

مقاله پژوهشی

ایجاد جنس نر تاسماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) با به کارگیری اسپرم
هترولوگ غیرفعال در القای گاینوژنز

محمد حسن زاده صابر^۱، حسین ذولقرنین^{۲*}، محمد علی سالاری علی آبادی^۳،
محمد علی یزدانی ساداتی^۴، مهتاب یارمحمدی^۵

تاریخ پذیرش: آبان ۹۷

تاریخ دریافت: مرداد ۹۷

چکیده

تاسماهی استرلیاد در تقسیم‌بندی IUCN در دسته گونه‌های آسیب‌پذیر قرار گرفته است که جنس نر آن در غالب مراکز تکثیر و بازسازی ذخایر کشور دچار کمبود یا فقدان است. این مطالعه با هدف ایجاد جنس نر تاسماهی استرلیاد با استفاده از القای گاینوژنز و اسپرم هترولوگ، صورت گرفت. برای این منظور، اسپرم هترولوگ تاسماهی سیبری در معرض اشعه UV با شدت ۴۷۳ میکرووات بر سانتی‌متر مربع و مدت زمان ۹۰ ثانیه قرار گرفت و تخریب DNA اسپرم با موفقیت انجام شد. ترکیب این اسپرم با تخمک تاسماهی استرلیاد و قرارگیری تخم لقاح یافته در معرض شوک گرمایی ۳۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، ۱۵ دقیقه بعد از فعالیت، نتاج گاینوژن تاسماهی استرلیاد را ایجاد کرد. سپس با استفاده از مارک‌های میکروساتلایت (*Afu-68* و *Afug-195*) وراثت‌پذیری فرزندان از والد صرفاً مادری تایید شد. ماهیان به دست آمده به مدت ۱۷ ماه نگهداری شدند. سپس با استفاده از بیوپسی، تکه‌ای از گناد اولیه آن‌ها خارج و بافت آن بررسی شد. بررسی‌ها نشان داد که ۷۶/۶ درصد نتاج گاینوژن ماده و ۲۳/۳ درصد آن‌ها نر بودند. با توجه به سیستم تعیین جنسیت هتروگامتی ماده در تاسماهی استرلیاد، می‌توان با القای گاینوژنز و اسپرم هترولوگ غیرفعال ژنتیکی، هر دو جنس نر و ماده را به صورت خالص ایجاد کرد.

واژگان کلیدی: تاسماهی استرلیاد، گاینوژنز، اسپرم هترولوگ، ایجاد جنس نر.

- ۱- دانشجوی دکتری زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.
- ۲- استاد گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.
- ۳- دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.
- ۴- دانشیار گروه تکثیر و پرورش، موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج جهاد کشاورزی، رشت، ایران.
- ۵- استادیار گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج جهاد کشاورزی، رشت، ایران.

* نویسنده مسئول: zolgharnein@kmsu.ac.ir

مقدمه

تاس‌ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) کوچک‌ترین گونه از خانواده تاس‌ماهیان است که در آب‌های مصبی منتهی به دریای خزر زیست می‌کند. این گونه در شرایط پرورشی در سن تقریباً ۳-۶ سالگی به بلوغ جنسی می‌رسد که در بین سایر تاس‌ماهیان سریع‌ترین سن بلوغ را دارد (Fopp-Bayat and Ocalewicz, 2015). این ماهی یک گونه با ارزش در آبی‌پروری است که گوشت آن بخشی از پروتئین مورد نیاز انسان را تامین می‌کند و خاویار آن می‌تواند سود ارزی مناسبی را برای کشور ایجاد کند. همچنین از این گونه به منظور دورگه‌گیری با انواع دیگر ماهیان خاویاری مانند تاس‌ماهی سبیری (*Acipenser baerii*)، تاس‌ماهی روسی (*A. gueldenstaedtii*) و تاس‌ماهی اروپایی (*A. studio*) استفاده زیادی می‌شود (برادران نویری، ۱۳۸۰؛ Urbani et al., 2004) به همین خاطر صید ماهیان نر استرلیاد، به ویژه به منظور دورگه‌گیری با فیل‌ماهی (*Huso huso*) و تولید دورگه بستر، تکثیر طبیعی این ماهی را در بسیاری از زیستگاه‌های اصلی آن به مخاطره جدی انداخته است (نظری و همکاران، ۱۳۸۵؛

یکی از اصلی‌ترین مشکلات که در تاس‌ماهی استرلیاد (همانند سایر تاس‌ماهیان) وجود دارد، کمبود مولد نر در غالب مراکز بازسازی ذخایر تاس‌ماهیان کشور است که به عدم تکثیر و حفظ این گونه با ارزش منجر می‌شود و احتمال استفاده از اسپرم سایر تاس‌ماهیان به منظور تلقیح تخمک‌های آن را افزایش می‌دهد. دورگه‌گیری سریع‌ترین فعالیت ژنتیکی است که جمعیت‌های در معرض خطر را تهدید می‌کند (Wolf et al., 2001). بنابراین احتمال تشکیل دورگه در این گونه

تاس‌ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) کوچک‌ترین گونه از خانواده تاس‌ماهیان است که در آب‌های مصبی منتهی به دریای خزر زیست می‌کند. این گونه در شرایط پرورشی در سن تقریباً ۳-۶ سالگی به بلوغ جنسی می‌رسد که در بین سایر تاس‌ماهیان سریع‌ترین سن بلوغ را دارد (Fopp-Bayat and Ocalewicz, 2015). این ماهی یک گونه با ارزش در آبی‌پروری است که گوشت آن بخشی از پروتئین مورد نیاز انسان را تامین می‌کند و خاویار آن می‌تواند سود ارزی مناسبی را برای کشور ایجاد کند. همچنین از این گونه به منظور دورگه‌گیری با انواع دیگر ماهیان خاویاری مانند تاس‌ماهی سبیری (*Acipenser baerii*)، تاس‌ماهی روسی (*A. gueldenstaedtii*) و تاس‌ماهی اروپایی (*A. studio*) استفاده زیادی می‌شود (برادران نویری، ۱۳۸۰؛ Urbani et al., 2004) به همین خاطر صید ماهیان نر استرلیاد، به ویژه به منظور دورگه‌گیری با فیل‌ماهی (*Huso huso*) و تولید دورگه بستر، تکثیر طبیعی این ماهی را در بسیاری از زیستگاه‌های اصلی آن به مخاطره جدی انداخته است (نظری و همکاران، ۱۳۸۵؛

می‌تواند به زودی منتج به نابودی کامل آن شود. گاینوژنز وضعیتی است که یک تخمک، بدون تاثیر ژنتیکی جنس نر تکامل می‌یابد. به عبارت دیگر، گاینوژنز یک روش تولیدمثل است که در آن فرزندان، منحصرآ اطلاعات ژنتیکی مادر را به ارث می‌برند (Donaldson and Devlin, 1996; Arai, 2001). این حالت در تعداد کمی از گونه‌های ماهیان به طور طبیعی رخ می‌دهد و می‌تواند در ماهیان پرورشی به منظور آمیزش خویشاوندی سریع القا شود (Purdom, 1969; Thorgaard, 1983). این روش در واقع یک نوع تکثیر بکرزایی (Parthenogenesis) محسوب می‌شود و فعال کردن روند تکاملی سلول تخم از طریق اسپرمی است که از لحاظ ژنتیکی غیرفعال شده است. زمانی که القای گاینوژنز آغاز می‌شود، تخمک‌ها معمولا با اسپرم هومولوگ (همان گونه) غیرفعال شده با اشعه فرابنفش (UV) تحریک می‌شوند. در بعضی موارد ممکن است که تکامل تخم با اسپرم سالم یا اشعه دیده هترولوگ (از یک گونه متفاوت) صورت پذیرد (Peruzzi and Chatain, 2000). مزایای استفاده از اسپرم هترولوگ در آزمایش‌های القای گاینوژنز، کاهش امکان

آلودگی جزئی مربوط به استفاده از اسپرم هومولوگ اشعه دیده (Varadaraj, 1990) و یا عدم فعالیت مجدد در نور (Photoreactivation) است (Ijiri and Egami, 1980). از طرفی، استفاده از اسپرم هترولوگ UV داده شده این امکان را فراهم می‌سازد که اگر اشعه به میزان کافی در اسپرم نفوذ نکند و DNA اسپرم تخریب نشود، یا دوره‌ای تشکیل نمی‌شود (Peruzzi et al., 1993) و یا در صورت تولید دوره‌گه، فنوتیپ آن‌ها با گونه مادری و پدری متفاوت است. دستکاری ژنوم شامل گاینوژنز (ماده‌زایی) و آندروژنز (نر‌زایی) در گونه‌های شدیداً در حال انقراض در جمعیت‌های وحشی می‌تواند به احیا و بازسازی جمعیت آن گونه‌ها منجر شود (Omoto et al., 2005; Komen and Thorgaard, 2007; Grunina et al., 2011; Zou et al., 2011; Hassanzadeh Saber et al., 2014; Nowosad et al., 2015). همچنین گاینوژنز می‌تواند مکانیزم سیستم تعیین جنسیت را مشخص کند که در بسیاری از گونه‌های تاس‌ماهیان به صورت هتروگامتی ماده (ZW) است (Van Eenennaam et al., 1999; Omoto et al., 2005; Flynn et al., 2006; Fopp-Bayat, 2010; Hassanzadeh Saber and Mims, 2014). فقط و همکاران

با استفاده از گاینوژنز می‌توان جمعیت‌های تخم‌ریز بومی در تاس‌ماهی ژاپنی (ساخالین، *Acipenser mikadoi*) که منقرض شده است را با در اختیار داشتن تنها یک مولد ماده احیا کرد.

هدف از این بررسی ایجاد جنس نر تاس‌ماهی استرلیاد با به کارگیری اسپرم هترولوگ غیرفعال از تاس‌ماهی سیبری در القای گاینوژنز است تا بتوان از این گونه تهدید شده حفاظت به عمل آورد و از پیشروی آن از مرحله آسیب‌پذیر به مرحله انقراض جلوگیری کرد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

این بررسی در فروردین سال ۱۳۹۵ در بخش تکثیر و بازسازی ذخایر موسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر انجام پذیرفت. یک جفت مولد نر و ماده تاس‌ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) با کیفیت مناسب و دو مولد نر تاس‌ماهی سیبری (*Acipenser baerii*) به عنوان تامین‌کننده اسپرم هترولوگ انتخاب شد تا با کیفیت‌ترین اسپرم‌های یکی از دو مولد تاس‌ماهی سیبری نر برای تکثیر و قرارگیری در معرض

(۱۹۹۷) اعلام کرده بودند که مکانیزم سیستم تعیین جنسیت در گونه پاروپوزه (*Polyodon spathula*) هموگامتی ماده است ولی ۱۵ سال بعد در تکرار دیگری از این آزمایش اظهار شد که گونه مذکور نیز هتروگامتی ماده است (Shelton and Mims, 2012). اخیراً Fopp-Bayat و همکاران در سال ۲۰۱۸ اظهار کردند که تاس‌ماهی استرلیاد نیز دارای سیستم تعیین جنسیت هتروگامتی ماده است. بنابراین امکان احیای تاس‌ماهیان با این سیستم تعیین جنسیت، به وسیله القای گاینوژنز وجود دارد. یعنی با داشتن فقط یک جنس ماده از گونه در حال انقراض، هر دو جنس نر و ماده خالص در آن‌ها تشکیل می‌شود. برای این کار اسپرم هترولوگ با استفاده از اشعه، غیرفعال ژنتیکی شده، با تخمک طبیعی از گونه تهدید شده آمیزش می‌یابد و تخم‌ها پلوئید ایجاد می‌شود. بلافاصله فرآیند دیپلوئیدسازی با استفاده از شوک‌های حرارتی و احتباس دومین گویچه قطبی می‌تواند هر کدام از هسته Z یا W مربوط به گویچه دوم قطبی را در کنار هسته Z یا W تخمک قرار دهد که بدین طریق هم ماده‌های WW و ZW و هم نر ZZ ایجاد می‌شود (Devlin and Nagahama, 2002). Omoto و همکاران (۲۰۰۴) عنوان کردند که

UV بدون تحرک باقی می‌مانند. از آنجایی که غلظت اسپرم دریافتی از تاس ماهی سیبری $10^9 \times 1/56$ عدد در میلی‌لیتر بود و برای تاباندن اشعه UV نیاز به اسپرم رقیق شده است، بنابراین $0/9$ میلی‌لیتر از مایع سمینال با $0/1$ میلی لیتر از اسپرم استوک (۱۰ درصد) در داخل ظرف پتری با قطر $3/2$ سانتی‌متر و به عمق ۱ میلی‌متر ریخته شد. ضخامت کم محلول اسپرم سبب می‌شود تا تاثیر اشعه UV بر روی آن بیشتر باشد. به منظور جلوگیری از کم شدن تحرک ناشی از گرمای حاصل از تابش اشعه به اسپرم، پتری حاوی اسپرم بر روی محلول آب و یخ قرار گرفت. همچنین به منظور جلوگیری از فعالیت مجدد اسپرم اشعه دیده در نور (Photoreactivation) بلافاصله اسپرم‌های UV داده شده و استوک در ظروف تیره ریخته شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تخریب DNA در اسپرم با تابش اشعه UV

در این بررسی از لامپ UV مدل UVG-54 با طول موج کوتاه ۲۵۴ نانومتر (UVP، آمریکا) استفاده شد. در هنگام اشعه دهی، منبع نوری و پتری حاوی اسپرم بر روی یک شیکر (شیمی‌فن، ایران) اوربیتالی با سرعت ۹۰ دور

اشعه انتخاب شود. این مولدین به صورت زنده به منظور دریافت تخمک و اسپرماتوزوآ با حداقل استرس در استخرهای کورانسکی نگهداری شدند. برای رسیدگی جنسی مولد ماده با توجه به درجه حرارت آب از هورمون GnRH (ثامن، ایران) به میزان ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در دو مرحله که در مرحله اول ۲۰ درصد و بعد از ۶ ساعت، باقیمانده هورمون به مولد ماده استرلیاد در داخل عضله پشتی تزریق شد. برای تاس‌ماهیان سیبری و استرلیاد نر تزریق GnRH در یک مرحله (همزمان با تزریق دوم مولد ماده) به میزان ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم صورت گرفت. سپس اسپرم و تخمک به ترتیب از مولدین نر و ماده استحصال شد (پوردهقانی و همکاران، ۱۳۸۹).

تهیه مایع سمینال و رقیق‌سازی اسپرم

به میزان ۴۰ میلی‌لیتر اسپرم از تاس‌ماهی سیبری دریافت شد. از ۳۰ میلی‌لیتر اسپرم دریافت شده، مایع سمینال با استفاده از سانتریفوژ (Hettich، آلمان) با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه جدا شد. از مایع سمینال برای رقیق‌سازی اسپرم استفاده شد، زیرا اسپرم‌ها در مایع سمینال هیچ گونه تحرکی ندارند و در طی مدت تاباندن اشعه

تعداد لارو تفریخ شده مورد ارزیابی قرار گرفت و با اسپرم شاهد مقایسه شد.

بررسی میزان تحرک اسپرم

برای بررسی میزان تحرک اسپرم، ۱۰ میکرولیتر از اسپرم هترولوگ با ۵۰۰ میکرولیتر محلول فعال کننده (آب) مخلوط شد (Aramli et al., 2015) و میزان درصد تحرک اسپرم‌ها در زمان‌های صفر، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ ثانیه در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت.

عملیات لقاح و شوک گرمایی

پس از استحصال تخمک از تاس‌ماهی استرلیاد، هر تیمار اسپرم با ۹ میلی‌لیتر آب ترکیب و بلافاصله به تخمک اضافه شد. تیمارهای آزمایشی مورد استفاده در این بررسی در مجموع ۱۳ تیمار بود، شامل: الف) ۵ تیمار گاینوژنتیک (لقاح اسپرم‌های اشعه دیده تاس‌ماهی سبیری (تیمارهای G_{30} ، G_{60} ، G_{90} ، G_{120} و G_{150}) با تخمک سالم تاس‌ماهی استرلیاد به همراه شوک گرمایی به منظور دیپلوئیدسازی؛ ب) ۱ تیمار هیبرید تریپلوئید (لقاح اسپرم سالم تاس‌ماهی سبیری با تخمک سالم تاس‌ماهی استرلیاد به همراه شوک

در دقیقه حرکت داده شد تا تابش اشعه بطور تقریباً یکسان بر تمامی اسپرم‌ها صورت گیرد. فاصله منبع UV با اسپرم رقیق شده با مایع سمینال ۱۲ سانتی‌متر بود. شدت تابش اشعه UV در فاصله مذکور ۴۷۳ میکرووات بر سانتی‌متر مربع ثبت شد (اندازه‌گیری شده در سازمان انرژی اتمی ایران). شدت موثر UV بر اساس روش Hassanzadeh Saber و همکاران (۲۰۰۸) تعیین شد. سپس پتری‌های حاوی اسپرم رقیق شده در فواصل زمانی مختلف ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ ثانیه (G_{30} ، G_{60} ، G_{90} ، G_{120} و G_{150}) در معرض تابش UV قرار داده شدند و پس از هر شدت اشعه یک نمونه اسپرم اشعه دیده شده با یک نمونه اسپرم شاهد (اسپرم سالم تاس‌ماهی سبیری) برای ارزیابی میزان تحرک (Motility) اسپرم به طور همزمان در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت و سپس منحنی کاهش تحرک اسپرم‌های اشعه دیده در مقایسه با اسپرم‌های شاهد رسم شد.

پس از آماده‌سازی اسپرم‌های اشعه دیده با تیمارهای مختلف، اسپرم‌های هر تیمار با ۱۰ گرم از تخمک تاس‌ماهی استرلیاد (۹۰ عدد در هر گرم) ترکیب و میزان لقاح (محاسبه در مرحله نورولاسیون یا تشکیل طناب عصبی) و

پرورش لارو و بچه ماهی

لاروهای استحصالی پس از شمارش به بخش پرورش موسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر منتقل و در وان‌های فایبرگلاس نیم تنی با تراکم استاندارد پرورش داده شدند. 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 کنسانتره (بیومار، فرانسه) آغاز شد و تا پایان آزمایش ادامه داشت. مدت زمان نگهداری ماهیان تا سن ۱۸ ماهگی بود.

ارزیابی ژنتیکی

در این پژوهش استخراج DNA به روش Hillis و Moritz (۱۹۹۰) که برای ماهیان خاوباری توسط Pourkazemi (۱۹۹۶) کمی تغییر یافت، صورت پذیرفت. برای تایید گاینوژنز در تاس‌ماهی استرلیاد، از مارکرهای مولکولی میکروساتلایت (Microsatellite) طراحی شده برای تاس‌ماهی دریاچه‌ای (May et al., 1997; Welsh et al., 2003) استفاده شد (جدول ۱). در این بررسی دو جفت آغازگر (مارکر) *Afu-68* و *Afu-195* که اختصاصاً برای تاس‌ماهی دریاچه‌ای (*Acipenser fulvescens*) طراحی شده بود، استفاده شد.

گرمایی؛ ج) ۵ تیمار هاپلوئید (لقاح اسپرم اشعه دیده تاس‌ماهی سیبری (تیمارهای G_{30} ، G_{60} ، G_{90} ، G_{120} و G_{150}) با تخمک سالم تاس‌ماهی استرلیاد بدون شوک گرمایی؛ د) ۱ تیمار هیبرید دیپلوئید (لقاح اسپرم سالم تاس‌ماهی سیبری با تخمک سالم تاس‌ماهی استرلیاد؛ ه) ۱ تیمار شاهد (لقاح اسپرم با تخمک سالم تاس‌ماهی استرلیاد).

به منظور احتباس جسم دوم قطبی در زمان تقسیم دوم میوز در ۱۵ دقیقه بعد از عمل لقاح (افزودن آب به مخلوط تخمک و اسپرم) از شوک گرمایی ۳۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه استفاده شد. برای سهولت در انجام شوک‌های حرارتی سبدهای ویژه‌ای از جنس PVC تهیه شد که یک طرف آن توری با چشمه ریز قرار داشت و عمل هم‌زدن تخم‌ها بر حسب زمان شوک‌دهی، در داخل سبدهای فوق و در داخل وان‌های مخصوص صورت گرفت. سپس تخم‌ها بعد از شستشو (کهنه‌شهری و آذری تا کامی، ۱۳۵۳) به منظور گذراندن مراحل جنینی به انکوباتورهای ویس انتقال یافتند. در تمام این مدت دمای آب سالن انکوباسیون اندازه‌گیری شد. سپس درصد لقاح و درصد تفریح محاسبه شد.

ارزیابی گناد ماهیان استرلیاد گاینوژن به روش
 بافت‌شناسی
 روش بیوپسی استفاده شد (بهمنی و کاظمی،
 ۱۳۷۷).

جدول ۱: مشخصات توالی آغازگرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر

اندازه (bp)	توالی آغازگر	موتیف تکراری	شماره دستیابی در بانک ژن	آغازگر (مارکر)
۱۲۰	F: TTATTGGATGGTGTACCTAAAC R: AGCCCAACACGACAATATC	(GATA)13	U72739	<i>Afu-68</i>
۱۶۵	F: ATTCTCCAGCCGTATTATTA R: AAGCAGTTAGTTTATGTGGTTGTG	(AAAC)7	AF529548	<i>Afu-195</i>

برای بررسی میزان تحرک و قابلیت باروری اسپرم اشعه داده شده در تیمارهای متفاوت و مقایسه آن با گروه شاهد، همچنین مقایسه لقاح، تفریح و بازماندگی در تیمارهای مختلف گاینوژن و مقایسه آن با شاهد از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و پس‌آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0.05$) توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۰، استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شدند. نمودارها نیز با استفاده از برنامه Microsoft Excel 2010 رسم شدند.

نتایج

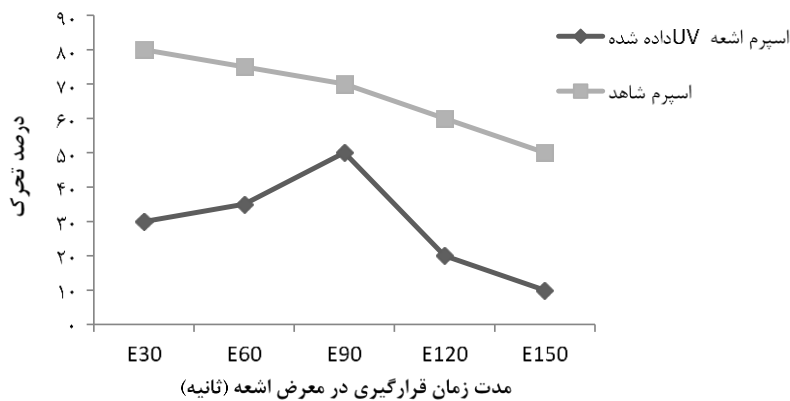
درصد تحرک اسپرم قبل و بعد از تابش UV

برای بیوپسی، ابتدا ماهیان مورد مطالعه بیهوش شدند. سپس در ناحیه بین چهارمین و پنجمین صفحه استخوانی شکمی از سمت دم به طرف سر، شکافی به طول ۳ تا ۴ سانتی‌متر ایجاد و قطعه کوچکی از بافت گناد (به ضخامت چند میلی‌متر و به وسعت کمتر از یک سانتی‌متر) از حفره شکمی خارج شد. آزمایش تعیین جنسیت در ماهیان ژینوژن با استفاده از بیوپسی در سن ۱۷ ماهگی انجام شد و تعداد ۳۰ ماهی ژینوژن استرلیاد مورد مطالعات بافت‌شناختی قرار گرفت. برای تعیین جنسیت و مراحل رسیدگی جنسی، برش‌های بافتی با روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین تهیه شد (بهمنی و کاظمی، ۱۳۷۷).

تجزیه و تحلیل آماری

حرکت درجا ارزیابی شد. درصد تحرک اسپرم در تیمارهای قرار گرفته در معرض UV برای تاس ماهی سیبری نر دوم به ترتیب ۳۰، ۳۵، ۵۰، ۲۰ و ۱۰ بود و اسپرم‌ها در همه تیمارها جهت حرکت رو به جلو داشتند. بر اساس منحنی شبه هرتویگ در شکل ۱، بهترین زمان قرارگیری اسپرم در معرض اشعه UV، در زمان ۹۰ ثانیه ارزیابی شد، زیرا در آن اسپرم‌ها دارای درصد تحرک مناسبی نسبت به گروه شاهد بودند و حرکت رو به جلو داشتند (جدول ۳).

اسپرم تازه مولد نر اول و دوم تاس ماهی سیبری به ترتیب دارای تحرک ۹۰ و ۸۰ درصد در جهت رو به جلو، مدت تحرک ۲۵۰ و ۳۱۸ ثانیه و با تراکم $1/17 \times 10^9$ و $1/56 \times 10^9$ عدد در میلی‌لیتر ارزیابی شد (شکل ۱، جدول ۲). در تیمارهای متفاوت اسپرم UV داده شده، در زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ ثانیه در مولد تاس ماهی سیبری نر اول به ترتیب ۳۰، ۱۰، ۳۰، ۱۰ و ۲۰ درصد و عمدتاً حرکت رو به جلو بود، اما در بعضی از تیمارها بی‌تحرک و با



شکل ۱: مقایسه تیمارهای اسپرم UV داده شده با شاهد بر اساس درصد تحرک در زمان‌های مشخص

جدول ۲: شاخص‌های مورد بررسی در اسپرم شاهد مولدین تاس ماهی سیبری

شاخص	اسپرم تاس ماهی سیبری ۱	اسپرم تاس ماهی سیبری ۲
درصد تحرک	۹۰	۸۰
زمان تحرک (ثانیه)	۲۵۰	۳۱۸
pH	۷/۹۱	۸/۰۳
حجم (میلی‌لیتر)	۷۰	۱۲۰

$1/56 \times 10^9$	$1/17 \times 10^9$	تراکم (میلی‌لیتر)
۱۳/۳۳	۸/۳۳	اسپرماتوکریت (درصد)

جدول ۳: درصد تحرک و نوع حرکت اسپرم تاس‌ماهی سیبری قرارگرفته در معرض اشعه UV و شاهد در زمان‌های مشخص

اسپرم تاس‌ماهی سیبری ۲		اسپرم تاس‌ماهی سیبری ۱		مدت زمان قرارگیری در معرض اشعه (ثانیه)
نوع حرکت	درصد تحرک	نوع حرکت	درصد تحرک	
رو به جلو	۳۰	رو به جلو	۳۰	۳۰
رو به جلو	۳۵	بی‌تحرک	۱۰	۶۰
رو به جلو	۵۰	درجا	۳۰	۹۰
رو به جلو	۲۰	رو به جلو	۱۰	۱۲۰
رو به جلو	۱۰	رو به جلو	۲۰	۱۵۰
رو به جلو	۸۰	رو به جلو	۹۰	شاهد

۱۲۰ و ۱۵۰ ثانیه قرار گرفته بودند، به ترتیب ۳۶/۳، ۳۹/۷، ۵۲/۱، ۲۷/۲ و ۱۲/۱ درصد و در شاهد ۷۰/۷ درصد گزارش شد. میزان لارو تفریخ شده در این تیمارها به ترتیب ۲/۱، ۲، ۱/۱، ۰/۷، ۰ درصد و در شاهد ۶۵/۵ درصد بود (شکل ۲، جدول ۴).

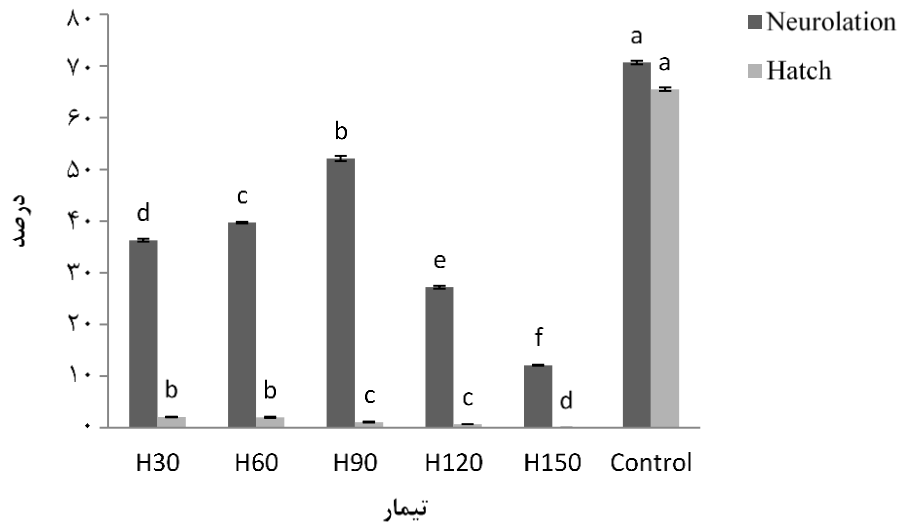
درصد لقاح و تفریخ در تیمارها و تاثیر شوک گرما

میانگین درصد لقاح در تیمار شاهد 70.7 ± 0.6 درصد بود که این میزان در تیمارهای G_{30} ، G_{60} ، G_{90} ، G_{120} و G_{150} به ترتیب 46.0 ± 2.5 ، 51.1 ± 0.5 ، 59.1 ± 5.7

با توجه به درصد تحرک و نوع حرکت اسپرم، تاس‌ماهی سیبری نر دوم به عنوان ماهی نر هترولوگ برای آزمایش انتخاب شد و با توجه به شکل ۱ و جدول ۳، بهترین تیمار زمانی، محاسبه و تعیین شد. به منظور بررسی دقیق‌تر تاثیر زمان قرارگیری در معرض اشعه UV بر روی اسپرم تاس‌ماهی سیبری، ترکیب اسپرم قرار گرفته در معرض اشعه با مقداری از تخمک تاس‌ماهی استرلیاد صورت گرفت و تیمار هاپلوئید به وجود آمد. نتایج نشان داد که درصد لقاح در تیمارهای هاپلوئید به دست آمده از اسپرم‌های تاس‌ماهی سیبری نر که در معرض اشعه در مدت زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۹۰،

با گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بودند (P<۰/۰۵). میزان لقاح در تیمار دورگه ۲۲/۳±۲/۳ درصد بود که با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵؛ جدول ۵، شکل ۳).

تمامی تیمارها با یکدیگر و با شاهد دارای تفاوت معنی‌داری بودند (P<۰/۰۵). میزان لقاح در تیمار تریپلوئید ۶۷/۸±۱/۵ درصد بود که با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). تیمارهای هاپلوئید نیز با یکدیگر و



شکل ۲: مقایسه تیمارهای مختلف هاپلوئید با شاهد بر اساس درصد نورولاسیون تخم و میزان تفریح آن (میانگین ± انحراف معیار)

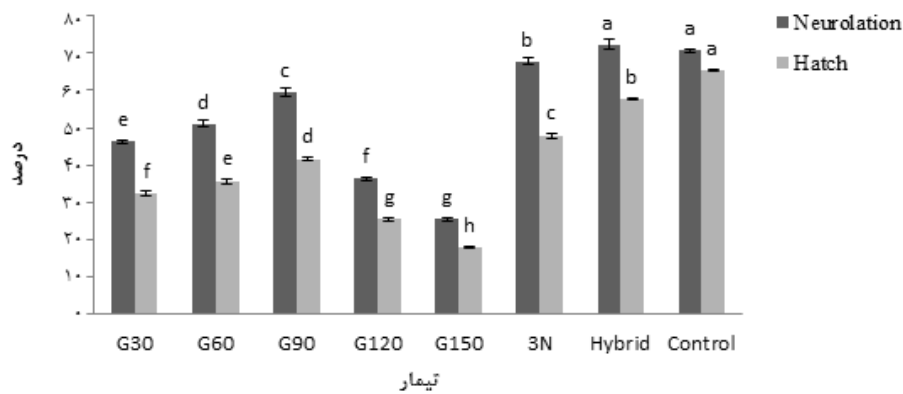
جدول ۴: مقایسه درصد لقاح و تفریح تخم در نمونه‌های هاپلوئید شاهد و اشعه UV داده شده در زمان‌های مشخص (میانگین ± انحراف معیار)

تیمار	زمان تابش اشعه UV (ثانیه)	درصد لقاح	درصد تفریح
H ₃₀	۳۰	۳۶/۳±۰/۵	۲/۱±۰/۱
H ₆₀	۶۰	۳۹/۷±۰/۳	۲±۰/۲
H ₉₀	۹۰	۵۲/۱±۰/۹	۱/۱±۰/۲

۰/۷±۰/۰	۲۷/۲±۰/۵	۱۲۰	H ₁₂₀
۰±۰/۰	۱۲/۱±۰/۲	۱۵۰	H ₁₅₀
۶۵/۵±۰/۶	۷۰/۷±۰/۶	۰	شاهد

جدول ۵: میزان لقاح و تفریح در تیمارهای مختلف در تاس‌ماهی استرلیاد (میانگین ± انحراف معیار)

تیمار	نورولاسیون (درصد)	تفریح (درصد)
G ₃₀	۴۶/۲±۰/۵	۳۲/۴±۱/۴
G ₆₀	۵۱/۰±۱/۵	۳۵/۷±۱/۲
G ₉₀	۵۹/۵±۱/۷	۴۱/۶±۰/۸
G ₁₂₀	۳۶/۳±۰/۸	۲۵/۴±۰/۵
G ₁₅₀	۲۵/۵±۰/۹	۱۷/۸±۰/۲
تری‌پلوئید	۶۷/۸±۱/۵	۴۷/۹±۱/۱
دورگه	۷۲/۳±۲/۳	۵۷/۷±۰/۶
شاهد	۷۰/۷±۰/۶	۶۵/۵±۰/۶



شکل ۳: مقایسه میزان نورولاسیون و تفریح تخم در تیمارهای مختلف در تاس‌ماهی استرلیاد (میانگین ± انحراف معیار)

میزان تفریح لارو در گروه شاهد تیمارهای G₃₀، G₆₀، G₉₀، G₁₂₀ و G₁₅₀ به ترتیب ۶۵/۵±۰/۶ درصد بود که این میزان در ۳۲/۴±۱/۴، ۳۵/۷±۱/۲، ۴۱/۶±۰/۸،

تفریخ لارو در تیمار مذکور به ترتیب $۶۷/۸ \pm ۱/۵$ و $۴۷/۹ \pm ۱/۱$ درصد بود که نشان دهنده تاثیر مثبت رعایت الگوی القای شوک گرمایی بر فرآیند دیپلوئیدسازی است. همچنین میزان لقاح در گروه دورگه به عنوان شاهد تلاقی بین گونه‌ای در تاس ماهی استرلیاد ماده و تاس ماهی سیبری نر (هترولوگ) دارای اختلاف معنی داری با شاهد تاس ماهی استرلیاد نبود ($P > ۰/۰۵$). این دو تیمار دارای اختلاف معنی دار در درصد تفریخ بودند ($P < ۰/۰۵$), ولی نزدیک به گروه شاهد بود که نشان دهنده میزان موفقیت لقاح در آمیزش این دو گونه است.

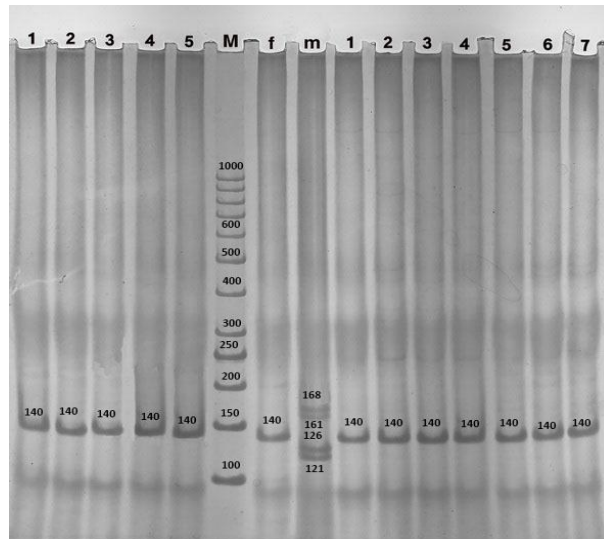
ارزیابی ژنتیکی نتاج گاینوژن و والدین آن‌ها

نتایج به دست آمده از تحلیل مارکر میکروساتلیت *Afu-68* نشان داد که ال‌های به دست آمده در مولد مادری (f یا تاس ماهی استرلیاد) دارای یک ال با وزن مولکولی ۱۴۰ جفت بازی بودند، ولی در ال‌های مولد پدری (تاس ماهی سیبری) دو جفت ال ۱۶۸ و ۱۶۱ جفت بازی و ۱۲۶ و ۱۲۱ جفت بازی مشاهده شد. در تمامی نتاج گاینوژن به دست آمده فقط ال‌های مادری با وزن مولکولی ۱۴۰ جفت بازی به ارث رسید و هیچ گونه مشارکت

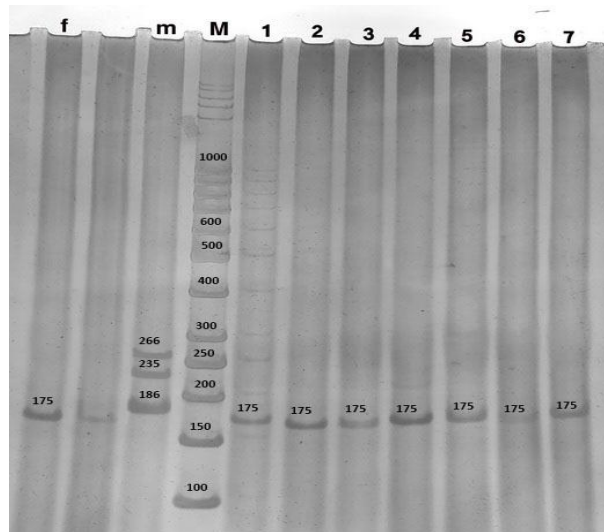
$۲۵/۴ \pm ۰/۵$ و $۱۷/۸ \pm ۰/۲$ درصد بود. تمامی تیمارها با یکدیگر و با گروه شاهد اختلاف معنی دار داشتند ($P < ۰/۰۵$). میزان تفریخ لارو در تیمار تریپلوئید $۴۷/۹ \pm ۱/۱$ درصد بود که با تیمار شاهد اختلاف معنی دار داشت ($P < ۰/۰۵$). در بین تیمارهای هاپلوئید H_{30} , H_{60} و H_{90} اختلاف معنی داری در میزان تفریخ لارو وجود نداشت و همچنین بین تیمارهای هاپلوئید H_{120} و H_{150} ($P > ۰/۰۵$), ولی این دو دسته با یکدیگر و با شاهد دارای اختلاف معنی دار بودند ($P < ۰/۰۵$). میزان تفریخ لارو در تیمار دورگه $۵۷/۷ \pm ۰/۶$ درصد بود که با گروه شاهد دارای اختلاف معنی دار بودند ($P < ۰/۰۵$). جدول ۵ و نمودار ۳ درصد لقاح و تفریخ تخم را در ماهی استرلیاد در تیمارهای متفاوت نشان می‌دهد.

تیمار هاپلوئید (H_{90}) با درصد لقاح متوسط و میزان تفریخ بسیار پایین خود را نشان داد. تعداد لارو باقیمانده در این تیمار دارای سندرم هاپلوئید بودند و به صورت ناقص الخلقه تفریخ شدند که در فاصله کوتاهی پس از تفریخ تلف شدند. موفقیت شوک گرمایی ۳۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و شروع شوک دهی در ۱۵ دقیقه بعد از لقاح در این بررسی در تیمار تریپلوئید نشان داد که میزان لقاح و

ژنتیکی از ژنوم پدری در این نتایج وجود نداشت (شکل ۴).
 در مارکر بررسی شده دیگر (*Afug-195*) که در گروه گاینوژن مطالعه شد، تنها یک لوکوس ۱۷۵ جفت بازی ظاهر شد که مشابه با ژنوم مادری (تاس‌ماهی استرلیاد) بود و ال‌های پدری هیچ نقشی در وراثت فرزندان گاینوژن نداشتند. ال‌های تاس‌ماهی سیبری (مولد پدری) در این مارکر دارای وزن مولکولی ۲۶۶، ۲۳۵ و ۱۸۶ جفت بازی بودند (شکل ۵).



شکل ۴: الگوی باندهای منومورفیک در نتایج گاینوژن (۱-۷) و f مولد مادری (تاس‌ماهی استرلیاد) و مقایسه آن با m مولد پدری (تاس‌ماهی سیبری) با استفاده از نشانگر میکروساتلیت *Afu-68*



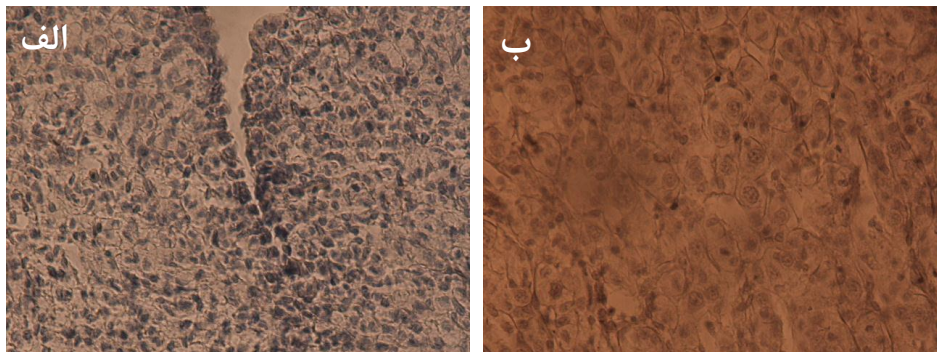
شکل ۵: الگوی بانندی منومورفیک در نتاج گاینوژن (۱-۷) و f مولد مادری (تاس ماهی استرلیاد) و مقایسه آن با m مولد پدری (تاس ماهی سیبری) با استفاده از نشانگر میکروساتلیت *Afug-195* نتایج تعیین جنسیت در ماهیان گاینوژن مطالعه دارای جنسیت نر بودند که از این تعداد ۳ ماهی دارای گنادهایی عمدتاً حاوی کیسه‌های اسپرماتوگونی بودند که همگی در گروه نرها قرار گرفتند (۳/۲۳ درصد؛ شکل ۶).

بحث

در مطالعه کنونی القای گاینوژنز در تاس ماهی استرلیاد (به عنوان گونه در معرض خطر انقراض) با استفاده از اسپرم هترولوگ تاس ماهی سیبری با هدف تولید هر دو جنس نر و ماده انجام شد. تراکم اسپرم مولد نر تاس ماهی سیبری مورد آزمایش $1/56 \times 10^9$ عدد در میلی‌لیتر بود که بسیار کمتر از تراکم اسپرم

نتایج به دست آمده نشان داد که تکامل گنادی به اندازه‌ای نبود که بتوان از طریق لاپراسکوپ ماهیان را تعیین جنسیت کرد. بنابراین ماهیان از طریق بیوپسی نمونه‌برداری شدند و به منظور تعیین جنسیت، بافت‌شناسی از گناد آن‌ها صورت گرفت. تعداد ۳۰ ماهی گاینوژن استرلیاد مورد مطالعه قرار گرفت که از این تعداد ۲۳ ماهی کاملاً ماده بودند. یعنی به طور میانگین ۷۶/۶ درصد نتاج به دست آمده از القای گاینوژن دارای جنسیت ماده و در مرحله یک رسیدگی جنسی قرار داشتند و حاوی اووگونی بودند. تعداد ۷ ماهی از ۳۰ نمونه مورد

تاس‌ماهی سیبری ($10^9 \times 5/6$ در میلی‌لیتر) در مطالعه حسن‌زاده صابر و همکاران (۱۳۹۱) بود.



شکل ۶: بافت گناد ماهیان استرلیاد گاینوژن. الف) ماده؛ ب) نر.

داده شده به مراتب بیشتر از اسپرم شاهد بود. Xu و همکاران (۲۰۰۸) در ماهی کراکر زرد (*Pseudosciaena crocea*) به این نتیجه اشاره کردند که با افزایش شدت و مدت تابش اشعه UV، تحرک اسپرم نیز کاهش می‌یابد. در این مطالعه بالاترین درصد تحرک اسپرم (۵۰ درصد) در زمان ۹۰ ثانیه قرارگیری در معرض اشعه UV ارزیابی شد (Xu et al., 2008) که در مقایسه با مطالعه انجام شده توسط حسن‌زاده صابر و همکاران (۱۳۹۱) تقریباً مشابه بود.

در بعضی از گونه‌ها در زمان بهینه کردن شدت و مدت زمان قرارگیری در معرض اشعه، یک پدیده پارادوکس به نام «اثر هرتویگ» وجود دارد که در آن میزان بازماندگی جنین‌ها

یکی از مولفه‌های مهم در اسپرم بعد از تابش اشعه، کیفیت مناسب اسپرم دریافتی اولیه از مولد نر شامل تحرک مستقیم و تراکم بهینه است. میزان تحرک اسپرم به مولفه‌های مختلفی از جمله کیفیت مولدین نر، رسیدگی جنسی از لحاظ فیزیولوژی و همچنین شرایط حمل، نگهداری و میزان پاسخ‌دهی به تزریق GnRH متناسب با درجه حرارت بستگی دارد (پورکاظمی و همکاران، ۱۳۸۹).

با نگهداری اسپرم UV داده شده در خارج از بدن ماهی و مقایسه آن با شاهد، میزان تحرک اسپرم نشان داد که در هر دو گروه شاهد و اشعه داده شده، این میزان کاهش یافت که این کاهش تحرک در اسپرم اشعه

- Pongthana et al. (1995) (*Puntius gonionotus*)، گربه ماهی (*Ictalurus punctatus*) (Goudie et al., 1995)، باس دریایی (Felip et al., 1999)، فلاندر (*Paralichthys lethostigma*) (Luckenbach et al., 2004) و توربوت (Piferrer et al., 2004) نیز مشاهده شد.
- در این بررسی بالاترین میزان تفریخ در لاروهای هاپلوئید در مدت ۹۰ ثانیه تابش اشعه، ۱/۱ درصد برآورد شد که با افزایش مدت اشعه‌دهی به صفر رسید. Omoto و همکاران در سال ۲۰۰۵ اظهار داشتند که تعداد کم لارو تفریخ شده در تیمار هاپلوئید نشان دهنده عدم توانایی تاثیر اسپرم UV داده شده بر فعالیت تخم است. تعداد کم لارو به جود آمده در تیمارهای هاپلوئید در مطالعه حاضر، دارای سندرم هاپلوئید بودند که در همان ابتدای زندگی از بین رفتند. این سندرم هاپلوئیدی در تاس ماهی سفید (*Acipenser transmontanus*) (Van Eenennaam et al., 1996)، بستر (دورگه فیل ماهی ماده و استرلیاد نر) (Omoto et al., 2005)، استرلیاد و استرلیاد آلبینو (Fopp-Bayat et al., 2007; Fopp-Bayat and Ocalewicz, 2015)، ازون‌برون (*Acipenser stellatus*) با افزایش شدت اشعه و زمان مواجهه، به تدریج کاهش می‌یابد تا به صفر برسد، ولی بعد از آن با افزایش شدت اشعه و مدت مواجهه، یک افزایش در میزان بازماندگی جنین‌ها حاصل می‌شود. چنین اثری در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (Chourrout, 2006; Dorafshan et al., 1980)، آزادماهی چام (*Oncorhynchus keta*) (Onozato, 1982)، باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*) (Felip et al., 2001)، توربوت (*Scophthalmus maximus*) (Piferrer et al., 2004) و کراکر زرد بزرگ (*Pseudosciaena crocea*) (Xu et al., 2008) مشاهده شد که مشابه با مطالعه کنونی بود. نتایج به دست آمده از لقاح و تفریخ تخم هاپلوئید در تاس ماهی استرلیاد نشان می‌دهد که بهترین زمان قرارگیری اسپرم تاس ماهی سیبری در معرض اشعه UV با شدت ۴۷۳ میکرووات بر سانتی‌متر مربع به مدت ۹۰ ثانیه بود که در راستای نتایج به دست آمده از منحنی شبه هرتویگ است.
- با افزایش مدت تابش اشعه UV، درصد لقاح کاهش محسوسی داشت، به طوری که در تابش UV به مدت ۱۵۰ ثانیه درصد لقاح به ۱۲/۱ درصد رسید. این کاهش در بارب نقره‌ای

نشان دهنده شدت و مدت مناسب اشعه‌دهی UV برای تولید ماهیان هاپلوئید و گاینوژن‌های مغلوب بود.

بر خلاف تیمار هاپلوئید، تیمار گاینوژن دیپلوئید (G₉₀) به دست آمده از شوک گرما، در مرحله نورولاسیون ۵۹/۵ درصد لقاح داشت و میزان تفریح در این تیمار ۴۱/۶ درصد بود. این امر نشان دهنده تاثیر مثبت شوک فیزیکی گرما در احتباس جسم دوم قطبی در این گونه است، به طوری که در تیمار تریپلوئید، میزان لقاح در مرحله نورولاسیون ۶۷/۸ درصد و میزان تفریح لارو ۴۷/۹ درصد بود. القای تریپلوئیدی همانند القای گاینوژن، با احتباس دومین گویچه قطبی در تقسیم دوم میوز در تخم لقاح یافته همراه است (Thorgaard, 1983). سه عامل زمان شروع شوک، درجه حرارت یا فشار وارده بر تخم لقاح یافته و مدت شوک‌دهی در بازماندگی و بازده تریپلوئیدی تاثیر دارد. مدت زمان طولانی شوک‌دهی میزان بازماندگی را به طور چشمگیری کاهش می‌دهد و همچنین زمان کوتاه و نامناسب شوک‌دهی نیز نمی‌تواند در احتباس دومین گویچه قطبی و به دنبال آن در القای تریپلوئیدی موثر باشد (Cassani and Caton, 1985). انتخاب نوع شوک در بازده تریپلوئیدی موثر است. تاثیر

(Hassanzadeh Saber et al., 2008)، شیپ (Hassanzadeh) (*Acipenser nudiventris*) (Saber et al., 2014) و در ماهیان دریایی مانند کراکر بزرگ زرد (Xu et al., 2008) و توربوت (Piferrer et al., 2004) نیز ایجاد شده بود. Yamaki و همکاران (۱۹۹۹) و Kashiwagi (۱۹۸۰) عنوان کردند که هاپلوئیدها در طی مراحل تکامل جنینی قبل یا به زودی بعد از تفریح و یا در مراحل اولیه لاروی، قبل از شروع تغذیه می‌میرند. هرچند ممکن است تعداد خیلی کمی از لاروهای هاپلوئید زایا (مانندی) در القای گاینوژن در بعضی از تیلاپها مانند تیلاپای موزامبیک (*Oreochromis mossambicus*) مشاهده شود ولی آن‌ها بدشکلی شدیدی مانند شکستگی دم را نشان دادند و در شنا کردن، تغذیه و فرار از شکارچی ناتوان بودند (Varadaraj, 1993). بعضی از پژوهشگران اظهار داشتند که سندرم هاپلوئیدی می‌تواند به علت عدم جفت شدن ژن‌های طبیعی یا بیان ژن‌های نهفته مزاحم ناشی از آمیزش خویشاوندی با درجه بالا باشد (Xu et al., 2008; Hassanzadeh Saber et al., 2008). در مطالعه حاضر، شدت ۴۷۳ میکرووات بر سانتی‌متر مربع به مدت ۹۰ ثانیه

القای گاینوژنز میزان مرگ و میر را افزایش می‌دهد، زیرا این مرگ و میر مرتبط با شدت هموزیگوسیتی و هم القای شوک در طی مراحل اولیه تکاملی است (Felip et al, 1999; Fopp-Bayat and Ocalewicz, 2015). مطالعات بر چندین گونه از ماهیان نشان داده است که نوزادان گاینوژن بازماندگی کمتری از نمونه‌های شاهد طبیعی داشتند. Suzuki و همکاران (۱۹۸۵) بازماندگی پایینی را در نتاج گاینوژن ماهی لوچ (*Misgurnus anguillicaudatus*) مشاهده کردند و اظهار داشتند که شاید علت آن بیان ژن‌های نهفته مزاحم باشد که ناشی از آمیزش خویشاوندی با درجه بالا است. Xiao و همکاران (۲۰۱۱) اظهار کردند که کاهش بازماندگی می‌تواند دو دلیل داشته باشد. اول، اسپرماتوزوای استفاده شده برای فعال کردن تخمک باید به وسیله اشعه UV غیرفعال شود که ممکن است این اسپرم قدرت مناسبی برای لقاح نداشته باشد. دوم، تخم نیاز به شوک حرارتی دارد تا دومین گویچه قطبی را در خود نگه دارد که می‌تواند سبب آسیب رساندن به تخم‌ها و کاهش میزان تفریخ شود. انتخاب اسپرم مناسب از یک گونه هترولوگ به منظور القای گاینوژنز می‌تواند ضریب فعالیت را اصلاح کند. میزان لقاح بالاتر

مناسب شوک گرمایی به منظور احتباس دومین گویچه قطبی خود گواه مناسبی در تولید گاینوژن دپلوئید در این گونه است که با آزمایش‌های Fopp-Bayat و همکاران (۲۰۰۷) و Fopp-Bayat و Ocalewicz (۲۰۱۵) تشابه دارد.

مهم‌ترین بخش در مطالعات مرتبط با گاینوژنز در ماهیان به جنس ماده بستگی دارد. زیرا لقاح و احتباس دومین گویچه قطبی باید در تخمک صورت گیرد (پورکامی و همکاران، ۱۳۸۹). کیفیت مولدین و شرایط فیزیولوژیکی آن‌ها به ویژه کیفیت و همزمانی رهاسازی تخمک‌ها بسیار حائز اهمیت است. نارس بودن یا فوق رسیده بودن تخمک استحصالی از مولد ماده می‌تواند در بازده تریپلوئیدی و گاینوژنز موثر باشد (Cassani and Caton, 1985; Varadaraj and Panadian, 1990). در مطالعه حاضر به دلیل کم بودن تعداد مولدین ماده مناسب استرلیاد برای تکثیر، تنها از یک مولد ماده استفاده شد که آزمایش‌ها حاکی از این است که شرایط استاندارد برای احتباس جسم دوم قطبی و القای تریپلوئیدی رعایت شده است، ولی میزان لقاح و تفریخ متوسط تخم در گروه شاهد، ناشی از کیفیت مواد تناسلی مولد ماده مورد استفاده است. از طرفی،

نیز زمانی که اسپرماتوزوا از یک گونه هومولوگ باشد مشاهده شده است (Sun et al., 2006). یکی از دلایل افزایش بازماندگی در این بررسی شاید به علت استفاده از اسپرم هتروولوگ گونه نزدیک باشد.

در این بررسی به منظور تایید نتاج گاینوژن در مراحل اولیه زندگی (انگشت‌قندی)، از روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR (روش میکروساتلیت) استفاده شد. مارکرهای میکروساتلیت مناسب‌ترین شیوه برای تایید نتاج گاینوژن و نحوه وراثت‌پذیری ژنوم والدین و فرزندان است (Fopp-Bayat, 2008). این تکنیک به اندازه کافی برای تایید وراثت تک والدینی در ماهیانی که دستکاری ژنوم شده‌اند حساس است زیرا می‌توان دیپلوئیدهای گاینوژنتیک یا آندروژنتیک را از دیپلوئیدهای شاهد تشخیص داد و نمونه‌های گاینوژنتیک میوزی و میتوزی را متمایز کرد (Fopp-Bayat et al., 2007). مارکرهای میکروساتلیت در اثبات گاینوژنز در بعضی از گونه‌های تاس‌ماهیان مانند تاس‌ماهی پوزه کوتاه (*Acipenser brevirostrum*) (Flynn et al., 2006)، پاروپوزه آمریکایی (*Polyodon spathula*) (Zou et al., 2011)، تاس‌ماهی پاروپوزه

(*Scaphirhynchus platyrhynchus*) (Mims et al., 1997)، تاس‌ماهی سبیری با استفاده از اسپرم فیل‌ماهی (Grunina et al., 2011) و تاس‌ماهی شیپ (Hassanzadeh Saber et al., 2014) موفقیت‌آمیز بود. در این بررسی از مارکرهای میکروساتلیت مخصوص تاس‌ماهی دریاچه‌ای (May et al., 1997; Welsh et al., 2003) استفاده شد. همچنان که Fopp-Bayat و همکاران (۲۰۰۷) بعضی از مارکرهای میکروساتلیت تاس‌ماهی دریاچه‌ای را برای تشخیص نتاج گاینوژن در ماهی استرلیاد استفاده کردند. در بررسی آن‌ها، لوکوس *Afu-68* نشان داد که جایگاه ژنی مولد پدری که دارای اسپرم هتروولوگ (دورگه بستر) بود، متفاوت از جایگاه ژنی مولد مادری و نتاج گاینوژن بود (Fopp-Bayat et al., 2007). همچنین Hassanzadeh Saber و همکاران (۲۰۰۸) با استفاده از دیگر مارکرهای میکروساتلیت طراحی شده از تاس‌ماهی دریاچه‌ای توانستند نتاج گاینوژن را در ازون-برون تایید کنند. آن‌ها توانستند با استفاده از دو لوکوس، به متمایز بودن جایگاه ژنی در مولد پدری و مادری پی ببرند و ژنوم نتاج گاینوژن را مشابه با ژنوم والد مادری عنوان کردند (Hassanzadeh Saber et al., 2008).

حالت دیزومی را نشان داد. ولی در تاس ماهی سیبری (مولد پدری) این حالت تترازومی بود. تاس ماهی سیبری با $2n=246 \pm 10$ کروموزوم (Vasiliev et al., 1980; Fontana, 1994;) (Fontana et al., 1997) به صورت تتراپلوئید است و به همین دلیل الگوی باندی آن به صورت تترازومی است. اما تاس ماهی استرلیاد با $2n=116 \pm 4$ کروموزوم (Rab, 1986) به صورت دیپلوئید است و الگوی باندی آن دیزومی است. مطالعه Ludwig و همکاران (۲۰۰۱) الگوی الی دیزومی را در گونه‌هایی با تقریباً ۱۲۰ کروموزوم و الگوهای الی تترازومی را در گونه‌هایی با تقریباً ۲۵۰ کروموزوم گزارش کردند. در مطالعه حاضر، تمامی نتاج گاینوژن به دست آمده، دارای الگوی الی مشابه با مولد مادری (استرلیاد) بودند و به صورت دیزومی ظاهر شدند. مارکرهای میکروساتلیت مورد استفاده در این بررسی نشان دادند که اشعه UV توان غیرفعال‌سازی DNA والد پدری را داشت و ژنوم پدری هیچ گونه مشارکتی در ژنوم فرزندان گاینوژن نداشت. از طرفی این بررسی نشان داد که لاین خالص شبه مادری به طور موفقی در تاس ماهی استرلیاد به دست آمد. همچنان که Xiao و همکاران (۲۰۱۱) Fopp-Bayat (۲۰۱۰) نیز با استفاده از مارکرهای به دست آمده از تاس ماهی دریای ای توانست گاینوژن را در تاس ماهی سیبری اثبات کند. در این بررسی از دو مارکر میکروساتلیت استفاده شد، همچنان که Thorgaard و همکاران (۱۹۸۵) و Fopp-Bayat و Ocalewicz (۲۰۱۵) اظهار کردند که تنها دو یا سه لوکوس برای تایید وراثت مادری کافی است. در این راستا تعدادی از نویسندگان اعلام کردند که فقط مارکرهایی که ال‌های باندی قابل خوانا داشته باشند و به وضوح باندهای اختصاصی ماده را تشخیص دهند، می‌توانند به عنوان مارکرهای تشخیصی در آنالیز نتاج گاینوژن مورد توجه باشند (Flynn et al., 2006; Fopp-Bayat and Woznicki, 2006; Fopp-Bayat, 2007). در مطالعه حاضر بر اساس مارکرهای میکروساتلیت مورد استفاده، فرزندان گاینوژن وراثت الی مادری را نشان دادند و در هیچ کدام از آن‌ها وراثت پدری مشاهده نشد که نشان دهنده تاثیر مناسب اشعه UV بر اسپرم و غیرفعال شدن ژنتیکی آن و دیپلوئیدسازی تخم‌های هاپلوئید با استفاده از شوک گرمایی است. در مارکرهای فوق الگوی باندها در ماهی استرلیاد (مولد مادری) و فرزندان گاینوژن

امکانپذیر است. در مطالعه حاضر سیستم تعیین جنسیت تاس‌ماهی استرلیاد نیز به صورت هتروگامتی ماده معرفی شد بنابراین دستکاری ژنوم این تاس‌ماهی به روش القای گاینوژنز و اسپرم هترولوگ می‌تواند مشکل کمبود جنس نر را در این گونه با ارزش رفع کند.

یکی از بهترین روش‌های تشخیص جنسیت ماهیان، بافت‌شناسی گناد در سن تشکیل گنادهای اولیه است (صدرایی و همکاران، ۱۳۷۸). این سن در تاس‌ماهیان معمولاً از ۲ سالگی آغاز می‌شود (بهمنی و کاظمی، ۱۳۷۷؛ حلاجیان و همکاران، ۱۳۸۶). در این بررسی تعداد ۳۰ ماهی استرلیاد گاینوژنتیک ۱۷ ماهه انتخاب و جنسیت آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. همانند مطالعات قبلی (Fopp-Bayat et al., 2018) نسبت جنسی در ماهی استرلیاد شاهد ۱:۱ بود. در این بررسی از مطالعه بافت‌شناسی گناد ماهیان گاینوژن مشخص شد که ۷۶/۶ درصد از ماهیان تولید شده ماده و تنها ۲۳/۳ درصد آن‌ها نر بودند. تفاوت مطالعه حاضر با مطالعه Fopp-Bayat و همکاران (۲۰۱۸) در میزان نسبت جنسی ماهیان گاینوژن تولید شده بود که در مطالعه آن‌ها تنها ۷ درصد ماهی گاینوژن نر تولید شد

توانستند با استفاده از القای گاینوژنز میوزی در ماهی کپور معمولی به لاین خالص دست یابند. از طریق القای گاینوژنز، الگوی وراثت جنسی در چندین گونه تعیین شده است. الگوی هوموگامتی ماده در تعدادی از ماهیان استخوانی مانند کپور معمولی (Nagy et al., 1978)، کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) (Stanley, 1976)، قزل‌آلای رنگین‌کمان (Thorgaard, 1977) و کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) (Mirza and Shelton, 1988) گزارش شده است. بر عکس، در تاس‌ماهیان این الگو به صورت هتروگامتی ماده است (Van Eenennaam et al., 1999; Omoto et al., 2005; Flynn et al., 2006; Fopp-Bayat, 2010; Shelton and Mims, 2012; Hassanzadeh Saber and Hallajian, 2014; Fopp-Bayat et al., 2018). به علت قرارگیری تاس‌ماهیان در فهرست قرمز IUCN (Gessner et al., 2010) و وجود سیستم جنسیتی هتروگامتی ماده در آن‌ها، القای گاینوژنز می‌تواند آن‌ها را احیا کند (Grunina et al., 2011). اکثر پژوهشگران فوق اذعان دارند که حفاظت از ذخایر وحشی و اصلاح توسعه آبی‌پروری تاس‌ماهیان از طریق تکنیک دستکاری ژنوم

در مطالعه حاضر مشخص شد که اسپرم هترولوگ غیرفعال شده ژنتیکی تاس ماهی سیبری می‌تواند نه تنها در تولید نتاج گاینوژنتیک تاس ماهی استرلیاد، بلکه در سایر تاس ماهیان مفید باشد. با توجه به شناسایی سیستم تعیین جنسیت این گونه به صورت هتروگامتی ماده، امکان تولید نتاج نر خالص وجود دارد و می‌توان نتایج کاربردی این پژوهش را در مراکز اجرایی و بازسازی ذخایر شیلاتی به کار گرفت.

و در مطالعه حاضر این میزان ۲۳/۳ درصد بود. نظریه‌ای که Fopp-Bayat و همکاران (۲۰۱۸) بیان می‌دارند این است که میزان فراوانی تبادل کروموزومی ZZ در نرهای گاینوژن با فراوانی نتاج ماده‌های خالص WW برابر است. بر اساس این نظریه، در مطالعه حاضر، احتمال تولید لاین خالص ماده WW به میزان ۲۳/۳ درصد وجود داشت که این مهم می‌تواند در تولید نتاج تمام ماده ZW در نسل دوم از طریق آمیزش نرهای ZZ طبیعی با ماده‌های خالص WW نتیجه بدهد اگرچه تشخیص آن نیاز به آزمایش‌های بیشتری دارد.

منابع

- برادران نویری ش. ۱۳۸۰. پرورش تاس‌ماهیان. انتشارات حق شناس. ۱۱۵ص.
- بهمنی م. و کاظمی ر. ۱۳۷۷. مطالعه بافت‌شناسی غدد جنسی در تاس‌ماهیان جوان پرورشی. مجله علمی شیلات ایران، ۷(۱): ۱۶-۱.
- پوردهقانی، م.، کاظمی ر. و پورکاظمی م. ۱۳۸۹. تکثیر و پرورش ماهی خاویاری استرلیاد به عنوان ماهی زینتی در ایران. نخستین همایش ماهیان زینتی ایران، تهران.
- پورکاظمی م.، محسنی م.، علیپور ع.ر.، نوروز فشخامی م.ر.، حسن‌زاده صابر م.، برادران نویری ش.، بهمنی م. و رضوانی گیل کلایی س. ۱۳۸۹. ژینوژنیز در تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و فیل‌ماهی (*Huso huso*). گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی، موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۷۰ص.
- حسن‌زاده صابر م.، پورکاظمی م.، بهمنی م.، برادران نویری ش.، نوروزفشخامی م.ر.، کاظمی ر.، چکمه‌دوز قاسمی ف.، یارمحمدی م.، محمدی پرشکوهی ح.، یزدانی م.ع.، پوردهقانی م.، غرق‌آ. و
- برادران نویری ش. ۱۳۸۰. پرورش تاس‌ماهیان. انتشارات حق شناس. ۱۱۵ص.
- بهمنی م. و کاظمی ر. ۱۳۷۷. مطالعه بافت‌شناسی غدد جنسی در تاس‌ماهیان جوان پرورشی. مجله علمی شیلات ایران، ۷(۱): ۱۶-۱.
- پوردهقانی، م.، کاظمی ر. و پورکاظمی م. ۱۳۸۹. تکثیر و پرورش ماهی خاویاری استرلیاد به عنوان ماهی زینتی در ایران. نخستین همایش ماهیان زینتی ایران، تهران.
- پورکاظمی م.، محسنی م.، علیپور ع.ر.، نوروز فشخامی م.ر.، حسن‌زاده صابر م.، برادران نویری ش.، بهمنی م. و رضوانی گیل کلایی س. ۱۳۸۹. ژینوژنیز در تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و فیل‌ماهی (*Huso huso*). گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی، موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۷۰ص.
- حسن‌زاده صابر م.، پورکاظمی م.، بهمنی م.، برادران نویری ش.، نوروزفشخامی م.ر.، کاظمی ر.، چکمه‌دوز قاسمی ف.، یارمحمدی م.، محمدی پرشکوهی ح.، یزدانی م.ع.، پوردهقانی م.، غرق‌آ. و
- یگانه ه. ۱۳۹۱. امکان تولید تاس‌ماهی شیپ نر ماده‌زاد با استفاده از تغییر جنسیت (Sex Reversal) و القای ماده‌زایی (Gynogenesis). گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی، موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۹۳ص.
- حلاجیان ع.، کاظمی ر.، محسنی م.، بهمنی م. و یوسفی ا. ۱۳۸۶. تعیین جنسیت و مراحل رسیدگی جنسی در تاس‌ماهی شیپ پرورشی (*Acipenser nudiventris*) با استفاده از روش تکه‌برداری از گناد. مجله علمی شیلات ایران، ۱۶(۳): ۶۵-۷۲.
- صدرایی س.ه.، کاظمی ر. و بهمنی م. ۱۳۷۸. کنترل مراحل رسیدگی غدد جنسی تاس‌ماهیان (ترجمه). انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری. ۶ص.
- کهنه‌شهری م. و آذری تاکامی ق. ۱۳۵۳. تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری. انتشارات دانشگاه تهران. ۲۸۱ص.
- نظری ر.م.، عبدالحی ح. و مخدومی ن.م. ۱۳۸۵. تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری (ترجمه). انتشارات شیلات ایران. ۴۲۲ص.
- Arai K. 2001. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. *Aquaculture*, 197: 205–228.
- Aramli M.S., Azarin H. and Farsi P. 2015. Motility parameters, adenosine triphosphate content and oxidative stress indices of sterlet (*Acipenser ruthenus*) sperm

- after 6 days of storage. *Aquaculture Research*, 2015: 1–6.
- Birstein V.J., Bemis W.E. and Waldman J.R. 1997.** The threatened status of Acipenseriform species: A summary. *Environmental Biology of Fishes*, 48: 427–435.
- Cassani J.R. and Caton W.E. 1985.** Induced triploidy in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture*, 46: 37–44.
- Chourrout D. 1980.** Thermal incubation of diploid gynogenesis and triploidy in the eggs of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Reproduction Nutrition Development*, 20: 727–733.
- Devlin R.H. and Nagahama Y. 2002.** Sex determination and sex differentiation in fish: An overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208: 191–364.
- Donaldson E.M. and Devlin R.H. 1996.** Uses of biotechnology to enhance production. P: 969–1020. In: Pennell W. and Barton B. (Eds.). *Principles of Salmonid Culture*. Elsevier, Netherlands.
- Dorafshan S., Kalbasi 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 photoreactivation. *Iranian Journal of Fisheries Science*, 6(1): 19–34.
- 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: 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: 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: 721–727.
- Fontana F. 1994.** Chromosomal nucleolar organizer region in four sturgeon species as markers of karyotype evaluation in Acipenseriformes (Pisces). *Genome*, 37: 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: 91–95.
- Fopp-Bayat D. 2007.** Verification of meiotic gynogenesis in Siberian

- sturgeon (*Acipenser baerii*) using microsatellite DNA and cytogenetical markers. *Journal of Fish Biology*, 77: 478–485.
- Fopp-Bayat D. 2008.** Inheritance of microsatellite loci in polyploid Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt) based on uniparental haploids. *Aquaculture Research*, 39: 1787-1792.
- Fopp-Bayat D. 2010.** Meiotic gynogenesis revealed not homogametic female sex determination system in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt). *Aquaculture*, 305: 174–177.
- 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. and Woznicki P. 2006.** Verification of ploidy level in sturgeon larvae. *Aquaculture Research*, 37: 1671–1675.
- 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*). *Aquaculture*, 264: 54–58.
- Gessner J., Freyhof J. and Kottelat M. 2010.** *Acipenser ruthenus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e. T227A13039007. Retrieved November 22, 2015, from <https://www.iucnredlist.org/species/227/13039007>.
- Goudie C.A., Simco B.A., Davis K.B. and Liu Q. 1995.** Production of gynogenetic and polyploid catfish by pressure-induced chromosome set manipulation. *Aquaculture*, 133: 185–198.
- 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: 701–705.
- Hassanzadeh Saber M. and Hallajian A. 2014.** Study of sex determination system in ship sturgeon (*Acipenser nudiventris*) using meiotic gynogenesis. *Aquaculture International*, 22: 273–279.
- Hassanzadeh Saber M., Baradaran Noveiri S., 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: 1183–1787.
- Hassanzadeh Saber M., Noveiri S.B., Pourkazemi M., Yazdani M., Ghoroghi A., Bahmani M., Pourdehghani M., Chakmehdouz F., Yarmohammadi M., Nowruzfashkhami M. 2014.** Induction of meiotic gynogenesis in ship sturgeon (*Acipenser nudiventris*) using UV-irradiated heterologous sperm. *Journal of Applied Genetics*, 55: 223–229.
- Hillis D.M. and Moritz C. 1990.** *Molecular Taxonomy*. Sinauer Associate, Inc. Publishers, USA. 572P.
- Ijiri K. and Egami N. 1980.** Hertwig effect causes by UV irradiation of sperm of *Oryzias latipes* (Teleost) and its photoreactivation. *Mutation Research*, 69: 241–248.
- Kashiwagi K. 1980.** Mature haploids and their reproductive capacity in *Rana rugosa*. *Scientific Report of the Laboratory for Amphibian Biology*, 4: 217–237.
- Komen H. and Thorgaard G.H. 2007.** Androgenesis, gynogenesis and production of clones in fishes: A review. *Aquaculture*, 269: 150–173.
- Luckenbach J.A., Godwin J., Daniels H.V., Beasley J.M., Sullivan C.V. and Borski R.J. 2004.** Induction of diploid gynogenesis in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) with homologous and heterologous sperm. *Aquaculture*, 237: 499–516.
- 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: 1203–1215.
- May B., Charles C., Krueger C. and Kincaid L. 1997.** Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon. Primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 54: 1542–1547.
- 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: 334–343.
- Mirza J.A. and Shelton W.L. 1988.** Induction of gynogenesis and sex reversal in silver carp. *Aquaculture*, 68: 1–14.
- Nagy K., Rajki L., Horvath L. and Csany V. 1978.** Investigation on carp (*Cyprinus carpio* L.) gynogenesis. *Journal of Fish Biology*, 13: 215–224.
- Nowosad J., Kucharczyk D., Targonaska K., Kujawa R. 2015.** Comparison of temperature shock timing to induced artificial mitotic

- gynogenesis and androgenesis in common tench. *Aquaculture International*, 23: 45–53.
- 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: 39–47.
- Omoto N., Maebayashi M., Hara A., Adachi S. and Yamauchi K. 2004.** Gonadal maturity in wild sturgeons, *Huso dauricus*, *Acipenser mikadoi* and *A. schrenckii* caught near Hokkaido, Japan. *Environmental Biology of Fishes*, 70: 381–391.
- Onozato H. 1982.** The ‘Hertwig effect’ and gynogenesis in chum salmon (*Oncorhynchus keta*) eggs fertilized with 60C gamma-ray irradiated milt. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, 48: 1237–1241.
- Peruzzi S. and Chatain B. 2000.** Pressure and cold shock induction of meiotic gynogenesis and triploidy in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): Relative efficiency of methods and parental variability. *Aquaculture*, 189: 23–37.
- Peruzzi S., Scott A.G., Domaniewski J.C.J. and Warner G.F. 1993.** Initiation of gynogenesis in *Oreochromis niloticus* following heterologous fertilisation. *Journal of Fish Biology*, 43: 585–591.
- Piferrer F., Cal R.M., Gomez B., 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: 403–419.
- Pongthana N., Penman D.J., Karnasuta J. and McAndrew B.J. 1995.** Induced gynogenesis in the silver barb (*Puntius gonionotus* Bleeker) and evidence for female homogamety. *Aquaculture*, 135: 267–276.
- Pourkazemi M. 1996.** Molecular and biochemical genetic analysis of sturgeon stocks from the South Caspian Sea. Ph.D. Thesis, University of Wales, United Kingdom. 260P.
- Purdom C.E. 1969.** Radiation induced gynogenesis and androgenesis in fish. *Heredity*, 24: 431–444.
- Rab P. 1986.** A note on the karyotype on the starlet (*Acipenser ruthenus*) (Pisces, Acipenseridae). *Folia Zoologica*, 35: 73–78.
- Shelton W.L. and Mims S.D. 2012.** Evidence for female heterogametic sex determination in paddlefish (*Polyodon spathula*) based on

- gynogenesis. *Aquaculture*, 356-357: 116-118.
- Stanley J.G. 1976.** Production of hybrid, androgenetic and gynogenetic grass carp and carp. *Transactions of the American Fisheries Society*, 105: 10-16.
- Sun Y.D., Tao M., Liu S.J., Zhang C., Duan W., Shen J.M., Wang J., Zeng C., Long Y. and Liu Y. 2007.** Induction of gynogenesis in red crucian carp using spermatozoa of blunt snout bream (*M. amblycephala*). *Progress in Natural Science*, 17: 163-167.
- Sun Y.D., Zhang C., Liu S.J., Tao M., Zeng C. and Liu Y. 2006.** Induction of gynogenesis in Japanese crucian carp (*Carassius cuvieri*). *Acta Genetica Sinica*, 33: 405-412.
- Suzuki R., Oshiro T. and Nakanishi T. 1985.** Survival, growth and fertility of gynogenetic diploids induced cyprinid loach (*Misgurnus anguillicadatus*). *Aquaculture*, 48: 45-55.
- Thorgaard G.H. 1977.** Heteromorphic sex chromosomes in male rainbow trout. *Science*, 196: 900-902.
- Thorgaard G.H. 1983.** Chromosome set manipulation and sex control in fish. P: 405-434. In: Hoar W.S., Randall D.J. and Donaldson E.M. (Eds.). *Fish Physiology*, Vol. IX, Part B. Academic Press, USA.
- Thorgaard G.H., Scheerer P.D. and Parsons J.E. 1985.** Residual paternal inheritance in gynogenetic rainbow trout (*Salmo gairdneri*): implications for gene transfer. *Theoretical and Applied Genetics*, 71: 119-121.
- Urbani B., Horvath A. and Kovacs B. 2004.** Successful hybridization on *Acipenser* species using cryopreserved sperm. *Aquaculture International*, 12(1): 47-56.
- Van Eenennaam A.L., Van Eenennaam J.P., Medrano J.F., Doroshov S.I. 1999.** Evidence of female heterogametic genetic sex determination in white sturgeon. *Journal of Heredity*, 90: 231-233.
- Van Eenennaam A.L., Van Eenennaam J.P.V., Medrano J.F. and Dorshov S.I. 1996.** Rapid verification of meiotic gynogenesis and polploidy in with sturgeon (*Acipenser transmontanus* Richardson). *Aquaculture*, 147: 177-189.
- Varadaraj K. 1990.** Production of diploid *Oreochromis mossambicus* gynogenes using heterologous sperm of (*Cyprinus carpio*). *Indian Journal of Experimental Biology*, 28: 701-705.
- Varadaraj K. 1993.** Production of viable haploid (*Oreochromis mossambicus*) gynogens using UV-irradiated sperm. *Journal of Experimental Zoology*, 267: 460-467.

- Varadaraj K. and Panadian T.J. 1990.** Production of all female sterile triploid (*Oreochromis mossambicus*). *Aquaculture*, 84: 117–123.
- Vasiliev V.P., Sokolov L.I. and Serebryakova E.V. 1980.** Karyotype of the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt) from the Lena River and some questions of the acipenserid karyotypic evolution. *Voprosy Ikhtiologii*, 23: 814–822.
- 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: 47–55.
- Wolf D.E., Takebayashi N. and Rieseberg L.H. 2001.** Predicting the risk of extinction through hybridization. *Conservation Biology*, 15(4): 1039–1053.
- Xiao J., Zou T.M., Chen L., Liu S.J., Xiao J., Zhang H., Long Y., Yan J.P., Zhao R.R., Tao M., Zhang C., You C.P. and Liu Y. 2011.** Microsatellite analysis of different ploidy offspring of artificial gynogenesis in *Cyprinus carpio*. *Journal of Fish Biology*, 78: 150–165.
- Xu J.H., You F., Sun W., Yan B.L., Zhang P.J. and Jing B.X. 2008.** Induction of diploid gynogenesis in turbot (*Scophthalmus maximus*) with left-eyed flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm. *Aquaculture International*, 16: 623–634.
- Yamaki M., Kawakami K., Taniura K. and Arai K. 1999.** Live haploid-diploid mosaic charr (*Salvelinus leucomaenis*). *Fisheries Science*, 65(5): 736–741.
- 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: 496–500.



Research Paper

Induction of gynogenesis by using inactivated heterologous sperm to produce male Sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*)

Mohammad Hassanzadeh Saber¹, Hossein Zolgharnein^{2*}, Mohammad Ali Salari Aliabadi³, Mohammad Ali Yazdani Sadati⁴, Mahtab Yarmohammadi⁵

Received: August 2018

Accepted: November 2018

Abstract

Based on IUCN criteria, sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*) has been shown as vulnerable species. Its male sex is inadequate or absent in the most of propagation and rehabilitation centers of Iran. The aim of this study is the induction of gynogenesis to produce male sterlet sturgeon using heterologous sperm. DNA of heterologous sperm from Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) was damaged successfully by UV irradiation with 473 $\mu\text{w}/\text{cm}^2$ intensity and 90 seconds duration. The irradiated sperm mixed with sterlet sturgeon eggs to induce gynogenetic progenies of sterlet sturgeon. For this purpose, 15 minutes after activation, the fertilized eggs exposed to 34°C heat shock for 2 minutes. Gynogenetic progenies were verified by microsatellite markers (AFU68 and AFUG195) as only maternal heritability. Histological observations of preliminary gonads of gynogenetic progenies were carried out by biopsy method at 17 months-age. Results showed that gynogenetic progenies consisted of 76.6% female and 23.3% male. Regarding to female heterogametic sex determination system in sterlet sturgeon, this study showed that both female and male as pure could be induced by inactivated heterologous sperm and gynogenesis.

Key words: *Sterlet Sturgeon, Gynogenesis, Heterologous Sperm, Male Production.*

1- Ph.D. Student in Marine Biology, Faculty of Marine and Oceanic Science, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

2- Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine and Oceanic Science, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

3- Associate Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine and Oceanic Science, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

4- Associate Professor in Aquaculture Department, International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

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

*Corresponding Author: zolgharnein@kmsu.ac.ir

