تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۳/۱٤

نشریه شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۶۸، شماره ۱، بهار ۱۳۹٤

ص ۱-۱۱

امکان تعیین جنسیت قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از نشانگرهای مولکولی

- **حمید فرحمند***: دانشیار دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- **محمد اخوان بهابادی:** دانش‌آموختهٔ کارشناسی ارشد مهندسی شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- **محمدعلی نعمت‌اللهی:** دانشیاردانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- **علیرضا میرواقفی:** دانشیار دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

چکیده

این تحقیق با هدف بررسی امکان تعیین جنسیت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از طریق غربالگری مولکولی به منظور ایجاد جمعیت‌های تک‌جنسیت انجام شد. بدین منظور تعداد ۳۵ نمونه از بافت بالهٔ دمی ماهیان بالغ قزل‌آلای رنگین‌کمان بازار کرج، به‌منزلهٔ نمونهٔ آماری، تهیه شد و پس از استخراج DNA از نمونه‌ها، تکثیر جایگاه نشانگرها انجام پذیرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر نشانگرهای وابسته به جنسیت در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان بر اساس دو نشانگر *OmyFA* و *OmyFATU* تنظیم شد. در نهایت جمعیت مذکور بر اساس حضور یا نبود باندی مخصوص به جنسیت برای نشانگرها غربالگری شد. نتایج این پژوهش حضور نشانگرهای *OmyFA* و *OmyFATU* در یک جنسیت (نر) را با دقت ۱۰۰ و ۵۵ درصد گزارش کردند. بر اساس این نتایج نشانگر *OmyFA* برای غربال نمونهٔ آماری مذکور (قزل‌آلای رنگین‌کمان بازار کرج) پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: نشانگرهای وابسته به جنسیت، قزل‌آلای رنگین‌کمان، تعیین جنسیت، تمایز جنسیت، پرورش تک‌جنسیت.

* نویسندهٔ مسئول: hfarahmand@ut.ac.ir

۱. مقدمه

یکی از اساسی‌ترین مشکلات پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان در ایران مرگ‌ومیر ماهیان نر به علت بلوغ زودرس است (Mc Andrew, 2001). این مشکل در بسیاری از کشورها با ایجاد لاین‌های تمام ماده (تک‌جنسیت) مرتفع شده است. از طرف دیگر، جمعیت تمام ماده در آزادماهیان، به سبب رشد سریع‌تر ماده‌ها، کیفیت کم گوشت نر و مخصوصاً بلوغ زودرس نرها، قبل از رسیدن به سن بازاری (حدود یک‌سال) بر جمعیت تمام نر ارجحیت دارد (Dunham *et al.*, 2004). بنابراین، ایجاد جمعیت‌های تمام ماده برای صنعت آبزی‌پروری این گونهٔ اقتصادی ضروری است.

چندین صفت مهم اقتصادی در زمینهٔ توسعهٔ جنسی ماهی‌ها وجود دارد. اهمیت اقتصادی دوشکلی جنسیتی[1]، در سرعت رشد، زمان و سن بلوغ، شکل و وضعیت بدن و ترکیب لاشهٔ برخی گونه ماهیان خوراکی مشاهده شده است. حتی هنگامی که هیچ تفاوت مهمی بین جنسیت‌ها در صفات مهم اقتصادی وجود ندارد، دوشکلی جنسیتی برای پرورش ذخایر تک‌جنسیت به منظور جلوگیری از تولیدمثل غیرمنتظره و کنترل‌نشده مفید است (Lutz *et al.*, 2001; Dunham *et al.*, 2004).

تاکنون برای تولید جمعیت‌های تک‌جنسیت روش‌های گوناگونی از قبیل جداکردن[2]، تیمار هورمونی[3] (ماده‌سازی[4] و نرسازی[5])، دستکاری‌های کروموزومی[6] (ماده‌زایی[7] و نرزایی[8]) و دورگه‌گیری درون‌گونه‌ای[9] پیشنهاد شده است، اما این روش‌ها به دلایل مختلف نظیر الزامات کار، هزینه و بی‌نتیجه‌بودن تغییر جنسیت هورمونی برای تولید تجاری ذخایر تک‌جنسیت، توجیه اقتصادی نداشته (Lutz *et al.*, 2001) و در بسیاری از کشورها فروش ماهی تیمارشده با هورمون غیرقانونی است و در صورت صدور مجوز، مصرف‌کننده‌ها ممکن است تمایلی به خرید این گونه محصولات نشان ندهند. همچنین تغییر جنسیت همیشه ۱۰۰ درصد مؤثر نیست و می‌تواند برای برخی گونه‌ها مشکل یا غیرممکن باشد (Dunham *et al.*, 2004). با تلفیق تغییر جنسیت با یک برنامهٔ اصلاح نژاد که در آن ماهیان تغییر جنسیت‌یافته به‌منزلهٔ مولد در تولید فرزندان تک‌جنسیت استفاده می‌شوند، می‌توان بر این مشکل غلبه کرد، اما چنین برنامه‌هایی پیچیدگی فراوانی دارد (انجام آزمون نتاج و جزآن) و نیازمند طراحی دقیق و امکانات کافی است (Cnaani *et al.*, 2009; Dunham *et al.*, 2001, 2004). روش دیگر برای بهبود برنامه‌های اصلاحی در تولید جمعیت‌های تک‌جنسیت، استفاده از نشانگرهای DNA مرتبط با جنسیت است (Cnaani *et al.*, 2009). آزمایش‌های مبتنی بر DNA می‌تواند در این زمینه کمک شایانی به ما کند.

یکی از مباحث مهم در ایجاد جمعیت‌های تک‌جنسیت، تعیین جنسیت است که به منظور مدیریت بهتر هچری‌ها، افزایش راندمان کار و کاهش هزینه‌ها تشخیص جنسیت در مراحل اولیهٔ زندگی امری ضروری است. سیستم‌های تعیین جنسیت در بین ماهیان استخوانی به طور قابل توجهی متغیر است و در معرض تأثیرات خارجی از قبیل دما، pH،

1. Sexual dimorphism
2. Sorting
3. Hormmonal Treatmeant
4. Feminisation
5. Masculinization
6. Chromosomal Manipulations
7. Gynogenesis
8. Androgenesis
9. Interspecific Hybridization

فاکتورهای اجتماعی و غیره قرار دارد (Yamamoto, 1969; Bull, 1983).

در پستانداران، ژن تعیین‌کنندهٔ جنسیت *SRY*[1] است که عضو اصلی خانوادهٔ ژن‌های *Sox* است. در بررسی ژن‌های پیوسته با کروموزوم Y پستانداران از قبیل *SRY* و *ZFY*[2] در چندین خانوادهٔ ماهی‌ها، مشخص شد که این ژن‌ها مرتبط با جنسیت نیستند (Wachtel *et al*., 1991; Tiersch *et al*., 1992; Husebye *et al*., 1994; Fukada *et al*., 1995)، اما اولین ژن تعیین جنسیت در ماهی استخوانی مداکا (*Oryias latipes*) شناسایی شده است که *DMY* نام دارد (Matsuda *et al*., 2002, 2003). این ژن قابل مقایسه با ژن تعیین بیضه در پستانداران (*Sry*) است، اما ژن تعیین جنسیت عمومی و اصلی در ماهی‌ها نیست (Volff *et al*., 2003).

اولین لوکوس مخصوص جنسیت در آزادماهیان در چینوک سالمون (*O. tshawytscha*) از طریق روش دورگه‌گیری تفریقی[3] شناسایی شد که منجر به ایجاد یک قطعه DNA مخصوص نرینگی به نام *OtY1* شد (Devlin *et al*., 1991). مطالعات بیشتر نشان داد که قطعهٔ *OtY1* بخشی از یک توالی تکراری پشت سر هم ۸ Kb، *OtY8* است که دست‌کم در شش مجموعه (Devlin *et al*., 1994; Devlin *et al*., 1998) شامل ۲۵۰ـ۱۲ نسخه و دربردارندهٔ تقریباً ۲/٤ Mb DNA کروموزوم Y چینوک سالمون است (Devlin *et al*., 1998).

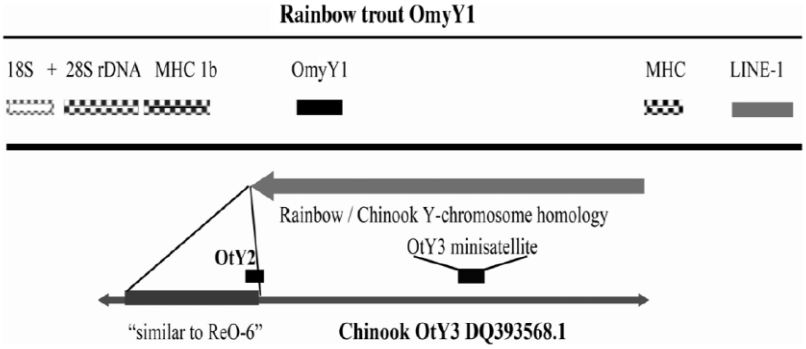
یک ژن شبه‌هورمون رشد (*GH-ψY*) در همهٔ گونه‌های Pacific salmon به جز در سوکو سالمون (*O.nerka*)، آتلانتیک سالمون (Salmo salar) و قزل‌آلای رنگین‌کمان در پیوستگی با کروموزوم Y است (Du *et al*., 1993; Forbes *et al*., 1994; Devlin *et al*., 2001).

نشانگرهای AFLP مخصوص جنسیت برای جداسازی نشانگر *OtY2* مرتبط با کروموزوم Y در چینوک سالمون استفاده شد. همچنین نشانگر *OtY2*، یک قطعه مخصوص نرینگی در کوهو سالمون (*O. kisutch*)، چوم سالمون (*O. keta*) و سوکو سالمون ایجاد کرد، اما در سالمون صورتی (*O. gorbusch*) و قزل‌آلای رنگین‌کمان با موفقیت همراه نبود (Brunelli and Thorgaard, 2004).

تشخیص یک قطعه ۱۲/۵ Kb کروموزوم Y چینوک سالمون در کنار *OtY2* و مقایسهٔ آن با یک قطعه ۲۱ Kb از ژنوم قزل‌آلای رنگین‌کمان، تشابه تقریباً ۱۰ Kb توالی کروموزوم Y چینوک سالمون را نسبت به قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد (Brunelli *et al*., 2008). از طرف دیگر، تشخیص نشانگر مینی ستلایت *OtY3* منجر به ایجاد یک قطعهٔ مخصوص نرینگی در چینوک و کوهو سالمون شد، اما در پروفیل‌های مرتبط با جنسیت برای قزل‌آلای رنگین‌کمان، چوم و سوکو سالمون مشاهده نشد. این در حالی است که تشخیص جنسیت در چینوک، کوهو، چوم و سوکو سالمون با پرایمرهای *OtY2* با موفقیت انجام شده بود، اما در مطالعه‌ای که از یک جفت پرایمرهای نشانگر *OtY3* در منطقه‌ای از توالی قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده شده بود، باعث کشف قطعه‌ای به نام *omyY1* شد که می‌توانست برای تشخیص نرها با دقت ۹٦/۵ درصد استفاده شود (شکل ۱) (Brunelli *et al*., 2008).

اگرچه امروزه روش‌های متعددی به منظور ایجاد جمعیت‌های تک‌جنسیت انجام شده است، در

1. Sex determining region of the Y chromosome
2. Zinc finger Y gene
3. Subtractive hybriddization



شکل ۱. موقعیت نشانگر *omy1* روی کروموزوم Y قزل‌آلای رنگین‌کمان در ارتباط با نشانگرهای *OtY2* و *OtY*

تحقیق پیش رو هدف تعیین جنسیت قزل‌آلای رنگین‌کمان از طریق نشانگرهای ملکولی و در مرحلهٔ بعد ساخت کیت تعیین جنسیت و در مرحلهٔ نهایی ایجاد جمعیت‌های تک‌جنسیت است.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. مکان نمونه‌برداری و روش انجام تحقیق

این تحقیق به منظور تعیین جنسیت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با استفاده از نشانگرهای مولکولی، دربارهٔ نمونه‌های تهیه‌شده از بازار کرج به‌منزلهٔ نمونهٔ آماری، انجام شد. بدین منظور تعداد ۳۵ نمونه از بافت بالهٔ دمی ماهیان بالغ خریداری‌شده از بازار کرج تهیه شد و پس از تثبیت در اتانول ۹۶ درصد به منظور استخراج DNA، هم‌زمان ماهی‌ها جراحی شدند و جنسیت آن‌ها از طریق مشاهدهٔ مستقیم گنادها مشخص شد.

استخراج DNA به روش فنول ـ کلروفرم (Phenol-Chloroform) (Sambrook *et al.*, 1989) انجام شد. سنجش کیفیت DNA استخراج‌شده از بافت به کمک الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد انجام گرفت. همچنین، سنجش کمیت DNA استخراج‌شده به کمک الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد و روش اسپکتوفتومتری انجام شد.

۲.۲. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

در این مرحله، DNA استخراج‌شده با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده، به منظور تعیین چندشکلی، ارزیابی شد. برای انجام PCR از موادی با غلظت‌های مختلف و در حجم ۲۵ µl استفاده شد که در جدول ۱ آورده شده است. سپس، چرخهٔ حرارتی در دستگاه ترموسایکلر (Astec, PC320) طبق جدول ۲ دستورالعمل ذکرشدهٔ هر پرایمر اعمال شد. پس از اتمام برنامهٔ PCR، نمونه‌ها به فریزر ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد انتقال داده شدند.

۳.۲. ارزیابی نمونهٔ مورد بررسی

برای بررسی محصولات واکنش زنجیرهٔ پلیمراز، از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم براماید

جدول ۱. غلظت مواد مصرفی برای هر واکنش PCR در حجم ۲۵µl

ماده	غلظت	مقدار برای هر واکنش
H_2O	-	۱۷/۵ µl
PCR Buffer	۱۰ X	۲/۵ µl
$MgCl_2$	۵۰ mM	۱ µl
dNT	۱۰ mM	۰/۵ µl
Forward Primer	۱ P mol/µl	۰/۵ µl
Reverse Primer	۱ P mol/µl	۰/۵ µl
DNA	۵۰ ng	۰/۵ µl
Taqpolymeras	۵ U/µl	۰/۵ µl

جدول ۲. چرخه‌های حرارتی استفاده‌شده جهت PCR

مراحل	درجهٔ حرارت (سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)	تعداد چرخه‌های حرارتی
واسرشته‌سازی ابتدایی	۹۶	۷	۱
واسرشته‌سازی	۹۴	۱	
الحاق	۵۶	۱	۳۰
توسعه	۷۲	۱	
توسعهٔ نهایی	۷۲	۱۰	۱

و DNA ladder استفاده شد. هدف تعیین وزن ملکولی و موقعیت محصولات واکنش زنجیرهٔ پلیمراز بود. همچنین، برای مشاهدهٔ حرکت DNA روی ژل، Dye[1] با غلظت X ۱۰ به میزان µl ۲ به همراه هر محصول PCR به درون چاهک‌های سینی الکتروفورز اضافه شده بود. در نهایت محصولات ایجادشده با استفاده از دستگاه UVITEC مشاهده شد و با دستگاه مستندسازی ژل[2] عکس‌برداری شد.

۳. نتایج

۱.۳. غربالگری نمونهٔ آماری (بازار کرج)

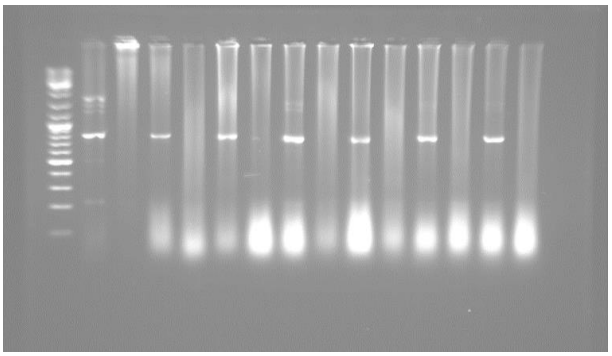
این تحقیق با هدف تعیین جنسیت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از طریق غربالگری مولکولی به منظور ایجاد جمعیت‌های تک‌جنسیت انجام شد. نتایج غربالگری نمونهٔ قزل‌آلای رنگین‌کمان بالغ بازار کرج بر اساس حضورداشتن یا نداشتن جایگاهی مرتبط با جنسیت نشان داد که درصد فراوانی دو نشانگر *OmyFA* و *OmyFATU* به ترتیب برابر با ۱۰۰ و ۵۵ درصد است (جدول ۳، شکل‌های ۲ و ۳).

جدول ۳. درصد موفقیت نشانگرهای استفاده‌شده در تعیین جنسیت در قزل‌آلای رنگین‌کمان

نشانگر	نر	دقت (٪)	ماده	دقت (٪)	میانگین (٪)
OmyFA	۱۱/۱۱	۱۰۰	۲۵/۲۵	۱۰۰	۱۰۰
OmyFATU	۵/۱۱	۴۵	۱۶/۲۵	۶۴	۵۵

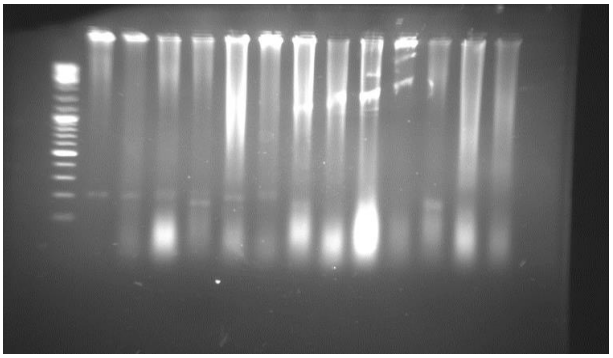
1. Loading buffer
2. Gel documentation

L M FM F M FM F M FM F M F



شکل ۲. نمونه‌ای از تصویر الکتروفورز با آگارز ۱/۵ درصد برای *OmyFA*

L M F M FM F M FM F M F M



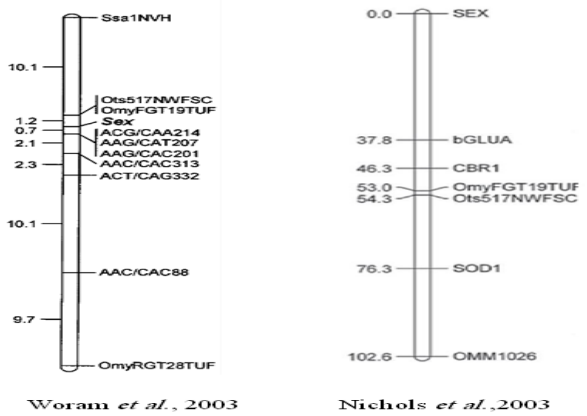
شکل ۳. نمونه‌ای از تصویر الکتروفورز با آگارز ۱/۵ درصد برای *OmyFATU*

۴. بحث و نتیجه‌گیری

نزدیک به جایگاه‌های ژن تعیین جنسیت، انواع بازآرایی‌های توالی DNA روی کروموزوم‌های جنسی شامل حذف، پیوستن، معکوس‌شدن، جابه‌جایی (قطعات کروموزومی یا عناصر قابل انتقال) یا تکثیر توالی‌های تکراری تجمع یافتند. این موضوع در همهٔ ارگانیسم‌ها از قبیل مهره‌داران، بی‌مهرگان و گونه‌های گیاهی وجود دارد. این توالی‌ها می‌توانند شامل صفات مهم کروموزوم‌های جنسی باشند و باعث ایجاد نشانگرهای DNA مخصوص جنسیت شوند (Singh *et al*., 1994; Scutt *et al*., 1997; Devlin *et al*., 1998; Shibata, Hizume & Kuroki, 1999; Zhou, Untalan and Haymer, 2000: Tilford *et al*., 2001)، اما در مواردی که تکامل کروموزوم‌های

جنسی در مرحلهٔ اولیه باشد، کروموزوم‌های جنسی در یک گونه ممکن است زمان کافی برای تجمع اختلاف‌های مولکولی بزرگ را نداشته باشند، بنابراین جداسازی توالی‌های مرتبط با جنسیت می‌تواند مشکل باشد. اطلاعات سیتوژنتیک موجود این دیدگاه را تأیید می‌کند که گونه‌های آزادماهیان تمایز کروموزوم‌های جنسی را در مراحل اولیه نمایش می‌دهند (Phillips *et al*., 2001). نتایج مطابق با این موضوع، قابلیت لقاح و زنده‌مانی نرهای YY قزل‌آلای رنگین‌کمان (Parsons and Torgaard, 1985) و چینوک سالمون (Devlin *et al*., 2001) است که حکایت از آن دارد که کروموزوم‌های X و Y خزانه‌ای یکسان از ژن‌های عملی (کاربردی) دارند و یک منطقهٔ کوچک DNA در تعیین جنسیت نقش دارد (Woram *et al*., 2003) و تمایز کروموزوم‌های جنسی در آزادماهیان به منطقه‌ای محدود می‌شود که بلافاصله نزدیک به لوکوس تعیین جنسیت است و باقیماندهٔ آثار شبه‌آتوزومی این کروموزوم‌ها با همولوژی کافی برای شروع مبادلهٔ ژنتیکی وجود دارد (May *et al*. 1989; Allendorf *et al*. 1994). به عبارت دیگر، کروموزوم‌های جنسی در آزادماهیان یک منطقهٔ شبه‌آتوزومی بزرگ و یک منطقهٔ تعیین جنسیت کوچک دارند (Davidson *et al*., 2009). بنابراین شناسایی نشانگرهای مرتبط با جنسیت در آزادماهیان بسیار مشکل است.

از طرف دیگر، نقشه‌های ژنتیکی متفاوت قزل‌آلای رنگین‌کمان (شکل ۲) وجود مکانی اضافی برای لوکوس تعیین‌کنندهٔ جنسیت در این گونه را به‌شدت تقویت کرده است (Woram *et al*., 2003) و بیانگر این نکته است که کروموزوم جنسی در قزل‌آلای رنگین‌کمان به وسیلهٔ تغییر مکان یک قطعهٔ کروموزومی جنسی اجدادی به یک کروموزوم آتوزومی (Woram *et al*., 2003) یا این‌که به وسیلهٔ معکوس‌شدن در پروسهٔ آغازی تمایز کروموزوم Y از یک جفت کروموزوم اجدادی یکسان از نظر مورفولوژیکی ایجاد شده است (Iturra *et al*., 2001a; Thorgaard *et al*., 2002).



شکل ٤. جایگاه متفاوت لوکوس تعیین جنسیت در نقشه‌های ژنتیکی مختلف قزل‌آلای رنگین‌کمان

در این مطالعه از نشانگرهای *OmyFA* و *OmyFATU* مخصوص کروموزوم Y برای ارزیابی نمونهٔ قزل‌آلای رنگین‌کمان تهیه‌شده از بازار کرج استفاده شد که به طور فنوتیپی تعیین جنسیت شده بودند. میانگین دقت تعیین جنسیت با استفاده از این نشانگرها به ترتیب ۱۰۰ و ۵۵ درصد گزارش شد. از طرف دیگر، وجود برخی نشانگرهای نر در جنسیت ماده و برعکس مشاهده شده بود. این قبیل اختلافات قبلاً نیز بین کاریوتیپ‌های XY هتروگامتی و جنسیت فنوتیپی در قزل‌آلای رنگین‌کمان (Thorgaard, 1977, 1983) و بین جنسیت فنوتیپی و جنسیت ژنوتیپی به وسیلهٔ نشانگرهای *OtY1* و *GH-Y* در چینوک سالمون (Devlin *et al*., 2005) و نشانگر *OmyY1* در قزل‌آلای رنگین‌کمان (Brunelli *et al*., 2008) گزارش شده است.

از طرف دیگر، با این‌که جایگاه نشانگرها روی کروموزوم‌های جنسی قرار دارند، نوترکیبی بین نشانگر و لوکوس تعیین جنسیت در بیشتر موارد مشاهده شده است (Zhang *et al*., 2001; Devlin and Nagahama, 2002; Felip *et al*., 2004; Williamson and May, 2005; Brunelli *et al*., 2008; Chen *et al*., 2009; Ma *et al*., 2010) که نشان‌دهندهٔ این است که این نشانگرها به‌شدت به منطقهٔ کروموزومی تعیین جنسیت وابسته نیستند (Devlin *et al*., 2001; Iturra *et al*., 2001b; Felip *et al*., 2004) و یا در منطقهٔ نوترکیبی کروموزوم Y قرار دارند (Felip *et al*., 2005).از دلایل این اختلافات می‌توان به کروموزوم‌های متفاوت از نظر مورفولوژیکی اشاره کرد که فقط در گونه‌های کمی از آزادماهیان گزارش شده است. برخی از جمعیت‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان پلی مورفیسم در کروموزوم Y دارند (Thorgaard, 1983; Ueda and Ojima, 1984a; Colihueque and Díaz, 1995; Colihueque *et al*. 2001; Iturra *et al*., 2001b; Felip *et al*., 2004; Ocalewicz *et al*., 2007).

فرضیهٔ دیگر دربارهٔ وجود کروموزوم‌های جنسی مشابه در نرهای ژنتیکی مبتنی بر این واقعیت است که نمونهٔ آماری بازار کرج دربردارندهٔ حداقل ۱۱ جمعیت مختلف قزل‌آلای رنگین‌کمان است که طی سال‌های ۱۹۹۶-۱۹۹۰ وارد ایران شده است (Abdolhay, 2005)، که ممکن است دارای کروموزوم‌های جنسی متفاوت از نظر مورفولوژی باشند. نتایج مشابه را نیز قبلاً Colihueque و همکاران (۲۰۰۱) و Ocalewicz و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کرده‌اند.

از دلایل دیگر می‌توان به فرضیه‌ای مبنی بر تغییر جنسیت خود به خودی در آزادماهیان اشاره کرد که در برخی مطالعات تأیید شده است (Craig *et al*., 1 996; Colihueque *et al*., 2001; Zhang *et al*., 2001; Felip *et al*., 2004; Brunelli *et al*., 2008; Ma *et al*., 2010) که منجر به ایجاد نرهای ژنتیکی یا ماده‌های مشخص با فنوتیپ شده است.

وجود پلی‌مورفیسم درون‌گونه‌ای کروموزوم Y قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز می‌تواند دلیلی بر این گونه اختلافات باشد که مؤید این موضوع، کشف برخی نشانگرهای مخصوص جمعیت، گونه و یا حتی سویه است (Thorgaard, 1977, 1983; Felip *et al*., 2005).

بر اساس نتایج این تحقیق نشانگر *OmyFA* برای غربال نمونه‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان بازار کرج پیشنهاد می‌شود. گفتنی است برای نتیجه‌گیری نهایی و انتخاب این نشانگر برای ساخت کیت تعیین جنسیت و ایجاد جمعیت‌های تک‌جنسیت این گونه، لازم است این نشانگر برای جمعیت‌های کارگاهی مختلف ایران و با سنین مختلف آزمایش شود. از طرف دیگر، با توجه به این‌که برخی نشانگرها مخصوص جمعیت، گونه و یا حتی سویه‌اند، می‌توان از این نشانگرها به منظور شناسایی منشأ جغرافیایی جمعیت قزل‌آلای رنگین‌کمان ایران استفاده کرد، اما این موضوع به مطالعات تکمیلی نیاز دارد. برای نتیجه‌گیری کلی می‌توان از قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌منزلهٔ مدلی باارزش برای تحقیق در تمایز و تکامل کروموزوم‌های جنسی در مهره‌داران نام برد. این گونه شاخصی برای بروز اختلاف‌های کروموزومی بین جمعیت‌ها با برخی نژادهاست که کروموزوم Y مشابه از نظر مورفولوژیکی با کروموزوم X دارند و آن‌هایی که نوع کروموزوم Y معمولی را نمایش می‌دهند.

References

[1]. Abdolhay, H., 2005. Comprehensive study of molecular genetic and selective breeding in coldwater fish of Iran. Iranian Fisheries Research Organization. project number: 796.

[2]. Allendorf, F.W., Gellman, W.A., Thorgaard G.H., 1994. Sex-linkage of two enzyme loci in *Oncorhynchus mykiss*. Heredity 72, 498–507.

[3]. Baroiller, J.F., D'Cotta, H., 2001. Environment and sex determination in farmed fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 30(4), 399–409.

[4]. Brunelli, J.P., Thorgaard, G.H., 2004. A new Y-chromosome- specific marker for the Pacific salmon. Transactions of the American Fisheries Society 10247–10253.

[5]. Brunelli, J.P., Wertzler K.J., Sundin, K., Thorgaard, G,H.,2008. Y-specific sequences and polymorphisms in rainbow trout and Chinook salmon. Genome 51, 739–748.

[6]. Bull, J.J.,1983. Evolution of Sex Determining Mechanisms Benjamin/Cummings. Menlo Park. CA, 316 pp.

[7]. Chen, J., Fu, Y., Xiang, D., Zhao, G., Long, H., Liu, J., Yu, Q., 2008. XX/XY heteromorphic sex chromosome systems in two bullhead catfish species, *Liobagrus marginatus* and *L. styani* (Amblycipitidae, Siluriformes). Cytogenetic and Genome Research 122(2), 169–174.

[8]. Colihueque, N., Iturra, P., Estay, F., Diaz, N.F., 2001. Diploid chromosome number variations and sex chromosome polymorphism in five cultured strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 198, 63–77.

[9]. Cnaani, A., Levavi-Sivan, B., 2009. Sexual Development in Fish, Practical Applications for Aquaculture. Sexual Development 3, 164–175.

[10]. Craig, J.K., Foote, C.J., Wood, C.C.,1996. Evidence for temperature- dependent sex determination in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 53, 141–147.

[11]. Devlin, R.H., NcNeil, B.K., Groves, T.D.D., Donaldson, E.M., 1991. Isolation of a Y-chromosomal DNA probe capable of determining genetic sex in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 48, 1606–1612.

[12]. Devlin, R.H., McNeil, B.K., Groves, T.D.D., Donaldson, E.M., 1994. Isolation of Y-chromosomal DNA probe capable of determining genetic sex in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 48, 1606–1612.

[13]. Devlin, R.H., Stone, G.W Smailus, D.E., 1998. Extensive direct tandem organization of a long repeat DNA sequence on the Y-chromosome of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Journal of Molecular Evolution 46, 277–287.

[14]. Devlin, R.H., Biagi, C.A., Smailus, D.E., 2001. Genetic mapping of Y-chromosomal DNA markers in Pacific salmon. Genetica 111, 43–58.

[15]. Devlin, R.H., Nagahama, Y., 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture 208, 191–364.

[16]. Devlin, R.H., Park, L., Sakhrani, D.M., Baker, J.D Marshall, A.R., 2005. Variation of Y-chromosome DNA markers in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) populations. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 62, 1386–1399.

[17]. Davidson, W.S., Huang, K., Fujiki, T.K., von Schalburg, K.R., Koop, B.F., 2009. The sex determining loci and sex chromosomes in the family Salmonidae. Sexual Development 3,78–87.

[18]. Dunham, R.A., Majumdar, K., Hallerman, E., Bartley, D., Mair, G., et al., 2001. Review of the status of aquaculture genetics. In: Subasinghe, R.P., Bueno, P., Phillips, M.J., Hough, C., McGladdery, S.E., Arthur, J.R. (eds.), Aquaculture in the Third Millennium. Pp. 137–166 (NACA and FAO, Bangkok 2001).

[19]. Dunham, R.A., 2004. Aquaculture and fisheries biotechnology, genetic approaches (CABI Publishing,Wallingford).

[20]. Du, S.J., Devlin, R.H., Hew, C.L., 1993. Genomic structure of growth hormone genes in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*): presence of two functional genes *GH-I* and *GH-II*, and a male-specific pseudogene, GH-psi. DNA Cell Biology 12, 739–751.

[21]. Felip, A., Fujiwara, A., Young, W.P., Wheeler, P.A., Noakes, M., et al., 2004. Polymorphism and differentiation of rainbow trout Y-chromosomes. Genome 47, 1105–1113.

[22]. Felip, A., Young, W.P., Wheeler, P.A., Thorgaard, G.H., 2005. An AFLP-based approach for the identification of sex-linked markers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 247, 35-43.

[23]. Forbes, S.H., Knudsen, K.L., North, T.W., Allendorf, F.W., 1994. One of two growth hormone genes in coho salmon is sex linked. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91, 1628–1631.

[24]. Fukada, S., Tanaka, M., Iwaya, M., Nakajima, M., Nagahama, Y., 1995. The Sox gene family and its expression during embryogenesis in the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*). Development Growth and Differentiation 37, 379–385.

[25]. Galay-Burgos, M., Llewellyn, L., Mylonas, C. C., Canario, A. V. M., Zanuy, S., and Sweeney, G. E., 2003. Analysis of the *Sox* gene family in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B 137, 279- 284.

[26]. Husebye, H., Lund, S., Moeller, M., Sunde, A., Krokan, H.E., 1994. A *Bkm*-related DNA sequence gives individual DNA fingerprints in turbot (*Scophthalmus maximus*), but neither *Bkm*-related, human *SRY* or human *ZFY* probes detect genetic sex differences. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 107B, 69–73.

[27]. Iturra, P., Medrano, J.F., Bagley, M., Lam, N., Vergara, N., Marin, J.C., 1998. Identification of sex chromosome molecular markers using RAPDs and fluorescent in situ hybridization in rainbow trout. Genetica 101, 209–213.

[28]. Iturra, P., Lam, N., delaFuente, M., Vergara, N., 2001a. Characterization of sex chromosomes in rainbow trout and coho salmon using fluorescence in situ hybridization (FISH). Genetica 11, 1125–131.

[29]. Iturra, P., Bagley, M., Vergara, N., Imbert, P., Medrano, J.F., 2001b. Development and characterization of DNA sequence *OmyP9* associated with the sex chromosomes in rainbow trout. Heredity 86, 412–419.

[30]. Lutz, C.G., 2001. Practical Genetics for Aquaculture (Blackwell, Oxford).

[31]. Matsuda, M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., Kobayashi, T., Morrey, C.E., Shibata, N., Asakawa, S., Shimizu, N., Hori H., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M., 2002. *DMY* is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. Nature 417, 559–563.

[32]. Matsuda, M., Sato, T., Toyazaki, Y., Nagahama, Y., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M., 2003. Oryzias curvinotus has *DMY*, a gene that is required for male development in the medaka, *O. latipes*. Zoological Science 20, 159–161.

[33]. May, B., Johnson, K.R., Wright, J.r., J.E., 1989. Sex linkage in salmonids: Evidence from a hybridized genome of brook trout and Arctic charr. Biochemical Genetics 27, 291–301.

[34]. Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X.T., Nagahama, Y., 1998. Gonadal sex differentiation in teleost fish. Journal of Experimental Biology 281, 362–372.

[35]. Nagler, J.J., Bouma, J., Thorgaard, G.H., Duable, D.D., 2001. High incidence of a male-specific genetic marker in phenotypic female chinook salmon from the Columbia River. Environmental Health Perspectives 109, 67–69.

[36]. Nichols, K.M., Young, W.P., Danzmann, R.G., Robison, B.D Rexroad, C., 2003. A consolidated linkage map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Animal Genetics 34, 102–115.

[37]. Ocalewicz, K., Babiak, L., Kasprzycka, B., Dobosz, S., Kuzminski, H Goryczko, K., 2007. Occurrence of two forms of Y chromosome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) males from Rutki strain. Aquaculture 270, 546-551.

[38]. Parsons, J. E., Thorgaard, G. H., 1985. Production of androgenetic diploid rainbow trout. journal of Heredity76, 177-181.

[39]. Phillips, R.B., Rab, P., 2001. Chromosome evolution in the Salmonidae (Pisces): an update. Biological Reviews 76, 1–25.

[40]. Sakamoto, T., Danzmann, R.G., Gharbi, K., Howard, P., Oxaki, A., 2000. A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rates. Genetics 155, 1331–1345.

[41]. Sambrookm, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning: laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

[42]. Scutt, C.P., Kamisugi, Y., Sakai, F., Gilmartin, P.M., 1997. Laser isolation of plant sex chromosomes: studies on the DNA composition of the X and Y sex chromosomes of Silene latifolia. Genome 40, 705–715.

[43]. Shibata, F., Hizume, M., Kuroki, Y., 1999. Chromosome painting of Y chromosomes and isolation of a Y chromosome-specific repetitive sequence in the dioecious plant Rumex acetosa. Chromosoma 108, 266–270.

[44]. Singh, L., Panicker Shirly, G., Nagaraj, R., Majumdar Kshitish C., 1994. Banded krait minor-satellite (*Bkm*)-associated Y chromosome-specific repetitive DNA in mouse. Nucleic Acids Research22, 2289–2295.

[45]. Thorgaard, G.H., 1977. Heteromorphic sex chromosomes in male rainbow trout. Science 196, 900– 902.

[46]. Thorgaard, G.H., 1983. Chromosomal differences among rainbow trout populations. Copeia 650–662.

[47]. Thorgaard, G.H., Bailey, G.S., Williams, D., Buhler, D.R., Kaattari, S.L., 2002. Status and opportunities for genomics research with rainbow trout. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 133, 609–646.

[48]. Tiersch, T.R., Simco, B.A., Davis, K.B., Wachtel, S.S., 1992. Molecular genetics of sex determination in channel catfish: studies on *SRY*, *ZFY*, *Bkm*, and human telomeric repeats. Biology Reproduction 47, 185– 192.

[49]. Tilford, C.A., Tomoko, K.-K., Skaletsky, H., Rozen, S., Brown, L.G., Rosenberg, M., McPherson, J.D., Wylie, K., Sekhon, M., Kucaba, T.A., Waterston R.H., Page D.C., 2001. A physical map of the human Y chromosome. Nature 409, 943–945.

[50]. Ueda, T., Ojima, Y., 1984. Sex chromosomes in the kokanee salmon, *Oncorhynchus nerka*. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 50, 1495–1498.

[51]. Volff, J.N., Schartl, M., 2001. Variability of genetic sex determination in poeciliid fishes.

Genetica 111(1–3), 101–110.

[52]. Wachtel, S., Demas, S., Tiersch, T., Pechan, P., Shapiro, D., 1991. *Bkm* satellite DNA and *ZFY* in the coral reef fish Anthias squamipinnis. Genome 34, 612– 617.

[53]. Williamson, K.S., May, B., 2002. Incidence of phenotypic female chinook salmon positive for the male Y-chromosome specific marker *OtY1* in the Central Valley, California. Journal Aquatic Animal Health 14, 175–183.

[54]. Woram, R.A., Gharbi, K., Danzmann, R.G., Sakamoto, T., Hoyheim, B., 2003. Comparative genome analysis of the primary sex determining locus in salmonid fishes. Genome Research 13, 272–280.

[55]. Young, W.P., Wheeler, P.A., Coryell, V.H., Leim, P., Thorgaard, G.H., 1998. A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids. Genetics148, 839–850.

[56]. Yamamoto, T., 1969. Sex differentiation. In: Hoar, W., Randall, D. (Eds.), Fish Physiology. Academic Press, pp. 117– 175.

[57]. Zhang, Q., Nakayama, I., Fujiwara, A., Kobayashi, T., Oohara, I., Masaoka, T., Kitamura, S., Devlin, R.H., 2001. Sex identification by male-specific growth hormone pseudogene (*GH-Ψ*) in Oncorhynchus masou complex and a related hybrid. Genetica 111, 111–118.