



University of Tehran

Journal of Fisheries

Home Page: <https://jfisheries.ut.ac.ir>

Online ISSN: 2423-7809

Sex determination of Caspian trout (*Salmo caspius*) using the SRY sex-determining locus

Shirin Jamshidi*

Corresponding author, International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran. Email: jamshidi99@yahoo.com

ARTICLE INFO

Article type:
Research Article

Article History:
Received: 12 February 2025
Revised: 16 August 2025
Accepted: 23 August 2025
Published online: 23 September 2025

Keywords:
Caspian Sea,
Male sex locus,
Molecular,
Sex determination,
Salmonidae.

ABSTRACT

The Caspian trout is one of the valuable and native fish species of Caspian Sea and its surrounding river from the north to south. Researches regarding this species are particularly important for conserving its population, as a valuable and native species of the Caspian Sea. Additionally, due to its potential for reproduction, cultivation, and fish farming as a cold-water fish species with high marketability, it holds a special role in aquaculture in Iran. Therefore, identifying male and female individuals and determining the genetic sex of Caspian Sea trout before they reach reproductive maturity when their sex can be morphologically determined is highly desirable and of great importance. In this study, DNA extraction was performed using the phenol-chloroform method on 37 broodstock samples of male and female Caspian Sea trout, including 21 males and 16 females. The morphological sex of these individuals was confirmed based on the presence of eggs and sperm or by opening the abdominal cavity and visually identifying the gonads. Amplification of the male-specific locus was conducted using two different groups of primers based on previous studies targeting the SRY locus, each with a different fragment size, using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. The analysis of the amplified bands on agarose gel and scoring of the bands from both primer groups showed that the phenotypic sex of the broodstock samples matched the genotypes identified using both sets of primers. Furthermore, the results from the two primer groups were fully consistent in terms of sex determination. This study not only established an optimized method for genetic sex determination in Caspian Sea trout, but also confirmed the presence of the male-specific locus and a heterogametic sex determination system in Caspian Sea salmon, similar to other salmonid species.

Cite this article: Jamshidi, Sh. (2025). Testing the molecular sex determination of Caspian trout (*Salmo caspius*) using the SRY sex-determining locus. *Journal of Fisheries*, 78 (3), 261-270. DOI: <http://doi.org/10.22059/jfisheries.2025.390403.1450>



© The Author(s) **Publisher:** University of Tehran Press.
DOI: <http://doi.org/10.22059/jfisheries.2025.390403.1450>



دانشگاه تهران

تعیین جنسیت مولکولی ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*) با استفاده از جایگاه تعیین جنسیت SRY

شیرین جمشیدی*

نویسنده مسئول، موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران. رایانامه: jamshidi99@yahoo.com

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

پژوهشی

تاریخ‌های مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۲۴

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۵/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۰۱

تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۷/۰۱

کلیدواژه:

آزادماهیان،

تعیین جنسیت،

جایگاه جنس نر،

دریای خزر،

مولکولی.

ماهی آزاد دریای خزر از ماهیان ارزشمند و بومی این دریاچه و رودخانه‌های جنوب و شمال آن است. اهمیت تحقیق روی این گونه از جهت حفظ ذخایر آن برای مباحث حفاظت گونه‌های بومی و با ارزش دریای خزر و همچنین تکثیر، پرورش و رشد این گونه به‌عنوان گونه ماهی سردآبی با خصوصیات بازاریابی بالا از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بدین‌جهت، شناسایی جنس نر و ماده و تعیین جنسیت ژنتیکی^۱ ماهی آزاد دریای خزر قبل از بلوغ و تولیدمثل و زمانی که از نظر ریختی^۲ قابل تشخیص باشد؛ مطلوب بوده و اهمیت ویژه‌ای دارد. در این تحقیق، استخراج DNA با استفاده از روش فنل-کلروفرم روی ۳۷ نمونه از مولدین آزاد ماهی نر و ماده دریای خزر شامل ۲۱ عدد نر و ۱۶ عدد ماده که از نظر ریختی جنسیت آنها مشخص بود و براساس تخمک و اسپرم‌دهی یا باز شدن حفره شکمی و رویت گنادها انجام شد. تکثیر باند جایگاه نر با استفاده از دو گروه متفاوت از آغازگرهای دو تحقیق روی جایگاه SRY با اندازه متفاوت، با استفاده از روش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) انجام شد. نتایج بررسی باندهای تکثیر شده روی ژل آگارز و امتیازدهی باندها در دو گروه آغازگرهای مورد بررسی نشان داد که فنوتیپ نمونه‌های مولدین نر و ماده، مطابق با ژنوتیپ به‌دست آمده براساس دو گروه آغازگرهای مورد استفاده است و همین‌طور نتایج دو گروه آغازگر به‌کار برده شده از نظر تعیین جنسیت، کاملاً بر هم انطباق دارد. این تحقیق علاوه بر دستیابی به روش بهینه برای تعیین جنسیت ژنتیکی ماهی آزاد دریای خزر، تأیید کرد که جایگاه جنس نر و سیستم تعیین جنسیت هتروژنتیک^۳ در آزاد ماهی دریای خزر همانند دیگر آزادماهیان است.

استناد: جمشیدی؛ شیرین (۱۴۰۴). برآورد آزمودن تعیین جنسیت مولکولی ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*) با استفاده از جایگاه تعیین جنسیت SRY. نشریه شیلات،

مجله منابع طبیعی ایران، ۷۸ (۳)، ۲۶۱-۲۷۰. DOI: <http://doi.org/10.22059/jfisheries.2025.390403.1450>

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: <http://doi.org/10.22059/jfisheries.2025.390403.1450>



^۱Genotypic

^۲Phenotypic

^۳XY (Hetrogenic)

۱. مقدمه

سیستم اصلی تعیین جنسیت در گروه بزرگی از مهره‌داران یعنی پستانداران که در اوایل سال‌های دهه ۱۹۹۰ معرفی شد؛ به صورت XX/XY است و نشان داده شد که منطقه اصلی تعیین‌کننده جنسیت روی کروموزوم جنسی نر^۱ قرار دارد و نر هتروگامت^۲ است. این مناطق حاوی کلیدهای ژنتیکی است که آبشار تمایز جنسی را با تأثیر روی رشد بیضه‌ها و تخمدان‌ها اعمال می‌سازد (Sinclair *et al.*, 1990) و در نهایت منجر به تولید فنوتیپ نر یا ماده در جانور می‌شود (Bachtrog *et al.*, 2014). سال‌های بعد در مرغ خانگی^۳ سیستم تعیین جنسیت دیگری یافت شد و بیان شد که فرد ماده هتروگامت و ژن تعیین جنسیت وابسته به کروموزوم Z، ژن dmrt1 است و در بسیاری از پرندگان وجود این سیستم تعیین جنسیت ثابت شده است (Stiglec *et al.*, 2007). گرچه، روش‌های جدید توالی‌یابی و بررسی ژنوم در سال‌های اخیر به وجود آمده ولی منطقه تعیین جنسیت در ماهی‌ها خیلی کم تعیین شده است (Schart, 2004)؛ و در تمام گروه‌ها و گونه‌ها از یک منطق پیروی نمی‌کند. برای مثال در دو گونه از ماهیان جنس *Oryzias*^۴ ژن تعیین جنسیت شامل ژن dmrt1bY (Matsuda *et al.*, 2002; 2007)؛ و در ماهی *O. luzonensis* (Myosho *et al.*, 2012) عامل رشد مشتق از سلول‌های سوماتیک روی کروموزوم Y (gsdfy) عامل ژن تعیین جنسیت است و در ماهی *Patagonian pejerrey*^۵ ژن amhy یا ژن هورمون آنتی مولرین (Hattori *et al.*, 2012) عامل تعیین جنسیت شناسایی شده است. همچنین، ژن amhr2Y^۶ (ژن رسپتور هورمون آنتی مولرین) عامل تعیین جنسیت در جنس بادکنک ماهیان ژاپنی^۷ گزارش شده است (Ieda *et al.*, 2018; Kamiya *et al.*, 2012). سیستم تعیین جنسیت در آزاد ماهیان به صورت XY است؛ در ماهی قزل آلا^۸، ژن دو شکلی جنسی روی کروموزوم Y توسط Yano و همکاران (۲۰۱۲) شناسایی شد. این وضعیت در مورد ماهی آزاد اقیانوس اطلس^۹ نیز صادق بوده و ژن تعیین جنسیت همان ژن sdy معرفی شده است (Bertho *et al.*, 2021). در ماهیان خاویاری^{۱۰} سیستم تعیین جنسیت به صورت ZW است و بر همین اساس یک منطقه تعیین‌کننده جنسیت در جنس ماده کشف شده است (Khul *et al.*, 2021) و نشان داده شد که جنس ماده در تعیین جنسیت در ماهیان خاویاری نقش دارد. تعیین جنسیت آزاد ماهیان تجاری مثل ماهی آزاد اقیانوس اطلس و قزل‌آلای قهوه‌ای در صنعت آبی‌پروری دنیا و همین‌طور شناسایی جنسیت در جمعیت‌های آزاد ماهیان وحشی مثل ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*) از چالش‌های مهم علمی در صنعت شیلات جهان و ایران به‌شمار می‌آید. در دهه‌های گذشته تعیین جنسیت در آزاد ماهیان، با چالش‌های زیادی روبه‌رو بود و بیان شده بود که جنس نر هتروگامت است و در تعیین جنسیت نقش دارد (Davidson *et al.*, 2009). در سال‌های اخیر مشخص شده است که ژن SDY به‌عنوان ژن اصلی تعیین‌کننده جنسیت در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان است (Yano *et al.*, 2012; Yano *et al.*, 2013). اکنون کشف این موضوع امکان بررسی جنسیت توسط این ژن را در تمامی اعضای خانواده آزاد ماهیان فراهم کرده است. براساس مطالعات Yano و همکاران در سال‌های ۲۰۱۲ و ۲۰۱۳ وجود ژن تعیین جنسیت در ۱۱ گونه از آزاد ماهیان از جنس‌های *Salmo*، *Oncorhynchus* و *Salvelinus* اثبات شده است در جنس *Coregonus* جایگاه تعیین جنسیت SDY هم در جنس نر و هم ماده وجود دارد. در بین ماهیان آب شیرین ایران در حوضه دریای خزر، از جنس *Salmo* دو گونه *Salmo trutta* و *S. caspius* (Salehi *et al.*, 2022; Jourdeh-roudbar *et al.*, 2020) گزارش شده است و این دو گونه دارای تفاوت ریختی‌اند. براساس اطلاعات ژنومیک و تحلیل و ارزیابی DNA میتوکندری به‌دست آمده، تمامی جمعیت‌های ماهی قزل‌آلای قهوه‌ای در جنوب و جنوب غربی دریای خزر متعلق به گونه‌ماهی آزاد دریای خزر هستند و با اسم علمی *S. caspius* شناخته می‌شوند (Ninua *et al.*, 2018; Hashemzadeh Segherloo *et al.*, 2021, 2022). با توجه به اینکه

^۱Sex-determining region of the Y chromosome^۲Heterogametic^۳*Gallus gallus*^۴Doublesex and mab-3 related transcription factor 1^۵*Oryzias latipes* and *Oryzias curvinotus*^۶*Odontesthes hatcheri*^۷Anti-Müllerian hormone receptor^۸Takifugu^۹*Oncorhynchus mykiss*^{۱۰}*Salmo salar*^{۱۱}Sturgeons

تحقیق مولکولی برای ردیابی این جایگاه در ماهی آزاد دریای خزر به صورت جامع انجام نشده است. در این پژوهش به بررسی وضعیت تعیین جنسیت ژنوتیپی و انطباق آن با جنسیت ریختی و نیز بررسی جایگاه تعیین جنسیت نر در ماهی آزاد دریای خزر پرداخته شد.

۲. روش‌شناسی پژوهش

۲-۱. نمونه‌برداری از بافت باله‌های ماهی آزاد دریای خزر

تعداد ۳۷ عدد بافت باله سینه‌ای و دمی ماهیان مولدین ماهی آزاد نر و ماده از سال ۱۳۹۳ تا سال ۱۴۰۱ از استان مازندران و استان گیلان جداسازی و در الکل ۹۶ درصد اتانول ذخیره‌سازی شد. معیار تشخیص جنسیت ماهی، اسپرم‌دهی و تخمک‌دهی در مولدین نر و ماده یا مشاهده گنادها با باز شدن حفره شکمی بود.

۲-۲. استخراج DNA به روش فنل-کلروفرم

از بافت باله دمی یا سینه‌ای ماهی آزاد نمونه‌برداری و در الکل ۹۶ درصد ذخیره‌سازی و با استفاده از کاغذ صافی خشک شد سپس با کمک نیتروژن مایع به صورت پودر درآمد و استخراج DNA با استفاده از روش فنل-کلروفرم با اندکی تغییر انجام شد (Hillis et al., 1996). حدود ۵۰ میلی گرم از پودر باله برداشته شد و ۵۰۰ میکرولیتر از بافر استریل لیز کننده (تریس-اسیدکلریدریک ۱۰۰ میلی مولار pH حدود ۸ حاوی نمک کلرید سدیم ۱۰ میلی مولار و ۱ میلی مولار EDTA) و ۳۰ میکرولیتر SDS^۲ ۲۰ درصد و ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K با غلظت ۱۰ میلی گرم بر میکرولیتر به تیوب‌ها اضافه شد. نمونه‌ها در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت (یک شبانه‌روز) همراه با تکان ملایم انکوبه شدند. بقیه روش کار دقیقاً مانند روش Hillis و همکاران (۱۹۹۶) دنبال شد.

۲-۳. ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از بافت باله دمی و سینه‌ای

جهت تعیین کمیت DNA های استخراج شده از دستگاه نانودراپ اسپکتروفتومتر (ND-1000) در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر، استفاده شد. جهت بررسی کیفیت DNA های استخراج شده بافت باله روی ژل آگارز ۰/۹ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۴. تکثیر ناحیه اختصاصی ژنوم نر در آزاد ماهی دریای خزر با استفاده از دو آغازگر متفاوت جایگاه نر

دو آغازگر اختصاصی جایگاه تعیین جنسیت در این تحقیق استفاده شد. اولین جفت آغازگر مربوط به تحقیق Yano و همکاران (۲۰۱۳) بود. این آغازگر که روی منطقه تعیین جنسیت کروموزوم Y طراحی شده است؛ قطعه‌ای بزرگتر از ۳۰۰ نوکلئوتیدی را در آزاد ماهیان جنس نر به طور واضح تکثیر می‌کند. آغازگر دیگر مورد استفاده مربوط به تحقیق Quéméré و همکاران (۲۰۱۴) است که قطعه‌ای کوچکتر از ۲۰۰ نوکلئوتید را در آزاد ماهی اقیانوس اطلس و ماهی قزل‌آلای قهوه‌ای روی همان منطقه یعنی کروموزوم Y تکثیر کرده است. اجزای تشکیل‌دهنده واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز شامل بافر مستر میکس قرمز با غلظت 2X بود و به اندازه نصف حجم نهایی یعنی ۱۰ میکرولیتر به تیوب PCR اضافه شد و آغازگرهای پیشرو معکوس (جدول ۱) هر کدام با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر به حجم ۱ میکرولیتر اضافه شدند و DNA ژنومی استخراج شده با غلظت ۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر اضافه شد (۱ میکرولیتر). با استفاده از آب مقطر تزریقی استریل حجم واکنش به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسانده شد (۷ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد). برنامه حرارتی شامل واسرشته کردن کلی ۹۵ درجه سانتی‌گراد در ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه واسرشته شدن اولیه (۳۰ ثانیه)؛ الحاق در دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد برای قطعه ۲۰۰ نوکلئوتیدی و ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای قطعه ۳۰۰ نوکلئوتیدی؛ گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای قطعه ۲۰۰ نوکلئوتیدی ۳۰ ثانیه و برای قطعه ۳۰۰ نوکلئوتیدی ۴۰ ثانیه تنظیم شد و در انتها گسترش نهایی در ۷ دقیقه قرار داده شد. برای هر آغازگر یک کنترل منفی شامل تمام اجزای واکنش به غیر از DNA الگو (نمونه‌ها) تعیین شد.

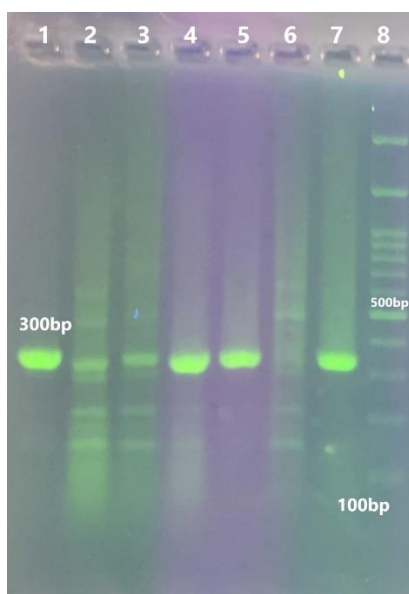
^۱Ethylenediaminetetraacetic acid

^۲Sodium dodecyl sulfate

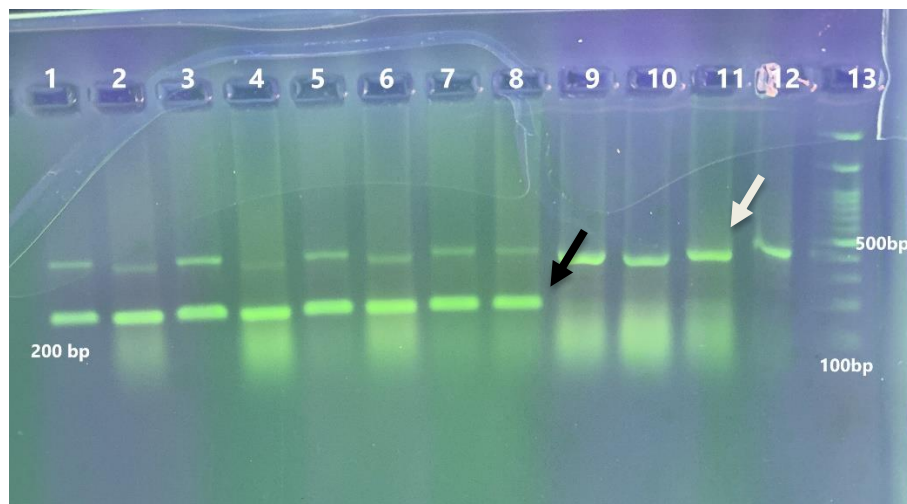
جدول ۱- مشخصات ۲ سری از آغازگرهای پیشرو و معکوس استفاده شده در تحقیق حاضر		
اندازه قطعه	توالی نوکلئوتیدی جهت ۵ به ۳ پرایم	نام آغازگر
بزرگتر از ۳۰۰ نوکلئوتید	5'-CCCAGCACTGTTTTCTTGTCTC-3' 5'-CTGTTGAAGAGCATCACAGGGTC-3'	sdY E2S1 sdY E2AS2 (Yano <i>et al.</i> , 2013)
کوچکتر از ۲۰۰ نوکلئوتید	5'-GGGCCTATGAATTTCTGATG-3' 5'-ACAGATTTGCGACATGAACA-3'	Salmo-sdY-F Salmo-sdY-R (Quéméré <i>et al.</i> , 2014)

۳. یافته‌های پژوهش

براساس نتایج کمی غلظت DNA با استفاده از نانو دراپ، همگی دارای نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر مناسب در دامنه ۲-۱/۸ بودند و غلظت DNA استخراج شده بین ۱۰۰ تا ۶۰۰ نانوگرم در میکرولیتر بود. در این تحقیق تکثیر ژنوم نمونه‌های مولدین نر و ماده با آغازگرهای اختصاصی مختص تکثیر ژنوم جنس نر یک باند واضح بزرگتر از ۳۰۰ جفت نوکلئوتیدی را در روی ژل آگارز در نمونه‌های DNA استخراج شده در جنس نر تکثیر و نشان داد (شکل ۱) اما باند واضح در نمونه‌های جنس ماده تکثیر نشد ولی پروفایل تکثیر شده‌ای در قسمت‌های دیگر مشاهده شد و به‌طور کلی پروفایل تکثیر جنس نر و ماده کاملاً با هم متفاوت بود. تمام نمونه‌های نر و ماده با آغازگر دیگری از همان منطقه جایگاه جنس نر (Quéméré *et al.*, 2014) نیز تکثیر شدند و تمامی نمونه‌های فنوتیپی جنس نر باند کوچکتر از ۲۰۰ نوکلئوتیدی را تکثیر کردند (شکل ۲)؛ پروفایل تکثیر شده‌ای نیز برای جنس ماده به دست آمد که علی‌رغم بالا بردن دما در محدوده مناسب آغازگر طراحی شده؛ این باند حذف نشد و محدوده آن حدود ۴۰۰ نوکلئوتید بود ولی هیچ باندهای در محدوده باند اختصاصی جنس نر در نمونه‌های جنس ماده تکثیر نشد. باند تکثیر شده در محدوده ۴۰۰ نوکلئوتیدی برای جنس نر هم تکثیر شد، اطلاعات به‌دست آمده برای ۳۷ نمونه نر و ماده ماهی آزاد خزر در جدول ۲ به‌اختصار ارائه شده است. کنترل منفی باندهای را در هر دو آغازگر تکثیر نکرد.



شکل ۱- نتایج محصول PCR با استفاده از آغازگرهای تحقیق Yano و همکاران (۲۰۱۳) برای آزاد ماهی دریای خزر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. شماره ۱، ۴ و ۵، ماهی آزاد نر و شماره ۳ و ۶ ماهی آزاد ماده است. شماره ۸ لدر ۱۰۰ نوکلئوتیدی را نشان می‌دهد.



شکل ۲- نتایج محصول PCR با استفاده از آغازگرهای تحقیق Quéméré و همکاران (۲۰۱۴) برای آزاد ماهی دریای خزر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. شماره ۱ تا ۸ ماهی آزاد مولد نر و شماره ۹ تا ۱۲ ماهی آزاد مولد ماده است. شماره ۱۳ نشانگر ۱۰۰ نوکلئوتیدی سینا کلون را نشان می دهد. همانطور که در شکل مشخص است؛ باند تقریباً ۲۰۰ نوکلئوتیدی در ماهی آزاد نر تکثیر شده که در نمونه های آزاد ماهی ماده در هیچ کدام از نمونه ها تکثیر نشده است. پروفایل تکثیر در جنس نر و ماده روی ژل آگارز متفاوت اند، اما باند ۲۰۰ نوکلئوتیدی فقط در جنس نر تکثیر شده است.

جدول ۲- نتایج تکثیر ژنوم مولدین نر و ماده در ماهی آزاد دریای خزر

جنسیت مولدین ماهی آزاد دریای خزر	نوع تشخیص فنوتیپ جنسی مولدین	تعداد مولدین	نتیجه تکثیر با استفاده از آغازگر نشانگر مولکولی جایگاه جنس نر (Yano <i>et al.</i> , 2013)	نتیجه تکثیر با استفاده از آغازگر نشانگر مولکولی جایگاه جنس نر (Quéméré <i>et al.</i> , 2013)	تطابق تعیین جنسیت فنوتیپی و مولکولی
ماده	برداشت بافت در زمان تولید مثل (استحصالی تخمک)	۱۶ قطعه مولد ماده	باند جایگاه نر در مولدین ماده تکثیر نشد و تمام مولد ماده دارای پروفایل تکثیر یکسان می باشند.	باند جایگاه نر در مولدین ماده تکثیر نشد و تمام مولدین ماده دارای پروفایل تکثیر یکسان می باشند.	۱۶ مولد ماده تشخیص داده شدند.
نر	برداشت بافت در زمان تولید مثل (استحصالی اسپرم)	۲۱ قطعه مولد نر	تک باند جایگاه نر در مولدین نر تکثیر شد.	تک باند جایگاه نر در مولدین نر تکثیر شد و باند مشاهده شده در پروفایل تکثیر ماده در نر هم تکثیر شد.	۲۱ مولد نر تشخیص داده شدند.

۴. بحث و نتیجه گیری نهایی

برخلاف پستانداران و مهره داران پیشرفته که دارای منطقه ژن تعیین کننده جنسیت اند (SRY یا SD^۱)؛ حداقل پنج ژن در ماهیان شناسایی شده است (amhy^۳، amhr2^۴، dmy^۵، gsdf^۶ و sdy^۷) که جنسیت را کنترل می کنند (Matsuda *et al.*, 2002; Kamiya *et al.*, 2012; Yano *et al.*, 2012; Martinez *et al.*, 2014). این ژن ها هر کدام مکانیسم متفاوتی دارند ولی به نظر می رسد شروع و تکثیر سلولی یک ویژگی مشترک در بین تمامی جانوران باشد. کنترل ژنتیکی تعیین جنسیت در ماهی قزل آلا ی رنگین کمان تحت کنترل ژن sdy (کروموزوم Y دو شکلی جنسی دارد) است و تصور می شود که از یک سیستم هتروگامتی نر (XY) استفاده می کند. Davidson و همکاران (۲۰۰۹) سیستم تعیین جنسیت را در زیر خانواده Salmoninae که شامل جنس های *Salmo*، *Oncorhynchus*

^۱Sex-determining region Y gene

^۲Sex determination

^۳Anti-müllerian hormone

^۴Anti-müllerian hormone receptor

^۵DM-domain gene on the Y chromosome

^۶Gonadal soma derived growth factor

^۷Sexually dimorphic on the Y chromosome

و *Salvelinus*؛ مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که در این زیر خانواده سیستم هتروگامی جنس نر وجود دارد ولی با این حال باید ذکر کرد که خانواده آزادماهیان شامل زیر خانواده‌های دیگری مثل *Coregoninae* و *Thymallinae* هستند که کمتر مورد مطالعه واقع شده است و هنوز هیچ چیز به‌طور کامل در مورد ژن تعیین جنسیت در این دو زیر خانواده شناخته شده نیست. در اکثر موارد ژن تعیین جنسیت در گونه‌های این دو زیر خانواده روی کروموزوم‌های متفاوت واقع شده است (Li et al., 2011; Woram et al., 2003). براساس تحقیق Yano و همکاران (۲۰۱۳) روی ۱۵ گونه از خانواده آزادماهیان نشان داده شد که تعداد ۱۱ گونه‌ای که در زیر خانواده *Salmoninae* قرار می‌گیرند، دارای جایگاه جنس نرند، اما آغازگرهای نشانگر این جایگاه در جنس ماده باندی را تکثیر نکرد. این جایگاه ژن در جنس *Coregonus* هم در جنس ماده و هم در جنس نر وجود دارد. کروموزوم جنسی در ماهی آزاد اقیانوس اطلس و بسیاری از آزادماهیان دیگر به روش ریختی امکانپذیر نیست (Sutherland et al., 2017). در این تحقیق نشان داده شد که ژن *sdY* مانند تمام آزادماهیان مورد آزمون در مطالعات پیشین، در جنس نر ماهی آزاد دریای خزر نیز وجود دارد و الگو مشابه آن چیزی را روی ژل نشان می‌دهد که برای گونه‌های مثل قزل‌آلا و ماهی آزاد اقیانوس اطلس و آرام به‌دست آمده است. عملکرد ژن *sdY* به نسبت عملکرد ژن‌های اصلی تعیین جنسیت کمتر مورد مطالعه واقع شده است و قبلاً نشان داده شد که این ژن، در رشد جنسی در گونه‌های دیگر دخیل نیست. در پژوهش‌های حاضر، این ژن در ۱۱ گونه از آزادماهیان مسئول تعیین جنسیت شناخته شد و نقش کنترلی آن در تعیین جنسیت اثبات شد (Yano et al., 2013). مقایسه ژنومی محل جایگاه تعیین جنسیت در آزادماهیان نشان می‌دهد که این جایگاه (*sdY*) متحرک است و از طریق گونه‌زایی در هر گونه از آزادماهیان موقعیت‌های منحصر به فردی را به‌خود اختصاص می‌دهد. مثلاً طبق بررسی‌های متفاوت نشان داده شده است که منطقه تعیین جنسیت (جایگاه نر) در ماهی آزاد اقیانوس اطلس بین کروموزوم‌های ۲، ۳ و ۶ در حرکت است (Eisbrenner et al., 2014; Lubieniecki et al., 2015; Kijas et al., 2018) و در گونه‌های دیگر مثل جنس *Salvelinus* این جایگاه در کروموزوم‌های متفاوتی جای گرفته و تغییرات جایگاه ناشی از کراسینگ‌اور متوالی در این گونه اثبات شده است (Sutherland et al., 2017). Makhrov و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که در قزل‌آلای صورتی^۱ منطقه تعیین جنسیت که در کروموزوم Y وجود دارد در کروموزوم X هم موجود است. براساس تحقیقات، Yano و همکاران (۲۰۱۳) برخی از نمونه‌های گونه‌ماهی آزاد چینوک^۲، جایگاه تعیین جنسیت نر در جنس ماده نیز وجود دارد، اما در برخی از نمونه‌های دیگر جایگاه تعیین جنسیت نر فقط در جنس نر مشاهده شده است. Cavileer و همکاران (۲۰۱۵)، تعداد ۱۰۷ نمونه از ماده‌های فنوتیپی ماهی آزاد چینوک از جمعیت‌های آیداهو^۳، واشنگتن^۴ و آلاسکا^۵ را مورد بررسی قرار دادند که ۱۳ قطعه از آنها، ژنوتیپ نر را نشان دادند، ولی علت این پدیده مشخص نشد. توضیح این وضعیت با تحقیقات Bertho و همکاران (۲۰۲۲) تکمیل شد و علت این وضعیت جهش غیرعملکردی در منطقه جایگاه تعیین جنسیت نر عنوان شد و نشان داده شد در افرادی که فنوتیپی ماده دارند و از نظر ژنتیکی، جایگاه نر در آنها تکثیر شده با یک جهش اشتباه^۶ در یک اسید آمینه آب گریز (ایزولوسین) به اسید آمینه آب دوست (آسپاراژین) تغییر شکل ساختمان سه بعدی پروتئین ژن *sdY* صورت گرفته و به‌همین دلیل آبشار انسداد تولید پروتئین Foxl2 و پروتئین Nr5a1 از طریق تأثیرگذاری روی منطقه پیشبر^۷ ژن *cyp19a1a* مختل شده و فردی که ژنتیکی نر داشته، فنوتیپ ماده را نشان داده است. از طرفی در تحقیق دیگر که توسط Brown و همکاران (۲۰۲۲) انجام شد، این فرضیه را که تعداد کپی‌های جایگاه نر شناسایی شده می‌تواند عامل تعیین‌کننده جنسیت باشد را با به‌کارگیری روش Real time PCR روی تکثیر اگزون‌های جایگاه نر، در ماهی آزاد اقیانوس اطلس رد کرد، چون هیچ تکثیری روی نمونه‌های جنس ماده مشاهده نشد. Shahhosseini با (۲۰۲۰) با به‌کارگیری آغازگرهای مختص آزادماهیان، تکثیر محصول جایگاه نر را در ماهی آزاد برای بررسی ماده‌زایی مورد بررسی قرار داد. در تحقیق حاضر که روی ماهی آزاد خزر انجام شد از دو سری آغازگر مربوط به دو مطالعه متفاوت استفاده شد، تمامی نرهای فنوتیپی (مولدین و مشاهده با باز کردن حفرة شکمی)، باند

^۱*Oncorhynchus gorbuscha*^۲*Oncorhynchus tshawytscha*^۳Idaho^۴Washington^۵Alaska^۶Missense^۷Promoter

نشانگر جایگاه نر را، با استفاده از آغازگر Yano و همکاران (۲۰۱۳)، به صورت تک باند تکثیر کردند ولی این آغازگر پروفایل باندی تکثیر ضعیفی را در جنس ماده ایجاد کرد. از میان ۲۱ مولد دارای فنوتیپ نر، همگی دارای تک باند مخصوص جایگاه نر را نشان دادند ولی ماده‌های فنوتیپی دارای پروفایل باندی ضعیفی بودند. این نتیجه با به کار گیری آغازگرهای مطالعه دوم و طبق روش Quéméré و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام و با تکثیر باند تقریباً ۲۰۰ نوکلئوتیدی در نرها تأیید شد. Quéméré و همکاران (۲۰۱۴) باند تکثیر شده مختص جایگاه نر را مورد توالی‌یابی قرار دادند و در ماهی آزاد اقیانوس اطلس و ماهی قزل‌آلای قهوه‌ای^۱ هاپلوتایپ‌های متفاوت را گزارش کردند. در تحقیق حاضر، پدیده عدم تطابق فنوتیپ جنسی ماهی آزاد با ژنوتیپ تکثیر شده برای دو آغازگر در ۳۷ نمونه نر و ماده مشاهده نشد. Habibi و همکاران (۲۰۱۳) با استفاده از ترکیب ۹۶ آغازگر نشانگرهای AFLP تفاوت ژنوتیپی جنس نر و ماده را مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که ترکیب آغازگرهای بیشتری برای حصول نتایج تفاوت ژنومی جنس نر و ماده لازم است. با توجه به اینکه در سال‌های اخیر ماهی آزاد دریای خزر به عنوان گونه مستقل از قزل‌آلای قهوه‌ای شناخته شده است، نیاز است تعیین جنسیت مولکولی این گونه و دیگر گونه‌های آزاد ماهیان، با دیدگاه مدیریت بهتر و علمی تکثیر و پرورش و حفاظت گونه‌های در معرض خطر انقراض، در پژوهش‌های بعدی مورد بررسی قرار گیرد.

۵. نتیجه‌گیری نهایی

براساس این تحقیق، ماهی آزاد دریای خزر نیز مانند اعضای زیر خانواده Salmoninae دارای جایگاه SRY نر در ماهیان فنوتیپی نر است و می‌توان از این نشانگرها، جهت شناسایی جنس نر و ماده ماهی آزاد دریای خزر استفاده نمود.

References

- Bertho, S., Herpin, A., Jouanno, E., Yano, A., Bobe, J., Parrinello, H., Journot, L., Guyomard, R., Muller, T., Swanson, P., McKinney, G., 2022. A nonfunctional copy of the salmonid sex-determining gene (sdY) is responsible for the “apparent” XY females in Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, 12(2), 451. DOI: 10.1093/g3journal/jkab451
- Bertho, S., Herpin, A., Scharl, M., Guiguen, Y., 2021. Lessons from an unusual vertebrate sex-determining gene. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 376(1832), 20200092. DOI: 10.1098/rstb.2020.0092
- Brown, M.S., Evans, B.S., Afonso, L.O., 2020. Discordance for genotypic sex in phenotypic female Atlantic salmon (*Salmo salar*) is related to a reduced sdY copy number. *Scientific Reports*, 10(1), 9651. DOI: 10.1038/s41598-020-66406-x
- Cavileer, T.D., Hunter, S.S., Olsen, J., Wenburg, J., Nagler, J.J., 2015. A sex- determining gene (sdY) assay shows discordance between phenotypic and genotypic sex in wild populations of Chinook Salmon. *Transactions of the American Fisheries Society*, 144(2), 423-430. DOI: 10.1080/00028487.2014.993479
- Eisbrenner, W.D., Botwright, N., Cook, M., Davidson, E.A., Dominik, S., Elliott, N.G., Henshall, J., Jones, S.L., Kube, P.D., Lubieniecki, K.P. and Peng, S., 2014. Evidence for multiple sex-determining loci in Tasmanian Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Heredity*, 113(1), pp.86-92.
- Habibi, E., Kalbassi, M., Hosseini, S., Qasemi, S., 2013. Feasibility analysis of sex determination of caspian trout (*Salmo trutta caspius*, Kessler, 1877) using AFLP markers. *Modern Genetics Journal* 7(4). (In Persian)
- Hashemzadeh Segherloo, I., Freyhof, J., Berrebi, P., Ferchaud, A.L., Geiger, M., Laroche, J., Levin, B.A., Normandeau, E., Bernatchez, L., 2021. A genomic perspective on an old question: Salmo trout or *Salmo trutta* (Teleostei: Salmonidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 162, 107204. DOI: 10.1016/j.ympev.2021.107204
- Hashemzadeh Segherloo, I., Tabatabaei, S.N., Abdoli, A., Freyhof, J., Normandeau, E., Levin, B., Geiger, M.F., Laporte, M., Hallerman, E., Bernatchez, L., 2022. Biogeographic insights from a genomic survey of *Salmo* trout from the Aarloo-Caspian regions. *Hydrobiologia*, 849(19), 4325-4339. DOI: 10.1007/s10750-022-04993-8
- Hattori, R.S., Murai, Y.U., Oura, M., Masuda, S., Majhi, S.K., Sakamoto, T., Sakamoto, J.I. Fernandino Somoza,

^۱*Salmo trutta*

- G.M., Yokota, M., Strüssmann, C.A., 2012. A Y-linked anti-Mullerian hormone duplication takes over a critical role in sex-determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(8), 2955-2959. DOI: 10.1073/pnas.1018392109
- Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K., 1996. *Molecular systematics* (Vol. 23). Sinauer.
- Ieda, R., Hosoya, S., Tajima, S., Atsumi, K., Kamiya, T., Nozawa, A., Aoki, Y., Tasumi, S., Koyama, T., Nakamura, O., Suzuki, Y., 2018. Identification of the sex-determining locus in grass puffer (*Takifugu niphobles*) provides evidence for sex-chromosome turnover in a subset of Takifugu species. *PLoS One*, 13(1), e0190635. DOI: 10.1371/journal.pone.0190635
- Jouladeh-Roudbar, A., Ghanavi, H.R. and Doadrio, I., 2020. Ichthyofauna from Iranian freshwater: Annotated checklist, diagnosis, taxonomy, distribution and conservation assessment. *Zoological Studies*, 59. DOI: 10.6620/ZS.2020.59-21
- Kamiya, T., Kai, W., Tasumi, S., Oka, A., Matsunaga, T., Mizuno, N., Fujita, M., Suetake, H., Suzuki, S., Hosoya, S., Tohari, S., 2012. A trans-species missense SNP in Amhr2 is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (fugu). *PLoS Genetics*, 8(7), e1002798. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002798
- Kijas, J., McWilliam, S., Naval Sanchez, M., Kube, P., King, H., Evans, B., Nome, T., Lien, S., Verbyla, K., 2018. Evolution of sex determination loci in Atlantic salmon. *Scientific Reports*, 8(1), 5664. DOI: 10.1038/s41598-018-23984-1
- Kuhl, H., Guiguen, Y., Höhne, C., Kreuz, E., Du, K., Klopp, C., Lopez-Roques, C., Yebra-Pimentel, E.S., Ciorpac, M., Gessner, J., Holostenco, D., 2021. A 180 Myr-old female-specific genome region in sturgeon reveals the oldest known vertebrate sex determining system with undifferentiated sex chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 376(1832), 20200089. DOI: 10.1098/rstb.2020.0089
- Li, J., Phillips, R.B., Harwood, A.S., Koop, B.F., Davidson, W.S., 2011. Identification of the sex chromosomes of brown trout (*Salmo trutta*) and their comparison with the corresponding chromosomes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytogenetic and Genome Research*, 133(1), 25-33. DOI: 10.1159/000323410
- Lubieniecki, K.P., Lin, S., Cabana, E.I., Li, J., Lai, Y.Y., Davidson, W.S., 2015. Genomic instability of the sex-determining locus in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 22, 2513-22. DOI: 10.1534/g3.115.020115
- Makhrov, A.A., Artamonova, V.S., Kolmakova, O.V., Ponomareva, M.V., 2018, January. Sex determination model in pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum, 1792) (Salmonidae, Osteichthyes) controlled by multi-copy genes located in sex chromosomes. In *Doklady Biochemistry and Biophysics* (Vol. 478, No. 1, pp. 21-24). Moscow: Pleiades Publishing.
- Martínez, P., Viñas, A.M., Sánchez, L., Díaz, N., Ribas, L., Piferrer, F., 2014. Genetic architecture of sex determination in fish: applications to sex ratio control in aquaculture. *Frontiers in genetics*, 5, p.340. DOI: 10.3389/fgene.2014.00340/full
- Matsuda, M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., Kobayashi, T., Morrey, C.E., Shibata, N., Asakawa, S., Shimizu, N., Hori, H., 2002. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, 417(6888), 559-563. DOI: 10.1038/nature751
- Matsuda, M., Shinomiya, A., Kinoshita, M., Suzuki, A., Kobayashi, T., Paul-Prasanth, B., Lau, E.L., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M., Nagahama, Y., 2007. DMY gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(10), 3865-3870. DOI: 10.1073/pnas.0611707104
- Myosho, T., Otake, H., Masuyama, H., Matsuda, M., Kuroki, Y., Fujiyama, A., Naruse, K., Hamaguchi, S. and Sakaizumi, M., 2012. Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis*. *Genetics*, 191(1), 163-170. DOI: 10.1534/genetics.111.137497
- Ninua, L., Tarkhnishvili, D., Gvazava, E., 2018. Phylogeography and taxonomic status of trout and salmon from the Ponto- Caspian drainages, with inferences on European Brown Trout evolution and taxonomy. *Ecology and Evolution*, 8(5), 2645-2658. DOI: 10.1002/ece3.3884
- Quéméré, E., Perrier, C., Besnard, A.L., Evanno, G., Baglinière, J.L., Guiguen, Y., Launey, S., 2014. An improved PCR-based method for faster sex determination in brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Conservation Genetics Resources*, 6, 825-827. DOI: 10.1007/s12686-014-0259-8

- Salehi, M., Mousavi-Sabet, H., Eagderi, S., 2022. The Iranian native salmonids (*Salmo caspius* and *S. trutta*), distinct species or two forms of the same species; a geometric-morphometric based hypothesis. *Aquaculture Sciences*, 10(2), 25-34. (In Persian)
- Schartl, M., 2004. A comparative view on sex determination in medaka. *Mechanisms of Development*, 121(7-8), 639-645. DOI: 10.1016/j.mod.2004.03.001
- Shahhosseini, Gh., 2020. Meiotic gynogenesis inducing in Caspian Sea salmon (*Salmo trutta caspius*) using gamma irradiation followed by sex determination using SDY gene. *Journal of Nuclear Science, Engineering and Technology (JONSAT)*, 41(3), 145-154. (In Persian)
- Sutherland, B.J., Rico, C., Audet, C., Bernatchez, L., 2017. Sex chromosome evolution, heterochiasmy, and physiological QTL in the salmonid brook charr *Salvelinus fontinalis*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 7(8), 2749-2762. DOI: 10.1534/g3.117.040915
- Woram, R.A., Gharbi, K., Sakamoto, T., Hoyheim, B., Holm, L.E., Naish, K., McGowan, C., Ferguson, M.M., Phillips, R.B., Stein, J., Guyomard, R., 2003. Comparative genome analysis of the primary sex-determining locus in salmonid fishes. *Genome Research*, 13(2), 272-280.
- Yano, A., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Fostier, A., Guyomard, R., Guiguen, Y., 2013. The sexually dimorphic on the Y- chromosome gene (sdY) is a conserved male- specific Y- chromosome sequence in many salmonids. *Evolutionary Applications*, 6(3), 486-496. DOI: 10.1111/eva.12032