فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال پنجم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۶

بررسی بیان ژن *sox9* طی مراحل تکوین لاروی و بلوغ گنادی فیل‌ماهی (*Huso huso*)

مهتاب یارمحمدی[۱]*، محمد پورکاظمی[۲]، رضوان اله کاظمی[۳]، علی حلاجیان[۴]، محمد حسن‌زاده صابر[۵]، ایوب یوسفی جوردهی[۶]

تاریخ دریافت: آبان ۹۵ تاریخ پذیرش: دی ۹۵

چکیده

sox9 یکی از ژن‌های کد کننده پروتئینی است که نقش مهمی در تنظیم برخی از فعالیت‌های سلولی در مهره‌داران ایفا می کند. با توجه به اهمیت فیل‌ماهی به عنوان یک گونه مهم در آبزی‌پروری تاسماهیان و نقش ***sox9*** در فرآیندهای تکوینی مهره داران، در این پژوهش اقدام به توالی‌یابی ژن ***sox9*** و بررسی الگوی بیان آن در مراحل مختلف لاروی و تکوین گناد جنس نر فیل‌ماهی شد. نتایج نشان داد که توالی ژن ***sox9*** در فیل‌ماهی شباهت زیادی با گونه های دیگر تاسماهیان و مهره‌داران دارد که بیانگر نقش بنیادین و تکوینی این ژن در جانوران مختلف است. مطالعه بیان ژن ***sox9*** طی مراحل تکوینی لاروی (۱ ، ۳، ۶، ۱۵ و ۵۰ روز پس از تفریخ) نشان داد که ***sox9*** در مراحل مختلف لاروی بیان شد و بیشترین بیان آن مربوط به ۱۵ روز پس از تفریخ بود. در حالی که در نمونه‌های گناد تمایز یافته ماهیان (مراحل ۱ تا ۴ رسیدگی جنسی) ***sox9*** فقط در مرحله ۴ بیان می‌شد. درمجموع، به نظر می‌رسد فعالیت ژن ***sox9*** در مراحل ابتدایی زندگی با فرآیندهای غضروف‌زایی و اندام‌زایی و در مراحل رسیدگی جنسی با تکامل بیضه در ارتباط است.

واژگان کلیدی: *بیان ژن، فیل‌ماهی، تعیین جنسیت، مراحل تکوین، sox9*

۱- استادیار بخش ژنتیک، موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران.
۲- استاد موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.
۳- استادیار بخش فیزیولوژی و بیوشیمی، موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران.
۴- کارشناس ارشد مهندسی منابع طبیعی، بخش فیزیولوژی و بیوشیمی، موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران.
۵- کارشناس ارشد مهندسی منابع طبیعی، بخش ژنتیک، موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران.
۶- استادیار بخش فیزیولوژی و بیوشیمی، موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران.
* نویسنده مسئول: mahtabyarmohammadi@gmail.com

مقدمه

با توجه به کاهش شدید ذخایر طبیعی ماهیان خاویاری، تنها راه حفظ و احیای این گونه‌های باارزش، توسعه آبزی‌پروری تاسماهیان است تا به این وسیله علاوه بر تولید خاویار مورد نیاز، با کاهش صید این ماهیان به حفظ منابع موجود در دریا کمک شود. میزان صید و استحصال خاویار دریای خزر در دهه گذشته شدیدترین روند نزولی را نسبت به سال‌های گذشته داشته است به طوری که صید ماهیان خاویاری از ۲۵،۰۰۰ تن در اوایل دهه ۱۹۸۰ به ۲۵۶ تن در سال ۲۰۱۳ کاهش یافته است (FAO, 2015). مطالعات نشان داده است که تاسماهیان در طول دوره زندگی خود، حتی پس از بلوغ نیز، فاقد نشانه‌های ظاهری جنسی (نر یا ماده) هستند و به همین علت چالش‌های زیادی برای تعیین جنسیت دارند (Doroshov et al., 1997). با توجه به طولانی بودن سن بلوغ و نیز چرخه تولیدمثلی ماهیان خاویاری (در فیل‌ماهی نر حداقل ۸ و در فیل‌ماهی ماده ۱۲ سال) و به منظور کاهش هزینه‌های نگهداری، راهبرد مدیریت تاسماهیان به جداسازی ماهیان نر از ماده وابسته است و به همین دلیل، پژوهشگران روش‌های گوناگونی را برای تشخیص جنسیت و مراحل رسیدگی جنسی به کار گرفته‌اند (Bahmani and Kazemi, 1998). امروزه تشخیص جنسیت ماهیان خاویاری با استفاده از روش زمان‌بر و پرمخاطره‌ای همچون تکه‌برداری گناد و انجام مطالعات بافت‌شناختی و اندازه‌گیری سطوح هورمونی امکان‌پذیر است که استفاده از این روش‌ها استرس‌زا بوده، می‌تواند عوارض جانبی را نیز برای ماهی مورد نظر به همراه داشته باشد (Keyvanshokooh and Gharaei, 2010). علاوه بر این در روش بافت‌شناسی، ماهی‌های طبیعی و پرورشی مورد نظر باید به ترتیب حداقل یک تا چهار ساله باشند (Bahmani and Kazemi, 1998). با توجه به موارد ذکر شده ایجاد روش‌های مولکولی بدون مخاطره و قابل اطمینان برای تشخیص جنسیت این ماهی‌ها بسیار مورد توجه قرار گرفته است. از آنجایی که استفاده از روش‌های مولکولی مبتنی بر DNA (مانند AFLP، RFLP و ISSR) در زمینه تعیین جنسیت ماهیان خاویاری موفقیت‌آمیز نبودند (Wuertz et al., 2006; Keyvanshokooh et al., 2007; McCormick et al., 2008; Keyvanshokooh and Gharaei, 2010; Yarmohammadi et al., 2011)، اخیرا بررسی الگوی بیان ژن‌های جنسی مهم مورد

توجه بسیاری از دانشمندان قرار گرفته است که در این میان، ژن‌های منتخب جنسی، به دلیل دخالت در روند تکوین گنادی و تنظیم هورمون‌های استروئیدی جنسی، مورد مطالعه و بررسی تعداد زیادی از پژوهشگران بوده است. با این وجود، مطالعات کمی در تاسماهیان در ارتباط با بیان ژن‌های منتخب جنسی انجام شده است، به طوری که اولین مطالعه بر روی تاس‌ماهی آتلانتیک اروپایی (*Acipenser sturio*) توسط Hett و همکاران (۲۰۰۵) صورت گرفت. همچنین گزارش‌هایی از بررسی ژن‌های جنسی منتخب توسط Hale و همکاران (۲۰۱۰) در تاس‌ماهی دریاچه‌ای (*Acipenser fulvescens*)، Berbejillo و همکاران (۲۰۱۲) در تاس‌ماهی سیبری (*Acipenser baerii*) و Hagihara و همکاران (۲۰۱۴) در تاس‌ماهی روسی (*Acipenser gueldenstaedtii*)، ارایه شده است.

sox9 یکی از عوامل سرتولی است که در این مطالعه به عنوان ژن دخیل در تمایز بیضه در فیل‌ماهی پرورشی در نظر گرفته شد. ژن *sox9* بر اساس توالی در گروه *sox* E قرار دارد (Liu et al., 2004). در میان ژن‌های موجود در این گروه ژن‌های *sox8* و *sox9* با تعیین جنسیت نر در پستانداران در ارتباط هستند (Bowles et al., 2000; Chaboissier et al., 2004; Koopman, 2005). در سطوح عملکردی، *sox9* نقش بسیار مهمی در تمایز سلول‌های سرتولی دارد، آن‌ها یکی از اولین ژن‌های تنظیم‌کننده فعالیت سلول‌های پیش‌سرتولی تحت بیان ژن *SRY* هستند و نقشی کلیدی در تمایز جنسی پستانداران ایفا می‌کنند (Bowles and Koopman, 2001; Brennan and Capel, 2004). با این حال، اطلاعات محدودی درباره نقش ژن *sox9* در تمایز گنادی جنس نر در مراحل اولیه زندگی ماهیان خاویاری و موجودات غیرپستاندار منتشر شده است. در مطالعات پیشین بر روی ماهیان خاویاری ژن *sox* به عنوان یک ژن منتخب برای دخالت در تمایز بیضه، انتخاب شده بود (Berbejillo et al., 2011; Berbejillo et al., 2013). اما در مورد تاسماهیان، شواهدی مبنی بر دوبرابرسازی ژنوم (دوپلیکاسیون) ژن *sox9*، همانند آنچه در پستانداران وجود دارد، مشاهده نشد (Hett and Ludwig, 2005). ژن *sox9* در پستانداران و پرندگان محافظت شده است، همچنین ساختار و عملکرد آن در ماهیان استخوانی نیز حفظ شده است. در ماهی Medaka (*Oryzias latipes*) و Pejerrey

(*Odontesthes bonariensis*)، نقش *sox9* در تشکیل ساختار بیضه، اما نه در تمایز بیضه پیشنهاد داده شده است (Fernandino et al., 2003; Nakamoto et al., 2005).

فیل‌ماهی یا تاس‌ماهی بزرگ (بلوگا) بزرگ‌ترین آبزی آب‌های شیرین و از مهم‌ترین گونه‌های ماهیان خاویاری و پرورشی است (Vecsei et al., 2002). فیل‌ماهی از ماهیان با رشد سریع و یکی از گونه‌های اصلی پرورشی در تاسماهیان است و با توجه به رشد و نمو مناسب این گونه در آب‌های شیرین و لب‌شور و سازگاری بسیار عالی آن‌ها به محیط پرورشی، می‌توان از آن‌ها در توسعه آبزی‌پروری استفاده کرد. بر خلاف ماهیان استخوانی، عملکرد ژن *sox9* در ماهیان خاویاری کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است. معدود مطالعات صورت گرفته روی انواع تاسماهیان، عملکردهای متفاوتی مانند تعیین جنسیت، تمایز جنسی و غضروف‌سازی را نشان داده است. تاکنون هیچ مطالعه‌ای در زمینه بررسی نحوه بیان ژن *sox9* طی مراحل تکوینی از مرحله جنینی تا بلوغ در گونه فیل‌ماهی به عنوان گونه با ارزش تجاری و آبزی‌پروری، منتشر نشده است. با توجه به نقش‌های بنیادی و پایه‌ای ژن *sox9* طی فرآیندهای تکوینی مهره‌داران، در این مطالعه میزان کمی بیان ژن *sox9* در طی مراحل تکوین لاروی و در مراحل مختلف رسیدگی گناد جنس نر در فیل‌ماهی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در مطالعه حاضر، نمونه‌برداری از مراحل لاروی تا مرحله بلوغ از فیل‌ماهیان پرورشی در بخش تکثیر موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر واقع در شهر رشت، استان گیلان انجام شد. نمونه‌ها در دو مرحله لاروی و بلوغ جمع‌آوری شدند. نمونه‌های مرحله لاروی شامل لاروها در روزهای ۱، ۳، ۶، ۱۵ و ۵۰ روز پس ازتفریخ به صورت تصادفی و در ۳ تکرار بودند. برای مرحله بالغ، از گناد ۱۹ قطعه فیل‌ماهی نر با گناد تمایز یافته در مراحل مختلف رسیدگی جنسی (با میانگین وزنی ۰/۲±۴۰ کیلوگرم و میانگین طول کل ۲۰±۱۸۳ سانتی‌متر) نمونه‌برداری انجام شد. ابتدا لاروها و ماهیان بالغ قبل از نمونه‌برداری با استفاده از محلول ۳۰۰ppm پودر گل میخک بیهوش و سپس نمونه‌برداری انجام شد. در مرحله لاروی با توجه به مشخص نبودن و عدم شکل‌گیری گناد، نمونه‌برداری از کل لارو و در

ماهیان بزرگ‌تر نمونه‌برداری از گناد با استفاده از روش جراحی و بیوپسی صورت پذیرفت. نمونه‌های مورد نیاز مربوط به هر یک از مراحل ذکر شده درون ویال‌های عاری از RNase قرار داده شد و بلافاصله در ازت مایع قرار گرفت، سپس به منظور انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

مطالعات بافت‌شناسی

به منظور تعیین دقیق جنسیت و مراحل رسیدگی جنسی نمونه‌های گناد فیل‌ماهیان پرورشی مورد مطالعه از روش‌های مرسوم بافت‌شناسی استفاده شد. پس از تثبیت نمونه‌ها در محلول بوئن، مراحل آبگیری، شفاف‌سازی، پارافینه، قالب‌گیری، برش‌های سریالی و رنگ‌آمیزی بر اساس روش‌های بافت شناسی انجام شد. پس از رنگ‌آمیزی لام‌های حاوی نمونه بافتی به کمک میکروسکوپ نوری (Nikon ،E600، ژاپن) مجهز به مانیتور و دوربین عکاسی- فیلم‌برداری مورد مطالعه قرار گرفت. از هر لام ۱۰ میدان بافتی مطالعه شد و از سلول‌های جنسی گناد در مراحل مختلف رسیدگی جنسی با بزرگنمایی‌های مختلف عکس‌برداری شد (Bahmani and Kazemi, 1998). مراحل رسیدگی جنسی بر اساس مطالعات پیشین به ۶ مرحله تقسیم‌بندی شد (Mojazi Amiri, 1996; Webb et al., 2002). این مراحل در تاسماهیان با گناد نر شامل مرحله ۱ (نارس) ، مرحله ۲ (در حال رشد)، مرحله ۳ (تولید اسپرماتید)، مرحله ۴ (پیش‌مولد)، مرحله ۵ (مولد) و مرحله ۶ (بعد از تخم‌ریزی) است.

استخراج RNA و شناسایی ژن

استخراج RNA کل از نمونه‌های لاروی و گناد فیل‌ماهیان پرورشی در مراحل مختلف جنسی با استفاده از محلول BIOZOL Reagent (Bioflux-Bioer، چین) و طبق دستور العمل شرکت سازنده انجام شد. کیفیت Total RNA با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ و مشاهده باندهای ۱۸Sو ۲۸S مربوط به RNA ریبوزومی و فقدان آلودگی DNA ژنومی با استفاده از نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر (OD 260/280) به دست آمده از اسپکتروفتومتر نانودراپ (ND 1000، آمریکا) انجام شد. غلظت نمونه‌های RNA با استفاده از سنجش میزان جذب آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ تعیین شد و سپس با استفاده از آب تیمار شده با DEPC

به غلظت ۵۰۰ نانوگرم در میکرولیتر رسانده شد. به منظور حذف باقی مانده DNA ژنومی در نمونه‌های RNA، مقدار ۱۰ میکروگرم از RNA کل برای هر نمونه با استفاده از DNase I (Fermentas، فرانسه) تیمار شد.

رشته اول DNA مکمل (cDNA) با استفاده از ۲ تا ۳ میکروگرم از RNA کل تیمار شده با DNase I و آنزیم M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas، فرانسه) و ۲/۵ میکرومولار آغازگر Oligo(dT)20 و بر اساس دستور العمل شرکت سازنده، برای هر کدام از نمونه‌های مربوطه ساخته شد. کیفیت cDNAهای ساخته شده با استفاده از ژن کنترل داخلی *EF* بررسی شد (جدول ۱).

از آنجایی که تا کنون توالی ژن *sox9* در فیل‌ماهی (*Huso huso*) به ثبت نرسیده است، ابتدا نسبت به شناسایی توالی این ژن در گونه فیل‌ماهی اقدام شد. توالی‌های شناسایی شده ژن‌های دخیل در تمایز جنسی و تکامل گنادی شامل ژن *sox9*، در گونه‌های مختلف تاسماهیان موجود در بانک ژن NCBI (تاس‌ماهی چینی (*Acipenser sinensis*): KJ526295.1، تاس‌ماهی سیبری (*Acipenser baerii*): EU241882.1.1، تاس‌ماهی آمور (*Acipenser schrenckii*): AY573261.1 و AY581214.1، تاس‌ماهی آتلانتیک (*Acipenser sturio*): AY788912.1) و دیگر ماهیان با استفاده از نرم افزار Clustal X مورد مقایسه قرار گرفت و بر اساس نواحی حفاظت شده در گونه‌های مختلف، نسبت به طراحی آغازگر با نرم افزار Oligo v.5 و Primer 3 اقدام شد. برای تایید و اطمینان از اختصاصی بودن آغازگرها از برنامه Primer-Blast استفاده شد. DNA مکمل با استفاده از آغازگر اختصاصی *sox9* طراحی و برای شناسایی، به وسیله تکنیک PCR تکثیر شد (جدول ۱). سپس قطعات تکثیر یافته با استفاده از کیت CloneJET TM PCR Cloning Kit (Fermentas، فرانسه) کلون و تعیین توالی در مورد ۵ نمونه پلاسمید نوترکیب (توسط شرکت فزاپژوه، تهران، با استفاده از دستگاه Genetic Analyzer (ABI 3130، Applied Biosystems، آمریکا) انجام شد. کروماتوگرام‌های به دست آمده و توالی‌ها با استفاده از برنامه MEGA 6 به طور دستی کنترل شدند. همچنین شناسایی توالی‌ها توسط جستجوی BLAST در بانک اطلاعاتی GenBank

(http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) انجام شد (Altschul et al., 1990).

توالی ژن sox9 در فیل‌ماهی با توجه به توالی دیگر مهره‌داران به و سیله نرم‌افزار CLUSTAL W، ترازبندی شد. درخت فیلوژنی بر اساس توالی‌های ترازبندی شده ۱۱ گونه مهره‌دار با روش Neighbor-Joining و با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 ترسیم شد (Tamura et al., 2013). لازم به ذکر است که آزمون Bootstrapping با ۱۰۰۰ تکرار صورت پذیرفت.

سنجش بیان ژن *sox9*

بیان نسبی ژن sox9 در DNA مکمل تهیه شده از نمونه‌های مراحل مختلف رسیدگی جنسی شامل مرحله لاروی و ماهیان تمایز یافته با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده از توالی به دست آمده در این مطالعه سنجیده شد. برای این منظور از دستگاه Real Time PCR Detection System (CFX96، Bio-Rad، آمریکا) و کیت سایبرگرین (Fermentas، فرانسه) و بر اساس دستور العمل پیشنهادی شرکت سازنده استفاده شد.

شرایط واکنش PCR کمی شامل ۲ دقیقه در دمای ۹۴ سانتی‌گراد به منظور واسرشته‌سازی و فعال‌سازی اولیه، ۴۰ چرخه حرارتی شامل ۱۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد (واسرشته‌سازی)، ۱۵ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد (اتصال)، ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (بسط) و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (بسط نهایی)، بود. تمامی واکنش‌ها برای هر آغازگر دارای سه تکرار تکنیکی و در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای انجام شد. مخلوط واکنش PCR کمی در حجم نهایی ۱۲ میکرو لیتر و شامل: cDNA تولید شده از RNA اولیه الگو، Master Mix PCR و آغازگرهای طراحی شده بود. به منظور اطمینان از عدم آلودگی مواد مورد استفاده در واکنش، شاهد منفی (استفاده از تمام ترکیبات واکنش بدون cDNA) در هر پلیت قرار گرفت (Yarmohammadi et al., 2014). برای نرمال‌سازی واکنش از ژن *RPL6* (Ribosomal Protein L6) به عنوان ژن مرجع مناسب برای کنترل داخلی و نرمال‌سازی بیان ژن گزارش شده در تاس‌ماهی ایرانی استفاده شد (Akbarzadeh et al., 2011؛ جدول ۱).

جدول ۱: آغازگرهای طراحی‌شده مورد استفاده در بررسی بیان ژن *sox9* در مراحل لاروی و بافت‌های

گناد نر فیل‌ماهی

آغازگر	توالی ('3→'5)	دمای ذوب (°C)	کاربرد
sox9	F: GAAGCGTCCTTTCGTTGAAG R: AAGATCGCAGTGGGTGAGAT	۵۸	شناسایی ژن
sox9	F: AGCAGCAAAAACAAGCCTCA R: AGCTCCGCGTTGTGAAGAT	۶۰	Real-time PCR
RPL6	F: AGCTGGGCAAGCCCAACACC R: TGGTGGAAGGCCAGGTCGCT	۶۰	Real-time PCR
EF	F: AGGAGGCCGCTGAGATGGGGAAAG R: GTGGCCGGGAGCATCAATGATGGT	۶۰	کنترل کیفیت cDNA

به منظور تخمین بازده، منحنی استاندارد برای هر جفت آغازگر بر مبنای غلظت‌های سریالی رقیق شده cDNA تهیه شد. سپس بازده PCR بر مبنای رابطه ۱ و با استفاده از شیب منحنی استاندارد محاسبه شد.

رابطه ۱:

$$\mathbf{E = [10^{(1/slop)} -1] \times 100}$$

E: بازده (٪).

داده‌های به دست آمده از واکنش Real-time PCR از نرم‌افزار Bio-Rad CFX Manager v1.6 استخراج و به Microsoft Excel 2010 و SPSS 20 برای نرمال‌سازی و تجزیه و تحلیل آماری انتقال داده شد.

بیان نسبی ژن هدف به ژن مرجع بر اساس رابطه $۲^{-\Delta\Delta Ct}$ (رابطه ۲) محاسبه شد (Livak and Schmittgen, 2001) که در آن ابتدا ΔCt ژن هدف (ΔCt_T) و سپس ΔCt ژن کالیبراتور (ΔCt_C) محاسبه شد، در مرحله بعد تمامی داده‌ها با توجه به مقدار به‌دست‌آمده ΔCt ژن‌های کالیبراتور و هدف و طبق رابطه $۲^{-\Delta\Delta Ct}$ (رابطه ۲)، نرمال‌سازی شدند. شایان ذکر است که در میان تمامی داده‌ها نمونه‌ای که دارای بیشترین بیان ژن یا کمترین میزان Ct (چرخه آستانه، Threshold Cycle) بود به عنوان نمونه کالیبراتور، برای اندازه‌گیری تفاوت مقدار بیان ژن هدف، انتخاب شد.

رابطه ۲:

$$\mathbf{\Delta Ct_T = Ct_T - Ct_R}$$
$$\mathbf{\Delta Ct_C = Ct_C - Ct_R}$$
$$\mathbf{2^{-\Delta\Delta Ct} = \Delta Ct_T - \Delta Ct_C}$$

Ct: چرخه آستانه؛ ΔCt_T: ΔCt ژن هدف؛ Ct_T:

چرخه آستانه ژن هدف؛ Ct_R: چرخه آستانه ژن مرجع؛ ΔCt_C: ΔCt ژن کالیبراتور؛ Ct_C: چرخه آستانه ژن کالیبراتور.

تجزیه و تحلیل‌های آماری

برای ارزیابی نرمال بودن داده‌ها از آزمون Kolmogorov-Smirnov استفاده شد و به دلیل نرمال نبودن داده‌ها، برای مقایسه‌های آماری میزان بیان ژن در مراحل مختلف نمونه برداری، از آزمون غیرپارامتریک Kruskal-Wallis استفاده شد. در مرحله بعد برای بررسی تشخیص اختلاف بین گروه‌های مورد مطالعه از آزمون Mann-Whitney استفاده شد. همه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار IBM SPSS Version 20 صورت پذیرفت. تفاوت‌های آماری بین تیمارهای آزمایشی از نظر معنی‌دار بودن در سطح ٪۹۵ ($P<۰/۰۵$) بررسی شد.

نتایج

آنالیز توالی ژن *sox9* در فیل‌ماهی

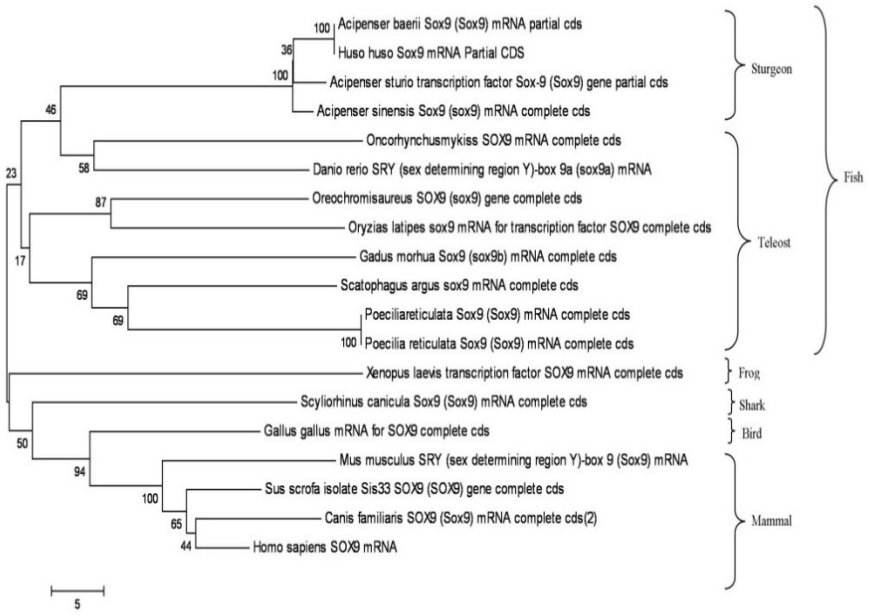
برای شناسایی توالی نسبی ژن *sox9* در فیل‌ماهی پرورشی، تکثیر رشته اول cDNA با استفاده از آغازگرهای طراحی شده بر اساس ناحیه حفاظت شده در توالی‌های *sox9* گونه‌های مختلف ماهیان خاویاری انجام شد. نتایج به دست آمده از توالی‌یابی، قطعه‌ای با طول ۲۱۰ جفت باز را نشان داد. قطعه توالی‌یابی شده پس از بررسی‌های نهایی در بانک ژن NCBI با نام ژن *sox9* فیل‌ماهی و با کد دسترسی KM280567 ثبت شد.

نتیجه BLAST توالی ثبت شده در بانک اطلاعاتی NCBI نشان داد که sox9 mRNA در فیل‌ماهی دارای ٪۱۰۰ تشابه با تاس‌ماهی سیبری، ٪۹۸ تشابه با گونه‌های تاس‌ماهی آمور و تاس‌ماهی چینی و همچنین ٪۹۷ تشابه با گونه تاس‌ماهی اروپایی است. همچنین توالی *sox9* فیل‌ماهی از نظر نوکلئوتیدی شباهت بالایی (بیش از ٪۷۰) با توالی ژن مذکور در ماهیان استخوانی مانند کپور و ماهی گورخری (به ترتیب ٪۸۰ و ٪۷۹) داشت. میزان مشابهت *sox9* فیل‌ماهی با توالی این ژن در انسان ٪۷۹ محاسبه شد (جدول ۲).

درخت فیلوژنی *sox9* فیل‌ماهی به منظور بررسی ارتباط تکاملی بین فیل‌ماهی و توالی‌های موجود این ژن در دیگر تاسماهیان و مهره‌داران به روش Neighbor-Joining ترسیم شد (شکل ۱).

جدول ۲: مقایسه شباهت نوکلئوتیدی ژن *sox9* فیل‌ماهی با برخی دیگر از گونه‌های مهره‌داران

گونه	درصد تشابه	کد دسترسی
Acipenser baerii	۱۰۰	EU241882.1
Acipenser schrenckii	۹۸	AY581214.1
Acipenser sinensis	۹۸	KJ526295.1
Acipenser sturio	۹۷	AB012236.1
Latimeria menadoensis	۸۱	NM_131643.1
Carassius auratus	۸۰	AB006448.1
Cyprinus carpio	۸۰	AY956415.1
Danio rerio	۷۹	NM_011448.4
Canis familiaris	۷۷	AY237827.1
Homo sapiens	۷۹	NM_000346.3



شکل ۱: روابط فیلوژنی بین فیل‌ماهی، ماهیان خاویاری و استخوانی و دیگر مهره‌داران بر مبنای مقایسه توالی نوکلئوتیدی ژن sox9 با روش Neighbor-Joining و با استفاده از نرم‌افزار MEGA6

نتایج فیلوژنی نشان داد که فیل‌ماهی از لحاظ تکاملی مشابهت بالایی با سایر ماهیان خاویاری دارد. همچنین مقایسه‌های دیگر نشان‌دهنده شباهت نسبی (با وجود فواصل ژنتیکی زیاد)، توالی *sox9* بین شاخه‌های گوناگون جانوری بود. نتایج نشان داد که تاسماهیان با Bootstrap معادل ۱۰۰ در یک کلاستر قرار گرفتند.

تکامل گنادی

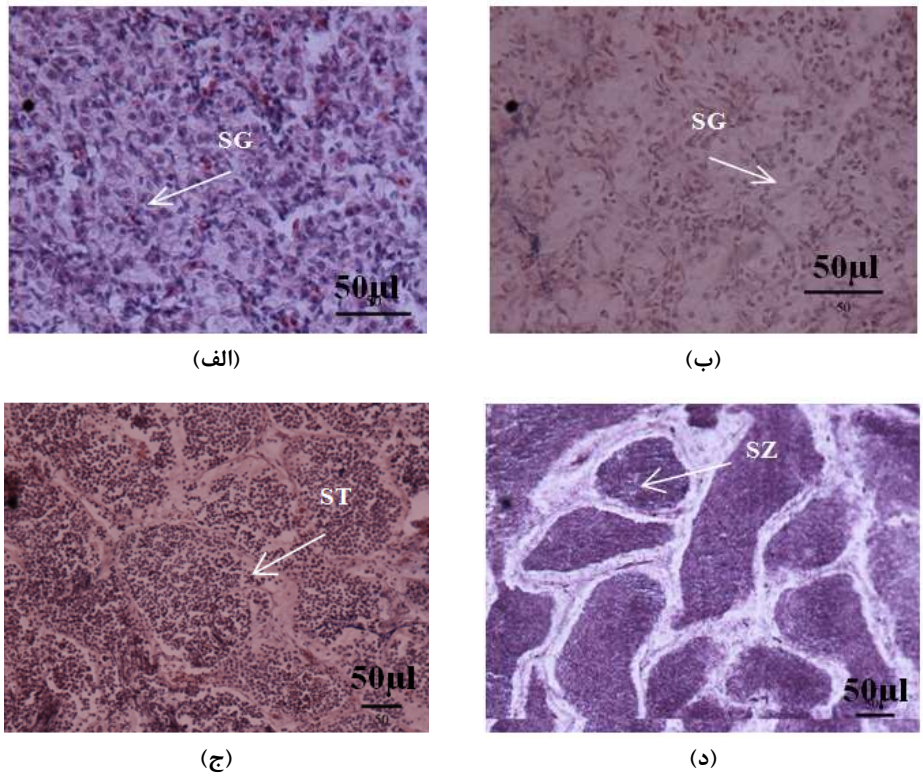
با توجه به ساختار تکامل گناد تاسماهیان در مراحل لاروی (۱، ۳، ۶، ۱۵ و ۵۰ روز پس از تفریخ) شناسایی سلول‌های جنسی غیر ممکن بود. در نمونه‌های گناد تمایز یافته به منظور تشخیص مرحله دقیق رسیدگی جنسی، بررسی‌های بافت‌شناختی انجام شد.

در بررسی نمونه‌های گناد نر تمایز یافته فیل‌ماهیان پرورشی با استفاده از روش بافت‌شناسی مراحل تکامل و رسیدگی گناد جنس نر شامل مراحل ۱، ۲ ، ۳ و ۴ رسیدگی جنسی به ترتیب با تعداد ۵، ۶، ۳ و ۴ عدد فیل‌ماهی نر مشاهده شد. نتایج نشان داد که فیل‌ماهیان پرورشی جنس نر در مراحل مختلف رسیدگی جنسی قرار داشتند (شکل ۲).

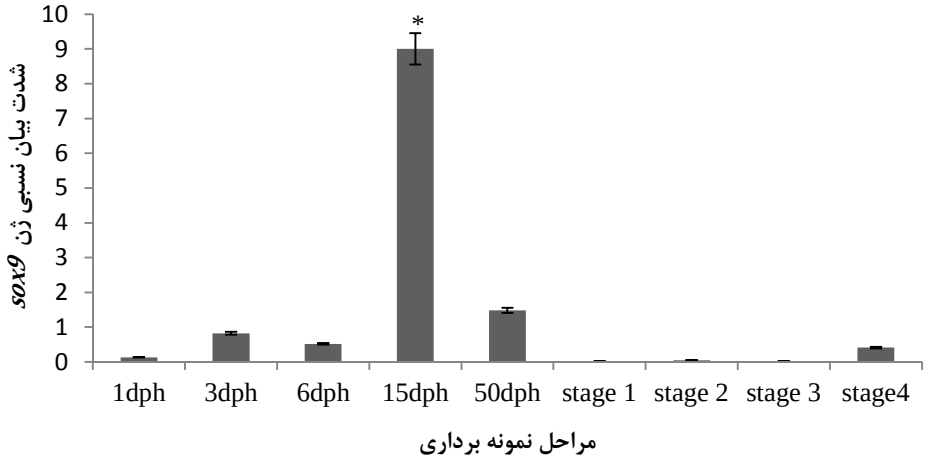
بررسی بیان ژن *sox9*

میزان نسبی بیان ژن *sox9* در طول مراحل مختلف لاروی و تکامل گنادی (مراحل مختلف رسیدگی جنسی) فیل‌ماهی، پس از نرمال‌سازی داده‌ها بر مبنای میزان بیان ژن *RPL6* در شکل ۳ ارائه شده است. نتایج نشان داد که بیان ژن *sox9* در لاروهای تازه تفریخ شده یعنی نمونه‌های یک روز پس از تفریخ به میزان خیلی جزئی مشاهده شد، سپس میزان بیان آن افزایش یافت به طوری که در روزهای سوم و ششم پس از تفریخ افزایش جزئی در بیان ژن مشاهده شد. این میزان افزایش بیان ژن *sox9* ادامه یافت و در روز پانزدهم پس از تفریخ میزان بیان آن به حداکثر رسید. پس از آن شدت بیان کاهش یافت. نتایج میزان بیان ژن *sox9* طی دوران لاروی (روزهای مختلف پس از تفریخ) نشان داد که میزان بیان این ژن در روز پانزدهم پس از تفریخ به طور معنی‌داری بیشتر از روزهای دیگر بود ($P<۰/۰۵$). در ادامه بررسی، میزان بیان ژن *sox9* طی مراحل تکامل بیضه در ماهیان نر تمایز یافته به طور معنی‌داری کاهش نشان داد. به طوری که در مراحل ۱، ۲ و ۳ رسیدگی جنسی بیضه میزان بیان آن به شدت کاهش یافت و قابل سنجش نبود. در حالی که میزان

بیان این ژن در مرحله ۴ رسیدگی جنسی در بیضه نر مجددا افزایش یافت. بر اساس نتایج این مطالعه، کمترین میزان بیان ژن *sox9* در گناد جنس نر فیل‌ماهی در مراحل ۱، ۲ و ۳ رسیدگی جنسی و بیشترین میزان بیان آن در فیل‌ماهیان ۱۵ روزه مشاهده شد (شکل۳). نتایج بررسی‌های آماری نشان داد سطوح *sox9* mRNA در بین مراحل مختلف تکوینی دارای تفاوت معنی‌دار است ($P<0/05$).



شکل ۲: ریخت‌شناسی و مراحل رسیدگی جنسی گناد فیل‌ماهی نر. (الف) نر مرحله ۱. (ب) نر مرحله ۲. (ج) نر مرحله ۳. (د) نر مرحله ۴. SG: اسپرماتوگونیا؛ ST: اسپرماتید؛ SZ: اسپرماتوزوآ.



شکل ۳: شدت بیان نسبی ژن sox9 در مراحل تکوینی لاروی و مراحل مختلف رسیدگی جنسی گناد تمایز یافته فیل‌ماهی نر (میانگین ± خطای استاندارد؛ نرمال‌سازی داده‌ها بر اساس میزان بیان ژن *RPL6*)

بحث

sox9 یکی از اعضای خانواده *SOX* بوده که علاوه بر عملکردهای تکاملی مانند تشکیل غضروف، نقش بسیار مهمی در تعیین جنسیت دارد (Healy et al., 1999; Jakubiczka et al., 2010). بنابراین، شناسایی ژن *sox9* اطلاعات ارزشمندی برای تجزیه و تحلیل عملکرد *sox9* در فرآیندهای تکاملی و تعیین جنسیت ارائه می‌کند.

در مطالعه حاضر، توالی نسبی ژن *sox9* به عنوان عامل رونویسی در تعیین و تمایز جنسیت مهره‌داران در فیل‌ماهی پرورشی برای اولین مورد شناسایی قرار گرفت و در بانک ژن با کد شناسایی KM280567 ثبت شد. تاکنون ژن sox9 در چندین گونه از ماهیان خاویاری مانند تاس‌ماهی دریایی اروپایی (Hett et al., 2005)، تاس‌ماهی سیبری (Berbejillo et al., 2011)، تاس‌ماهی آمور (Chen et al., 2006) و تاس‌ماهی چینی (Yue et al., 2015) و تاس‌ماهی ایرانی (رنجبر و همکاران، ۱۳۹۵) شناسایی شده است. مقایسه توالی نوکلئوتیدی ژن مذکور در فیل‌ماهی با سایر گونه‌های ماهیان خاویاری نشان دهنده تشابه قابل توجه بین آن‌ها است. همچنین مقایسه آن با دیگر گروه‌های جانوری نشان دهنده شباهت نسبی در بین شاخه‌های مختلف جانوری است که می

تواند دلیلی بر نقش بنیادین و تکوینی این ژن در جانوران مختلف باشد. توالی ژن فوق در تاسماهیان از نظر فیلوژنی، در یک موقعیت متمایزی با ماهیان استخوانی و دیگر مهره‌داران از جمله پستانداران قرار دارد که تا حدودی بازتاب دهنده موقعیت فیلوژنی تاسماهیان در رده‌بندی جانوری است. نتایج مطالعه حاضر با نتایج به دست آمده از طبقه‌بندی و شناسایی ژن *sox9* در فیل‌ماهی مبنی بر موقعیت متمایز تاسماهیان از دیگر مهره‌داران و نیز شباهت بالای آن به دیگر گونه‌های ماهیان خاویاری، مطابقت می‌کند (Hett and Ludwig 2005; Berbejillo, 2013).

بر اساس الگوی بیان *sox9* گزارش شده در مطالعه حاضر، بیان ژن *sox9* در مراحل لاروی (۱، ۳، ۶، ۱۵ و ۵۰ روز پس از تفریخ) مشاهده شد. به طوری که در ۱۵ روز پس از تفریخ میزان بیان آن به طور معنی‌داری افزایش یافت. بررسی الگوی بیان ژن *sox9* در ماهیانی مانند Medaka، کپور معمولی، تیلاپیا، لامباری (*Astyanax altiparanae*)، کفشک‌ماهی و روغن‌ماهی آتلانتیک (*Gadus morhua*) گزارش شده است (Johnsen, 2012; Haugen et al., 2012). در روغن‌ماهی آتلانتیک بیان ژن‌های *sox9a* و *sox9b* در تخم لقاح نیافته، تخم لقاح یافته و مرحله تقسیم مشاهده نشد. اولین حضور ایزوفرم‌های a و b ژن *sox9* در مرحله بلاستولا و ۲/۵ روز بعد از لقاح تعیین شد و پس از آن در ۶ روز پس از لقاح (مراحل گاسترولا) و ۷ تا ۱۴ روز پس از لقاح (تقسیم‌بندی) مشاهده شد. بیشترین میزان بیان ژن در ۲۱ روز پس از لقاح و همزمان با تفریخ تخم‌ها ثبت شد و بعد از آن روند کاهشی نشان داد و سپس ۳۵ روز پس از لقاح افزایش میزان بیان مشاهده شد (Johnsen, 2012). در لارو ماهی لامباری بیشترین سطح بیان ژن *sox9* در ۵ روز پس از تفریخ ثبت شد و پس از آن یک کاهش قابل ملاحظه در ۱۲ روز پس از تفریخ مشاهده شد. روند کاهشی در روزهای ۱۹ و ۲۶ روز پس از تفریخ ادامه داشت و در ۳۳ روز پس از تفریخ مجددا روند صعودی مشاهده شد (Adolfi et al., 2015). درمجموع این یافته‌ها نشانگر این است که الگوی بیان ژن *sox9* در بین گونه‌های مختلف ماهیان متغیر است که احتمال می‌رود این تفاوت‌ها در الگوی بیان ژن *sox9* ناشی از متفاوت بودن رشد و نمو لاروی در بین گونه‌های مختلف باشد.

بر طبق نتایج این مطالعه، اولین بیان ژن *sox9* در یک روز پس از تفریخ به میزان

خیلی کم مشاهده شد و تا ۵۰ روز پس از تفریخ (آخرین مرحله لاروی) ادامه یافت که بیشترین سطح بیان مربوط به لاروهای ۱۵ روز پس از تفریخ بود و پس از آن بیان ژن در مراحل تمایز یافتگی گناد جنس نر روند نزولی داشت. یافته‌های این پژوهش با نتایج Johnsen (۲۰۱۲) بر روی روغن ماهی آتلانتیک و همچنین Barney (۲۰۱۰) بر روی کپور معمولی مطابقت دارد، در حالی که با نتایج Strykowski (۲۰۱۱) بر روی ماهی Mangrove Rivulus مغایرت دارد. با توجه به نتایج مطالعات انجام شده و نتایج حاصل از پژوهش حاضر و نیز در نظر گرفتن نقش *sox9* در فعالیت‌های دیگر به نظر می‌رسد که علت بیان ژن *sox9* در مراحل اولیه رشد و نمو لاروی ممکن است مربوط به فعالیت‌های غضروف‌سازی در ماهیان باشد (Barney, 2010; Johnsen, 2012). به علاوه مطالعات مختلف نشان داده است که شروع و محل بیان ژن *sox9* در گونه‌های مختلف بسیار متفاوت است (Kluver, 2007). به عنوان مثال ژن *sox9a* در مراحل لاروی ماهی سه خاره و ماهی گورخری در سیستم عصبی مرکزی بیان می‌شود در حالی که در Medaka ژن *sox9* در سیستم عصبی مرکزی بیان نمی‌شود (Chiang et al., 2001; Cresko et al., 2003; Yan et al., 2005). همچنین در طول جنین‌زایی Medaka رونوشت‌های *sox9a* و *sox9b* در غضروف‌های سر و جمجمه به طور واضح قابل‌شناسایی است (Kluver, 2007). مطالعات Johnsen (۲۰۱۲) بر روی لارو تازه تفریخ شده روغن ماهی آتلانتیک نشانگر بیان بالای ژن *sox9b* در کمان آبششی بود. گزارش شده است که در ماهیان خاویاری روز اول پس از تفریخ زائده آبششی ظاهر می‌شود و پس از آن در سه روز پس از تفریخ نخستین رشته‌های آبششی شکل می‌گیرند و تکامل رشته‌های آبششی اولیه و ثانویه آبشش‌های اولیه شروع می‌شود (Abdali and Eagderi, 2015). نتایج مطالعه انجام شده بر روی بیان ژن *sox9* در بافت‌های مختلف تاس‌ماهی ایرانی نشان داد بیشترین میزان بیان این ژن در بافت آبشش مشاهده شد که می‌تواند به دلیل اهمیت نقش ژن *sox9* در فرآیندهای فیزیولوژیکی از جمله غضروف‌سازی باشد (رنجبر و همکاران، ۱۳۹۵). در مجموع با توجه به نتایج مطالعات پیشین، نتایج به دست آمده از بیان این ژن طی مراحل تکوینی فیل‌ماهی می‌تواند احتمالا به دلیل نقش ژن *sox9* در وقوع تغییرات ریخت‌شناختی از جمله شکل‌گیری بافت آبشش باشد. تفاوت

زمانی و مکانی در بیان ژن *sox9* در میان گونه‌های مختلف نشان می‌دهد که تنظیم فضایی و زمانی این ژن پس از انشعاب از دودمان مربوطه تغییر کرده است (Kluver, 2007).

همچنین بیان بالای ژن *sox9* در روز اول پس از تفریخ ممکن است به دلیل نقش *sox9* به عنوان یک تنظیم‌کننده اصلی در طول غضروف‌سازی باشد که می‌تواند در فعال‌سازی انواع ژن‌های دخیل در غضروف‌سازی مانند ژن‌های کلاژن‌های نوع II، IX، XI و 27a، اگریکان و ماتریلین موثر باشد (Kiefer, 2007). Barney (۲۰۱۰) نیز گزارش کرد که بیان بالای ژن sox9 در طول جنین‌زایی کپور معمولی نشان می‌دهد که نقش آن در غضروف‌زایی حفاظت شده است (Barney, 2010).

همچنین در مطالعه حاضر مشخص شد که در ۱۵ روز پس از تفریخ بیان ژن *sox9* در لارو فیل‌ماهی نسبت به مراحل دیگر لاروی و تکامل گنادی به طور معنی‌داری افزایش یافت. نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج مطالعات انجام شده بر روی سالمون آتلانتیک وکپور معمولی مطابقت دارد (Barney, 2010; Lubieniecki et al., 2015). با در نظر گرفتن تفاوت در زمان تشکیل گناد در ماهیان استخوانی که در آن‌ها تشکیل اندام‌های جنسی زودتر از ماهیان خاویاری صورت می‌گیرد، نمی‌توان عملکرد یکسانی برای این ژن در این دو گروه از ماهیان در نظر گرفت.

بیان ژن *sox9* تا ۵۰ روز پس از تفریخ در فیل‌ماهی ادامه می‌یابد. در این مرحله ماهی از مرحله لاروی وارد مرحله نوجوانی می‌شود که در آن از لحاظ ویژگی‌های اصلی، ظاهری شبیه به ماهی بالغ دارد. با این حال نتایج مطالعه حاضر بیان پایینی از ژن *sox9* را در این روز نشان داد که مطالعات Hagihara و همکاران (۲۰۱۴) بر روی تاس‌ماهی روسی نیز این یافته را تایید می‌کند. احتمال می‌رود که بیان این ژن، به دلیل فعالیت‌های عمومی در سلول‌های مختلف باشد به طوری که بیان ژن *sox9* در بافت‌های مختلف تاسماهیان از جمله تاس‌ماهی ایرانی (رنجبر و همکاران، ۱۳۹۵)، تاس‌ماهی سیبری (Berbejillo et al., 2013) و تاس‌ماهی آمور (Chen et al., 2006) گزارش شده است.

تاکنون هیچ مطالعه‌ای بر روی بیان ژن *sox9* ماهیان خاویاری در این بازه زمانی صورت نگرفته و مطالعه حاضر اولین مطالعه در روند تکوینی تاسماهیان است. در این پژوهش به منظور بررسی بیشتر نقش *sox9* در تعیین و

تمایز جنسی در بیضه ماهیان نر، سنجش ژن مذکور در گناد تمایز یافته فیل‌ماهیان پرورشی در مراحل ۱، ۲، ۳ و ۴ رسیدگی جنسی ادامه یافت. نتایج نشان داد که این ژن در مراحل ۱، ۲ و ۳ رسیدگی جنسی در بیضه فیل‌ماهی بیان نشد و فقط در گناد نر فیل‌ماهیان مرحله ۴ رسیدگی جنسی بیان شد. بر همین اساس می‌توان احتمال نقش *sox9* را در مراحل انتهایی تمایز بیضه در فیل‌ماهی عنوان کرد. همچنین با توجه به بیان ضعیف آن در گنادهای تمایز نیافته و مراحل اولیه رسیدگی جنسی، هنوز نمی‌توان نقش آن را در مراحل اولیه تمایز گنادی مشخص کرد و نیاز به مطالعات بیشتر برروی گناد تمایز نیافته تاسماهیان است. این نتایج مطابق مطالعات پیشین بر روی تاس‌ماهی سیبری است و بیان می‌کند که ژن *sox9* احتمالا در مراحل انتهایی تمایز بیضه در تاس‌ماهی سیبری دخیل باشد و نمی‌تواند به عنوان ژن تعیین کننده جنسیت در مراحل اولیه تاسماهیان به کار گرفته شود (Berbejillo et al., 2012).

به طور کلی در پژوهش حاضر توالی قسمتی از ژن *sox9* فیل‌ماهی شناسایی و به صورت اختصاصی برای این گونه در بانک ژن NCBI ثبت شد. نتایج به دست آمده از مطالعه فیلوژنی و بررسی توالی نوکلئوتیدی ژن *sox9* فیل‌ماهی با دیگر گونه‌های تاسماهیان بیانگر مشابهت بالای توالی این ژن در بین این ماهیان بود. همچنین بررسی الگوی بیان ژن *sox9* در مراحل تکوینی لاروی و گناد نر تمایز یافته فیل‌ماهی در مراحل مختلف رسیدگی جنسی با استفاده از روش Real Time PCR نشان داد که الگوی بیان ژن *sox9* در فیل‌ماهی در مراحل مختلف زندگی با توجه به عملکرد آن متفاوت است. با توجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان چنین استنباط کرد که فعالیت ژن *sox9* در مراحل لاروی و ابتدایی زندگی احتمالا با فرآیندهای غضروف‌زایی و اندام‌زایی مرتبط است در حالی که بیان آن در مراحل بالای رسیدگی جنسی گناد نر فیل‌ماهی به دلیل نقش ژن *sox9* در مراحل انتهایی تمایز بیضه است.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران کشور و انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دریای خزر به انجام رسید. از مدیریت وقت و کارشناسان انستیتو که در اجرای این پژوهش ما را یاری رساندند سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

رنجبر ح.، یارمحمدی م.، سجادی م. و کاظمی ر. ۱۳۹۵. بررسی بیان ژن SOX9 در بافت‌های تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*). ژنتیک نوین، ۱۱(۱): ۲۹-۲۱.

Abdali H. and Eagderi S. 2015. Ontogeny of gill structure in Sterlet, *Acipenser ruthenus* (Linnaeus, 1758). Iranian Journal of Ichthyology, 2: 87–92.

Adolfi M., Carreira A., Jesus L., Bogerd J., Funes R., Schartl M., Sogayar M. and Borella M. 2015. Molecular cloning and expression analysis of dmrt1 and sox9 during gonad development and male reproductive cycle in the lambari fish, *Astyanax altiparanae*. Reprodive Biology Endocrinology, 13: 1–15.

Akbarzadeh A., Farahmand H., Mahjoubi F., Nematollahi M.A., Leskinen P., Rytkonen K. and Nikinmaa M. 2011. The transcription of l-gulono-gamma-lactone oxidase, a key enzyme for biosynthesis of ascorbate, during development of Persian sturgeon *Acipenser persicus*. Comparative Biochemistry and Physiology B, 158: 282–288.

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. and Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, 215: 403–410.

Bahmani M. and Kazemi R. 1998. Histological study of gonad in young cultured sturgeon. Iranian Fisheries Journal, 7: 1–16.

Barney M.L. 2010. Molecular investigations on sex determination and differentiation pathways in the common carp, *Cyprinus carpio*. Ph.D. Thesis, University of Tasmania, Australia. 236P.

Berbejillo J., Martinez-Bengochea A., Bedo G. and Vizziano-Cantonnet D. 2011. Molecular characterization of testis differentiation in the Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. Indian Journal of Science and Technology, 4: 71–72.

Berbejillo J., Martinez-Bengochea A., Bedo G. and Vizziano-Cantonnet D. 2013. Expression of dmrt1 and sox9 during gonadal development in the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). Fish Physiology and Biochemistry, 39: 91–94.

Berbejillo J., Martinez-Bengochea A., Bedo G., Brunet F., Volff J.N. and Vizziano-Cantonnet D. 2012. Expression and phylogeny of candidate genes for sex differentiation in a primitive fish species, the Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. Molecular

Reproduction and Development, 79: 504–516.

Bowles J., Schepers G. and Koopman P. 2000. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. Developmental Biology, 227: 239–255.

Bowles J. and Koopman P. 2001. New clues to the puzzle of mammalian sex determination. Genome Biology, 2(9): 1–4 (1025).

Brennan J. and Capel B. 2004. One tissue, two fates: Molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. Nature Reviews Genetics, 5: 509–521.

Chaboissier M.C., Kobayashi A., Vidal V.I., Lutzkendorf S., Van De Kant H.J., Wegner M., De Rooij D.G., Behringer R.R. and Schedl A. 2004. Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. Development, 131: 1891–1901.

Chen J., Yuan H., Sun D., Liang B. and Zhang S. 2006. Sequence and expression of three members of the Sox gene in Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). Journal of Applied Ichthyology, 22(1): 77–81.

Chiang E.F.L., Pai C.I., Wyatt M., Yan Y.L., Postlethwait J. and Chung B.C. 2001. Two sox9 genes on duplicated zebrafish chromosomes: Expression of similar transcription activators in distinct sites. Developmental Biology, 231: 149–163.

Cresko W.A., Yan Y.L., Baltrus D.A., Amores A., Singer A., Rodriguez-Mari A. and Postlethwait J.H. 2003. Genome duplication, sub-function partitioning, and lineage divergence: Sox9 in stickleback and zebrafish. Developmental Dynamics, 228:480–489.

Doroshov S.I., Moberg G.P. and Van Eenennaam J.P. 1997. Observations on the reproductive cycle of cultures white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. Environmental Biology of Fishes, 48: 265–278.

FAO. 2015. An Overview of Recently Published Global. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome. 3P.

Fernandino J.L., Guilgur L.G., Strobl-Mazzulla P.H. and Somoza G.M. 2003. Molecular cloning of SOX9, DMRT1 and SF1 cDNA partial sequences in the pejerrey fish *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes). Fish Physiology and Biochemistry, 28(1-4): 145–146.

Hagihara S., Yamashita R., Yamamoto S., Ishihara M., Abe T., Ijiri, S. and Adachi S. 2014. Identification of genes involved in gonadal sex differentiation and the dimorphic expression pattern in undifferentiated gonads of Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii*

Brandt and Ratzeburg, 1833. Journal of Applied Ichthyology, 30: 1557–1564.

Hale M.C., Jackson J.R. and DeWoody J.A. 2010. Discovery and evaluation of candidate sex-determining genes and xenobiotics in the gonads of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). Genetica, 138: 745–756.

Haugen T., Almeida F.F., Andersson E., Bogerd J., Male R., Skaar K.S., Schulz R.W., Sorhus E., Wijgerde T. and Taranger G.L. 2012. Sex differentiation in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): morphological and gene expression studies. Reproductive Biology and Endocrinology, 10(1): 47–60.

Healy C., Uwanogho D. and Sharpe P.T. 1999. Regulation and role of SOX9 in cartilage formation. Developmental Dynamics, 215: 69–78.

Hett A.K. and Ludwig A. 2005. SRY-related (Sox) genes in the genome of European Atlantic sturgeon (*Acipenser sturio*). Genome, 48: 181–186.

Hett A.K., Pitra C., Jenneckens I. and Ludwig A. 2005. Characterization of sox9 in European Atlantic sturgeon (Acipenser sturio). Journal of Heredity, 96(2): 150–154.

Jakubiczka S., Schroder C., Ullmann R., Volleth M., Ledig S., Gilberg E., Kroisel P. and Wieacker P. 2010. Translocation and deletion around SOX9 in a patient with acampomelic campomelic dysplasia and sex reversal. Sexual Development, 4(3): 143–149.

Johnsen H. 2012. Key genes and regulators associated with sexual differentiation and gonad development in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). Ph.D. Thesis, University of Tromso UIT, Norway. 60P.

Keyvanshokooh S. and Gharaei A. 2010. A review of sex determination and searches for sex-specific markers in sturgeon. Aquaculture Research, 41: 1–7.

Keyvanshokooh S., Pourkazemi M. and Kalbassi M.R. 2007. The RAPD technique failed to identify sex-specific sequences in beluga (*Huso huso*). Journal of Applied Ichthyology, 23: 1–2.

Kiefer J.C. 2007. Back to basics: Sox genes. Developmental Dynamics, 236: 2356–2366.

Kluver N. 2007. Molecular analysis of gonad development in medaka (*Oryzias latipes*) and *Oryzias celebensis*. Ph.D. Thesis, University of Wurzburg, Germany. 142P.

Koopman P. 2005. Sex determination: A tale of two Sox genes. Trends in Genetics, 21: 367–370.

Liu S., Sun Y., Zhang C., Luo K. and Liu Y. 2004. Production of gynogenetic progeny from allo-

tetraploid hybrids red crucian carp × common carp. Aquaculture, 236: 193–200.

Livak K.J. and Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 25: 402–408.

Lubieniecki K.P., Botwright N.A., Taylor R.S., Evans B.S., Cook M.T. and Davidson W.S. 2015. Expression analysis of sex-determining pathway genes during development in male and female Atlantic salmon (*Salmo salar*). Physiological Genomics, 47(12): 581–587.

McCormick C., Bos D. and DeWoody J. 2008. Multiple molecular approaches yield no evidence for sex-determining genes in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). Journal of Applied Ichthyology, 24: 643–645.

Mojazi Amiri B., Maebayashi M., Hara A., Adachi S. and Yamauchi K. 1996. Ovarian development and serum sex steroid and vitellogenin profiles in the female cultured sturgeon hybrid, the bester. Journal of Fish Biology, 48(6): 1164–1178.

Nakamoto M., Suzuki A., Matsuda M., Nagahama Y. and Shibata N. 2005. Testicular type Sox9 is not involved in sex determination but might be in the development of testicular structures in the medaka (*Oryzias latipes*). Biochemical and Biophysical Research Communications, 333: 729–736.

Strykowski J. 2011. Effects of temperature on gene expression and sex determination in the mangrove rivulus, *Kryptolebias marmoratus*. Ph.D. Thesis, University of Maryland, USA. 91P.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30: 2725–2729.

Vecsei P., Sucui R. and Peterson D. 2002. Threatened fishes of the world: *Huso huso* (Linnaeus, 1758) (Acipenseridae). Environmental Biology of Fishes, 65(3): 363–365.

Webb M.A., Feist G.W., Foster E.P., Schreck C.B. and Fitz-Patrick M.S. 2002. Potential classification of sex and stage of gonadal maturity of wild white sturgeon using blood plasma indicators. Transactions of the American Fisheries Society, 131: 132–142.

Wuertz S., Gaillard S., Barbisan F., Carle S., Congiu L., Forlani A., Aubert J., Kirschbaum F., Tosi E. and Zane L. 2006. Extensive screening of sturgeon genomes by random screening techniques revealed no sex-specific marker. Aquaculture, 258: 685–688.

Yan Y.L., Willoughby J., Liu D., Crump J.G., Wilson C., Miller C.T., Singer A., Kimmel C., Westerfield M. and Postlethwait J.H. 2005. A pair of Sox: Distinct and overlapping functions of zebrafish sox9 co-orthologs in craniofacial and pectoral fin development. Development, 132: 1069–1083.

Yarmohammadi M., Pourkazemi M., Ghasemi A., Hassanzadeh M. and Chakmehdouz F. 2011. AFLP reveals no sex-specific markers in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) or beluga sturgeon (*Huso huso*) from the southern Caspian Sea, Iran. Progress in Biological Sciences, 1: 55–114.

Yarmohammadi M., Pourkazemi M., Kazemi R., Hallajian A., Soltanloo H., Hassanzadeh Saber M. and Abbasalizadeh A. 2014. Persian sturgeon insulin-like growth factor I: Molecular cloning and expression during various nutritional conditions. Journal of Applied Genetics, 55: 239–247.

Yue H., Li C., Du H., Zhang S. and Wei Q. 2015. Sequencing and de novo assembly of the gonadal transcriptome of the endangered Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*). PLOS One, 10(6): 1–22 (0127332).

Aquatic Physiology and Biotechnology

Vol. 5, No. 2, Summer 2017

sox9 gene expression during stages of larval development and gonadal maturation in the beluga (*Huso huso*)

Mahtab Yarmohammadi[1]*, Mohammad Pourkazemi[2], Rezvanollah Kazemi[3], Ali Hallajian[4], Mohammad Hassanzadeh Saber[5], Ayub Yousefi Jordehi[6]

Received: October 2016 Accepted: December 2016

Abstract

sox9 is a protein coding gene that plays a crucial role in the regulation of several cellular activities among vertebrates. The present study was developed for the identification of sox9 gene sequence and expression pattern in different stages of larval and gonadal development of male beluga as it is known a major species in acipenser culture. The results showed that the ***sox9*** sequence in the beluga has high homology with the ***sox9*** sequence in other vertebrates, which represents its fundamental role. Indeed, the study of ***sox9*** gene expression during larval development (1, 3, 6, 15 and 50 days post hatching- dph) revealed that ***sox9*** mRNA is expressed at different larval stages most importantly at 15 dph. However, in differentiated gonads (developmental stages 1-4), ***sox9*** mRNA expressed only at stage 4. In conclusion, it seems that the ***sox9*** expression was related with cartilage formation and organogenesis at early life stages and with testicular development at advanced stages of sexual maturation.

Key words: *Gene Expression, Beluga, Sex Determination, Developmental Stages, sox9.*

1- Assistant Professor in Department of Genetics, International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

2- Professor in Iranian Fisheries Research Organization, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

3- Assistant Professor in Department of Physiology and Biochemistry, International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

4- M.Sc. in Natural Resources Engineering, Department of Physiology and Biochemistry, International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

5- M.Sc. in Natural Resources Engineering, Department of Genetics, International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

6- Assistant Professor in Department of Physiology and Biochemistry, International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

*Corresponding Author: mahtabyarmohammadi@gmail.com