCTTCAAACATGTTCTTTTCGGAACCTAGCTCCTCGCTGAGGCTC
TGGCAGCGGTTCTCCAGGTCCACTCTCAGGAGGGTCTCCTCTTCCAGCTGCTTCGTTACTCAGGACT
CATCAATCTGAATTCGTGACAAGCTTCTCGAGCCTAGGCTAGCTCTAGACCACACGTGTGGGGGC
CCGAGCTCGCGGCCGCTGTATCATAGTNCC

P200-2-M13F sequence exported from P2002-M13F.ab1

NACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACG
CGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCT
GATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCAACGACC
GAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGC
GCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCG
CAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCT
CGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC
GCCAAGCTCTAATACGACTCACTATAGGGAAAGCTCGGTACCACGCATGCTGCAGACGCGTTACGT
ATCGGATCCAGAATTCGTGATTGACTGCGTACCAATTCATACTCCATCTGACGACCAGAATCCACC
TCCACCAACCGGGCCTCGAGATTTCTGCGAGTATCCTTGACCTCCTCTTCAAACATGTTCTTTTCGGA
ACTTAGCTCCTCGCTGAGGCTCTGGCAGCGGTTCTCCAGGTCCACTCTCAGGAGGGTCTCCTCTTC
CAGCTGCTTCGTTACTCAGGACTCATCAATCTGAATTCGTGACAAGCTTCTCGAGCCTAGGCTAGC
TCTAGACCACACGTGTGGGGGCCCGAGCTCGCGGCCGCTTATCNTAGTNCCNA

P200-3-M13F sequence exported from P2003-M13F.ab1

TTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACCGCG
CCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATT
CTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCAACGACCAGC
GCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGT
TGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGCTGAGCGCAA
CGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGT
ATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCC
AAGCTCTAATACGACTCACTATAGGGAAAGCTCGGTACCACGCATGCTGCAGACGCGTTACGTATC
GGATCCAGAATTCGTGATTGACTGCGTACCAATTCATACTCCATCTGACGACCAGAATCCACCTCC
ACCAACCGGGCCTCGAGATTTCTGCGAGTATCCTTGACCTCCTCTTCAAACATGTTCTTTTCGGAAC
CTAGCTCCTCGCTGAGGCTCTGGCAGCGGTTCTCCAGGTCCACTCTCAGGAGGGTCTCCTCTTCCAG
CTGCTTCGTTACTCAGGACTCATCAATCTGAATTCGTGACAAGCTTCTCGAGCCTAGGCTAGCTCT
AGACCACAACGTGTGGGGGCCCGAGCTCGCGGCCGCTTATCTATAGTCCCNAA

نتایج Protein BLAST مارکر AP2

3'5' Frame 2

D E S Stop V T K Q L E E E T L L R V D L E N R C Q S L S E E L E F R K N Met F E E E V K D T R R N L
E A R L V E V D S G R Q Met E Y E L V R S

Sequences producing significant alignments:	score (Bits)	E Value
emb CAB58234.1 lamin B1 protein [Danio rerio]	99.8	6e-20 G
gb AAH68414.1 Lmnb1 protein [Danio rerio]	99.8	6e-20 G
ref NP_694504.2 lamin B1 [Danio rerio] > gb AAH44402.1 Lamin...	99.8	6e-20 UG
dbj BAC37665.1 unnamed protein product [Mus musculus]	95.5	1e-18 G
ref XP_531892.2 PREDICTED: similar to Lamin B1 [Canis famili...	95.5	1e-18 UG
gb AAC96023.1 lamin B [Mus musculus]	95.1	1e-18 G
ref NP_001096765.1 lamin B1 [Bos taurus] > gb AAI51305.1 LMN...	95.1	1e-18 UG
gb EDM14499.1 rCG46767, isoform CRA_c [Rattus norvegicus]	95.1	1e-18
emb CAA34677.1 unnamed protein product [Mus musculus]	95.1	1e-18 G
ref NP_034851.2 lamin B1 [Mus musculus] > sp P14733 LMNB1_MOU...	95.1	1e-18 UG
ref XP_001158070.1 PREDICTED: lamin B1 isoform 1 [Pan troglo...	95.1	1e-18 UG
ref XP_001158129.1 PREDICTED: lamin B1 isoform 2 [Pan troglo...	95.1	1e-18 UG
ref NP_446357.1 lamin B1 [Rattus norvegicus] > sp P70615 LMNB...	95.1	1e-18 UG
gb EDM14498.1 rCG46767, isoform CRA_b [Rattus norvegicus]	95.1	1e-18
ref XP_001097340.1 PREDICTED: lamin B1 isoform 2 [Macaca mul...	95.1	1e-18 UG
ref XP_517906.2 PREDICTED: lamin B1 isoform 3 [Pan troglodytes]	95.1	2e-18 UG
ref XP_001097237.1 PREDICTED: lamin B1 isoform 1 [Macaca mul...	95.1	2e-18 UG
ref XP_001503253.1 PREDICTED: similar to Lamin-B1 [Equus cab...	93.2	5e-18 UG
ref XP_001506656.1 PREDICTED: similar to Lamin-B1 [Ornithorh...	93.2	5e-18 UG
gb EAW48845.1 lamin B1, isoform CRA_a [Homo sapiens]	93.2	6e-18 G
gb AAH12295.1 Lamin B1 [Homo sapiens] > gb ABM82518.1 lamin ...	92.8	7e-18 G
ref NP_005564.1 lamin B1 [Homo sapiens] > sp P20700 LMNB1_HUM...	92.8	7e-18 UG
emb CAJ83381.1 lamin B1 [Xenopus tropicalis]	88.2	2e-16 G
ref NP_989198.1 lamin B1 [Xenopus tropicalis] > gb AAH63368.1...	88.2	2e-16 UG
ref NP_990617.1 lamin B1 [Gallus gallus] > sp P14731 LMNB1_CH...	88.2	2e-16 UG
ref NP_001080053.1 lamin B1 [Xenopus laevis] > gb AAH41185.1 ...	87.8	2e-16 UG
gb AAC31543.1 lamin B1 [Xenopus laevis]	87.8	2e-16 G
gb AAH84199.1 LOC397911 protein [Xenopus laevis]	86.3	7e-16 G
ref NP_001081547.1 lamin L(I) [Xenopus laevis] > sp P09010 LA...	86.3	7e-16 UG
ref XP_001521528.1 PREDICTED: similar to lamin B2, partial [...]	85.1	2e-15 UG
gb AAH78178.1 LMNB1 protein [Homo sapiens]	84.7	2e-15 G
ref NP_571077.1 lamin b2 [Danio rerio] > emb CAB41015.1 lami...	84.7	2e-15 UG
gb AAI62105.1 Lamin B2 [Danio rerio]	84.7	2e-15 G
emb CAF90344.1 unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	83.2	5e-15
ref XP_001372674.1 PREDICTED: similar to lamin B2, [Monodelp...	81.3	2e-14 UG
ref NP_990616.1 lamin B2 [Gallus gallus] > sp P14732 LMNB2_CH...	80.5	4e-14 UG
ref XP_216850.4 PREDICTED: similar to Lamin-B2 [Rattus norve...	76.3	7e-13 UG
gb EDL89210.1 similar to Lmnb2 protein (predicted) [Rattus n...	75.9	8e-13
dbj BAB32978.1 lamin B2 [Carassius auratus]	70.5	4e-11
emb CAL49390.1 lamin B2 [Xenopus tropicalis]	70.5	4e-11 G
gb AAH77526.1 LOC397912 protein [Xenopus laevis]	70.1	5e-11 G
ref NP_001095239.1 lamin LII [Xenopus laevis] > sp P21910 LAM...	70.1	5e-11 UG

Abstract

Due to high maturation age in sturgeons and lack of morphologic differences between male and female even in brood stocks, sex determination is difficult in these species. In this research with using of AFLP approach and 100 primer combinations, male and female genomic DNA of 20 individuals in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) and beluga (*Huso huso*) were investigated. Ligation was carried out with using of *Mse*I and *Eco*RI, and then adapters were ligated with using of T4 DNA Ligase. Fragments amplification was done through two steps PCR and electrophoresis on denature poly acrylamid and stained by silver staining. Data derived from banding patterns were scored as 0 (absence) and 1 (Presence). A set of 100 (*Eco*+3 and *Mse*+4) primer combinations in *A. persicus* and *H. huso* yielded approximately a total of 3771 and 3779 scorable bands, respectively of which 30% in *A. persicus* and 29.6% in *H. huso* were polymorphic. The fragments ranged from 50 to 600 bp without revealing any sex – specific markers. So we used cDNA-AFLP approach in order to analysis of gene expression in 8 female and 8 male Persian sturgeon gonads. Results revealed two cDNA markers in female gonad (TDF1, TDF2) and they verified with RT-PCR in male and female gonads cDNA. But unfortunately they didn't verify in genomic DNA. According to this research results and previous researches, it seems that sturgeons may have not sex chromosomes or the methods were used couldn't determine them.

Key words: Persian sturgeon, Beluga, sex marker, AFLP, cDNA-AFLP

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.