مجله علوم و فنون هسته‌ای، جلد ۱۰۰، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۱

Journal of Nuclear Science and Technology
Vol. 100, No. 3, 2022

کاربرد فن‌آوری هسته‌ای در القای وراثت مادری تاسماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*)

غلامرضا شاه‌حسینی*، علیرضا نیسی

پژوهشکده‌ی کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی، صندوق پستی: ۱۴۹۸-۳۱۴۸۵، کرج- ایران

*Email: gshahhosseini@aeoi.org.ir

مقاله‌ی پژوهشی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۳/۲۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۵/۱۳

چکیده

القای ماده‌زایی در ماهیان خاویاری، دارای ارزش زیادی است، لذا هدف از انجام این پژوهش القای ماده‌زایی در تاسماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) به وسیله پرتوتابی گاما به اسپرم هترولوگ ماهی قره‌برون (*Acipenser persicus*) بود. در ابتدا استحصال اسپرم انجام، و در مرحله بعد پرتوتابی با دزهای ۰/۴۵، ۰/۶، ۰/۷۵، ۰/۹ و ۱/۰۵ کیلوگری انجام شد. سپس از ماهی مولدماده تخمک استحصال و لقاح در گروه‌هایی به صورت جداگانه انجام و از شوک سرمایی برای القای پلوئیدی استفاده شد. گروه‌های آزمایشی شاهد (لقاح اسپرم و تخمک معمولی ماهی شیپ)، هیبرید (لقاح اسپرم معمولی قره‌برون و تخمک معمولی ماهی شیپ)، هاپلوئید (لقاح اسپرم پرتوخورده قره‌برون و تخمک معمولی ماهی شیپ)، و تریپلوئید (لقاح اسپرم و تخمک معمولی ماهی شیپ با شوک حرارتی)، در نظر گرفته شدند. تخم‌های لقاح یافته تا زمان تفریخ به انکوباتور انتقال داده شدند و درصد لقاح و تفریخ پس از طی دوره تکاملی در انکوباسیون محاسبه شد. استخراج DNA از لارو گروه‌های مختلف انجام و درصد موفقیت ماده‌زایی با استفاده از مارکرهای میکروستلایت Afu۹ و Afu۶۸ انجام شد. نتایج نشان داد که گروه ۰/۹ کیلوگری میزان لقاح و تفریخ بیش‌تری داشته است ($P<0/05$). سنجش وراثت نشان داد که ماده‌زایی در گروه‌های مختلف با موفقیت انجام شده است. با توجه به این نتایج می‌توان جمع‌بندی کرد که ماده‌زایی در این ماهی به طور موفقیت‌آمیزی انجام شده است و با توجه بازده بالاتر دز ۰/۹ کیلوگری پرتو گاما به عنوان دز پیشنهادی برای ماده‌زایی در این گونه توصیه می‌شود.

کلیدواژه‌ها: ماهی خاویاری شیپ، القای وراثت مادری (ماده‌زایی)، پرتو گاما، مارکر Afu۹ و Afu۶۸

Application of nuclear technology in maternal inheritance of ship sturgeon (*Acipenser nudiventris*)

Gh. Shahhosseini*, A. Neissi

Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, AEOI, P.O.Box: 31485-1498, Karaj - Iran

Research Article

Received 12.6.2021, Accepted 4.8.2021

Abstract

Induction of Gynogenesis in sturgeon is important, therefore, the aim of this study was gynogenesis inducing in Ship sturgeon *Acipenser nudiventris* by gamma radiation to the heterologous sperm of Persian sturgeon *Acipenser persicus*. At first, sperm was extracted, and in the next stage, irradiation was performed with doses of 0.45, 0.6, 0.75, 0.9 and 1.05 kGy. Then oocytes were obtained from fish and fertilized by different dosages of irradiated sperms and cold shock was used to ploidy inducing. Control group (fertilization of normal sperm and oocytes), hybrid (fertilization of normal Persian sturgeon sperm and ship sturgeon oocytes), haploid (fertilization of irradiated sperm and normal ship oocytes), and triploid (fertilization of ship sperm and oocytes with cold temperature shock) were considered. The fertilized eggs were transferred to the incubator until hatching and the percentage of fertilization and hatching was calculated after the evolutionary period in the incubation. DNA was extracted from different group's larvae and the success rate of inoculation was determined using Afu9 and Afu68 microsatellite markers. The results showed that the 0.9 kGy group had a higher rate of fertilization and hatching ($P<0.05$). Inheritance assessment showed that gynogenesis was performed successfully in different groups. It can be concluded that gynogenesis in this fish has been done successfully and due to the higher efficiency, 0.9 kGy dose, it was recommended for this species gynogenesis.

Keywords: Ship sturgeon, Gynogenesis, Gamma ray, Afu9 and Afu68 sequences

۱. مقدمه

تاس‌ماهیان یا ماهیان خاویاری از با ارزش‌ترین گونه‌های آبزیان اقتصادی دریای خزر می‌باشد [۱] ، این دریا و حوزه آبریز آن مهم‌ترین زیستگاه طبیعی ۶ گونه - فیل ماهی یا بلوگا *Huso huso*، تاسماهی ایرانی یا قره برون *Acipenser Persicus*، تاس ماهی روسی یا چالباش *Acipenser gueldenstaedtii*، شیپ *Acipenser nudiventris*، اوزون برون *Acipenser stellatus* و استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) است [۲].

در سال‌های اخیر صید تاس‌ماهیان کاهش یافته است [۳] و آن‌ها و این خانواده جزء ماهیان حمایت شده از جانب اتحادیه بین‌المللی حفاظت از محیط زیست (IUCN) محسوب می‌شود [۴].

یکی از روش‌ها برای حفظ ذخایر ماهیان خاویاری تحقیق و مطالعه دستگاه تولیدمثلی آن‌ها و شناسایی تمام شاخص‌های مؤثر در ارتقاء و توسعه ساختارهای تولیدمثلی آن‌ها می‌باشد [۴]. به طور کلی عوامل مؤثر بر رشد و رسیدگی دستگاه تولیدمثل ماهیان بیش‌تر شامل عوامل ژنتیکی، فیزیولوژیکی و از همه مهم‌تر فرایندهای مربوط به غدد درون ریز می‌باشند [۵].

جنس ماده در ماهیان خاویاری دارای اهمیت زیادی است [۶-۱۰] لذا تولید جنس ماده در این خانواده دارای اهمیت بسیار بالایی است.

صنعت آبزیان همواره از فن‌آوری‌هایی مختلفی از جمله فن‌آوری هسته‌ای جهت تولید محصول بیش‌تر و هم‌چنین با کیفیت بالاتر استفاده کرده است [۶-۱۰]، که این از طریق دست‌کاری‌های ژنتیکی به کمک این فن‌آوری (پرتوتابی)، یکی از مسیرهایی است که می‌توان از آن بهره برد. با استفاده از این تکنولوژی‌ها در بحث تکثیر آبزیان و جهت تولید جمعیت‌های تمام ماده است [۱۱-۱۴]. پرتوتابی به اسپرم روشی جهت القای ماده‌زایی می‌باشد. با غیرفعال‌سازی ژنوم اسپرم (حذف حضور کروموزوم-های پدری)، که توسط محققین مختلف استفاده شده است [۱۵-۱۷].

مکانیسم اثر پرتو گاما بر مواد وراثتی را می‌توان بدین‌گونه توضیح داد که به وسیله پرتوتابی، در اثر فرایند یونیزاسیون در سلول، رادیکال‌های مثبت و الکترون‌های آزاد تولید می‌گردند. رادیکال‌های فعال حاصل از فرایند یونیزاسیون با DNA واکنش نشان داده و در نتیجه کروموزوم به قطعاتی کوچک شکسته می‌شود [۱۸-۲۰].

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 بوده است، آزمایش‌های زنومیکس برای این منظور همواره روش هایی را ارایه کرده است [۲۱].

سیستم تعیین جنسیت و کروموزوم‌های جنسی دارای تنوع زیادی در ماهیان می‌باشد [۲۲] امروزه امکان تعیین جنسیت با کمک توالی‌یابی جایگاه اختصاصی تعییت جنسیت نظیر مارکرهای RAPD, RFLP, AFLP و میکروستلایت فراهم می باشد [۲۱]. محققان ژن‌های زیادی را جهت تعیین جنسیت در ماهیان استخوانی [۲۳، ۲۴] از جمله ژن gsdfY روی کروموزوم جنسی Y در ماهی *Oryzias luzonensis* [۲۵]، مارکر amhr۲ در ماهی *Takifugu rubrupes* [۲۶] سال‌ها بود که محققان بسیاری به دنبال پیدا کردن مارکری برای تعیین جنسیت ماهیان خاویاری بودند که اخیرا در سال ۲۰۲۰ نشان‌گر اختصاصی AllWSex۲ برای تعیین جنسیت گونه‌های متعددی از ماهیان خاویاری پیدا شده است [۲۷]. هم‌چنین در ماهی آزاد نیز شاخص دیگری به نام دو تصویری جنسی روی کروموزوم (Sdy) به عنوان معرف خوبی جهت تعیین جنسیت شناسایی شده است [۲۸]. سیستم تعیین جنسیت در ماهیان خاویاری ZZ نر، ZW ماده می‌باشد. در القای وراثت مادری ماهیان خاویاری وراثت از ماده به ارث می‌رسد ولی جنس نر (ZZ)، ماده معمولی (ZW) و ابرماده (WW) نیز تولید می‌شود، در این بین جنس‌های ماده تولید شده با ماهیت جنسیت WW یا ابر ماده دارای اهمیت زیادی می‌باشد، زیرا که در نسل بعد تولید جمعیت تمام ماده ZW می‌کنند [۲۹].

القای وراثت مادری در ماهیان با توجه به گونه ماهی و سیستم وراثتی آن می‌تواند به ۲ صورت هتروزایگوت و هموزایگوت باشد. از آن‌جایی که جنس ماده در گونه‌های خاویاری دارای سیستم کروموزومی ZW می‌باشد، مستقیماً امکان تولید جمعیت تمام ماده در این گونه‌ها از طریق ماده‌زایی وجود ندارد. بنابراین برای تولید آن نیاز به تولید ابر ماده WW با استفاده از ماده‌زایی (میوزی و یا میتوزی) می‌باشد. به علت نرخ لقاح، تفریخ و بقای بسیار پایین ماده‌زایی میتوزی در این خانواده [۲۹-۳۱] اغلب روش میوزی انتخاب می‌شود. علی‌رغم اهمیت پرتوهای یون‌ساز نظیر پرتو گاما تاکنون اگرچه گزارشی مبنی بر القای ماده‌زایی با روش پرتوتابی گاما در ماهیان خاویاری گزارش نشده است، ولی تحقیقاتی روی پرتوتابی با روش پرتو UV در گونه‌های خاویاری استرلیاد، پاروپوزه، سیبری و ماهی شیپ بوده است [۲۹-۳۲].

برای تعیین آلل‌های ارثی فرزندان گاینوژن، ژنوتیپ DNA با استفاده از مارکر میکروستلایت انجام می‌شود. که جایگاه‌ها Afu۹ و Afu۶۸ می‌توان برای ماهید خاویاری شیب استفاده کرد.

بنابراین هدف از این تحقیق استفاده از انرژی حاصل از پرتوی گاما (ساطع شده از کبالت ۶۰) برای القای وراثت مادری در ماهی خاویاری شیپ و تعیین درصد موفقیت آن با استفاده از مارکر میکروستلایت Afu۹ و Afu۶۸ [۳۳] بود.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲ انتخاب مولدین

به منظور ماده‌زایی و انجام آزمایشات مربوط به آن ۲ عدد ماهی شیپ مولد ماده و ۲ عدد ماهی قره‌برون مولد جنس نر با هورمونوتراپی آماده شدند. هورمون GnRH برای مولدین نر به میزان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در یک مرحله و برای مولدین ماده در دو مرحله ۱۰٪ در اولین تزریق و ۹۰٪ بعد از ۸ ساعت [۳۴] در مؤسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر انجام شد. سپس استحصال اسپرم و تخمک صورت گرفت. مقدار لازم اسپرم با استفاده از فشار اندک به ناحیه شکمی ماهی قره‌برون نر استحصال و جمع‌آوری شد.

جهت جدا کردن مایع اسپرمی ابتدا اسپرم استحصال شده با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس اسپرم با مایع اسپرمی (۱ اسپرم به ۹ مایع اسپرمی) رقیق‌سازی شد [۳۰] و در مجاورت یخ دور از دسترس آب (دمای کنترل شده ۴ تا ۵ درجه سانتی‌گراد) به پژوهشکده کاربرد پرتوها منتقل گردید و اسپرم‌ها در ۶ لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری تقسیم‌بندی و هر لوله محتوی نمونه اسپرم به صورت جداگانه با دزهای ۰/۴۵، ۰/۶، ۰/۷۵، ۰/۹ و ۱/۰۵ کیلوگری حاصل از پرتو گاما ساطع شده از کبالت ۶۰ با استفاده از گاماسل (Gamma cell PX-30-ISSIE, Russia) با دز ۰/۱۳۷ گری برثانیه پرتودهی شدند. سپس نمونه‌ها به مؤسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر جهت لقاح و انجام اعمال انکوباسیون بازگردانده شدند. سپس تعداد ۱۰۰۰۰ عدد تخمک مولدین ماهی خاویاری شیپ نیز با استفاده از فشار اندک به ناحیه شکمی از سمت سر (باله سینه‌ای) به ساقه دم استحصال شد. برای اندازه‌گیری مدت زمان و درصد تحرک اسپرم به صورت چشمی ۳۰۰ میکروگرم آب توسط پیپت روی لام قرار داده شد و سپس بعد از آماده شدن نمونه‌های هر دز اسپرم ۵۰ میکروگرم اسپرم توسط پیپت به لام منتقل و با آب مخلوط و بلافاصله مدت زمان (زمانی که ۱۰۰ درصد اسپرم‌ها از حرکت بایستند) و درصد تحرک اسپرم در قسمت‌های مختلف لام زیر میکروسکوپ نوری ضمینه تاریک با بزرگ‌نمایی × ۴۰۰ مورد اندازه‌گیری و شمارش قرار می‌گرفت. برای اندازه‌گیری مدت زمان و درصد تحرک اسپرم به صورت چشمی ۳۰۰ میکروگرم آب توسط پیپت روی لام قرار داده شد و سپس بعد از آماده شدن نمونه‌های هر دز اسپرم ۵۰ میکروگرم اسپرم توسط پیپت به لام منتقل و با آب مخلوط و بلافاصله مدت زمان (زمانی که ۱۰۰ درصد اسپرم‌ها از حرکت بایستند) و درصد تحرک اسپرم در قسمت‌های مختلف لام مورد اندازه‌گیری و شمارش قرار می‌گرفت.

برای بررسی میزان رسیدگی تخمک‌ها از تخمک ماهیان قبل از لقاح، نمونه‌برداری و میزان مهاجرت هسته به قطب حیوانی اندازه‌گیری گردید.

جهت مطالعه قابلیت لقاح و سلامت اسپرم‌های مولدین، میکروسکوپ نوری به سالن تکثیر منتقل شد. میزان رسیدگی تخم‌های ماهیان مورد بررسی قرار گرفت. بررسی GVBD نمونه گیری از تخمک انجام و نمونه‌ها در فرمالین ۱۰٪ فیکس شدند، سپس تخمک‌ها از فرمالین خارج و به میزان ۲ دقیقه روی چراغ الکلی جوشانده شدند و آب سرد به آن‌ها اضافه شده و سپس بعد از مشخص شدن قطب حیوانی و گیاهی برش به‌وسیله اسکالپل از محور حیوانی- گیاهی انجام شد. در زمان رسیدگی نهایی هسته ناپدید می‌شود [۳۵]. تقسیم‌بندی انکوباتورها جهت انتقال و توزیع تصادفی تخم‌های تیمارهای مختلف انجام شد.

بعد از جدا نمودن مایع تخمدانی از تخمک، ۵۰ گرم تخمک برای هر تیمار وزن شده داخل تشت‌های جداگانه‌ایی ریخته شد و سپس ۰/۵ میلی‌لیتر اسپرم تیمار مربوطه (دزهای مختلف) با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب کارگاه مخلوط و به مدت ۴ دقیقه با دست مخلوط گردید، سپس کمی آب به تشتک‌ها اضافه گردید و آب و اسپرم اضافه خارج شد. برای جلوگیری از چسبندگی تخمک از گل رس استفاده شد.

جهت القای پلوئیدی در تخم‌ها، حمام آبی با درجه حرارت‌های ۴ درجه سانتی‌گراد با استفاده از یخ خشک برقرار گردیده و تخم‌های لقاح یافته در زمان ۴۰ دقیقه پس از لقاح به مدت ۱۰ دقیقه تحت شوک حرارتی در این دما قرار گرفتند [۳۶]. پس از اعمال شوک تخم‌های لقاح یافته به انکوباتور زوک با دبی ۲ تا ۳ لیتر در ثانیه، هوادهی و تنظیم دما و دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد منتقل گردیده و تا زمان تفریخ و درون این انکوباتور نگه‌داری شدند. به منظور بررسی شرایط اپتیمال

یک گروه شاهد با استفاده از لقاح تخمک و اسپرم نرمال بدون استفاده از شوک حرارتی، در نظر گرفته شده بود. شرایط مطلوب شوک‌های حرارتی یک گروه شاهد هاپلوئید که حاصل لقاح اسپرم پرتودیده و تخمک نرمال ولی بدون شوک حرارتی (هاپلوئید) و نیز برای بررسی عملکرد شوک حرارتی یک گروه تریپلوئید به عنوان گروه شاهد شوک حرارتی با اعمال شوک حرارتی با استفاده از اسپرم عادی (پرتو ندیده) در نظر گرفته شد. در گروه هیبرید لقاح اسپرم معمولی ماهی قره‌برون با تخمک معمولی ماهی شیپ انجام شد. برای هر تیمار تعداد ۱۰۰۰ عدد تخمک استفاده شد.

بعد از لقاح تخم کلیه تیمارهای آزمایشی به صورت جداگانه ای به انکوباتور منتقل شدند. در طی شبانه‌روز هر دو ساعت یک بار با ساچوک از هر تیمار آزمایشی لاروهای تفریخ شده جداسازی و پس از شمارش به مخازن پرورشی ۲۰۰ لیتری منتقل شدند. پس از اتمام تفریخ لارو و تیماربندی نمونه‌های مختلف آزمایشی نمونه‌برداری صورت گرفت و نمونه‌ها جهت انجام آزمایشات تعیین وراثت با استفاده از مارکرهای مولکولی به آزمایشگاه منتقل شدند.

درصد لقاح (۳ تا ۴ ساعت پس از لقاح، در مرحله گاسترولاسیون و تقسیم دوم بلاستولایی) و تفریخ با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد [۳۷، ۳۸]:

۱۰۰* (تعداد تخم ماهی در زمان تکثیر ماهی / تعداد لارو ماهی دارای تقسیم دوتایی) = درصد لقاح

۱۰۰* (تعداد تخم ماهی در زمان تکثیر ماهی / تعداد لارو ماهی تفریخ شده درصد تفریخ) = درصد تفریخ

۲.۲ طی دوران تکامل جنینی در انکوباتور، انتقال به تراف‌های پرورشی، پروش اولیه و تغذیه لاروها

جهت جلوگیری از قارچ‌زدگی و بیماری‌های عفونی بچه ماهیان تخم‌ها در طول این دوره مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت و در صورت لزوم از محلول فرمالین و متیلن بلو با دز ۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد.

پس از طی دوره شروع شنای فعال با غذای استارتر شرکت بیومار فرانسه غذادهی شدند (جدول ۱). ماهیان تیمارهای مختلف آزمایشی پس از رسیدن به وزن ۵ گرم از مؤسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر به پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای منتقل شدند.

جدول ۱. آنالیز ترکیب شیمیایی خوراک مورد استفاده در تغذیه ماهی خاویاری (درصد براساس ماده خشک)

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

۳.۲ آزمایشات سلولی مولکولی ماهی خاویاری شیپ

۱.۳.۲ نمونه‌گیری و استخراج DNA

نمونه‌برداری از باله دمی مولد نر تاس‌ماهی ایرانی، مولد نر و مولد ماده تاس ماهی شیپ انجام گرفت. هم‌چنین DNA تعداد ۱۵ عدد لارو از هر تیمار که قبلاً در الکل اتانول خالص و در میکروتیوب‌های ۱٫۵ میلی‌لیتری نگه‌داری شده بودند، استخراج گردید و کیفیت و کمیت نمونه‌های DNA به ترتیب با ژل آگاروز (شکل ۱) و دستگاه نانودراپ بررسی و نمونه‌های با کیفیت مناسب (میانگین غلظت ۵۰ تا ۱۰۰ ng/µl) انتخاب شد [۳۹]. پس از بررسی مطالعات انجام شده روی گونه‌های تاس‌ماهیان با روش میکروستلایت [۳۴] و مشاهده الگوی باندهی آن‌ها در مطالعات مختلف، تعداد ۲ جفت آغازگر میکروستلایت Afu-۶۸ و Afug-۹ انتخاب گردید (جدول ۲).

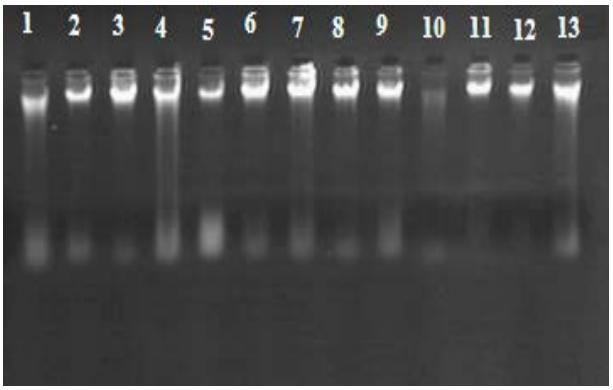
۲.۳.۲ تکثیر DNA و PCR

برنامه PCR هر ۲ جفت آغازگر روی مولدین (گونه تاس‌ماهی شیپ ماده و تاس‌ماهی ایرانی نر) و فرزندان گاینوژن در تیمارهای مختلف انجام شد (لازم به ذکر است که در این مرحله رقیق‌سازی پرایمر مارکرهای Afu-۶۸ و Afug-۹ (جدول ۳) مطابق دستورالعمل درج شده روی راهنمای استفاده از آغازگر انجام گردید). پس از تغییر شرایط PCR بهترین شرایط به‌دست آمده از نظر غلظت مواد و شرایط برنامه ترمال سایکلر به روشی که حداقل باند اضافی را دارا باشد و باندهای اصلی دارای وضوح کامل باشند. مواد مورد استفاده برای PCR شامل آنزیم تک DNA پلیمراز، Mgcl۲ با غلظت ۵۰ میلی‌مولار، بافر PCR در غلظت ۱۰x، آب مقطر تزریقی، DNA ژنومی استخراج شده، آغازگرهای میکروستلایت بود (جدول ۴).

برای PCR هر نمونه یک تیوب ۰٫۲ میلی‌لیتری استریل انتخاب و شماره نمونه روی آن ثبت گردید. سپس ترکیبات ذکر شده در بالا با نسبت تعیین شده در جدول ۳ به آن اضافه شد. محتویات ویال‌ها توسط سمپلر خوب هم زده شد و سپس ویال‌ها به مدت ۱۰ ثانیه در دمای اتاق و ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ کرده تا محتویات به‌خوبی هم زده و ترکیب گردد. تیوب‌ها به ترموسایکلر منتقل شدند و عملیات PCR بر طبق برنامه جدول ۳ امپلیفای شد.

جدول ۲. لوکوس، شماره دست‌یابی در بانک ژن، توالی آغازگرهای مورد استفاده و اندازه توالی Afug [۳۳]

	Locus	Gene Bank Acces .no	Primer sequence (5`-3`)	Sequenced size (bp)
۱	AfuG-۹	AF۵۲۹۴۴۷	F: CATAATGTAAAGCAAAAGT R: ACCTGAAATGTATGTTATG	۱۵۲
۲	Afu-۶۸	AF۵۲۹۴۸۰	F: AATGGCTTATCTTTTATCTTGACT R: AGCTTTTCTGGACTGTGTATGTT	۲۱۰



شکل ۱. DNA استخراج شده از لاروهای حاصل از تیمارهای متفاوت (ستون‌های ۱ در ۶۰۰ گری، ۲ در ۹۵۰ گری، ۳ در ۴۵۰ گری، ۴ در ۶۰۰ گری، ۵ در ۴۵۰ گری، ۶ در ۷۵۰ گری، ۷ در ۹۵۰ گری، ۸ در ۱۰۵۰ گری، ۹ در ۷۵۰ گری، ۱۰ در ۱۰۵۰ گری و ۱۱ در ۹۰۰ گری) و باله مولدین تاس‌ماهی ایرانی نر (ستون ۱۲) و تاس‌ماهی شیپ ماده (ستون ۱۳) به روش استات آمونیم.

جدول ۳. برنامه چرخه های واکنش PCR

مراحل	درجه حرارت (سانتی گراد)	زمان (min)	تعداد چرخه (سیکل)
واسرشته‌سازی اولیه	۹۴	۳	۱
واسرشته‌سازی	۹۴	۰/۵	۲۰-۳۵
الحاق	۵۷-۶۴	۰/۵	
بسط	۷۲	۰/۵	
بسط نهایی	۷۲	۵	۱

جدول ۴. نوع و مقدار مواد استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

ماده	غلظت مواد	مقدار برای واکنش ۲۰ میکرولیتری
DNA	۵۰ ng	۵۰ µ g
آنزیم تک DNA پلیمراز	۵ u / µ	۰/۱۵ میکرولیتر
dNTPs	۱۰ میلی مولار	۰/۴ میکرولیتر
MgCl۲	۵۰ میلی مولار	۰/۷ میکرولیتر
PCR Buffer	۱۰ x	۲ میکرولیتر
آغازگر ۱	۱۰ Variable پیکومول	۱ میکرولیتر
آغازگر ۲	۱۰ Variable پیکومول	۱ میکرولیتر
آب مقطر	ــــــــــ	تا ۲۰ میکرولیتر

۴.۲ الکترفورز نمونه‌ها روی ژل پلی‌اکریلامید ۶٪

ابتدا ۲۷/۵ میلی‌لیتر آب مقطر به ۷/۵ میلی‌لیتر آکریل آمید (۳۰٪) و ۳۲/۵ میکرولیتر تترا متیل اتیلن دی امین (TEMED)، ۳۰۰ میکرولیتر APS (آمونیم پرسولفات) به محلول اضافه شد و به خوبی هم زده شد. سپس محلول حاصل به فضای بسته شده بین صفحات شیشه‌ای که قبلاً آماده شده منتقل گردید و به دنبال آن شانه در محل خود قرار گرفت. پس از بسته شدن ژل (حدود نیم تا یک ساعت) شانه را برداشته و چاهک‌ها را با بافر TBE (۱x) شستشو داده و نمونه‌ها به ترتیب در محل چاهک‌ها ریخته شده و ژل در ستون عمودی بافر حاوی TBE (۱x) قرار گرفت و با روشن نمودن دستگاه و تنظیم مولد برق آن بر روی ولتاژ ۱۵۰ ولت، الکتروفورز نمونه‌ها در مدت ۳ ساعت انجام شد. مواد مورد استفاده رنگ‌آمیزی ژل پلی اکریل آمید با نیترات نقره عبارت بودند از اسید استیک، اتانول، نیترات نقره، NaOH، NaBH۴، فرمالدئید، آب مقطر دو بار تقطیر و تجهیزات مورد استفاده شامل شیکر مدل ۲۰۴۰-۰۵ (ساخت شرکت اختریان، ایران)، ظروف رنگ‌آمیزی بودند.

۵.۲ تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

طرح آزمایش به صورت یک طرح کاملاً تصادفی استفاده بود. برای مقایسه میانگین داده‌ها از تجزیه واریانس یک‌طرفه (ONE-WAY-ANOVA) انجام و سطح معنی‌دار بودن در بین تیمارها از طریق آزمون Duncan در سطح احتمال ۵٪ انجام گردید. تجزیه و تحلیل آماری به وسیله نرم‌افزار SPSS ۱۷ در محیط ویندوز انجام شد و برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Excel, ۲۰۱۰ در محیط ویندوز استفاده شد.

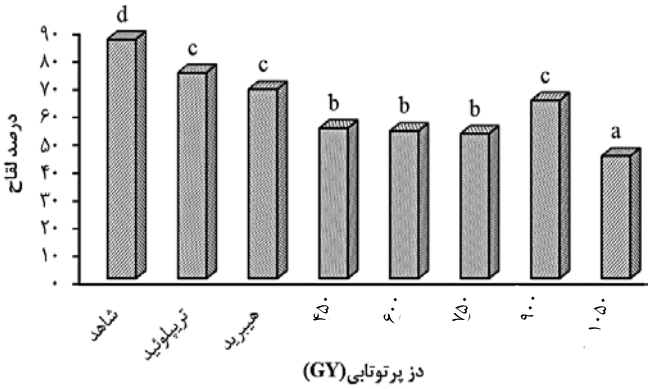
۳. نتایج

۱.۳ کیفیت اسپرم، لقاح و تفریخ لارو ماهی

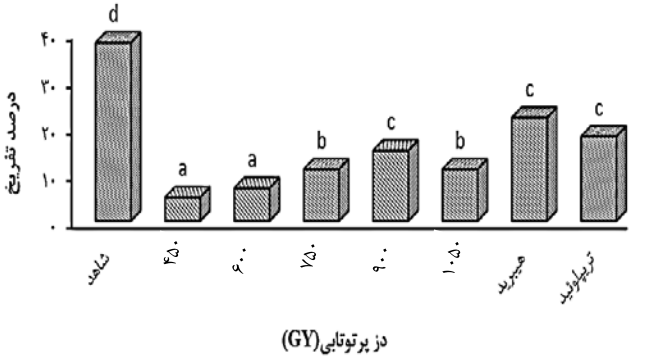
نتایج نشان داد که بیش‌ترین گری و کم‌ترین فعالیت اسپرم بعد از پرتوتابی به ترتیب مربوط به گروه ۰/۹ کیلو گری و ۱/۰۵ کیلو گری می‌باشد ($p<0/05$) (جدول ۵). هم‌چنین نتایج نشان داد که بین تیمارهای آزمایشی تیمار پرتودهی شده با دز ۰/۹ کیلوگری دارای بیش‌ترین لقاح و درصد تفریخ (۱۵٪) بود ($p<0/05$). (شکل‌های ۲ و ۳). با توجه به مطالعات قبلی کاهش فعالیت اسپرم در دزهای ۰/۷۵-۰/۴۵ کیلوگری می‌تواند به دلیل پدیده باقی‌ماندن قطعات کروموزوم اسپرم تخریب نشده (Paternal Chromosome Contamination) در دزهای پایین باشد [۴۰].

جدول ۵. مقایسه میانگین (SD±میانگین) درصد تحرک اسپرم ماهی خاویاری شیپ، با دزهای مختلف

	دزهای پرتو تابی (کیلو گری)					
	شاهد	۰/۴۵	۰/۶	۰/۷۵	۰/۹	۱/۰۵
درصد تحرک قبل از پرتودهی (ثانیه)	۴۷	۴۷	۴۷	۴۷	۴۷	۴۷
میزان تحرک بعد از پرتودهی (ثانیه)	۴±۳۶/۱^{c}	۲±۱۲/۳^{a}	۳±۱۴/۱^{a}	۴±۲۳/۲^{b}	۴±۲۵/۳^{b}	۳±۱۰/۶^{a}



شکل ۲. درصد لقاح در گروه‌های مختلف آزمایشی.

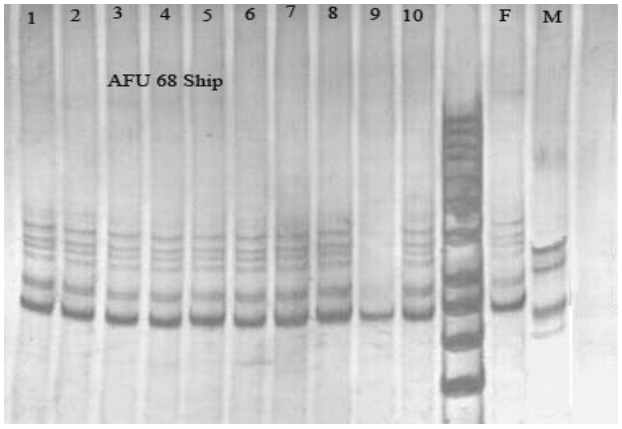


شکل ۳. درصد تفریخ در گروه‌های مختلف آزمایشی.

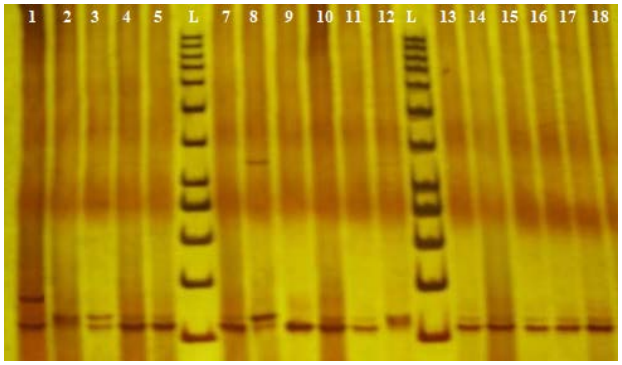
۲.۳ بررسی‌های مولکولی وراثتی

در لوکوس Afu-۶۸ الگوی باندها حالت دیسومیک را نشان می‌دهند (شکل ۴). الگوی باندی مشابه‌ی در تاسماهی شیپ (مولد مادری) با نتاج گاینوژن ظاهر گردید که نشان‌دهنده وراثت‌پذیری مادری در فرزندان و تأیید ژاینوژنزیز در آن‌ها می‌باشد ولی عدم تشابه در الگوی باندی ژنوم پدری با نتاج حاصله نشان‌دهنده عدم وراثت‌پذیری ژنومیک فرزندان از والد پدری (تاس‌ماهی ایرانی) می‌باشد. در لوکوس Afug-۹ که الگوی باندها حالت دیسومیک را نشان می‌دادند (شکل ۳) در تاس‌ماهی شیپ (مولد مادری) با نتاج ژاینوژن دارای الگوی مشابه بودند (شکل ۵).

نتایج حاصل از تعیین وراثت ماهی خاویاری شیپ تیمارهای مختلف نشان داد که از ماهیان مربوط به تیمار ۰/۴۵ کیلوگری ۴ نمونه وراثت شیپ و تنها ۱ نمونه وراثت ماهی قره‌برون را به ارث برده بود، هم‌چنین نتایج نشان داد که در تیمار شاهد کلیه نمونه‌ها دارای وراثت مادری ماهی شیپ بودند. هم‌چنین در تیمار تریپلوئید ۵ نمونه دارای وراثت مادری بودند. در تیمارهای ۰/۶، ۰/۷۵، ۰/۹ و ۱/۰۵ کیلوگری کلیه نمونه‌ها از نظر مولکولی دارای وراثت جنس شیپ یا ماده بودند.



شکل ۴. الگوی باندی منومورفیک در نتاج ژاینوژن (تیمار ۰/۴۵ کیلوگری ستون‌های ۱ و ۲، تیمار ۰/۶ کیلوگری ستون ۳ و ۴، ستون‌های ۵ و ۶ تیمار ۰/۷۵ کیلوگری، ستون ۷ و ۸ تیمار ۰/۹ کیلوگری و ستون‌های ۹ و ۱۰ تیمار ۱/۰۵ کیلوگری) و F مولد مادری و مقایسه آن با ژنوم پدری M (Persian sturgeon) با استفاده از نشان‌گر AFU ۶۸.



شکل ۵. ستون اول الگوی مولد پدری قره برون را نشان می‌دهد و ستون دوم الگوی مولد مادری را نشان می‌دهد، الگوی باندی منومورفیک در نتاج گاینوژن (تیمار ۴۵۰ گری ستون‌های ۳-۵، تیمار ۰/۶ کیلوگری ستون ۷-۹، تیمار ۰/۷۵ کیلوگری ستون‌های ۱۰-۱۲، تیمار ۰/۹ کیلوگری ستون ۱۳-۱۵ و تیمار ۱/۰۵ کیلوگری ستون‌های ۱۶-۱۸ به وضوح شبیه به مولد مادری یعنی ستون دوم است و با مولد پدری یعنی ستون اول تفاوت دارد.

۴. بحث

ماده‌زایی نوعی تولید مثل است که در آن وجود اسپرم فقط برای القا رشد ارگانیسم جدید لازم است اما DNA پدر به زایگوت منتقل نمی‌شود. در نتیجه، فرزندان ماهیان ژنی ژنتیکی فقط

مواد ژنتیکی مادر دارند [۴۱]. این پدیده به طور طبیعی در برخی از گونه‌های ماهی مانند کپور کوی (کپور *Cipinus carpio*) یا ماهی حوض (*Carassius auratus gibelio*) رخ می‌دهد [۴۲]. تحقیقاتی در ایران و سایر کشورها روی ماده‌زایی ماهیان خاویاری صورت گرفته است که اکثر این تحقیقات ماده‌زایی با پرتو UV صورت گرفته است. در تحقیقی ماده‌زایی میوتیک در ماهی شیپ با استفاده از اسپرم پرتودیده با اشعه UV ماهی سیبری صورت گرفت نتایج این تحقیق نشان داد که می‌توان با استفاده از اسپرم سیبری در ماهی شیپ یک گانژنزیز موفقیت‌آمیز داشت که درصد لقاح در این تحقیق ۶۰ درصد بود [۳۱]. در تحقیقی دیگر تخمک ماهی استرلیاد ماده آلبینو با اسپرم پرتودیده با پرتو UV ماهی نر استرلیاد معمولی ماده‌زایی انجام شد. در تحقیق فوق‌الذکر درصد تفریخ زیر ۵٪ بود [۳۰]. در گونه‌های دیگر، از جمله ماهیان خاویاری سیبری *Acipenser baerii*، ماهیان خاویاری سفید *Acipenser transmontanus*، ماهیان خاویاری کوتاه پوزه *Acipenser brevirostrum*، و استرلیاد *Acipenser ruthenus*)، که احتمالاً دارای سیستم تعیین جنسیت ZW هستند که در آن ماده‌ها هتروگامتیک هستند می‌توان این پدیده را القا کرد [۴۳-۴۶]. برخی از فرزندان ماده "ابر ماده" WW هستند که وقتی با نرهای طبیعی (ZZ) تلاقی شوند، فرزندان کاملاً ماده (WZ) تولید می‌کنند. کروموزوم‌های جنسی در ماهیان خاویاری مشخص نشده است. بنابراین، "سوپر ماده‌ها" فقط با تجزیه و تحلیل غدد جنسی قابل تشخیص هستند.

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که میزان لقاح، تفریخ در ماهیان گاینوژن کاهش یافت این در حالی است که میزان بازماندگی در این ماهیان تغییری را نشان نمی‌دهد. هم‌چنین نتایج تعیین جنسیت با استفاده از روش‌های مولکولی نشان می‌دهد که در تیمارهای ماده‌زایی شده با دز ۰/۴۵ کیلوگری پرتو گاما هنوز از مولد نر آثار وراثت وجود دارد و این نتایج کاملاً وابسته به دز مورد استفاده شده جهت ماده‌زایی بستگی دارد.

در این تحقیق گروه تریپلوئید القا شده با شوک حرارتی از نظر شاخص‌های رشدی تفاوت معنی‌داری با گروه‌های ماده‌زایی شده نداشت و از آن‌جایی که، درصد تفریخ و بقاء در این گروه به صورت معنی‌داری کاهش یافته بود استفاده از این گروه با محدودیت مواجه می‌شود ولی در ماهیانی که بقاء پیدا می‌کنند و شرایط نرمال زیست در آن‌ها فراهم شود رشد و بازماندگی خوبی خواهند داشت که این با سایر اطلاعات مربوط به مطالعات دیگر هم‌خوانی دارد [۴۷، ۴۸].

ماده‌زایی در واقع یک دست‌کاری ژنومی است که بدون شک اهمیت آن در پرورش ماهیان خاویاری طی سال‌های آینده افزایش خواهد یافت [۴۶]. فن‌آوری مناسب برای تولید ذخایر ماهیان خاویاری ماده، با استفاده از تکنیک‌های مهندسی ژنوم، تا حد مطلوب و در چندین مرکز تحقیقاتی انجام می‌شود. این مطالعات طولانی مدت (به دلیل بلوغ جنسی دیررس ماهیان خاویاری) اغلب به دلیل عوامل طبیعی با شکست مواجه خواهند شد. یافته‌های انجام شده در مطالعه حاضر دانش مهمی را برای تولید مثل موفقیت‌آمیز ماده‌زایی ماهی شیپ فراهم می‌کند و می‌تواند به عنوان منحصر به فرد در نظر گرفته شود. ماده گاینوژن در مطالعه حاضر مورد ارزیابی قرار گرفت "و مطالعات بیش‌تری باید انجام شود تا مشخص شود آیا می‌توان" فوق‌ماده‌ها را شناسایی کرد.

از طرفی با توجه به اطلاعات به دست آمده و افزایش بازده در گروه ۰/۹ کیلوگری دز مذکور در بین گروه‌های مختلف به عنوان بهترین دز ماده‌زایی در ماهی خاویاری شیپ انتخاب می‌گردد. با توجه به احتمال وجود ماهی ابر ماده WW در این روش [۴۹] شناسایی ماهی ابر ماده در این گروه از ماهیان ارزش بسیار زیادی است که تاکنون برای شناسایی آن کم‌تر کاری صورت گرفته است، بنابراین جهت قضاوت قاطعانه انجام کارهای در سطح وسیع‌تر در زمان استفاده از این روش ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین با اطلاعات به دست آمده از این تحقیق نتیجه‌گیری می‌شود که استفاده از ماده‌زایی ۰/۹ کیلوگری پرتو گاما با استفاده از پرتو گاما به عنوان دز مناسب ماده‌زایی ماهی خاویاری شیپ انتخاب و به عنوان پیشنهاد برای فعالیت‌های آینده می‌توان تحقیقاتی را روی گونه‌های دیگر خاویاری انجام داد. اخیراً از توالی‌یابی نسل جدید برای تعیین جنسیت ماهیان خاویاری مارکری به نام AllWSex۲ پیدا شده است [۲۷]. در نتیجه در کارهای آینده می‌توان با کمک این مارکر و روش‌های تعیین ابر ماده به افزایش تولید خاویار کمک شایانی کرد.

مراجع

1. R.P. Khodorevskaya, et al., *Present status of commercial stocks of sturgeons in the Caspian Sea basin*, In Sturgeon Biodiversity and Conservation, 209-219 Springer (1997).
2. J. HOLČÍK, *In the catchment area of the southern caspian sea*, Biologica, **40**, 114-199 (1996).
3. H. Abdolhay, *Sturgeon stocking programme in the Caspian Sea with emphasis on Iran*, Fao Fisheries Technical Paper, **429**, 133 (2004).
4. M.A. Webb, S. Doroshov, *Importance of environmental endocrinology in fisheries management and aquaculture of sturgeons*, General and Comparative Endocrinology, **170**, 313-321 (2011).
5. J.H. Connell, E. Orias, *The ecological regulation of species diversity*, The American Naturalist, **98**, 399-414 (1964).
6. P.D. Greany, J.E. Carpenter, K.-H. Tan, *Use of nuclear techniques in biological control, Paper presented at the Area-wide control of fruit flies and other insect pests, Joint proceedings of the international conference on area-wide control of insect pests*, 28 May-2 June, 1998 and the Fifth International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, Penang, Malaysia, 1-5 June, (1998).
7. N. Sun, S. Lee, K.B. Song, *Characterization of a carotenoid-hyperproducing yeast mutant isolated by low-dose gamma irradiation*, International Journal of Food Mmicrobiology, **94**, 263-267 (2004).
8. M.M. Husseiny, H.F. Madsen, *Sterilization of the navel orangeworm, Paramyelois transitella (Walker)*, by gamma radiation (Lepidoptera: Phycitidae): University of Calif (1964).
9. L. Andrews, M. Jahncke, K. Mallikarjunan, *Low dose gamma irradiation to reduce pathogenic Vibrios in live oysters (Crassostrea virginica)*, Journal of Aquatic Food Product Technology, **12**, 71-82 (2003).
10. M. Parikka, et al., *Mycobacterium marinum causes a latent infection that can be reactivated by gamma irradiation in adult zebrafish*, (2012).
11. K.-I. Ijiri, *Gamma-ray irradiation of the sperm of the fish Oryzias latipes and induction of gynogenesis*, Journal of Radiation Research, **21**, 263-270 (1980).
12. D. Chourrout, B. Chevassus, F. Herioux, *Analysis of an Hertwig effect in the rainbow trout (Salmo gairdneri Richardson) after fertilization with γ-irradiated sperm*, Reproduction Nutrition Développement, **20**, 719-726 (1980).
13. H. Komen, G.H. Thorgaard, *Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: a review*, Aquaculture, **269**, 150-173 (2007).
14. J.G. Christopher, A.G. Murugesan, N. Sukumaran, *Optimization of UV treatment to induce haploid androgenesis in the stinging catfish*, Heteropneustes fossilis, International Aquatic Research, **4**, 1-8 (2012).
15. 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).
16. F. Piferrer, et al., *Induction of gynogenesis in the turbot (Scophthalmus maximus):: effects of UV irradiation on sperm motility, the Hertwig effect and viability during the first 6 months of age*, Aquaculture, **238**, 403-419 (2004).
17. J.A. Luckenbach, et al., *Induction of diploid gynogenesis in southern flounder (Paralichthys lethostigma) with homologous and heterologous sperm*, Aquaculture, **237**, 499-516 (2004).
18. A.P. Breen, J.A. Murphy, *Reactions of oxyl radicals with DNA*, Free Radical Biology and Medicine, **18**, 1033-1077 (1995).
19. M. Dizdaroglu, et al., *Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement*, Free Radical Biology and Medicine, **32**, 1102-1115 (2002).
20. J. Ward, *The yield of DNA double-strand breaks produced intracellularly by ionizing radiation: a review*, International Journal of Radiation Biology, **57**, 1141-1150 (1990).
21. H.R. Devlin, Y. Nagahama, *Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental inf luences*, Aquaculture, **208**, 191-364 (2002).
22. J.E. Mank, J.C. Avise, *Evolutionary diversity and turn-over of sex-determination in teleost fishes*, Sexual Development, **3**, 60-67 (2009).
23. M. Matsuda, et al., *Oryzias curvinotus has DMY, a gene that is required for male development in the medaka*, O. Latipes. Zoological Sciences, **20**, 159-161 (2003).
24. M. Matsuda, et al., *DMY gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **10**, 3865-3870 (2007).
25. T. Myosho, et al., *Tracing the emergence of a novel sexdetermining gene in medaka*, Oryzias Luzonensis, Genetics, **191**, 163-170 (2012).
26. T. Kamiya, W, et al., *A Trans-Species Missense SNP in Amhr2 Is Associated with Sex-determination in the Tiger Pufferfish, Takifugu rubripes (Fugu)*, PLoS Genetics, **8**, e1002798 (2012).
27. H. Kuhl, et al., *A 180 My-old female-specific genome region in sturgeon reveals the oldest known vertebrate sex determining system with undifferentiated sex chromosomes*, BioRxiv (2020).
28. A. Yano, et al., *The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (sdY) is conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids*, Evolutionary Applications, 1752-4571 (2012).
29. S. Wuertz, et al., *Sex determination in sturgeon*, Sex Control in Aquaculture, 645-668 (2018).
30. D. Fopp-Bayat, et al., *Disturbances in the ploidy level in the gynogenetic sterlet Acipenser ruthenus*, Journal of Applied Genetics, **58**, 373-380 (2017).
31. M.H. Saber, et al., *Induction of meiotic gynogenesis in ship sturgeon Acipenser nudiventris using UV-irradiated heterologous sperm*, Journal of Applied Genetics, **55**, 223-229 (2014).
32. S.D. Mims, et al., *Induced meiotic gynogenesis of paddlefish Polyodon spathula*, Journal of the World Aquaculture Society, **28**, 334-343 (1997).

33. A.B. Welsh, M. Blumberg, B. May, *Identification of microsatellite loci in lake sturgeon, Acipenser fulvescens, and their variability in green sturgeon*, A. medirostris, Molecular Ecology Notes, **3**, 47- 55 (2003).
34. M.H. Saber, et al., *Induction of meiotic gynogenesis in ship sturgeon Acipenser nudiventris using UV-irradiated heterologous sperm*, Journal of Applied Genetics, **55**, 223-229 (2014).
35. B. Taneh, B. Abtahi, R.M. Nazari, *In vitro assessment of final oocyte maturation index (GVBD) in Persian Sturgeon and broodstock selection*, Experimental Animal Biology, **1**, 31-40 (2012).
36. S. Dorafshan, M.R. Kalbassi, *Effects of triploidy on the Caspian salmon Salmo trutta caspius haematology*, Fish Physiol Biochem, **34**, 195-200 (2008).
37. 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).
38. M. Sswat, et al., *Growth performance and survival of larval Atlantic herring, under the combined effects of elevated temperatures and CO2*, PLoS One, **13**, e0191947 (2018).
39. M. Pourkazemi, *Molecular and biochemical genetic analysis of sturgeon stocks from the South Caspian Sea*, University of Wales Swansea (1996).
40. T.a. Pandian, R. Koteeswaran, *Ploidy induction and sex control in fish*, Hydrobiologia, **384**, 167-243 (1998).
41. D. Fopp-Bayat, K. Ocalewicz, *Activation of the albino sterlet Acipenser ruthenus eggs by UV-irradiated bester hybrid spermatozoa to provide gynogenetic progeny*, Reproduction in Domestic Animals, **50**, 554-559 (2015).
42. L. Zhou, Y. Wang, J.-F. Gui, *Genetic evidence for gonochoristic reproduction in gynogenetic silver crucian carp (Carassius auratus gibelio Bloch) as revealed by RAPD assays*, Journal of Molecular Evolution, **51**, 498-506 (2000).
43. A. Van Eenennaam, et al., *Brief communication. Evidence of female heterogametic genetic sex determination in white sturgeon*, Journal of Heredity, **90**, 231-233 (1999).
44. S. Flynn, et al., *Gynogenesis and sex determination in shortnose sturgeon, Acipenser brevirostrum Lesuere*, Aquaculture, 253, 721-727 (2006).
45. D. Fopp-Bayat, *Meiotic gynogenesis revealed not homogametic female sex determination system in Siberian sturgeon (Acipenser baeri Brandt)*, Aquaculture, **305**, 174-177 (2010).
46. D. Fopp-Bayat, P. Hliwa, K. Ocalewicz, *Presence of gynogenetic males suggests a female heterogamety in sterlet Acipenser ruthenus L*, Animal Reproduction Science, **189**, 110-118 (2018).
47. T.J. Benfey, *Use of all-female and triploid salmonids for aquaculture in Canada*, Bulletin of the Aquaculture Association of Canada, **96-2**, 6-8 (1996).
48. M. Yamashita, et al., *A tripolar spindle formed at meiosis-I assures the retention of the original ploidy in the gynogenetic triploid crucian carp (ginbuna), Carassius auratus langsdorfii*, Development Growth and Differentiation, **35**, 631-636 (1993).
49. N. Omoto, et al., *Sex ratios of triploids and gynogenetic diploids induced in the hybrid sturgeon, the bester (Huso huso female × Acipenser ruthenus male)*, Aquaculture, **245**, 39-47 (2005).

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، علیرضا نیسی (۱۴۰۱)، کاربرد فن‌آوری هسته‌ای در القای وراثت مادری تاسماهی شیپ (Acipenser nudiventris)، ۱۰۰، ۱۳۹-۱۴۷

DOR: 20.1001.1.17351871.1401.43.2.16.1 **Url**: https://jonsat.nstri.ir/article_1393.html