



القای ماده‌زایی بین‌گونه‌ای در تاس‌ماهی سیبری (*Acipenser baerii*) با استفاده از اسپرم غیرهمسان

محمد حسن‌زاده صابر^{۱*}، شهروز برادران نویری^۲، محمد پورکاظمی^۳، مهتاب یارمحمدی^۴،
هوشنگ یگانه راسته‌کناری^۵، جلیل جلیل‌پور رودکلی^۶

DOI:10.22124/japb.2021.20693.1439

تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: مهر ۱۴۰۰

چکیده

تاس‌ماهی سیبری (*Acipenser baerii*) در استخرهای پرورشی رشد سریعی دارد. ماده‌زایی تکنیک مناسبی برای تولید جنس ماده تاس‌ماهیان است. این مطالعه با هدف ایجاد جنس ماده در تاس‌ماهی سیبری با استفاده از القای ماده‌زایی صورت گرفت. اسپرم تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) با مقدار ۸۵۱۴ ژول بر متر مربع توسط پرتوی UV از نظر ژنتیکی غیرفعال شد. در این حالت، اسپرم با تحرک ۴۰ درصد با تخمک تاس‌ماهی سیبری ترکیب و در شوک سرمایی ۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه، ۱۰ دقیقه بعد از فعالیت، نتاج گاینوژنیک ایجاد شد. میزان لقاح ۴۴/۵ درصد (دورگه آمیخته شاهد ۶۲ درصد) و میزان تفریح ۱۹/۸ درصد (دورگه آمیخته شاهد ۴۰/۵ درصد) برآورد شد. وراثت‌پذیری صرفاً مادری در نتاج گاینوژنیک با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره تأیید شد. با دستیابی به زی‌فن اسپرم با DNA غیرفعال شده تاس‌ماهی ایرانی، امکان جلوگیری از خطر انقراض و حفاظت از تاس‌ماهیان دیگر نیز به وسیله القای ماده‌زایی فراهم می‌شود.

واژگان کلیدی: تاس‌ماهی سیبری، تاس‌ماهی ایرانی، ماده‌زایی، اسپرم غیرهمسان.

- ۱- مربی بخش ژنتیک و بیوتکنولوژی انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاوباری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت ایران
 - ۲- استادیار بخش ژنتیک و بیوتکنولوژی انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاوباری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج جهاد کشاورزی، رشت، ایران.
 - ۳- استاد موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج جهاد کشاورزی، تهران، ایران.
 - ۴- دانشیار بخش ژنتیک و بیوتکنولوژی انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاوباری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج جهاد کشاورزی، رشت، ایران.
 - ۵- کارشناس ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، بخش آبی پروری انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاوباری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج جهاد کشاورزی، رشت، ایران.
 - ۶- کارشناس ارشد شیلات، بخش بهداشت و بیماری‌ها انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاوباری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج جهاد کشاورزی، رشت، ایران.
- * نویسنده مسئول: saber.merag@gmail.com

مقدمه

تاس‌ماهی سیبری (*Acipenser baerii*) یکی از گونه‌های مناسب آبی‌پروری در خانواده تاس‌ماهیان است و گونه اصلی پرورش تاس‌ماهیان در آسیا-اروپا به عنوان گونه پرورشی جدید با سرعت رشد و عادت‌پذیری بالا است (Williot et al., 2002). این ماهی یک گونه با ارزش در آبی‌پروری است که گوشت آن پروتئین انسانی را تامین می‌کند و خاویار آن می‌تواند سود ارزی مناسبی را برای کشور ایجاد کند.

بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که جنسیت در تاس‌ماهیان اساساً به طور ژنتیکی تعیین می‌شود، بنابراین نسبت جنسی تاس‌ماهیان در حالت طبیعی بیشتر ۱:۱ است و علائمی از تعیین جنسیت محیطی دیده نمی‌شود (Doroshov et al., 1997; Hurvitz et al., 2007; Wuertz et al., 2018). تولید ماهیان تمام ماده یا ماهیان ماده با تعداد بالاتر نسبت به نرها می‌تواند با دستکاری‌های ژنتیکی (ماده‌زایی) امکان‌پذیر باشد (Lebeda et al., 2014a,b). از آنجایی که سیستم تعیین جنسیت هتروگامتی ماده در تاس‌ماهیان، تاکنون به عنوان الگوی رایجی معرفی شده است (Saber and Hallajian, 2014; Fopp-

تمامی گونه‌های ماهیان خاویاری که محل زیست طبیعی آنها در دریای خزر و حوضه آبریز اطراف آن است، در فهرست ماهیان در معرض خطر اتحادیه بین‌المللی حفاظت گونه‌ها و طبیعت (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources: IUCN) قرار دارند، همچنین کلیه ۲۷ گونه این ماهیان در جهان نیز در محیط طبیعی به شدت در معرض خطر هستند و ۸۵ درصد آنها در خطر انقراض قرار دارند (Ruban and Mugue, 2022).

ماهیان خاویاری در شرایط کنترل شده رشد سریع دارند و به نسبت محیط طبیعی سریع‌تر به بلوغ جنسی می‌رسند (Chebanov and Billard, 2001; Fopp-Bayat, 2018). پرورش تاس‌ماهیان می‌تواند فشار صید از منابع طبیعی را کاهش داده، پرورش تمام ماده تولید خاویار را افزایش دهد و پاسخگوی تقاضای مصرف‌کننده باشد. به همین دلیل تولید و پرورش ماهیان ماده دارای ارزش بالاتری از تولید و پرورش نرها و یا پرورش آنها به صورت مختلط در ماهیان خاویاری است (Mims et al., 2005).

در اکثر مطالعات ماده‌زایی، هم اسپرم همسان و هم اسپرم غیرهمسان غیرفعال برای پیشرفت مراحل جنینی استفاده می‌شود (Meng et al., 2016). درصد لاروهای زایای گاینوژنیک القا شده با اسپرم همسان، به طور واضح بالاتر از اسپرم غیرهمسان است ولی ممانعت از ورود اسپرم‌های همسان که به طور ناقص غیرفعال شده‌اند، دشوار است و به این ترتیب تشخیص دیپلوئید گاینوژنیک از دیپلوئید نرمال به آسانی انجام پذیر نیست (Pan et al., 2017). نشانگرهای مولکولی چندشکلی مانند AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) و SSR (Simple Sequence Repeats) می‌توانند این مشکل را با تشخیص خصوصیات ژنتیکی مادری حل کنند (Dan et al., 2013). اگر مولد نر غیرهمسان تعداد کروموزوم‌های متفاوتی با مولد ماده مورد بررسی داشته باشد، امکان لقاح و تولید دوره بسیار کم است و در صورت استفاده از این اسپرم می‌توان با اطمینان لاروهای باقی‌مانده را گاینوژن‌های واقعی نامید، زیرا دوره‌ها یا علائم ظاهری متفاوت از گونه اصلی را نشان می‌دهند و یا به طور کامل کشته شده‌اند. البته میزان لقاح و القای دیپلوئیدی در اسپرم غیرهمسان

(Bayat et al., 2018)، بنابراین ماده‌زایی به وسیله اسپرم غیرهمسان، می‌تواند گامی موثر در جهت تولید جنس ماده با نسبت بالاتر باشد. ماده‌زایی می‌تواند در ماده‌های هموگامتی (XX) ۱۰۰ درصد نتاج ماده تولید کند، اما در یک گونه با سیستم جنسیتی هتروگامتی ماده، ماده‌زایی به نسبت‌های متفاوتی نرهای ZZ، ماده‌های ZW و ماده‌های برتر WW را ایجاد می‌کند که به تبادل کروموزومی (Crossing Over) بین عامل تعیین جنسیت و سانترومر (Centromere) بستگی دارد. اگر تبادل کروموزومی بین عامل تعیین جنسیت و سانترومر به وقوع نپیوندد هیچ نتاج هتروزیگوتی تولید نمی‌شود. زمانی که عامل تعیین جنسیت به طور مستقل از سانترومر دسته‌بندی می‌شود، حدود ۶۷ درصد نتاج هتروزیگوت ممکن است تولید شود و این مقدار ممکن است به بالای ۸۸ درصد با زایا بودن ماده‌های برتر WW برسد (Van Eenennaam et al., 1999). Pandian در سال ۲۰۱۱ اظهار کرد که نسبت جنسی در ماهیان هتروگامتی اثبات شده با ماده‌زایی، دسته‌بندی مستقل عامل تعیین جنسیت از سانترومر را نشان می‌دهد یعنی به ازای هر نر، دو ماده وجود دارد.

بیوتکنیک (زی‌فن) غیرفعال‌سازی ژنوم اسپرم تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) با حفظ تحرک آن به منظور القای ماده‌زایی از اهداف جنبی این مطالعه است.

مواد و روش‌ها

این بررسی در فروردین سال ۱۳۹۶ در سایت تکثیر و بازسازی ذخایر موسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر انجام پذیرفت. یک جفت مولد با کیفیت مناسب تاس‌ماهی سیبری (*Acipenser baerii*) ماده ۶ ساله با وزن ۷ کیلوگرم و طول ۷۶ سانتی‌متر و مولد نر ۵ ساله با وزن ۵/۵ کیلوگرم و طول ۶۰ سانتی‌متر و یک مولد نر تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) (غیرهمسان) ۶ ساله با وزن ۸ کیلوگرم و طول ۹۰ سانتی‌متر انتخاب شد تا اسپرم آن در معرض پرتوی UV قرار گیرد. برای رسیدگی جنسی مولد ماده با توجه به دمای آب ($15 \pm 0/5$) درجه سانتی‌گراد) از هورمون GnRH (ثامن، ایران) به میزان ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم در دو مرحله که در مرحله اول ۲۰ درصد و بعد از ۶ ساعت، باقی مانده هورمون در داخل عضله پشتی تزریق شد. برای تاس‌ماهی سیبری نر و تاس‌ماهی ایرانی نر تزریق GnRH در یک مرحله (همزمان با تزریق

کمتر از اسپرم همسان است (Ji et al., 2010; Chen et al., 2012).

القای موثر ماده‌زایی به طور همزمان نیاز به غیرفعال کردن ژنوم اسپرم و توانایی باروری بالا دارد. بنابراین موفقیت در ماده‌زایی منوط به تعیین مقدار مناسب پرتوی فرابنفش (UV) برای غیرفعال‌سازی ژنوم اسپرم است. غیرفعال سازی معمولا با پرتو انجام می‌شود و بررسی تحرک اسپرم برای بهینه کردن فرآیندهای گاینوژنیک در ماهیان پیشنهاد شده است (Dietrich et al., 2005). تحرک اسپرم مهم ترین مقیاس در ارزیابی کیفی اسپرم است. تحرک می‌تواند وسیع‌ترین نشانگر زیستی استفاده شده برای کیفیت اسپرم باشد و در حالات متفاوت برای بررسی اسپرم به کار گرفته شده است. ارتباط بین تحرک و ظرفیت لقاح توسط چندین پژوهشگر گزارش شده است (Billard et al., 1993; Ohta et al., 1995; Linhart et al., 2000). آزمون تحرک شامل درصد اسپرماتوزوای متحرک (Levanduski and Cloud, 1988) و مدت کلی تحرک (Duplinsky, 1982) است.

مطالعه حاضر با هدف ایجاد جنس ماده در تاس‌ماهی سیبری با استفاده از القای ماده‌زایی و اسپرم غیرهمسان، صورت گرفت. دستیابی به

در این بررسی از لامپ UV (UVG-54)، UVP، آمریکا) با طول موج کوتاه ۲۵۴ نانومتر استفاده شد. در هنگام پرتودهی، منبع نوری و پتری دیش حاوی اسپرم بر روی یک شیکر اوربیتالی با ۹۰ دور در دقیقه حرکت داده شد تا تابش پرتو به طور تقریباً یکسان بر تمامی اسپرم‌ها باشد. فاصله منبع UV با اسپرم رقیق شده با مایع سمینال ۱۲ سانتی‌متر بود. شدت تابش پرتوی UV در فاصله یاد شده ۴۷۳ میکرووات بر سانتی‌متر مربع ثبت شد (اندازه‌گیری شده در سازمان انرژی اتمی ایران، ۱۳۸۴). شدت موثر UV، بر اساس روش Hassanzadeh Saber و همکاران (۲۰۰۸) تعیین شد. سپس پتری دیش حاوی اسپرم رقیق شده در فواصل زمانی مختلف ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ ثانیه در معرض لامپ UV قرار داده شد و پس از هر مدت پرتو، یک نمونه اسپرم پرتو داده شده با یک نمونه اسپرم شاهد برای ارزیابی میزان تحرک اسپرم به طور همزمان در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت و سپس منحنی کاهش تحرک اسپرم‌های پرتو دیده در مقایسه با اسپرم‌های شاهد رسم شد. به منظور آزمون باروری و میزان تفریح تخم، اسپرم‌های پرتو دیده و بدون پرتودهی با ۵۰ گرم از تخمک تاس‌ماهی سبیری (۵۴ عدد در گرم) ترکیب و میزان لقاح در مراحل جنینی و تعداد

دوم مولد ماده) به میزان ۲۰ میکروگرم در کیلوگرم صورت گرفت. سپس اسپرم و تخمک به ترتیب از مولد نر و ماده استحصال شد. به میزان ۶۰ میلی‌لیتر اسپرم از تاس‌ماهی ایرانی دریافت شد که ۱۰ میلی‌لیتر از آن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و از ۵۰ میلی‌لیتر اسپرم باقی‌مانده، مایع سمینال (Seminal Fluid) برای رقیق‌سازی اسپرم، با استفاده از سانتریفوژ (Eppendorf, 5415D، آلمان) با دور ۵۰۰۰ در دقیقه به مدت ۵ دقیقه جدا شد. غلظت اسپرم دریافتی از تاس‌ماهی ایرانی $10^9 \times 1/56$ اسپرم در میلی‌لیتر بود که با لام هموسیتومتر اندازه‌گیری شد، بنابراین برای هر تیمار به میزان $6/75$ میلی‌لیتر از مایع سمینال با $0/75$ میلی‌لیتر از اسپرم استوک (۱۰ درصد) در داخل پتری دیش با قطر $9/8$ سانتی‌متر و به عمق ۱ میلی‌متر ریخته شد. به منظور جلوگیری از کم شدن تحرک ناشی از گرمای حاصل از تابش پرتو به اسپرم، ظرف (پتری دیش) حاوی اسپرم بر روی آب سرد قرار گرفت. همچنین به منظور جلوگیری از فعالیت مجدد اسپرم پرتو دیده در نور (Photoreactivation) بلافاصله اسپرم‌های UV داده شده و استوک در ظروف تیره ریخته شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

لارو تفریخ شده (بازماندگی) مورد ارزیابی قرار گرفت و با تیمار شاهد مقایسه شد. پس از استحصال تخمک از تاس‌ماهی سیبری، هر تیمار اسپرم با حدود ۷۰ میلی‌لیتر از آب سالن تکثیر ترکیب و بلافاصله به تخمک اضافه شد. تیمارهای آزمایشی مورد استفاده در این بررسی (در مجموع ۹ تیمار) شامل (۱) سه تیمار گاینوژنیک G₆₀، G₁₂₀ و G₁₈₀ (اسپرم پرتو دیده تاس‌ماهی ایرانی در زمان‌های ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه و لقاح با تخمک سالم تاس‌ماهی سیبری به همراه شوک سرمایی به منظور دیپلوئیدسازی)، (۲) یک تیمار دورگه تریپلوئید (اسپرم سالم تاس‌ماهی ایرانی و لقاح با تخمک سالم تاس‌ماهی سیبری به همراه شوک سرمایی)، (۳) سه تیمار هاپلوئید H₆₀، H₁₂₀ و H₁₈₀ (اسپرم پرتو دیده تاس‌ماهی ایرانی در

زمان‌های ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه و لقاح با تخمک سالم تاس‌ماهی سیبری بدون شوک سرمایی)، (۴) یک تیمار دورگه دیپلوئید (اسپرم سالم تاس‌ماهی ایرانی و تخمک سالم تاس‌ماهی سیبری)، و (۵) یک تیمار شاهد (اسپرم و تخمک سالم تاس‌ماهی سیبری) بود (جدول ۱). مطابق با تغییرات جزئی در روش Hassanzadeh و همکاران (۲۰۰۸)، به منظور احتباس جسم دوم قطبی در زمان تقسیم دوم میوز در ۱۰ دقیقه بعد از عمل لقاح (افزودن آب به مخلوط تخمک و اسپرم) از شوک سرمایی ۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. سپس تخم‌ها بعد از شستشو (کهنه‌شهری و آذری تاکامی، ۱۳۵۳) به انکوباتورهای ویس به منظور گذراندن مراحل جنینی انتقال یافتند.

جدول ۱: الگوی آزمایش القای ماده‌زایی در تاس‌ماهی سیبری

الگو	تیمار تخم	تیمار اسپرم / گونه
شاهد	بدون شوک	بدون پرتو / تاس‌ماهی سیبری
دورگه شاهد	بدون شوک	بدون پرتو / تاس‌ماهی ایرانی
هاپلوئید	بدون شوک	پرتوی UV / تاس‌ماهی ایرانی
تریپلوئید	شوک سرما (۲ درجه سانتی‌گراد - بمدت ۳۰ دقیقه)	بدون پرتو / تاس‌ماهی ایرانی
گاینوژنیک دیپلوئید	شوک سرما (۲ درجه سانتی‌گراد - بمدت ۳۰ دقیقه)	پرتوی UV / تاس‌ماهی ایرانی

در تمام مدت آزمایش دمای آب سالن انکوباسیون اندازه‌گیری و بر این اساس درصد لقاح و درصد تفریخ محاسبه شد. لاروهای استحصالی پس از شمارش به بخش پرورش موسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر منتقل شد و در وان‌های فایبرگلاس نیم تنی با تراکم استاندارد پرورش داده شد. پس از جذب کیسه زرده، تغذیه با غذای زنده مانند ناپلیوس آرتمیا آغاز و با رشد دهانی لاروها با دافنی ادامه یافت. سپس تغذیه با غذای کنستانتره (فرادانه، ایران) آغاز شد و تا پایان آزمایش ادامه داشت.

در این مطالعه استخراج DNA در هر تیمار حداقل به میزان ۳۰ عدد لارو و بچه ماهی به روش Hillis و Moritz (۱۹۹۰) برای ماهیان خاویاری با کمی تغییر توسط Pourkazemi (۱۹۹۶) صورت پذیرفت. برای تایید ماده‌زایی در تاس‌ماهی سیبری، از نشانگرهای مولکولی ریزماهواره (۶ جفت) طراحی شده برای تاس‌ماهی دریاچه‌ای (*Acipenser fulvescens*) (May et al., 1997; Welsh et al., 2003) استفاده شد (جدول ۲) که نوع و مقدار ماده مورد استفاده در واکنش PCR (جدول ۳) و شرایط آن در جدول ۴ بیان شده است.

جدول ۲: مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در اثبات نتاج گاینوژن

اندازه کلون توالی‌یابی شده (جفت باز)	توالی آغازگرها	الگوی تکراری	شماره دسترسی بانک ژن	جایگاه ژن
۱۵۲	F: CATAATGTAAGCAAAAAGT R: ACCTGAAATGTATGTTATG	(GATA)14(GA)2GATA(GA)2(GATA)6	AF529447	<i>AfuG-9</i>
۱۳۹	F: TCCTGGCTAGCGAACGAA R: CTTTAAATGGGGACAGACTAT	(AAAC)8	AF529475	<i>AfuG-63</i>
۱۴۰	F: TTATTGGATGGTGTACCTAAAC R: AGCCCAACACGACAATATC	(GATA)13	U72739	<i>Afu-68</i>
۱۷۵	F: AACACGACAACAACTTATTCA R: TGTGTTTCTATGCTGTCTGTCTA	(GATA)13	AF529503	<i>AfuG-122</i>
۱۶۵	F: ATTCTCCAGCCGTATTATTA R: AAGCAGTTAGTTTATGTGGTTGTG	(AAAC)7	AF529548	<i>AfuG-195</i>
۲۶۰	F: TATGTTCCTTTATGGTTATG R: TATTCACTGTCTGTGTATGTA	(GATA)12GACA(GATA)6	AF529499	<i>AfuG-112</i>

جدول ۳: نوع و مقدار مواد استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

ماده	غلظت مواد	مقدار برای واکنش ۲۰ میکرولیتری
DNA	۵۰ نانوگرم	۵۰ میکروگرم
آنزیم تک DNA پلیمرز	۵ میکرولیتر در واحد	۰/۱۵ میکرولیتر
dNTPs	۱۰ میلی‌مولار	۰/۴ میکرولیتر
MgCl ₂	۵۰ میلی‌مولار	۰/۷ میکرولیتر
بافر PCR	۱۰ X	۲ میکرولیتر
آغازگر ۱	۱۰ پیکومول	۱ میکرولیتر
آغازگر ۲	۱۰ پیکومول	۱ میکرولیتر
آب مقطر	-	تا ۲۰ میکرولیتر

جدول ۴: برنامه‌های داده شده به دستگاه PCR

مراحل	دما (سانتی‌گراد)	زمان (ثانیه)	تعداد چرخه (سیکل)
واسرشته‌سازی اولیه	۹۴	۱۸۰	۱
واسرشته‌سازی	۹۴	۳۰	
الحاق	۶۲-۵۲	۳۰	۳۲-۳۰
بسط	۷۲	۳۰	
بسط نهایی	۷۲	۳۰۰	۱

برای بررسی میزان تحرک و قابلیت باروری اسپرم پرتو داده شده در تیمارهای متفاوت و مقایسه آن با گروه شاهد، همچنین مقایسه لقاح، تفریح و بازماندگی در تیمارهای مختلف گاینوژن با شاهد به صورت میانگین و انحراف معیار ثبت شد. به منظور بررسی توزیع نرمال داده‌ها در تیمارها و تکرارها از آزمون Shapiro-Wilk استفاده شد. پس از اطمینان از نرمال بودن و همگنی داده‌ها (با استفاده از آزمون Test of Homogeneity of Variances) به منظور مقایسه آماری تیمارها از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و پس‌آزمون دانکن (Duncan) در سطح ۹۵ درصد ($P < 0/05$) استفاده شد. کلیه بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۶ انجام شد و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Excel 2010 استفاده شد.

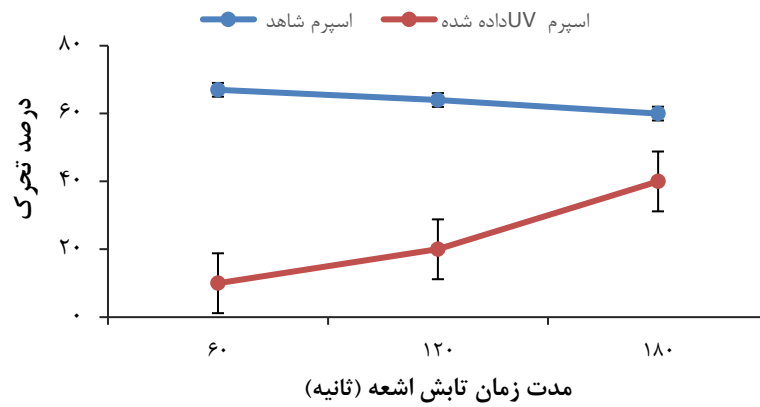
برای بررسی میزان تحرک و قابلیت باروری اسپرم پرتو داده شده در تیمارهای متفاوت و مقایسه آن با گروه شاهد، همچنین مقایسه لقاح، تفریح و بازماندگی در تیمارهای مختلف گاینوژن با شاهد به صورت میانگین و انحراف معیار ثبت شد. به منظور بررسی توزیع نرمال داده‌ها در تیمارها و تکرارها از آزمون Shapiro-Wilk استفاده شد. پس از اطمینان از نرمال بودن و همگنی داده‌ها (با استفاده از آزمون Test of

نتایج

تیمار هاپلوئید به وجود آمد. نتایج به دست آمده نشان داد که درصد لقاح در تیمارهای هاپلوئید در معرض پرتو در زمان‌های ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ ثانیه به ترتیب $۲۸/۴ \pm ۰/۱۷$ ، $۲۵/۲ \pm ۰/۲۸$ و $۳۸/۳ \pm ۰/۵۲$ و در دوره شاهد $۶۲ \pm ۱/۳۲$ درصد بود. میزان لارو تفریخ شده در این تیمارها به ترتیب $۰/۶ \pm ۰/۱۱$ ، $۱/۰۳ \pm ۰/۱۱$ ، $۱/۳۳ \pm ۰/۰۵$ و $۴۰/۵ \pm ۰/۳۴$ درصد سنجش شد (شکل ۲). بر اساس آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و پس‌آزمون دانکن، میزان لقاح در تیمارهای هاپلوئید با یکدیگر و با گروه دوره شاهد دارای اختلاف معنی‌داری بود ($P < ۰/۰۵$). اختلاف معنی‌داری در میزان خروج لارو بین تیمارهای هاپلوئید H_{60} و H_{120} وجود نداشت ($P > ۰/۰۵$). ولی این تیمارها با تیمار هاپلوئید H_{180} و دوره شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند ($P < ۰/۰۵$). تیمار H_{180} در مقایسه با تیمارهای دیگر هاپلوئید دارای درصد لقاح بالاتر و دارای میزان تفریخ پایینی بود. تعداد لارو باقی‌مانده در این تیمار دارای سندرم هاپلوئیدی بودند و به صورت ناقص الخلقه تفریخ شدند که در فاصله کوتاهی پس از تفریخ تلف شدند.

اسپرم تازه در مولد تاس‌ماهی ایرانی دارای تحرک ۶۷ درصد در جهت رو به جلو، مدت تحرک ۳۱۸ ثانیه و با تراکم $۱/۵۶ \times ۱۰^۹$ اسپرم در میلی‌لیتر ارزیابی شد (شکل ۱ و جدول ۵). در تیمارهای متفاوت اسپرم UV داده شده، در زمان‌های ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ ثانیه در مولد تاس‌ماهی ایرانی نر اول به ترتیب ۱۰، ۲۰ و ۴۰ درصد که در همه تیمارها جهت حرکت رو به جلو بود. بر اساس شکل ۱، با شروع تابش پرتو به مدت ۶۰ ثانیه، میزان تحرک کاهش و سپس در مدت ۱۲۰ ثانیه تابش، درصد تحرک افزایش یافت و در مدت ۱۸۰ ثانیه، میزان افزایش تحرک اسپرم، کاملاً محسوس بود. بنابراین بهترین زمان در معرض قرارگیری اسپرم تحت پرتوی UV، در زمان ۱۸۰ ثانیه ارزیابی شد، زیرا دارای درصد تحرک مناسبی نسبت به اسپرم شاهد بود و حرکت رو به جلو داشت.

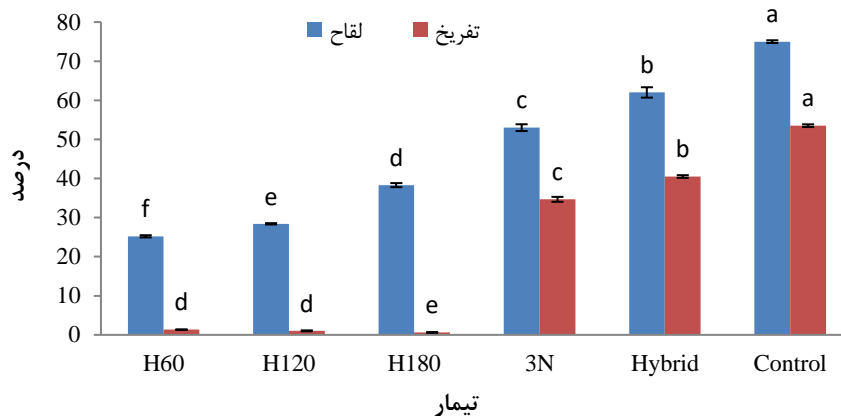
به منظور بررسی دقیق‌تر تاثیر زمان قرارگیری در معرض پرتوی UV بر روی اسپرم تاس‌ماهی ایرانی، ترکیب اسپرم در معرض UV قرار داده شده با مقداری از تخمک تاس‌ماهی سیبری صورت گرفت (آزمایش‌های باروری) و



شکل ۱: مقایسه تیمارهای اسپرم UV داده شده با شاهد تاس‌ماهی ایرانی بر اساس درصد تحرک در زمان های مشخص (میانگین \pm انحراف معیار)

جدول ۵: شاخص‌های مورد بررسی در اسپرم تازه مولد تاس‌ماهی ایرانی

شاخص	اسپرم تازه تاس‌ماهی ایرانی
درصد تحرک	۶۷ \pm ۵
زمان تحرک (ثانیه)	۳۱۸ \pm ۱۱
pH	۸/۰۳
اسمولالیته (اسمول در کیلوگرم)	۱۵۲
حجم (میلی لیتر)	۱۲۰
تراکم (اسپرم در میلی لیتر)	$۱/۵۶ \times ۱۰^۹$
اسپرما توکریت (درصد)	۱۳/۳۳



شکل ۲: مقایسه تیمارهای مختلف هاپلوئید با شاهد بر اساس درصد نرولاسیون تخم و میزان تفریح آن (میانگین \pm انحراف معیار). حروف متفاوت روی نمودار نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در هر شاخص است ($P < 0.05$): H60: قرارگیری اسپرم به مدت ۶۰ ثانیه تحت تابش پرتوی UV؛ H120: قرارگیری اسپرم به مدت ۱۲۰ ثانیه تحت تابش پرتوی UV؛ H180: قرارگیری اسپرم به مدت ۱۸۰ ثانیه تحت تابش پرتوی UV؛ 3N: تریپلوئید؛ Hybrid: دورگه شاهد بین تاس‌ماهی سیبری ماده و تاس‌ماهی ایرانی نر (بدون پرتودهی اسپرم).

تیمارهای G_{60} ، G_{120} و G_{180} به ترتیب $19/8 \pm 0/46$ و $12/1 \pm 0/7$ ، $5/48 \pm 0/8$ درصد تعیین شد. تمامی تیمارها با یکدیگر و با گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بودند ($P < 0.05$). میانگین درصد تفریح در تیمار تریپلوئید $34/66 \pm 0/63$ درصد بود که با تیمار دورگه شاهد اختلاف معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). شکل ۳ بیانگر درصد لقاح و تفریح تخم در تاس‌ماهی سیبری در تیمارهای متفاوت است.

موفقیت شوک سرمایی ۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه و شروع شوک‌دهی در ۱۰

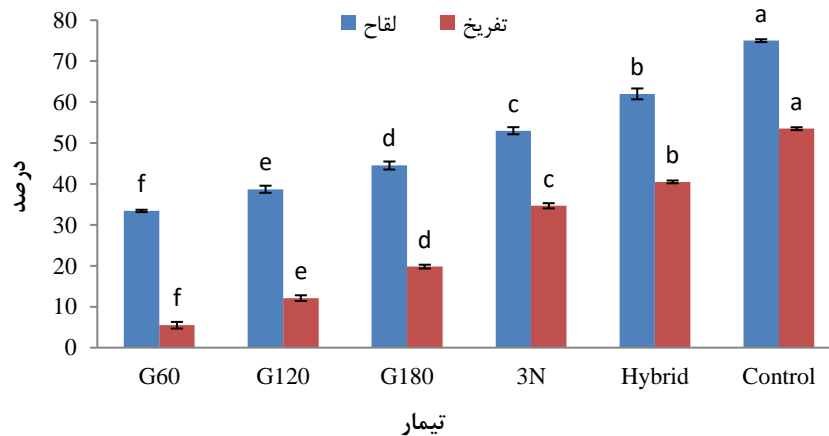
میانگین درصد لقاح در تیمار دورگه شاهد $62 \pm 1/32$ درصد بود که این میزان در تیمارهای G_{60} ، G_{120} و G_{180} به ترتیب $33/4 \pm 0/28$ ، $38/7 \pm 0/86$ و $44/5 \pm 0/98$ درصد تعیین شد. تمامی تیمارها با یکدیگر و با دورگه شاهد دارای تفاوت معنی‌داری بودند ($P < 0.05$). میانگین درصد لقاح در تیمار تریپلوئید $53 \pm 0/86$ درصد بود که با تیمار دورگه شاهد اختلاف معنی‌داری داشت ($P < 0.05$; شکل ۳).

میانگین درصد تفریح در گروه دورگه شاهد $40/5 \pm 0/34$ درصد بود که این میزان در

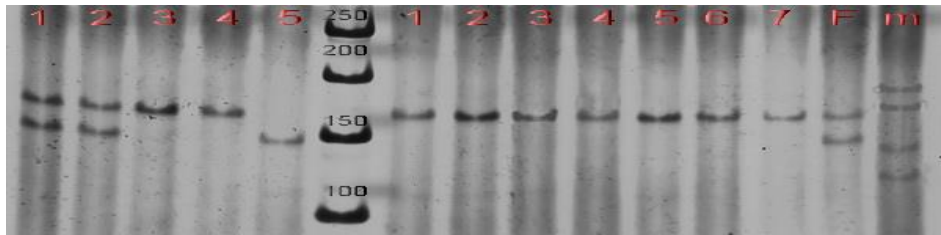
آزمایش توانایی لقاح و تفریح، بهترین مدت زمان قرارگیری اسپرم در معرض پرتوی UV، ۱۸۰ ثانیه با شدت ۴۷۳ میکرووات بر سانتی‌متر مربع یا مقدار ۸۵۱۴ ژول بر متر مربع بود.

نتایج بررسی نشانگرهای ریزماهوره نشان داد که ال‌های به دست آمده در فرزندان صرفاً از مولد مادری هستند و در تمامی نتایج گاینوژنیک هیچگونه مشارکت ژنتیکی از ژنوم پدری وجود ندارد (شکل ۴). همچنین جدول ۶ الگوی الی مشاهده شده در نشانگرهای مورد استفاده را نشان می‌دهد.

دقیقه بعد از لقاح در تیمارهای گاینوژن و تریپلوئید نشان دهنده تاثیر مثبت رعایت الگوی القای شوک سرمایی بر فرآیند دیپلوئیدسازی است. همچنین گروه دورگه شاهد، تیماری بود که به عنوان شاهد تلاقی بین گونه‌ای در تاس‌ماهی سیبری ماده و تاس‌ماهی ایرانی نر (هترولوگ) در نظر گرفته شد که میزان موفقیت لقاح را در آمیزش این دو گونه نشان می‌دهد. بر اساس نتایج مشخص شد که با تلفیق چندین روش در سنجش اسپرم قرار گرفته در معرض پرتوی UV شامل درصد تحرک اسپرم،



شکل ۳: مقایسه میزان لقاح و تفریح تخم در گروه شاهد و تیمارهای گاینوژنیک، 3N (تریپلوئید) و دورگه در تاس‌ماهی سیبری (میانگین \pm انحراف معیار). حروف متفاوت روی نمودار نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در هر شاخص است ($P < 0.05$). G60: فرزندان گاینوژن با اسپرم پرتو داده شده به مدت ۶۰ ثانیه؛ G120: فرزندان گاینوژن با اسپرم پرتو داده شده به مدت ۱۲۰ ثانیه؛ G180: فرزندان گاینوژن با اسپرم پرتو داده شده به مدت ۱۸۰ ثانیه؛ 3N: تریپلوئید؛ Hybrid: دورگه شاهد بین تاس‌ماهی سیبری ماده و تاس‌ماهی ایرانی نر (بدون پرتو دهی اسپرم).



شکل ۴: الگوی بانندی در نتاج گاینوژنیک و مولد مادری (تاس‌ماهی سیبری؛ F) و مقایسه آن با مولد پدری (تاس‌ماهی ایرانی؛ m) با استفاده از نشانگر ریزماهواره Afug-9

جدول ۶: ژنوتیپ‌های مشاهده شده از نشانگرهای ریزماهواره در نتاج گاینوژنیک تاس‌ماهی سیبری

نشانگر	ال‌های مشاهده شده (bp)	
	ماده (تاس‌ماهی سیبری)	نر (تاس‌ماهی ایرانی)
<i>Afu-68</i>	۱۴۰/۱۴۰	۱۶۵/۱۶۰/۱۲۵/۱۲۰
<i>Afug-9</i>	۱۶۵/۱۴۵	۱۹۰/۱۷۵/۱۴۰/۱۲۵
	۱۴۵/۱۴۵	
	۱۶۵/۱۶۵	
<i>Afug-63</i>	۱۸۵/۱۷۰	۱۵۰/۱۴۰/۱۱۵/۱۰۲
	۱۷۰/۱۷۰	
	۱۸۵/۱۸۵	
<i>Afug-112</i>	۲۶۵/۲۲۵	۲۸۵/۲۴۰/۲۰۰/۱۹۰
	۲۲۵/۲۲۵	
	۲۶۵/۲۶۵	
<i>Afug-122</i>	۸۷۵/۶۳۰	۵۸۵/۴۸۵
	۶۳۰/۶۳۰	
	۸۷۵/۸۷۵	
<i>Afug-195</i>	۱۷۵/۱۷۵	۲۶۰/۲۳۰/۱۸۵/۱۸۵

بحث

همکاران (۲۰۱۴a,b) توصیه اکید کرده‌اند که به منظور جذب بهینه UV توسط اسپرم، از شدت‌ها و رقت‌های مختص هر گونه استفاده شود. یکی از شاخص‌های مهم در اسپرم قبل از تابش پرتو، تراکم بهینه و بعد از تابش پرتو، حرکت مستقیم آن است. اگر تراکم اسپرم یا غلظت آن بیشتر از مقدار بهینه باشد، ممکن است که پرتوی UV نتواند به اسپرم‌های قرار گرفته در لایه‌های پایینی نفوذ کند که در این هنگام اسپرم پرتو دیده حتی در بالاترین شدت پرتو حاوی اسپرماتوزوا در لایه‌های پایین است که دارای جذب پایینی از UV است (Lebeda et al., 2014a,b). اگر تراکم اسپرم یا غلظت آن کمتر از مقدار بهینه باشد، افزایش چشمگیری در شکستگی DNA اسپرم ایجاد می‌شود که به دنبال آن منجر به کاهش چشمگیر تحرک اسپرم می‌شود و ممکن نیست که چنین اسپرمی مناسب برای ماده‌زایی باشد (Dietrich et al., 2005).

اگر کیفیت اولیه اسپرم تازه تاس‌ماهی ایرانی مورد استفاده در این مطالعه را در حد متوسط در نظر گرفته شود، مقایسه میزان تحرک اسپرم در هر دو گروه شاهد و پرتو داده شده، سیر نزولی داشت که این کاهش تحرک در اسپرم پرتو داده شده به مراتب بیشتر از اسپرم شاهد

به منظور القای ماده‌زایی می‌توان از اسپرم غیرفعال ژنتیکی همسان و یا غیرهمسان استفاده کرد ولی در تاس‌ماهیان که در نقطه بحرانی انقراض قرار دارند، استفاده از اسپرم غیرهمسان غیرفعال شده به دلیل کمبود اسپرم همسان توصیه می‌شود. همچنان که Meng و همکاران (۲۰۱۶) توصیه کردند که در صورت پایین بودن کمیت و کیفیت اسپرم همسان، می‌توان از اسپرم غیرفعال ژنتیکی غیرهمسان استفاده کرد. در صورتی که از اسپرم غیرهمسان غیرفعال شده ژنتیکی برای القای ماده‌زایی استفاده شود، بروز صفات ظاهری در نتاج این اجازه را می‌دهد که فرزندان گاینوژنیک از غیرگاینوژنیک یا دورگه‌ها قابل تشخیص باشند (Cabrita et al., 2008; Lebeda et al., 2018).

در بررسی حاضر، همانند بیشتر مطالعات القای ماده‌زایی در تاس‌ماهیان، از اسپرم با غلظت ۱۰ درصد برای جذب بهینه UV استفاده شد (Van Eenennaam et al., 1996; Fopp-Bayat et al., 2007; Hassanzadeh et al., 2014; Saber et al., 2008). اگرچه در اسپرم تاس‌ماهیان، عامل غلظت کمتر مورد توجه قرار گرفته بود ولی Lebeda و

بود. به نظر می‌رسد که کیفیت اسپرم بر حسب نوع گونه و شرایط فیزیولوژیک، به شدت تابعی از زمان باشد و هرچه اسپرم به مدت طولانی‌تری در خارج بدن ماهی نگهداری شود، دچار افت تدریجی کیفیت و به دنبال آن کاهش تحرک می‌شود. از طرفی کیفیت و میزان تحرک اسپرم دریافتی از جنس نر نیز مهم است. اما علت اصلی کاهش تحرک در اسپرم UV داده شده، تاثیر پرتو بر روی کل حجم اسپرماتوزوا است که نه تنها DNA اسپرم را تخریب می‌کند، بلکه سیستم تحرک و یا آکروزوم را به خوبی از بین می‌برد (Lebeda et al., 2014a,b). Xu و همکاران (۲۰۰۷) در ماهی کراکر زرد (*Pseudosciaena crocea*) به این نتیجه اشاره کردند که با افزایش شدت و مدت تابش پرتوی UV، تحرک اسپرم نیز کاهش می‌یابد.

در این بررسی، افزایش میزان تحرک در مدت زمان ۱۸۰ ثانیه قرارگیری اسپرم در معرض پرتو نسبت به دیگر مدت‌های تابش پرتو، سبب شد که این مدت زمان به عنوان بهترین زمان تابش پرتو مدنظر قرار گیرد. چنین حالتی که در آن میزان بازماندگی ابتدا کاهش و سپس افزایش و بعد به تدریج کاهش می‌یابد تا به صفر برسد، علاوه بر مطالعه حاضر در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (Chourrout, 1980; Dorafshan et al.,)

در مطالعه کنونی، از شدت بالای پرتوی UV استفاده شد زیرا استفاده از شدت بالاتر پرتو به مدت کوتاه‌تر، مفیدتر از پرتو با شدت کمتر و با مدت طولانی‌تر است و از طرفی اثرات منفی تاثیر دمایی نور، کمتر رخ می‌دهد. اگر اسپرم بعد از قرارگیری در معرض پرتوی UV، در مقابل نور مرئی قرار گیرد، فعالیت آنزیم‌های شبیه فتولیز می‌توانند آسیب‌های ایجاد شده ناشی از نور UV را در DNA از بین ببرند (Ijiri and Egami,)

به نظر می‌رسد که کیفیت اسپرم بر حسب نوع گونه و شرایط فیزیولوژیک، به شدت تابعی از زمان باشد و هرچه اسپرم به مدت طولانی‌تری در خارج بدن ماهی نگهداری شود، دچار افت تدریجی کیفیت و به دنبال آن کاهش تحرک می‌شود. از طرفی کیفیت و میزان تحرک اسپرم دریافتی از جنس نر نیز مهم است. اما علت اصلی کاهش تحرک در اسپرم UV داده شده، تاثیر پرتو بر روی کل حجم اسپرماتوزوا است که نه تنها DNA اسپرم را تخریب می‌کند، بلکه سیستم تحرک و یا آکروزوم را به خوبی از بین می‌برد (Lebeda et al., 2014a,b). Xu و همکاران (۲۰۰۷) در ماهی کراکر زرد (*Pseudosciaena crocea*) به این نتیجه اشاره کردند که با افزایش شدت و مدت تابش پرتوی UV، تحرک اسپرم نیز کاهش می‌یابد.

- 2006)، آزادماهی چام (*Oncorhynchus keta*) (Onozato, 1982)، باس دریایی (Felip et al.,) (*Dicentrarchus labrax*) (Fopp-Bayat and Ocalewicz, 2015) 2001)، ماهی توربوت (*Scophthalmus maximus*) (Piferrer et al., 2004) و کراکر زرد بزرگ (Xu et al., 2007) نیز مشاهده شد. نتایج به دست آمده از بالاترین میزان لقاح و کمترین میزان تفریح تخم در تیمارهای هاپلوئید تاس‌ماهی سبیری نشان می‌دهد که بهترین زمان قرارگیری اسپرم هترولوگ در معرض پرتوی UV مدت ۱۸۰ ثانیه است. Omoto و همکاران در سال ۲۰۰۵ اظهار داشتند که تعداد کم لارو تفریح شده در تیمار هاپلوئید نشان دهنده عدم توانایی تاثیر اسپرم UV داده شده بر فعالیت تخم است. تعداد کم لارو به وجود آمده در تیمارهای هاپلوئید مطالعه حاضر دارای سندرم هاپلوئیدی بودند که در همان ابتدای زندگی از بین رفتند. این سندرم هاپلوئیدی همچنین در تاس‌ماهی سفید *Acipenser transmontanus* (Van Eenennaam et al., 1996)، بستر (دورگه فیل‌ماهی *Huso huso* × *huso*) استرلیاد (Fopp- (Omoto et al., 2005) (♂) (Bayat et al., 2007)، ازون‌برون (*Acipenser stellatus*) (Hassanzadeh Saber et al., 2008)، شیپ (*Acipenser nudiventris*) (Saber et al., 2014)، استرلیاد آلبینو (Fopp-Bayat and Ocalewicz, 2015) ایجاد شده بود. Pan و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه‌ای بر روی گونه‌ای از گربه‌ماهی، اثر هرتویگ را مشاهده کردند و لاروهای تفریح شده آنها در بعضی از تیمارها قبل از تغذیه فعال از بین رفتند. Olaniyi و Omitogun (۲۰۱۴) اظهار داشتند که صفر شدن میزان بازماندگی در گروه‌های هاپلوئید، نشان دهنده غیرفعال شدن ژنتیکی موثر اسپرماتوزوا است. بنابراین در بررسی حاضر، شدت ۴۷۳ میکرووات بر سانتی متر مربع به مدت ۱۸۰ ثانیه نشان دهنده شدت و مدت مناسب پرتودهی UV بر روی اسپرم غیرهمسان (تاسماهی ایرانی) است. بر خلاف تیمار هاپلوئید، افزایش میزان تفریح لارو در تیمار گاینوزن دیپلوئید (G₁₈₀) ثابت کرد که شوک فیزیکی سرما در احتباس جسم دوم قطبی در این گونه تاثیر مثبت داشت، به طوری که در تیمار تریپلوئید، میزان لقاح و میزان خروج لارو نیز بالا بود که با آزمایش‌های Hassanzadeh Saber و همکاران (۲۰۰۸) و Saber و همکاران (۲۰۱۴) تشابه دارد. ماده‌زایی و به طور کلی دستکاری‌های کروموزومی در تاس‌ماهیان محدودیت‌هایی دارد.

ماده‌زایی می‌تواند ضریب فعالیت را اصلاح کند. میزان لقاح بالاتر نیز زمانی که اسپرماتوزوا از یک گونه مرتبط باشد مشاهده شده است (Yuandong et al., 2006, 2007). یکی از دلایل افزایش بازماندگی در بررسی حاضر شاید به علت استفاده از اسپرم غیرهمسان گونه مرتبط باشد.

استفاده از نشانگرهای ریزماهوره به عنوان مناسب‌ترین شیوه برای تایید نتاج گاینوزنیک و نحوه وراثت‌پذیری ژنوم والدین و فرزندان (Fopp-Bayat, 2008) به دلیل فراوانی آنها، هم‌بارز بودن، انتقال‌پذیری مناسب و چندشکلی بالای آنها در جانوران است (Ma et al., 2018). نشانگرهای ریزماهوره در اثبات ماده‌زایی در بعضی از گونه‌های تاس‌ماهیان مانند تاس‌ماهی کوتاه پوزه (*Acipenser brevirostrum*) (Flynn et al., 2006)، پارو پوزه آمریکایی (Mims et al., 2011) (*Polyodon spathula*) (Zou et al., 1997) و با استفاده از اسپرم فیل‌ماهی (Grunina et al., 2011)، شیپ (Saber et al., 2014) و استرلیاد (حسن‌زاده صابر و همکاران، ۱۳۹۸) موفقیت‌آمیز بود. در مطالعه کنونی از شش نشانگر ریزماهوره تاس‌ماهی دریاچه‌ای استفاده

تعداد کم مولدین تاس‌ماهیان، بلوغ جنسی دیر هنگام و از همه مهم‌تر بازماندگی کم تاس‌ماهیان ایجاد شده از طریق دستکاری‌های کروموزومی محدودیت‌های مورد اشاره هستند (Fopp-Bayat et al., 2017). از طرفی، القای ماده‌زایی میزان مرگ و میر را افزایش می‌دهد، زیرا این مرگ و میر با شدت هموزیگوسیتی و هم القای شوک در طی مراحل اولیه تکاملی مرتبط است (Felip et al., 1999; Fopp-Bayat and Grunina, 2015). (Ocalewicz, 2015) و همکاران (۲۰۱۱) علت پایین بودن بازماندگی نتاج گاینوزنیک را افزایش هموزیگوسیتی آنها و اثر مخرب تاثیرات احتباس جسم دوم قطبی در هنگام تقسیم دوم میوز دانستند. Xiao و همکاران (۲۰۱۱) و Michalik و همکاران (۲۰۱۵) اظهار کرده‌اند که کاهش بازماندگی می‌تواند دو دلیل داشته باشد. اول اسپرماتوزوای استفاده شده برای فعال کردن تخمک باید به وسیله پرتوی UV غیرفعال شود که ممکن است این اسپرم قدرت مناسبی برای لقاح نداشته باشد. دوم این که تخم نیاز به شوک حرارتی دارد تا دومین گویچه قطبی را در خود نگه دارد که این شوک می‌تواند سبب آسیب رساندن به تخم‌ها و کاهش میزان تفریح شود. انتخاب اسپرم مناسب از یک گونه غیرهمسان به منظور القای

الگوی الی مشابه با مولد مادری (تاس‌ماهی سیبری) بودند و به صورت دی‌سومیک ظاهر شدند.

در مجموع، بهترین شرایط برای تخریب DNA اسپرم تاس‌ماهی ایرانی با پرتوی UV در مطالعه حاضر مدت زمان ۱۸۰ ثانیه و با شدت ۴۷۳ میکرووات بر سانتی‌متر مربع یا مقدار ۸۵۱۴ ژول بر متر مربع بر اساس بررسی درصد تحرک اسپرم، درصد لقاح و میزان خروج لارو بود. برای القای ماده‌زایی در تخم‌های هاپلوئید تاس‌ماهی سیبری، شوک سرمایی ۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه، ۱۰ دقیقه بعد از فعالیت مناسب بود. در نتیجه القای ماده‌زایی توانست در دیپلوئیدسازی نتاج با وراثت مادری موثر باشد همچنان که نشانگرهای مولکولی آن را اثبات کردند. با دستیابی به زی‌فن اسپرم غیرفعال شده ژنتیکی، این پژوهش می‌تواند اسپرم هترولوگ (غیرهمسان) تاس‌ماهی ایرانی را علاوه بر امکان جلوگیری از خطر انقراض و حفاظت، به منظور القای ماده‌زایی و تولید جنس ماده در توسعه آبی‌پروری تاس‌ماهیان معرفی کند.

شد که همگی وراثت مادری را در نتاج گاینوژنیک نشان دادند.

در این مطالعه بر اساس نشانگرهای ریزماهواره مورد استفاده، فرزندان گاینوژنیک، وراثت الی مادری را نشان دادند و در هیچ کدام از آنها وراثت پدری به چشم نمی‌خورد که نشان دهنده تاثیر مناسب پرتوی UV بر اسپرم و غیرفعال شدن ژنتیکی آن و دیپلوئیدسازی تخم‌های هاپلوئید با استفاده از شوک سرمایی است. همچنان که Fopp-Bayat و Ocalewicz (۲۰۱۵) به این موضوع اشاره کرده اند. در نشانگرهای یاد شده الگوی ال‌ها در تاس‌ماهی سیبری (مولد مادری) و فرزندان گاینوژنیک حالت دی‌سومیک را نشان داد. تاس‌ماهی سیبری دارای $2n=246\pm 10$ کروموزوم (Vasilyev et al., 1980) و همچنین تاس‌ماهی ایرانی دارای $2n=246\pm 10$ کروموزوم (Fontana, 1994; Fontana et al., 1997) و همچنین تاس‌ماهی ایرانی دارای $2n=246\pm 10$ کروموزوم (Nowruzfashkhami et al., 2000) است. بر خلاف Ludwig و همکاران (۲۰۰۱) که الگوهای الی تتراسومیک را در گونه‌هایی با تقریباً ۲۵۰ کروموزوم گزارش کردند، تمامی نتاج گاینوژنیک به دست آمده، دارای

منابع

- گاینوژن. فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، ۷(۴): ۱۳۵-۱۰۵.
- کهنه‌شهری م. و آذری تاکامی ق. ۱۳۵۳. تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری. انتشارات دانشگاه تهران. ۲۸۱ص.
- Billard R., Cosson J. and Crim L.W. 1993.** Motility of fresh and aged halibut sperm. *Aquatic Living Resources*, 6(1): 67-75.
- Cabrita E., Robles V. and Herraez P. 2008.** *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. CRC Press, USA. 574P.
- Chebanov M. and Billard R. 2001.** The culture of sturgeons in Russia: Production of juveniles for stocking and meat for human consumption. *Aquatic Living Resources*, 14(6): 375-381.
- Chen S.L., Ji X.S., Shao C.W., Li W.L., Yang J.F., Liang Z., Liao X.L., Xu G.B., Xu Y. and Song W.T. 2012.** Induction of mitogynogenetic diploids and identification of WW super-female using sex-specific SSR markers in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Marine Biotechnology*, 14(1): 120-128.
- Chourrout D. 1980.** Thermal induction of diploid gynogenesis and triploidy in the eggs of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Reproduction Nutrition Developpement*, 20(3): 727-733.
- Dan C., Mei J., Wang D. and Gui J.F. 2013.** Genetic differentiation and efficient sex-specific marker development of a pair of Y- and X-linked markers in yellow catfish. *International Journal of Biological Sciences*, 9(10): 1043-1049.
- Dietrich G.J., Szpyrka A., Wojtczak M., Dobosz S., Goryczko K. and Ciereszko A. 2005.** Effects of UV irradiation and hydrogen peroxide on DNA fragmentation, motility and fertilizing ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology*, 64(8): 1809-1822.
- Dorafshan S., Kalbassi M.R., Pourkazemi M. and Mojazi Amiri B. 2006.** Optimization of UV irradiation for production of gynogenetic rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: Emphasizing Hertwig effect and photo-reactivation. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 6(1): 19-34.
- حسن‌زاده صابر م.، ذوالقرنین ح.، سالاری علی آبادی م.ع.، یزدانی ساداتی م.ع. و یارمحمدی م. ۱۳۹۸. ایجاد جنس نر تاس ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) با به کارگیری اسپرم هترولوگ غیرفعال در القای

- 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(1-4): 265–278.
- Duplinsky P.D. 1982.** Sperm motility of northern pike and chain pickerel at various pH values. Transactions of the American Fisheries Society, 111(6): 768–771.
- Felip A., Piferrer F., Carrillo M. and Zanuy S. 1999.** The relationship between the effects of UV light and thermal shock on gametes and the viability of early developmental stages in a marine teleost fish, the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Heredity, 83(4): 387–397.
- Felip A., Zanuy S., Carrillo M. and Piferrer F. 2001.** Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. Genetica, 111(1-3): 175–195.
- Flynn S.R., Matsuoka M., Reith M., Martin-Robichaud D.J. and Benfey T.J. 2006.** Gynogenesis and sex determination in shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum* Lesuere. Aquaculture, 253(1-4): 721–727.
- Fontana F. 1994.** Chromosomal nucleolar organizer regions in four sturgeon species as markers of karyotype evolution in Acipenseriformes (Pisces). Genome, 37(5): 888–892.
- Fontana F., Rossi R., Lanfredi M., Arlati G. and Bronzi P. 1997.** Cytogenetic characterization of cell lines from three sturgeon species. Caryologia, 50(1): 91–95.
- Fopp-Bayat D. 2008.** Inheritance of microsatellite loci in polyploid Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt) based on uniparental haploids. Aquaculture Research, 39(16): 1787–1792.
- Fopp-Bayat D. 2018.** Genome manipulation and sex control in the Siberian sturgeon: An updated synthesis with regard to objectives, constraints and findings. P: 327–336. In: Williot P., Nonnotte G. and Chebanov M. (Eds.). The Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869), Vol. 2: Farming. Springer, Cham, Switzerland.
- Fopp-Bayat D. and Ocalewicz K. 2015.** Activation of the albino sterlet *Acipenser ruthenus* eggs by UV-irradiated bester hybrid spermatozoa to provide gynogenetic progeny. Reproduction in Domestic Animals, 50(4): 554–559.
- Fopp-Bayat D., Hliwa P. and Ocalewicz K. 2018.** Presence of gynogenetic males suggests a female heterogamety in sterlet *Acipenser ruthenus* L. Animal Reproduction Science, 189: 110–118.

- Fopp-Bayat D., Kolman R. and Woznicki P. 2007.** Induction of meiotic gynogenesis in sterlet (*Acipenser ruthenus*) using UV-irradiated baster sperm. *Aquaculture*, 264(1-4): 54–58.
- Fopp-Bayat D., Ocalewicz K., Kucinski M., Jankun M. and Laczynska B. 2017.** Disturbances in the ploidy level in the gynogenetic sterlet *Acipenser ruthenus*. *Journal of Applied Genetics*, 58(3): 373–380.
- Grunina A.S., Skoblina M.N., Recoubratsky A.V., Kovalev K.V., Barmintseva A.E. and Goncharov B.F. 2011.** Obtaining gynogenetic progeny of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) using eggs matured and ovulated in vitro. *Journal of Applied Ichthyology*, 27(2): 701–705.
- Hassanzadeh Saber M., Noveiri S.B., Pourkazemi M. and Yarmohammadi M. 2008.** Induction of gynogenesis in stellate sturgeon (*Acipenser stellatus* Pallas, 1771) and its verification using microsatellite markers. *Aquaculture Research*, 39(14): 1483–1487.
- Hillis D.M. and Moritz C. 1990.** *Molecular Taxonomy*. Sinauer Associates Inc. Publishers, USA. 588P.
- Hurvitz A., Jackson K., Degani G. and Levavi-Sivan B. 2007.** Use of endoscopy for gender and ovarian stage determinations in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) grown in aquaculture. *Aquaculture*, 270(1-4): 158–166.
- Ijiri K.I. and Egami N. 1980.** Hertwig effect caused by UV-irradiation of sperm of *Oryzias latipes* (teleost) and its photoreactivation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 69(2): 241–248.
- Ji X.S., Tian Y.S., Yang J.F., Wu P.F., Jiang Y.L. and Chen S.L. 2010.** Artificial gynogenesis in *Cynoglossus semilaevis* with homologous sperm and its verification using microsatellite markers. *Aquaculture Research*, 41(6): 913–920.
- Lebeda I., Gazo I. and Flajshans M. 2014a.** Chemical induction of haploid gynogenesis in sterlet *Acipenser ruthenus*. *Czech Journal of Animal Science*, 59: 310–318.
- Lebeda I., Rodina M. and Flajshans M. 2014b.** Optimization of sperm irradiation protocol for induced gynogenesis in Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. *Aquaculture International*, 22(2): 485–495.
- Lebeda I., Steinbach C. and Flajshans M. 2018.** Flow cytometry for assessing the efficacy of interspecific gynogenesis induction in sturgeon. *Journal of Fish Biology*, 92(6): 1819–1831.

- Levanduski M.J. and Cloud J.G. 1988.** Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen: Effect of non-motile sperm on fertility. *Aquaculture*, 75(1-2): 171–179.
- Linhart O., Mims S.D., Gomelsky B., Hiott A.E., Shelton W.L., Cosson J., Rodina M. and Gela D. 2000.** Spermiation of paddlefish (*Polyodon spathula*, Acipenseriformes) stimulated with injection of LHRH analogue and carp pituitary powder. *Aquatic Living Resources*, 13(6): 455–460.
- Ludwig A., Belfiore N.M., Pitra C., Svirsky V. and Jenneckens I. 2001.** Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). *Genetics*, 158(3): 1203–1215.
- Ma H.Y., Chen S.L. and Ji X.S. 2018.** Sex-specific markers, gynogenesis, and sex control in spotted halibut. P: 631–643. In: Wang H.P., Piferrer F., Chen S.L. and Shen Z.G. (Eds.). *Sex Control in Aquaculture*, Vol. 2. John Wiley and Sons, USA.
- May B., Krueger C.C. and Kincaid H.L. 1997.** Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon: Primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54(7): 1542–1547.
- Meng Z., Liu X., Liu B., Hu P., Jia Y., Yang Z., Zhang H., Liu X. and Lei J. 2016.** Induction of mitotic gynogenesis in turbot *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture*, 451: 429–435.
- Michalik O., Dobosz S., Zalewski T., Sapota M. and Ocalewicz K. 2015.** Induction of gynogenetic and androgenetic haploid and doubled haploid development in the brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus 1758). *Reproduction in Domestic Animals*, 50(2): 256–262.
- Mims S.D., Shelton W.L., Linhart O. and Wang C. 1997.** Induced meiotic gynogenesis of paddlefish *Polyodon spathula*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 28(4): 334–343.
- Mims S.D., Shelton W.L., Linhart O., Wang C., Gomelsky B. and Onders R.J. 2005.** Application of a temperature-dependent mitotic interval (τ_0) for induction of diploid meiotic gynogenetic paddlefish. *North American Journal of Aquaculture*, 67(4): 340–343.
- Moan J. and Peak M.J. 1989.** Effects of UV radiation on cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology (B)*, 4(1): 21–34.
- Nowruzfashkhami M.R., Pourkazemi M. and Baradarannoveiri S. 2000.** Chromosome study of Persian sturgeon *Acipenser*

- persicus* B. Cytologia, 65: 197–202.
- Ohta H., Shimma H. and Hirose K. 1995.** Relationship between fertility and motility of cryopreserved spermatozoa of the amago salmon *Oncorhynchus masou ishikawae*. Fisheries Science, 61(5): 886–887.
- Olaniyi W.A. and Omitogun O.G. 2014.** Monosex fish production in fisheries management and its potentials for catfish aquaculture in Nigeria. P: 301–312. In: Behnassi M., Syomiti Muteng'e M., Ramachandran G. and Shelat K. (Eds.). Vulnerability of Agriculture, Water and Fisheries to Climate Change. Springer, Netherlands.
- Omoto N., Maebayashi M., Adachi S., Arai K. and Yamauchi K. 2005.** Sex ratios of triploids and gynogenetic diploids induced in the hybrid sturgeon, the bester (*Huso huso* female × *Acipenser ruthenus* male). Aquaculture, 245(1-4): 39–47.
- Onozato H. 1982.** The "Hertwig effect" and gynogenesis in chum salmon *Oncorhynchus keta* eggs fertilized with (60) Co gamma-ray irradiated milt (In Japanese with English summary). Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 48: 1237–1244.
- Pan Z.J., Zhu C.K., Wang H., Chang G.L., Ding H.Y., Qiang X.G. and Yu X.S. 2017.** Induction of meiotic gynogenesis in bagrid catfish (*Pseudobagrus ussuriensis*) with homologous sperm and its confirmation for female homogamety. Aquaculture Research, 48(11): 5659–5665.
- Pandian T.J. 2011.** Sex Determination in Fish. CRC Press, USA. 294P.
- Piferrer F., Cal R.M., Gomez C., Alvarez-Blazquez B., Castro J. and Martinez P. 2004.** 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(1-4): 403–419.
- Pourkazemi M. 1996.** Molecular and biochemical genetic analysis of sturgeon stocks from the South Caspian Sea. Ph.D. Thesis, Swansea University, Wales. 260P.
- Recoubratsky A.V., Grunina A.S., Barmintsev V.A., Golovanova T.S., Chudinov O.S., Abramova A.B., Panchenko N.S. and Kupchenko S.A. 2003.** Meiotic gynogenesis in the stellate and Russian sturgeons and sterlet. Russian Journal of Developmental Biology, 34(2): 92–101.
- Ruban G. and Mugue N. 2022.** *Acipenser baerii*. The IUCN Red List of Threatened Species 2022: Retrieved December 11, 2022,

- from <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2022-1.RLTS.T244A156718817.en>.
- Saber M.H. and Hallajian A. 2014.** Study of sex determination system in ship sturgeon, *Acipenser nudiventris* using meiotic gynogenesis. *Aquaculture International*, 22(1): 273–279.
- Saber M.H., Noveiri S.B., Pourkazemi M., Yazdani M., Ghoroghi A., Bahmani M., Pourdehghani M., Chakmehdouz F., Yarmohammadi M. and Nowruzfashkhami M. 2014.** Induction of meiotic gynogenesis in ship sturgeon *Acipenser nudiventris* using UV-irradiated heterologous sperm. *Journal of Applied Genetics*, 55(2): 223–229.
- Sinha R.P. and Hader D.P. 2002.** UV-induced DNA damage and repair: A review. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 1(4): 225–236.
- Van Eenennaam A.L., Van Eenennaam J.P., Medrano J.F. and Doroshov S.I. 1999.** Brief communication. Evidence of female heterogametic genetic sex determination in white sturgeon. *Journal of Heredity*, 90(1): 231–233.
- Van Eenennaam A.L., Van Eenennaam J.P., Medrano J.F. and Doroshov S.I. 1996.** Rapid verification of meiotic gynogenesis and polyploidy in white sturgeon (*Acipenser transmontanus* Richardson). *Aquaculture*, 147(3-4): 177–189.
- Vasilyev V.P., Sokolov L.I. and Serebryakova Y.V. 1980.** Karyotypes of the Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*, of the Lena river and some aspects of karyotype evolution in *Acipenseriformes*. *Journal of Ichthyology*, 20(6): 37–45.
- Welsh A.B., Blumberg M. and May B. 2003.** Identification of microsatellite loci in lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, and their variability in green sturgeon, *A. medirostris*. *Molecular Ecology Notes*, 3(1): 47–55.
- Williot P., Arlati G., Chebanov M., Gulyas T., Kasimov R., Kirschbaum F., Patriche N., Pavlovskaya L.P., Poliakova L., Pourkazemi M. and Kim Y. 2002.** Status and management of Eurasian sturgeon: An overview. *International Review of Hydrobiology*, 87(5-6): 483–506.
- Wuertz S., Guralp H., Psenicka M. and Chebanov M. 2018.** Sex determination in sturgeon. P: 645–668. In: Wang H.P., Piferrer F., Chen S.L. and Shen Z.G. (Eds.). *Sex Control in Aquaculture*, Vol. 2. John Wiley and Sons, USA.
- Xiao J., Zou T.M., Chen L., Liu S.J., Zhang H., Long Y., Yan J.P., Zhao R.R., Tao M., Zhang C. and You C.P. 2011.** Microsatellite

analysis of different ploidy offspring of artificial gynogenesis in *Cyprinus carpio*. *Journal of Fish Biology*, 78(1): 150–165.

Xu J.H., You F., Yan B.L. and Zhang P.J. 2007. Effects of ultraviolet irradiation on sperm motility and diploid gynogenesis induction in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) undergoing cold shock. *Aquaculture International*, 15(5): 371–382.

Yuandong S., Min T., Shaojun L., Chun Z., Wei D., Jiamin S., Jing W., Chen Z., Yu L. and Yun L. 2007. Induction of gynogenesis in red crucian carp using spermatozoa

of blunt snout bream. *Progress in Natural Science*, 17(2): 163–167.

Yuandong S.U.N., Zhang C., Shaojun L.I.U., Min T.A.O., Chen Z.E.N.G. and Yun L.I.U. 2006. Induction of gynogenesis in Japanese crucian carp (*Carassius cuvieri*). *Acta Genetica Sinica*, 33(5): 405–412.

Zou Y.C., Wei Q.W. and Pan G.B. 2011. Induction of meiotic gynogenesis in paddlefish (*Polyodon spathula*) and its confirmation using microsatellite markers. *Journal of Applied Ichthyology*, 27(2): 496–500.



Research Paper

**Interspecific gynogenesis induction in Siberian sturgeon
(*Acipenser baerii*) using heterologous sperm**

Mohammad Hassanzadeh Saber^{1*}, Shahrouz Baradaran Noveiri², Mohammad Pourkazemi³, Mahtab Yarmohammadi⁴, Houshang Yeganeh Rastekenari⁵, Jalil Jalilpour Roudkoli⁶

Received: October 2021

Accepted: December 2021

Abstract

Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) grows rapidly in breeding ponds. Gynogenesis is a suitable technique for producing sturgeon female sex. The aim of this study was to establish female sex in Siberian sturgeon using induction of gynogenesis. The sperm of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) was genetically inactivated by UV radiation at a dose of 8514 J/m². In this case, sperm with 40% motility were combined with Siberian sturgeon oocytes and in 2°C cold shock for 30 minutes, 10 minutes after activity, gynogenic progeny were created. Fertilization rate was 44.5% (control hybrid 62%) and hatching rate was 19.8% (control hybrid 40.5%). Purely maternal heritability in gynogenic progeny was confirmed using microsatellite markers. By achieving the biotechnique of sperm production with inactivated DNA of Persian sturgeon, it is possible to prevent the risk of extinction and protect other sturgeon by inducing gynogenesis.

Key words: *Siberian Sturgeon, Persian Sturgeon, Gynogenesis, Heterologous Sperm.*

1- Scientific Member in Genetics and Biotechnology Department, International Sturgeon Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

2- Assistant Professor in Genetics and Biotechnology Department, International Sturgeon Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

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

4- Associate Professor in Genetics and Biotechnology Department, International Sturgeon Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

5- M.Sc. in Fisheries, Aquaculture Department, International Sturgeon Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

6- M.Sc. in Fisheries, Health and Disease Department, International Sturgeon Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

*Corresponding Author: saber.merag@gmail.com