مجله علوم و فنون هسته‌ای، جلد ۹۳، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۹

Journal of Nuclear Science and Technology
Vol. 93, No. 3, 2020

ماده‌زایی میوزی با استفاده از پرتو گاما در ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* و تعیین جنسیت با استفاده از ژن SDY

غلامرضا شاه‌حسینی*

پژوهشکده‌ی کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی، صندوق پستی: ۱۴۹۸-۳۱۴۶۵، کرج- ایران

*Email: gshahhosseini@aeoi.org.ir

مقاله‌ی پژوهشی

تاریخ دریافت مقاله: ۹۹/۷/۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۹۹/۸/۱۷

چکیده

ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) گونه ماهی با ارزش دریای خزر و حوزه اطراف آن است که به‌عنوان گونه‌ای مناسب در صنعت شیلات کشورمان مطرح است. در این پژوهش تخم و اسپرم از ماهی آزاد دریای خزر استحصال شد. برای انجام ماده‌زایی (Gynogenesis) اسپرم با دزهای ۴۵۰، ۶۰۰، ۷۵۰، ۹۰۰ و ۱۰۵۰ Gy توسط پرتو گاما (^{60}Co) پرتودهی گردید. در مرحله بعد لقاح به‌صورت خشک با مخلوط نمودن تخمک و اسپرم‌های پرتو دیده انجام شد. جهت القای پلوییدی حمام آبی با درجه حرارت‌های ۲۶ تا ۲۸°C برقرار گردید. نمونه‌گیری از باله دمی ماهی‌های تیمارهای مختلف صورت گرفت و استخراج DNA صورت گرفته و تعیین جنسیت با استفاده از پرایمرهای E۱S۱ و E۲AS۴ مربوط به ژن SDY صورت پذیرفت. پس از رسیدن ماهیان آزاد به وزن مناسب با استفاده از بافت‌شناسی کلاسیک جنسیت مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که در گروه ۹۰۰ Gy میزان لقاح، بازماندگی لارو نسبت به سایر گروه‌های گاینوژن با اختلاف معنی‌داری بیش‌تر بود (p<۰/۰۵). تعیین جنسیت با استفاده از روش‌های مولکولی نشان داد که در تیمار ماده‌زایی شده با دز ۴۵۰ Gy هنوز جنس نر (۱ نمونه از ۵ نمونه) وجود دارد؛ این در صورتی بود که در دزهای دیگر جنس نر وجود نداشت. اما در کلیه نمونه‌های بافت‌شناسی نشانه‌ای از گناد جنسی نر مشاهده نمی‌شود. با توجه به این نتایج می‌توان نتیجه گرفت که ماده‌زایی ماهی آزاد دریای خزر با استفاده از روش پرتوتابی گاما به‌صورت موفقیت‌آمیزی انجام شده است و دز ۹۰۰ Gy به‌عنوان دز مناسب برای استفاده از این روش در این گونه پیشنهاد می‌شود.

کلیدواژه‌ها: ماهی آزاد دریای خزر، ماده‌زایی، پرتو گاما، بازماندگی، ژن SDY، تعیین جنسیت

Meiotic gynogenesis inducing in Caspian Sea salmon (*Salmo trutta caspius*) using gamma irradiation followed by sex determination using SDY gene

Gh. Shahhosseini*

Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, AEOI, P.O.Box: 31465-1498, Karaj - Iran

Research Article

Received 28.9.2020, Accepted 7.11.2020

Abstract

Caspian Sea salmon (*Salmo trutta caspius*) is a valuable fish species in the Caspian Sea and its surrounding basin, which is considered as a suitable species in our country's fishing industry. Caspian salmon ovums and sperms were extracted from Caspian salmon. To perform gynogenesis, the sperms were irradiated with a gamma ray (^{60}Co) at doses of 450, 600, 750, 900, and 1050 Gy. In the next stage, fertilization was performed by mixing the ovum and the irradiated sperm. To induce ploidy, a water bath with a temperature of 26-28 °C was established. The tail fins of different treatments were sampled and the DNA was extracted and its sex was determined using primers E1S1 and E2AS4 related to SDY gene. After salmon reached the appropriate weight, its sex was studied using classical histology. The results showed that in the 900 g group of fertilization, the survival larval was significantly higher than other gynogen groups ($p<0.05$). Gender determination using molecular methods showed that in the treatment of female with a dose of 450 Gy, there is still one male determined. (1 sample out of 5 samples), this happened in a case that there was no male in other doses. But in all histological samples, there is no sign of male gonad. According to these results, it can be concluded that the gynogenesis of Caspian Sea salmon has been done successfully using this gamma irradiation method and a dose of 900 Gy is recommended as a suitable dose for using this method in this species.

Keywords: Caspian sea salmon (*Salmo trutta caspius*), Gynogenesis, Gamma irradiation, Survival, SDY gene, Sex determination

۱. مقدمه

ماهی آزاد دریای خزر[1] یکی از آزاد ماهیان بومی در دریای خزر می‌باشد [۱]. این گونه با ارزش با افزایش آلودگی‌های ایجاد شده در دریای خزر و حوزه اطراف آن و هم‌چنین صید غیرمجاز در معرض خطر انقراض قرار گرفته است [۲]. با توجه به اهمیت زیست محیطی- اقتصادی این گونه در ایران، در طول چند سال گذشته جمعیت‌های پرورشی زیادی از آن به بخش آبزی‌پروری کشور معرفی شده است [۳]. با توجه به بازارپسندی و قیمت بالا، این ماهی به‌عنوان گونه‌ای مناسب در صنعت شیلات کشور مطرح است [۴].

در پرورش تک جنسی (نر یا ماده)، جنسی که دارای رشد بیش‌تری باشد، اهمیت بیش‌تری دارد. در این گونه جنس ماده به علت بلوغ طولانی‌تر می‌تواند از رشد بیش‌تری برخوردار باشد [۵]. لذا استفاده از تکنیکی برای تولید جنس ماده دارای اهمیت زیادی در این گونه است. از جمله راه‌های تولید جمعیت تمام ماده القای ماده‌زایی با استفاده از تکنیک پرتودهی به اسپرم است [۶، ۷]. پرتودهی را می‌توان در دو گروه پرتوهای یون‌ساز با انرژی زیاد و پرتوهای غیر یون‌ساز با انرژی کم تقسیم‌بندی کرد. پرتو گاما از واکنش‌های تجزیه هسته‌ای حاصل می‌گردد. منبع تولید این پرتو معمولاً کبالت (^{60}Co) و سزیم (^{137}Cs) می‌باشد و می‌توان از آن جهت القای ماده‌زایی استفاده کرد [۶، ۷].

ماده‌زایی می‌تواند به دو دسته میوزی و میتوزی تقسیم‌بندی شود. ماده‌زایی میوزی با استفاده از اشتراک محتویات ژنومی گویچه قطبی دوم قبل از خروج از تخمک و ایجاد شوک بلافاصله بعد از لقاح صورت گیرد و در ماده‌زایی میتوزی با استفاده از شوک دیرهنگام بعد از خروج گویچه قطبی دوم و افزایش دو برابری ژنوم و القای تقسیم میتوزی انجام می‌شود [۸، ۹]. ماده‌زایی میتوزی به‌علت بازده کم معمولاً با اهداف تولید مثلی نظیر تولید لاین‌های خالص جهت تکثیر صورت می‌گیرد و برای تولید جمعیت تمام ماده با هدف افزایش رشد و بازده از ماده‌زایی میوزی استفاده می‌شود [۱۰-۱۲].

تعیین جنسیت همواره از اعمال ضروری برای مطالعه خصوصیات مورفولوژیک، اکولوژیک، زیستی و ژنتیکی ماهیان بوده که در عین حال با چالش‌ها و سختی‌های بسیاری همراه است. آزمایش‌های ژنتیکی DNA راه‌حل‌هایی برای این مشکلات فراهم آورده است [۱۳]. سیستم تعیین جنسیت و کروموزوم‌های جنسی در ماهیان دارای تنوع زیادی می‌باشد [۱۴].

امروزه توالی‌های ویژه جنسیت روی DNA در برخی گونه‌های ماهیان با روش‌های مختلف آزمایشی نظیر RAPD, RFLP, AFLP و ریزنشان‌گرهای مولکولی فراهم شده است [۱۳].

پژوهشگران ژن‌های زیادی را جهت تعیین جنسیت در ماهیان استخوانی از جمله [۱۵، ۱۶] ژن gsdfY روی کروموزوم جنسی Y در ماهی *Oryzias luzonensis* [۱۷]، ژن amhr۲ در ماهی *Takifugurubrupes* [۱۸] شناسایی کرده‌اند. هم‌چنین در ماهی آزاد نیز شاخص دیگری به نام دو شکلی جنسی روی کروموزوم Y (SDY) به‌عنوان معرف خوبی جهت تعیین جنسیت شناسایی شده است [۱۹]. از این‌رو جایگاه‌های Sry[2] و SDY[3] که در سایر گونه‌های آزادماهیان به‌عنوان شاخص تعیین جنسیت معرفی شده‌اند، می‌توانند برای گونه ماهی آزاد دریای خزر قابل استفاده باشند. در آزادماهیان جنس نر عموماً واجد هتروکروموزوم XY بوده که این مسئله شرایط را برای بررسی و شناسایی جایگاه‌های احتمالی روی کروموزوم Y و ارتباط آن با جنس نر فراهم می‌کند [۱۳، ۲۰].

بنابراین هدف از انجام این پژوهش القای ماده‌زایی میوزی در ماهی آزاد دریای خزر با استفاده از دزهای مختلف ۴۵۰، ۶۰۰، ۷۵۰، ۹۰۰ و ۱۰۵۰ Gy انرژی حاصل از پرتوی گاما (گسیل شده از ^{60}Co) و پیدا کردن درصد موفقیت ماده‌زایی در سطح مولکولی است.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲ انتخاب مولدین و پرتوتابی اسپرم

برای ماده‌زایی میوزی در ابتدا استحصال اسپرم و تخمک از ۳ عدد ماهی مولد ماده و ۲ عدد ماهی مولد نر ماهی آزاد دریای خزر آماده تکثیر صورت گرفت.

تعداد ۱۰۰۰۰ قطعه تخمک و مقدار لازم اسپرم جهت لقاح این مقدار تخمک با استفاده از فشار اندک به ناحیه شکمی از سمت سر (باله سینه‌ای) به ساقه دم استحصال شد. تخمک (درون مایع سلومیک) و اسپرم استحصال شده در مجاورت یخ دور از دسترس آب (دمای کنترل شده ۴ تا ۵ $^{\circ}C$) به مجموعه آزمایشگاهی تحقیقات آبزیان در پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای منتقل گردید. به‌طور هم‌زمان نیز کلیه ادوات مخصوص اعمال شوک‌های حرارتی گامت‌های لقاح یافته تیمارهای گاینوژنز و

1. *Salmo Trutta Caspius*

2. Sex-Determining Region of the Y Chromosome

3. Sexually Dimorphic on the Y-Chromosome

تریپلوئید آماده شد. آب‌گیری و آماده‌سازی انکوباتورها جهت انتقال تخم‌ها پس از لقاح، هماهنگی و رزرو وقت جهت انجام آزمایش‌های پرتودهی اسپرم از بخش پرتودهی صورت گرفت.

جهت مطالعه قابلیت لقاح و سلامت اسپرم‌های مولدین، میکروسکوپ نوری به سالن تکثیر منتقل شد. هم‌چنین میزان رسیدگی تخم‌های ماهیان مورد بررسی قرار گرفت. تقسیم‌بندی سینی‌های انکوباتور جهت انتقال و توزیع تصادفی تخم‌های تیمارهای مختلف انجام شد.

اسپرم استحصال شده از مولدین نر ماهی آزاد دریای خزر مخلوط شده ($۸/۷\times۱۰^{۹}$ اسپرماتوزوآ بر میلی‌لیتر). برای حصول اطمینان از کیفیت آن (مدت زمان تحرک و نوع حرکت اسپرم) از میکروسکوپ نوری استفاده شد. پس از حصول اطمینان از کیفیت آن‌ها جهت غیرفعال‌سازی ژنتیکی اسپرم، اسپرم‌های اخذ شده با محلول کوهورت (۲۰ میلی‌مولار تریس، ۵۰ میلی‌مولار گلایسین، ۶٪ NaCl ، ۲٪ KCl = ۹ pH) به نسبت ۱ به ۴ رقیق‌سازی شده [۲۱] و سپس اسپرم مربوطه درون فالکون تقسیم‌بندی و در دمای ۵ °C با استفاده از پرتو گاما Gamma cell PX-30-ISSIE, Russia حاصل از ^{۶۰}Co با دز ۰/۱۳۷ Gy/s و با دزهای ۰، ۴۵۰، ۶۰۰، ۷۵۰، ۹۰۰ و ۱۰۵۰ Gy به‌صورت جداگانه پرتودهی شدند.

۲.۲ ماده‌زایی میوزی

در مرحله بعد لقاح برای کلیه تیمارها به صورت خشک با مخلوط نمودن تخمک و اسپرم‌های پرتو دیده با دزهای مختلف (۰/۵-۱ میلی‌لیتر اسپرم به ازای هر ۱۰۰۰ عدد تخمک) انجام شد. جهت القای پلوئیدی در تخم‌ها، حمام آبی با درجه حرارت‌های ۲۷±۲ °C برقرار گردیده و تخم‌های لقاح یافته در زمان ۳۰ دقیقه پس از لقاح به مدت ۱۰ دقیقه تحت شوک حرارتی قرار گرفتند [۶، ۷، ۲۲، ۲۳]. پس از اعمال شوک تخم‌های لقاح‌یافته تیمارهای مختلف (n=۳) به سیستم انکوباسیون مدار بسته تخم ماهی با دمای ۱۰°C منتقل گردیده و جهت ادامه تکامل مراحل جنینی تا زمان تفریخ و جذب کیسه زرده درون این انکوباتور نگه‌داری شدند. به‌منظور بررسی شرایط بهینه، گروه شاهد با استفاده از لقاح تخمک و اسپرم نرمال بدون استفاده از شوک حرارتی در نظر گرفته شده بود. به‌منظور بررسی شرایط مطلوب شوک‌های حرارتی یک گروه شاهد هاپلوئید که حاصل لقاح اسپرم پرتودیده و تخمک نرمال ولی بدون شوک حرارتی (هاپلوئید) و نیز یک گروه تریپلوئید با اعمال شوک حرارتی به گروه شاهد فیزیکی با استفاده از اسپرم عادی (پرتو ندیده) در نظر گرفته شد.

پس از طی دوره انکوباسیون تخم‌ها درون سیستم مدار بسته تفریخ تخم لاروهای تفریخ‌شده پس از جذب کیسه زرده به تراف‌های موجود در سالن منتقل شده و پس از شروع شنای فعال ۶ بار در روز، به میزان ۳ درصد وزن بدن توسط خوراک استارتر بیومار غذادهی شدند (جدول ۱). ماهیان تیمارهای مختلف آزمایشی پس از رسیدن به وزن ۱ g با سه تکرار (هر تکرار ۵۰ عدد ماهی) به مخازن ۱۰۰ لیتری پرورش بچه ماهی منتقل شده (با توجه به افزایش رشد در این مرحله و نیاز به فضای بیش‌تر جهت تبادلات گازی آبشش) و در سراسر این دوره با خوراک بیومار سایز ۰/۵ غذادهی شدند. جهت جلوگیری از قارچ‌زدگی و بیماری‌های عفونی بچه ماهیان، تخم‌ها در طول این دوره مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

۳.۲ محاسبه درصد لقاح و بازماندگی

درصد تفریخ (پس از تفریخ)، بازماندگی لارو (شروع تغذیه فعال) و بازماندگی بچه ماهی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

۱۰۰× (تعداد کل تخم‌های تواحد آزمایشی /تعداد تخم‌های لقاح یافته)=درصد لقاح [۲۴].

۱۰۰× (تعداد کل لارو در بدو آزمایش / تعداد لارو باقی‌مانده تا شروع تغذیه فعال)= درصد بازماندگی لارو

۱۰۰× (تعداد بچه‌ماهی با شروع تغذیه فعال/ تعداد بچه‌ماهی در انتهای دوره آزمایش)= درصد بازماندگی بچه ماهی [۲۵].

۴.۲ آزمایش‌های سلولی مولکولی تعیین جنسیت

برای تنظیم کردن سنجش مولکولی ماده‌زایی مولکولی از باله دمی بچه ماهیان تیمارهای مختلف و هم‌چنین ماهیان مولد آزاد دارای جنسیت مشخص (۷ جنس نر و ۵ جنس ماده، وزن ۵۰۰ g) نمونه‌برداری صورت گرفت. جهت استخراج DNA نمونه‌ها در اتانول ۹۶ درصد تثبیت و تا زمان آنالیز مولکولی در دمای محیط نگه‌داری شدند [۲۶].

جدول ۱. آنالیز ترکیب شیمیایی خوراک مورد استفاده در تغذیه بچه ماهی آزاد دریای خزر (درصد بر اساس ماده خشک)

ترکیب شیمیایی	درصد
ماده خشک	۹۱
پروتئین خام	۵۸
چربی خام	۱۵
کربوهیدرات	۶/۶
سلولز خام	۰/۱
خاکستر	۱۱/۳

۵.۲ استخراج DNA و انتخاب نمونه‌های مناسب

برای استخراج DNA ژنومیک نمونه‌ها، با توجه به دستورالعمل کیت GenAll خریداری شده ابتدا عملیات هضم شیمیایی در دمای ۵۶ °C به مدت ۱۲ ساعت در معرض آنزیم Proteinase K انجام گرفت. در ادامه پس از ورتکس نمونه‌ها و اضافه کردن بافر هموژن‌کننده، با استفاده از سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ rpm عملیات رسوب‌دهی و شستشو انجام شد و در نهایت کیفیت و کمیت نمونه‌های DNA به‌ترتیب با ژل آگاروز و دستگاه نانودراپ بررسی و نمونه‌های با کیفیت مناسب (میانگین غلظت ۵۰ تا ۱۰۰ ng/µl) انتخاب گردید. برای تکثیر ژن SDY با استفاده گونه‌های نزدیک و ۳ عدد از ژن‌های کشف‌شده اختصاصی در جنس نر، پرایمرهای (جدول ۲) SdYE۱S۱، SDY E۲AS۴، sdY E۱Sb و SDY E۴AS۱a (مختص گونه ماهی آزاد؛ *S. troutta*) و پرایمرهای ۱۸s S و ۱۸s AS (به‌صورت عمومی مورد استفاده در تمام گونه‌های Salmonid) استفاده شد [۱۹، ۲۷]. عملیات PCR با جفت پرایمرهای sdYE۱S۱، sdY E۲AS۴، sdY E۱Sb و SDY E۴AS۱a، ۱۸sS و ۱۸sAS و مواد مورد استفاده در عملیات PCR شامل آنزیم تک DNA پلیمراز، $MgCl_2$ ۵۰ mM با غلظت ۵۰ میلی‌مولار، بافر PCR در غلظت ۱۰x، آب مقطر تزریقی و DNA ژنومی استخراج شده پرایمرهای انتخابی بود (جدول ۲).

۶.۲ انجام PCR

برای هر نمونه یک تیوب ۰/۲ میلی‌لیتری استریل انتخاب و شماره نمونه روی آن ثبت گردید. بعد از اضافه کردن مخلوط مواد لازم برای PCR اشاره شده در بالا، محتویات تیوب‌ها توسط پیپت به‌خوبی مخلوط شدند. سپس تیوب‌ها به مدت ۱۰ ثانیه با دستگاه ورتکس هم زده شدند و برای انتقال مواد پخش شده روی دیواره به طرف مرکز تیوب به مدت ۳ s سانتریفیوژ شدند. برای بهینه کردن PCR ابتدا PCR استاندارد انجام شده و سپس با توجه به محصولات PCR، اقدام به تغییر شرایط گردید. در مرحله اول با دادن دامنه حرارتی، بهترین دمای اتصال هر کدام از آغازگرها به رشته الگو به‌دست آمد و در مرحله بعد جهت تظاهر خوب باندها و حذف اسمیر غلظت $MgCl_2$، بهینه‌سازی گردید. این غلظت از مقادیر ۱ تا ۲/۵ میکرولیتر تغییر داده شد تا باندهای ایجاد شده بدون اسمیر گردد. برای وضوح بهتر باندها، مقدار پرایمر تغییر داده شد تا باندهای ایجاد شده بدون اسمیر گردد. هم‌چنین برای وضوح بهتر باندها مقدار پرایمر بین ۱ تا ۲/۵ میکرولیتر تغییر داده شد (جدول ۳). با توجه به اندازه مولکولی ژن‌های انتخاب شده در الکتروفورز از نشان‌گر ۱۰۰۰ bp استفاده شد. برنامه انجام PCR در جدول ۴ آورده شده است.

جدول ۲. واکنش PCR انتخابی با استفاده از جفت پرایمرهای sdYE۱S۱، sdY E۲AS۴، sdY E۱Sb، sdY E۴AS۱a، ۱۸sS و ۱۸sAS

جفت پرایمر	توالی (′۳-′۵)	Tm	gradient
sdYE۱S۱	ATGGCTGACAGAGAGGCCAGAATCCAA	۶۲	۶۲-۵۵
sdY E۲AS۴	CTTAAAACCACTCCACCCTCCAT		
sdY E۱Sb	TTCAATGGCTGACAGAGAGGCCAGA	۹/۶۱	۶۲-۵۵
sdY E۴AS۱a	GGGAGGACTCAAGCCAGATCCTGAA		
۱۸s S	GTTCGAAGACGATCAGATACCGT	۵/۵۷	۶۲-۵۵
۱۸s AS	CCGCATAACTAGTTAGCATGCCG		

جدول ۳. درصد لقاح و بازماندگی لارو ماهی آزاد ماده‌زایی شده با دزهای ۴۵۰، ۶۰۰، ۷۵۰۰ ، ۹۰۰ و ۱۰۵۰ Gy پرتو گاما و گروه هاپلوئید (با اسپرم پرتوخورده و بدون شوک حرارتی)، گروه شاهد (بدون پرتودهی اسپرم و شوک حرارتی تخم) و گروه تریپلوئید (بدون پرتودهی اسپرم و با شوک حرارتی تخم).

	هاپلوئید	شاهد	تریپلوئید	۴۵۰	۶۰۰	۷۵۰	۹۰۰	۱۰۵۰
درصدلقاح	۵/۰±۵/۱ [a]	۴/۵±۷۴ [f]	۳/۳±۳۵ [c]	۴/۲±۲۸ [d]	۳/۱±۲۵ [b]	۴/۹±۳۳ [c]	۴/۷±۵۵ [e]	۵/۱±۴۷ [d]
بازماندگی لارو	۰	۵/۳±۶۷ [f]	۵/۶±۲۸ [c]	۴/۶±۲۲ [d]	۴/۷±۱۸ [b]	۵/۵±۲۸ [c]	۱/۴±۴۹ [e]	۴/۲±۴۰ [d]

جدول ۴. برنامه‌های داده شده به دستگاه PCR

تعداد چرخه (سیکل)	زمان (min)	دما (°C)	مراحل
۱	۵	۹۴	واسرشته‌سازی اولیه
	۵۰ثانیه	۹۴	واسرشته‌سازی
۳۵-۲۰	۵۰ثانیه	۶۰	الحاق
	۵۰ثانیه	۷۲	بسط
۱	۵	۷۲	بسط نهایی

۷.۲ بافت‌شناسی

برای تعیین جنسیت به روش بافت‌شناسی کلاسیک بعد از گذشت یک سال از ماهیان گروه‌های مختلف نمونه‌برداری شد. بدین صورت که از گنادهای ۴ قطعه ماهی از هر تکرار نمونه‌گیری به عمل آمد. نمونه‌ها در داخل فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفته و ۲۴ ساعت بعد فرمالین تعویض شد. جهت تعیین جنسیت از بافت‌های گناد مقطع‌گیری شده و با استفاده از روش H&E رنگ‌آمیزی شد [۲۸].

۸.۲ تجزیه وتحلیل آماری داده‌ها

میزان نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف اسمیرنف بررسی شد. داده‌های درصدی پیش از انجام آنالیزها با (Arc sin) تبدیل شدند. برای مقایسه میانگین داده‌ها از تجزیه واریانس یک‌طرفه[1] انجام شد و سطح معنی‌دار بودن در بین تیمارها از طریق آزمون Tukey در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت. تجزیه و تحلیل آماری به‌وسیله نرم‌افزار SPSS ۱۷ در محیط ویندوز انجام شد و برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Excel, ۲۰۰۷ درمحیط ویندوز استفاده شد.

۳. نتایج

۱.۳ درصد لقاح و بازماندگی لارو

نتایج نشان داد که درصد لقاح و بازماندگی لارو در ماهیان گروه هاپلوئید نسبت به کلیه گروه‌ها کم‌تر بود ($p<۰/۰۵$). این در حالی است که بیش‌ترین درصد لقاح و بازماندگی لارو مربوط به گروه شاهد بود ($p<۰/۰۵$). در بین تیمارهای گاینوژن، گروه ۹۰۰ Gy بیش‌ترین میزان لقاح و بازماندگی لارو و گروه ۶۰۰ Gy کم‌ترین میزان را نشان داد ($p<۰/۰۵$). گروه تریپلوئید نیز میزان درصد لقاح و بازماندگی لارونسبت به گروه ۴۵۰، ۷۵۰، ۹۰۰ و ۱۰۵۰ کم‌تر بود؛ این در حالی است که نسبت به گروه‌های ۴۵۰، ۶۰۰ و ۷۵۰ گروه تریپلوئید مقدار بیش‌تری از لقاح و بازماندگی لارو را نشان داد ($p<۰/۰۵$) (جدول ۴).

۲.۳ درصد تفریخ و بازماندگی بچه ماهی

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که بیش‌ترین و کم‌ترین درصد تفریخ به‌ترتیب مربوط به تیمار شاهد و تیمارهای ماده‌زایی شده با دز ۴۵۰ و ۶۰۰ Gy بود که با هم اختلاف آماری داشتند ($p<۰/۰۵$). هم‌چنین نتایج نشان می‌دهد که بین تیمارهای آزمایشی تیمار پرتودهی شده با دز ۹۰۰ Gy از نظر آماری دارای بیش‌ترین درصد تفریخ بود ($p<۰/۰۵$). هم‌چنین درصد تفریخ در تیمار تریپلوئید به‌صورت معنی‌داری کاهش پیدا کرد (شکل ۱). نتایج حاصل از اندازه‌گیری و مقایسه درصد بازماندگی بچه ماهی نشان داد که بیش‌ترین و کم‌ترین درصد بازماندگی به‌ترتیب مربوط به تیمار شاهد و تیمار تریپلوئید بود و در بین سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۲).

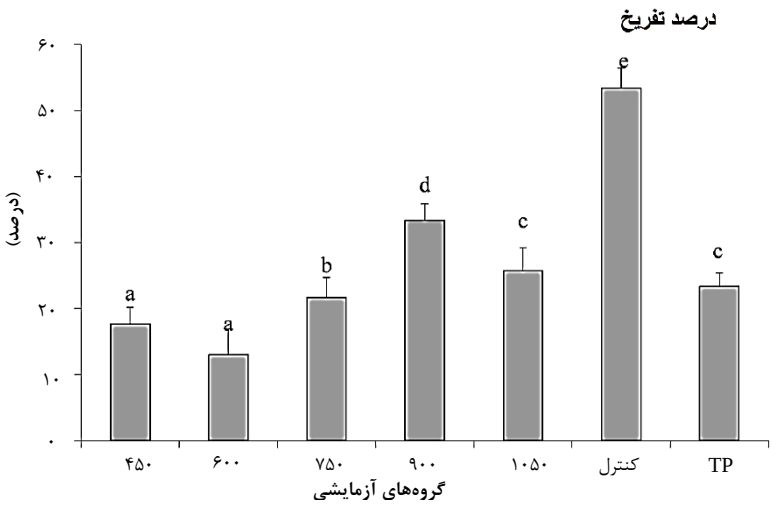
۳.۳ انتخاب پرایمر مناسب در ارتباط با ژن SDY

در مورد پرایمرهای E۱S۱ و E۲AS۴ نتایج نشان داد که این پرایمرها در مورد تعیین جنسیت این گونه از ماهی پاسخ مناسب را ارایه می‌دهد. از این‌رو از این نشان‌گرها در مرحله بعدی برای تعیین جنسیت تیمارهای مختلف استفاده می‌شود (شکل ۳).

۴.۳ تعیین جنسیت با روش مولکولی

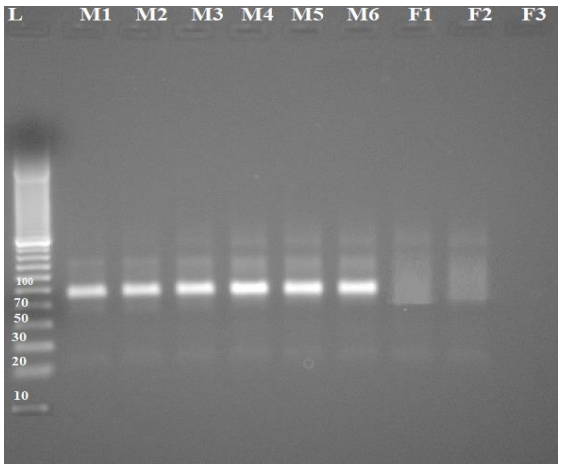
نتایج حاصل از تعیین جنسیت ماهی آزاد دریای خزر مربوط به تیمارهای مختلف نشان داد که از ماهیان مربوط به تیمار ۴۵۰ Gy، چهار نمونه ماده و تنها یک نمونه نر بودند. هم‌چنین نتایج نشان داد که در تیمار شاهد، سه نمونه از نمونه‌های بررسی شده جنسیت نر داشتند و دو نمونه باقی‌مانده دارای جنسیت ماده بودند. هم‌چنین در تیمار تریپلوئید چهار عدد از نمونه‌های بررسی شده جنس نر و بقیه ماده بودند. در تیمارهای ۶۰۰، ۷۵۰، ۹۰۰ و ۱۰۵۰ کلیه نمونه‌ها از نظر مولکولی دارای جنسیت ماده بودند (جدول ۵).

1. One-Way-Anova



شکل ۱. درصد تفریخ لارو ماهی آزاد ماده‌زایی شده با دزهای ۴۵۰، ۶۰۰، ۷۵۰۰ ، ۹۰۰ و ۱۰۵۰ Gy پرتو گاما و گروه هاپلوئید (با اسپرم پرتوخورده و بدون شوک حرارتی)، گروه شاهد (بدون پرتودهی اسپرم و شوک حرارتی تخم) و گروه تریپلوئید (بدون پرتودهی اسپرم و با شوک حرارتی تخم).

شکل ۲. درصد بازماندگی بچه ماهی آزاد ماده‌زایی شده با دزهای ۴۵۰، ۶۰۰، ۷۵۰۰ ، ۹۰۰ و ۱۰۵۰ Gy پرتو گاما و گروه هاپلوئید (با اسپرم پرتوخورده و بدون شوک حرارتی)، گروه شاهد (بدون پرتودهی اسپرم و شوک حرارتی تخم) و گروه تریپلوئید (بدون پرتودهی اسپرم و با شوک حرارتی تخم).



شکل ۳. محصول PCR پرایمرهای E۱S۱ و E۲AS۴:F، جنس ماده، M: جنس نر، L: مارکر وزن مولکولی.

جدول ۵. تعیین جنسیت ماهیان تیمارهای مختلف با پرایمرهای E۱S۱ و E۲AS۴

ردیف	شماره نمونه	گروه آزمایشی	جنسیت
۱	۱۰، ۲۲، ۲۴، ۴۱، ۳۲	شاهد	نر، نر نر، ماده، ماده
۲	۳، ۷، ۱۲، ۲۷، ۳۴	۴۵۰	ماده، ماده ماده ، ماده، نر
	۱، ۸، ۱۴، ۱۶، ۳۹	۶۰۰	ماده، ماده ماده، ماده، ماده
۳	۵، ۳۰، ۳۱، ۳۷، ۳۸	۷۵۰	ماده، ماده ماده، ماده، ماده
۴	۶، ۱۷، ۱۸، ۲۶، ۳۶	۹۰۰	ماده، ماده ماده، ماده، ماده
۵	۹، ۱۵، ۱۹، ۲۵، ۳۳	۱۰۵۰	ماده، ماده ماده، ماده، ماده
۶	۲۰، ۲۳، ۲۸، ۲۹، ۴۰	تریپلوئید	نر ، نر ، نر نر، ماده
۷	۴، ۳۵، M۱، M۲، M۳، M۴، M۵	نر دارای جنسیت مشخص	نر، نر، نر نر ، نر، نر
۸	۲، ۱۳، ۲۱، F۱، F۲	ماهی ماده دارای جنسیت مشخص	ماده، ماده، ماده، ماده، ماده

۵.۳ بافت‌شناسی

نتایج بافت‌شناسی مربوط به تیمارهای مختلف آزمایشی نشان داد که ماده‌زایی به‌خوبی صورت گرفته است. در شکل ۴ نمونه‌ای از این تیمارها نشان داده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که تیمارهای ماده‌زایی شده فقط دارای جنسیت ماده می‌باشند (شکل ۴-a, b, c, e, f, g). هم‌چنین نتایج نشان داد که تیمار شاهد (شکل ۴ -h, I, j) و تریپلوئید (شکل ۴-k, l, m) دارای جنسیت نر (شکل ۴ -l, m) و ماده (شکل ۴ - k) می‌باشند (شکل ۴).

۴. بحث

با توجه به مخاطرات استفاده از گونه‌های غیر بومی، انتخاب و استفاده از گونه‌های بومی با رشد بالا دارای اهمیت و اولویت پرورشی کشور است. خانواده آزادماهیان با توجه به بازارپسندی و قیمت بالای آن‌ها در این بین دارای ارزش زیادی بوده و گونه‌های مختلف آن‌ها در سراسر دنیا پراکنده هستند [۴]. ماهی آزاد دریای خزر به‌عنوان گونه‌ای مناسب برای پرورش در صنعت شیلات کشور مطرح می‌باشد؛ ولی از جمله مشکلاتی که برای پرورش آن وجود دارد این است که در خانواده آزاد ماهیان، از جمله ماهی آزاد دریای خزر، جنس ماده به‌علت بلوغ طولانی‌تر رشد بیش‌تری را دارا است [۵]. از جمله روش‌ها برای افزایش بازده این گونه تولید ماهی ماده با روش ماده‌زایی با استفاده از پرتوتابی می‌باشد.

ماده‌زایی میوزی آزادماهیان یا تلاقی موفقیت‌آمیز با گویچه قطبی دوم و بهینه‌سازی عملکرد تریپلوئیدی در این گونه، به زمان شروع شوک حرارتی بستگی دارد که اساساً حدود ۳۰ دقیقه پس از لقاح، که می‌توان شرایط تریپلوئید را در آن ایجاد کرد، رخ می‌دهد. با ایجاد شرایط بهینه شده می‌توان گاینوژن‌های میوزی تولید کرد [۱۰-۱۲].

به‌علت بازده کم‌تر ماده‌زایی میتوزی [۲۹، ۳۰]، در این پژوهش از ماده‌زایی میوزی برای تولید جمعیت تمام ماده استفاده شد. نتایج نشان داد که میزان لقاح و بازماندگی لارو در ماهیان گاینوژن کاهش می‌یابد. این در حالی است که میزان بازماندگی بچه ماهی در این ماهیان تغییری را نشان نداد. در مطالعات قبلی بازده زیاد ماده‌زایی میوزی و شوک حرارتی به‌عنوان عامل دست‌کاری پلوئیدی در ماهی آزاد آتلانتیک مشاهده شده بود [۲۹].

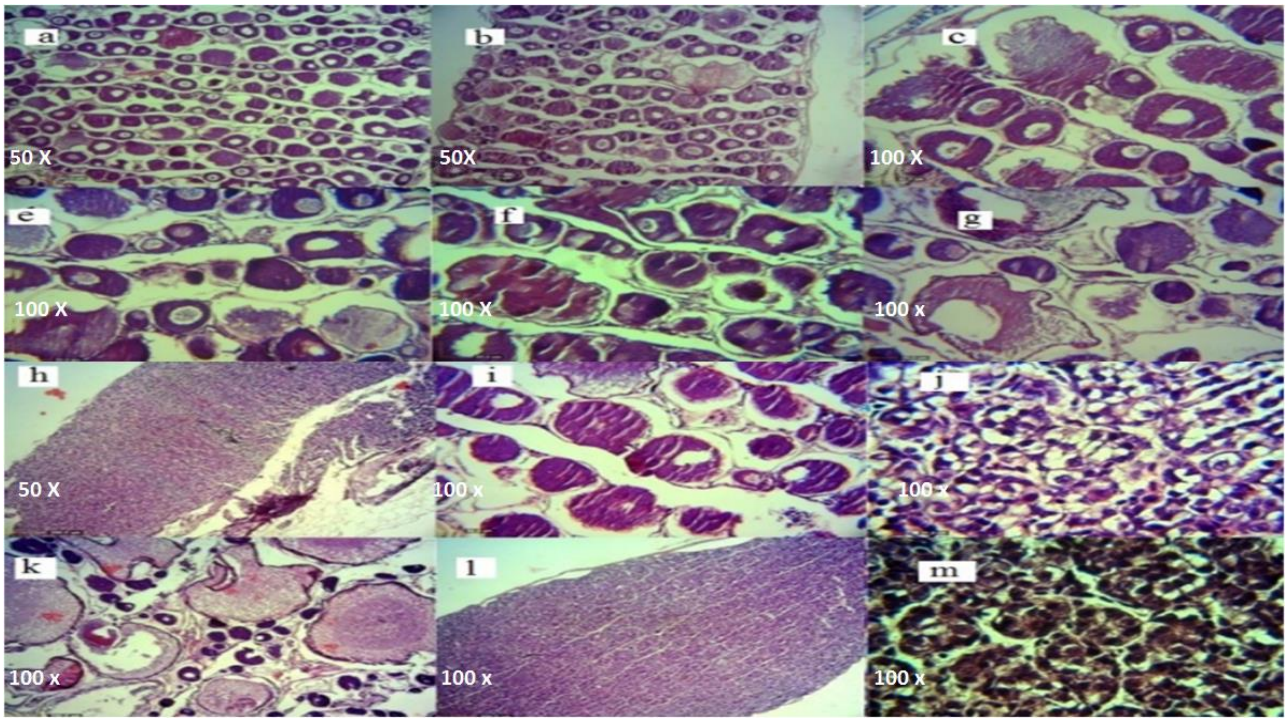
در مطالعات ماده‌زایی که در گونه‌های مختلفی انجام شده است، بقاء به‌طور قابل‌توجهی در ماده‌زایی میتوزی پایین و بین گونه‌های مختلف متفاوت است. به‌طوری‌که ۲۹٪ جنین‌هایی با ظاهر طبیعی، ۲۴ ساعت پس از لقاح در ماهی زبرا[1] [۳۱]، در مقایسه با زنده ماندن ۰ تا ۶٪ مداکا[2] [۳۲]، ۳٫۵ تا ۱۵٪ بچه‌ماهی کپور معمولی[3] [۳۳]، ۱ تا ۲۶٪ در ماهی لوچ[4] [۳۴]، ۶٫۹٪ در تیلاپیا نیل[5] [۳۵] و ۱۲٫۸٪ در ماهی sea bream [۳۶] ملاحظه شد. در این پژوهش در گروه گاینوژن بین ۲۸ تا ۴۱٪ بقاء ملاحظه شد؛ اختلاف بین نتایج پژوهش‌های مختلف به گونه ماهی، جمعیت ماهی تکثیر شده و شرایط متفاوت آزمایشی بستگی دارد [۳۰]. چنان‌که مشاهده می‌شود، نتایج حتی در این پژوهش نیز بین دزهای مختلف متفاوت است.

نتایج تعیین جنسیت با استفاده از روش‌های مولکولی که در تیمار ماده‌زایی شده با دز ۴۵۰ Gy نشان داد هنوز جنس نر (۱ نمونه از ۵ نمونه) وجود دارد؛ این در حالی بود که در دزهای دیگر جنس نر وجود نداشت. اما در مطالعات بافت‌شناسی کلیه تیمارهای پرتودهی شده دارای جنسیت ماده بودند ($P<0.05$) . با توجه به نتایج فوق می‌توان نتیجه گرفت که ماده‌زایی به خوبی انجام شده است.

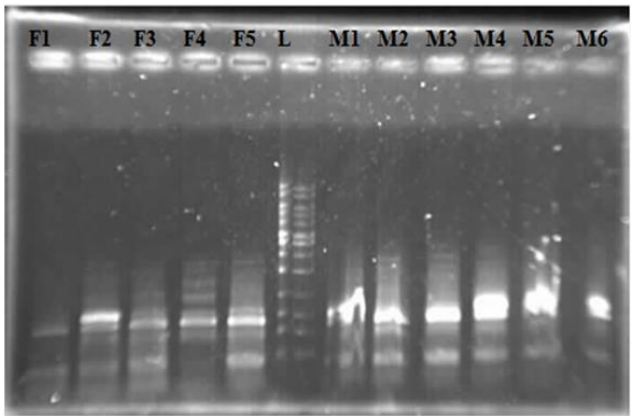
با توجه به مشاهده دو باند بسیار نزدیک مربوط به پرایمرهای E۱Sb و E۴AS۴ و هم‌چنین ۱۸s S و ۱۸ s AS در جنس نر و شدت بیش‌تر این باندها، این پرایمرها در این جنس مورد استفاده قرار گرفتند. اما نتایج به دست آمده (شکل ۵) نشان داد که پرایمرهای E۱Sb و E۴AS۴ و هم‌چنین ۱۸s S و ۱۸s AS در هر دو جنس نر و ماده جایگاه‌های یکسانی را تکثیر کرده و تمایزی بین جنس‌های نر و ماده نشان نمی‌دهند.

بنابراین در این پژوهش از بین پرایمرهای ژن‌های مختلف اختصاصی ژن SDY مربوط به جنس نر پرایمرهای E۱S۱ و E۴AS۴ به دلیل نتایج مناسب تفکیک جنسیت جنس نر از ماده انتخاب شدند. اغلب گفته شده است که ژن‌های درگیر در مسیر تمایز جنسیتی ممکن است به‌عنوان ژن‌های جدید تعیین‌کننده جنس در کارشناسی تکامل مهره‌داران به‌طور مستقل تکامل یافته باشند. با این حال یافته‌های اخیر نشان می‌دهد که ژن تعیین‌کننده جنسیت آزادماهیان SDY است، که از تکامل ژن مربوط به سیستم ایمنی بدن ایجاد شده و انعطاف‌پذیری تکاملی غیر منتظره‌ای در مکانیسم‌های تعیین جنسیت سایر مهره‌داران دارد [۱۹].

1. Danio Rerio
2. Oryzias Latipes
3. Cyprinus Carpio
4. Misgurnus Anguillicaudatus
5. Oreochromis Niloticus



شکل ۴. لام بافت‌شناسی گناد ماهی آزاد دریای خزر رنگ‌آمیزی شده با روش H&E (عکس بالا مربوط به تیمارهای پرتو دیده به‌ترتیب از (a, b, c, e, f g)، (۴۵۰، ۶۰۰، ۷۵۰، ۹۰۰، ۱۰۵۰ و ۱۰۵۰)، عکس پایین مربوط به تیمار شاهد نر و ماده (h ,i , j) و تیمار تریپلوئید دارای جنس نر (l, m) و جنس ماده (k).



شکل ۵. محصول PCR پرایمرهای E۱Sb و E۴AS۴. F: جنس ماده؛ M: جنس نر؛ L: مارکر وزن مولکولی

بیان SDY با بیان موضعی در برخی سلول‌های سوماتیک خاص گناد جنسی نر جنین تأیید شده است. این بیان اندکی پس از تفریخ شناسایی شده است که نشان می‌دهد SDY یک بازیگر اولیه در روند تمایز گناد جنسی نر در آزاد ماهیان است [۲۷]. علاوه بر این به‌عنوان نتایج تکمیلی از تعیین جنسیت به روش بافت‌شناسی در این تحقیق استفاده شد، که نتایج حاصله نشان داد که ۱۰۰ درصد گروه‌های ماده‌زایی شده با روش القای میوزی با استفاده از شوک حرارتی و پرتو گاما دارای جنسیت ماده بودند. این نتیجه با تحقیق سلطانی و همکاران بر روی ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان ماده‌زایی شده با پرتو گاما مشابه است [۷].

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت با توجه به این‌که استفاده از روش‌های مناسب در جهت خودکفایی و تولید تخم چشم زده و ماهیان تک جنس ماده و بومی در کشور امری ضروری بوده و نیز با توجه به اهمیت تولید ماهی تمام ماده آزاد دریای خزر، استفاده از این روش در ماده‌زایی ماهی آزاد دریای خزر انجام شدنی و کاربردی می‌باشد و دز ۹۰۰ Gy در این گونه ماهی به‌عنوان دز مناسب برای استفاده از این روش پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسنده مراتب تشکر خود را از کلیه همکاران پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، به‌ویژه پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای که در انجام این طرح تحقیقاتی ما را یاری رسانده‌اند، اعلام می‌دارد.

مراجع

1. A.N. Kazanchev, *Translated by: A. Shariati. Fishes of Caspian Sea and its watershed area*, Iranian Fish. Organiz., 171 (1992). (In persian)
2. B.H. Kiabi, A. Abdoli, M. Naderi, *Status of the fish fauna in the South Caspian Basin of Iran*, Zoology in the Middle East, **18**, 57-65 (1999).
3. G.H. Thorgaard, *Ploidy manipulation and performance*, Aquaculture, **57**, 57-64 (1986).
4. J.A. Moghaddam, A. Abedian-Kenari, S. Khodabandeh, *Effects of dietary vegetal fatty acid and fat content on growth and acclimation to Caspian Sea water in Caspian brown trout (Salmo trutta caspius) parr*, Aquaculture, **412**, 144-150 (2013).
5. E. Habibi, et al., *Feasibility analysis of sex determination of caspian trout (salmo trutta caspius, kessler, 1877) using aflp markers*, Genetic Novin **7**, 325-332 (2013).
6. G. Shahhosseini, et al., *The effect of gynogenesis by use of gamma radiation on hematology and immunology indices in rainbow trout Oncorhynchus mykiss (Walbaum, 1792)*, Journal of Applied Ichthyological Research, **4**, 63-74 (2016).
7. M. Soltani, et al., *Comparison of hatching, deformity, survival, growth performance female gynogenetic rainbow trout-and body composition in all (oncorhynchus mykiss) using gamma irradiation*, Iranian. Vet. J, **12**, 55-63 (2016) (In persian).
8. D. Bertotto, et al., *Production of clonal founders in the European sea bass, Dicentrarchus labrax L., by mitotic gynogenesis*, Aquaculture, **246**, 115-124 (2005).
9. H. Liu, et al., *Genetic difference between meiotic gynogenesis and mitotic gynogenesis in the Japanese flounder*, Journal of Fisheries of China, **34**, 718-724 (2010).
10. A.S. Alsaqufi, et al., *Verification of mitotic gynogenesis in ornamental (koi) carp (Cyprinus carpio L.) using microsatellite DNA markers*, Aquaculture Research, **45**, 410-416 (2014).
11. L. Foisil and Chourrout D., *Chromosome doubling by pressure treatments for tetraploidy and mitotic gynogenesis in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum): re-examination and improvements*, Aquaculture Research, **23**, 567-575 (1992).
12. M. Hussain, et al., *Induction of mitotic and meiotic gynogenesis and production of genetic clones in rohu, Labeo rohita Ham*, Bangladesh Journal of Fisheries Research, **1**, 1-7 (1997).
13. R.H. Devlin and Nagahama Y., *Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences*, Aquaculture, **208**, 191-364 (2002).
14. J. Mank, J. Avise, *Evolutionary diversity and turn-over of sex determination in teleost fishes*, Sexual Development, **3**, 60-67 (2009).
15. M. Matsuda, et al., *Oryzias curvinotus has DMY, a gene that is required for male development in the medaka, O. latipes*, Zoological Science, **20**, 159-161 (2003).
16. M. Matsuda, et al., *DMY gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish*, Proc National Academy Sciences, **104**, 3865-3870 (2007).
17. T. Myosho, et al., *Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, Oryzias luzonensis*, Genetics, **191**, 163-170 (2012).
18. T. Kamiya, et al., *A trans-species missense SNP in Amhr2 is associated with sex determination in the tiger pufferfish, Takifugu rubripes (fugu)*, PLoS genet, **8**, e1002798 (2012).
19. A. Yano, et al., *The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (sdY) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids*, Evolutionary applications, **6**, 486-496 (2013).
20. A. Felip, et al., *Polymorphism and differentiation of rainbow trout Y chromosomes*, Genome, **47**, 1105-1113 (2004).
21. D. Chourrout, *Gynogenesis caused by ultraviolet irradiation of salmonid sperm*, Journal of Experimental Zoology, **223**, 175-181 (1982).
22. S. Dorafshan, et al., *Effects of triploidy on the Caspian salmon Salmo trutta caspius haematology*, Fish Physiology and Biochemistry, **34**, 195-200 (2008).
23. R. Johnstone, R. Stet, *The production of gynogenetic Atlantic salmon, Salmo salar L*, Theoretical and Applied Genetics, **90**, 819-826 (1995).
24. S. Okunsebor, et al., *Effect of temperature on fertilization, hatching and survival rates of Heterobranchus bidorsalis eggs and hatchlings*, Current Journal of Applied Science and Technology, 372-376 (2015).
25. M. Sswat, et al., *Growth performance and survival of larval Atlantic herring, under the combined effects of elevated temperatures and CO_2*, PLoS One, **13**, e0191947 (2018).
26. L.J. Smith, et al., *Extraction of cellular DNA from human cells and tissues fixed in ethanol*, Analytical Biochemistry, **160**, 135-138 (1987).
27. A. Yano, et al., *An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss*, Current Biology, **22**, 1423-1428 (2012).
28. B. Schrek, B. Moyle, *Methods for fish biology. American fisheries society*, Bethesda. Maryland. USA (1990).
29. D. Chourrout, E. Quillet, *Induced gynogenesis in the rainbow trout: sex and survival of progenies production of all-triploid populations*, Theoretical and Applied Genetics, **63**, 201-205 (1982).
30. T.J. Hansen, et al., *Production and verification of the first Atlantic salmon (Salmo salar L.) clonal lines*, (2020).

31. G. Streisinger, et al., *Production of clones of homozygous diploid zebra fish (Danio rerio)*, Nature, **291**, 293-296 (1981).
32. K. Naruse, et al., *The production of cloned fish in the medaka (Oryzias latipes)*, Journal of Experimental Zoology, **236**, 335-341 (1985).
33. J. Komen, et al., *Gynogenesis in common carp (Cyprinus carpio L.): II. The production of homozygous gynogenetic clones and F1 hybrids*, Aquaculture, **92**, 127-142 (1991).
34. M. Itono, et al., *Cytological mechanisms of gynogenesis and sperm incorporation in unreduced diploid eggs of the clonal loach, Misgurnus anguillicaudatus (Teleostei: Cobitidae)*, Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology, **307**, 35-50 (2007).
35. M.R.I. Sarder, et al., *Production and propagation of fully inbred clonal lines in the Nile tilapia (Oreochromis niloticus L.)*, Journal of Experimental Zoology, **284**, 675-685 (1999).
36. K. Kato, *Viability growth and external morphology of meiotic-and mitotic-gynogenetic diploids red sea bream, Pagrus major*, J. Appl. Ichthyol., **17**, 97-103 (2001).

COPYRIGHTS
©2021 The author(s). This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, as long as the original authors and source are cited. No permission is required from the authors or the publishers.

استناد به این مقاله
غلامرضا شاه‌حسینی (۱۳۹۹)، مادەزایی میوزی با استفاده از پرتو گاما در ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* و تعیین جنسیت با استفاده از ژن SDY، ۹۳، ۱۴۵-۱۵۴

DOI: 10.24200/nst.2020.1156
Url: https://jonsat.nstri.ir/article_1156.html