معرفی ترکیب نشانگرهای مولکولی جدید در تعیین جنسیت ماهیان خاویاری به منظور تشخیص جنسیت در سنین مختلف

امید جعفری[1*]، حامد پاکنژاد[2] و مریم نصراله پورمقدم[3]

[1] **ایران، رشت، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری**

[2] **ایران، گرگان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده شیلات و محیط زیست**

[3] **ایران، کرج، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات**

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۱۲

چکیده

تعیین جنسیت ماهیان خاویاری یکی از مهم‌ترین و جذاب‌ترین موضوعات پیش روی محققین شیلاتی و همچنین آبزی‌پروران این حوزه بوده است. تعیین جنسیت مولکولی این ماهیان با استفاده از روش‌های سنتی مرسوم تا کنون نتایج مثبتی را در بر نداشته است در صورتیکه با بوجود آمدن تکنیک‌های جدید توالی یابی موسوم به (NGS) Next generation sequencing، امکان ردیابی و کشف نواحی ژنومی تمایز دهنده جنسیت فراهم گردیده است. پیش از این در دو مطالعه پیشین با استفاده از روش توالی یابی کل ژنوم، نواحی ژنتیکی مرتبط با جنسیت را شناسایی شده و سیستم تعیین جنسیت ZZ/ZW را در این ماهیان مورد تأیید قرار داده شده است. وجود توالی‌های مختلف اختصاصی تعیین جنسیت در ماهیان خاویاری بیانگر وجود نواحی ژنومی متفاوت اختصاصی تعیین جنسیت در گونه‌های ماهیان خاویاری است. مطالعه حاضر ضمن مروری بر تحقیقات انجام شده روی تعیین جنسیت ماهیان خاویاری، فهرست نشانگرهای قابل استفاده در تعیین جنسیت گونه‌های مختلف این ماهیان را جهت استفاده بهره‌برداران و ارتقای صنعت آبزی‌پروری ماهیان خاویاری در اختیار قرار می‌دهد. همچنین با توجه به نتایج دقیق و صحت بالای آزمایشات مولکولی و از سویی عدم آسیب رسانی به ماهی هنگام نمونه برداری، پیشنهاد می‌گردد از نشانگرهای ژنتیکی عمومی AllWsex2 و SM4 در تشخیص جنسیت این ماهیان به عنوان روش جدید و جایگزین روش‌های مرسوم مانند اولتراسونوگرافی و لاپراسکوپی، استفاده گردد.

کلیدواژگان: تعیین جنسیت، ژنومیکس کاربردی، کروموزوم جنسی، ماهیان خاویاری، نشانگر مولکولی.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: Jaafari.omid@yahoo.com

مقدمه

تعیین جنسیت در گیاهان و جانوران عموماً به دو دسته تعیین جنسیت ژنتیکی (سیستم های XY و ZW) و یا تعیین جنسیت محیطی (مانند تعیین جنسیت وابسته به دما) تقسیم‌بندی شده و مکانیزم‌های مولکولی مؤثر بر این دو نوع سیستم تعیین جنسیت به شدت متغیر بوده و مانع از مطالعات تکاملی تعیین جنسیت می‌شود (۱، ۱۴، ۱۸). درک و شناخت مبنای ژنتیکی تعیین جنسیت بطور کلی نیازمند شناخت کروموزوم‌های جنسی، نواحی تعیین کننده جنسیت و یا ژن‌های کلیدی تعیین کننده جنسیت است. با این حال، در ارگانیسم‌های با ژنوم‌های پیچیده و نواحی محافظت شده کوچک و یا کم در کروموزوم‌های جنسی، کشف و معرفی نواحی مرتبط با جنسیت با روش‌هایی مانند RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)، RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)، AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) و SSR (Simple Sequence Repeats) می‌تواند بسیار مشکل باشد، چرا که برخی از این روش‌های قدیمی برای شناسایی چند شکلی‌های DNA وابسته به اندونوکلئازهای محدود کننده کمی هستند که اطلاعات محدودی از نواحی ژنومی فراهم می‌آورند (۲۰).

ماهیان خاویاری (*Acipenseridae*) گونه‌های پلی‌پلوئیدی هستند که تحت فرایندهای کاهشی عملکردی کپی ژنوم

قرار دارند (۷، ۱۶، ۲۶). در حال حاضر مطالعات سیتوژنتیکی هیچ گونه وجود کروموزوم هتروموروفیک جنسی را در ماهیان خاویاری نشان نداده است (۱۰). همچنین هیچ گونه نشانگر DNA و یا توالی اختصاصی جنسیت با استفاده از روش‌های AFLP، RAPD، ISSR و یا روش‌های جدیدتر مانند RAD-seq در بسیاری از ماهیان خاویاری مانند تاس ماهی سیبری (*Acipenser baeri*)، تاس‌ماهی آدریاتیک (*Acipenser naccarii*)، چالباش(*Acipenser gueldenstaedtii*)، استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) (۴، ۲۳)، فیل‌ماهی (*Huso huso*) (۱۱)، تاس‌ماهی دریاچه‌ای (*Acipenser fulvescens*) (۱۷)، قره برون (*Acipenser persicus*) (۲۵)، تاس‌ماهی آمور (*Acipenser schrenckii*) (۲۴) و چینی (*Acipenser sinensis*) (۱۵) شناسایی نشده است. با این حال سیستم تعیین جنسیت ژنتیکی هتروگامتی (ZW/ZZ) در تاس‌ماهی سفید (*Acipenser transmontanus*) (۲۱)، بستر (*H. huso* ♀ × *A. ruthenus* ♂) (۱۹)، تاس‌ماهی دماغ کوتاه (*Acipenser brevirostrum*) (۶)، تاس ماهی سیبری (*Acipenser baerii*) (۸) و شیپ (*Acipenser nudiventris*) (۹) بر اساس ماده-زایی میتوزی گزارش گردیدشده است. بنابراین، این نتایج پیشنهاد کردند که باید برخی تغییرات DNA و یا قطعات کروموزومی بین جنس نر و ماده به لحاظ تئوری وجود داشته باشد. با شتاب سریع در علم ژنومیکس مقایسه‌ای هم اکنون تشخیص نواحی مرتبط با جنسیت در گونه‌های غیر مدل با ژنوم پیچیده بیش از پیش می‌تواند با استفاده از داده‌های ژنومی ردیابی و شناسایی شود.

علاوه بر این، به دلیل عدم وجود نشانه ثانویه جنسی قبل از بلوغ، جنسیت ماهیان خاویاری نمی‌تواند بطور مستقیم به‌وسیله ظاهر و شکل ماهی تشخیص داده شود و در نتیجه برخی روش‌ها مانند اولتراسونیک (۳)، اندوسکوپی (۲۲)، سطوح هورمون های استروئیدی (۵) و تکنیک‌های جراحی (۲) به منظور تشخیص جنسیت ایجاد شدند. با این حال، توسعه یک روش ساده، قابل اعتماد و بدون آسیب مانند روش‌های مولکولی برای تعیین جنسیت ماهیان خاویاری به منظور مدیریت تکثیر این ماهیان کماکان دارای اهمیت است. بنابراین ایجاد روش‌های ژنتیکی جدید به منظور تعیین جنسیت ماهیان خاویاری با همه سختی‌های ناشی از پلوئیدی بودن ژنوم کاملا احساس می‌شود (۴، ۱۲).

امروزه با تکیه بر پیشرفت‌های چشمگیر در علوم ژنومیکس و توالی یابی، امکان توالی یابی ژنوم همه موجودات مدل و غیر مدل فراهم گردیده است. این موضوع زمینه را بیش از گذشته جهت پیدا کردن نشانگرهای اختصاصی و اقتصادی در آبزیان نیز در اختیار محققین قرار داده است؛ به طوری که اخیرا طی دو پروژه مجزا با استفاده از داده‌های حاصل از توالی یابی کل ژنوم، نواحی ژنومی اختصاصی مرتبط با جنسیت در ماهیان خاویاری شناسایی و معرفی شدند. Kuhl و همکاران (۲۰۲۱) در مقاله خود ناحیه ژنتیکی مرتبط با جنسیت را در شش گونه از ماهیان خاویاری شامل فیل‌ماهی، چالباش، تاس‌ماهی سیبری، *Acipenser stuiro*، *Acipenser oxyrinchus* و استرلیاد معرفی کردند (۱۳). این قطعه دارای طولی حدود ۱۰۰ جفت باز بوده و با موفقیت نیز تمایز جنسیت را در شش گونه ذکر شده انجام داده و همچنین وراثت پذیری آن مورد تأیید قرار گرفت. مقاله دیگری که اخیرا در کشور چین نیز بروی هشت گونه از ماهیان خاویاری و یک هیبرید انجام پذیرفت، شش جفت نشانگر حاصل از توالی یابی کل ژنوم را به عنوان نشانگرهای کاندید در تعیین جنسیت معرفی نمودند که از بین این شش جفت نشانگر، دو جفت SM4 و SM6 به عنوان نشانگرهای عمومی (universal) معرفی گردید (۲۰). گونه های مورد مطالعه در مقاله اخیر شامل فیل ماهی، تاس‌ماهی سیبری، چالباش، اوزون برون، استرلیاد، تاس ماهی چینی، تاس‌ماهی یانگتسه و هیبرید (*Acipenser baerii*♀ × *Acipenser schrenckii*♂) بود. توالی نشانگرهای اختصاصی موجود در تعیین جنسیت ماهیان خاویاری در جدول ۱ ارایه گردیده است. از اینرو مقاله حاضر با هدف معرفی و ترویج نشانگرهای ژنتیکی قابل استفاده در تعیین جنسیت ماهیان خاویاری به تحریر درآمده است.

مراحل اجرایی تعیین جنسیت مولکولی

اولین مرحله در تعیین جنسیت ماهیان خاویاری به روش مولکولی استخراج DNA ژنومی با کمیت و کیفیت مناسب می‌باشد. به منظور استخراج DNA ژنومی می‌توان از کیت-های استخراج DNA و یا روش‌هایی مانند روش فنول-کلرفرم استفاده کرد. از اینرو ابتدا مقدار کمی بافت باله ماهی را جدا کرده و در اتانول مطلق فیکس می‌گردد. سپس از روش فنول-کلرفرم به منظور استخراج DNA ژنومی

استفاده می‌شود. پس از آنکه DNA استخراج شد، با استفاده از دستگاه نانودراپ و همچنین ژل آگارز ۱ درصد کمیت و کیفیت DNAهای استخراجی مورد بررسی قرار می‌گیرد.

جدول ۱- لیست نشانگرهای اختصاصی در تعیین جنسیت برخی از گونه‌های ماهیان خاویاری (۱۳، ۲۰)

نام نشانگر	توالی پرایمر	دمای نقطه اتصال (°C)	طول قطعه تولیدی (bp)	گونه	کروموزوم و یا کد کانتیگ (Contig ID)
SSM1	F: ATAACATAGTTCATTAATAATGCCT R: CGCCAACAGTGAATACGTT	56	204	*Acipenser schrenckii*	C10735
SSM2	F: GCCATAACTGTACATATATAGAAC R: CTTTCGATTATGCCGGACA	54	261	*Acipenser schrenckii*	C10907
SSM3	F: TGTGGATCACTCCCAGCAACTCA R: CCAGCACTGTGTTTGTTAACTGCAT	58	158	*Acipenser schrenckii*	C11103
SSM4	F: TCGGTATCTTAAACTGAACCAA R: AGATGGAGAATTCATTGCCTA	56	415	*Acipenser schrenckii, Acipenser sinensis, Acipenser dabryanus, Acipenser baerii, Acipenser gueldenstaedtii, Acipenser ruthenus, Acipenser stellatus, Huso huso*	C11427
SSM5	F: TACCCTTGTAAAGTTTGCCT R: GGCACCTCCTTATATACCCAA	54	199	*Acipenser schrenckii*	C12175
SSM6	F: TAATCAATTGTAAGTCGCCAAG R: ATTTTATTACGGTGAGTATACGAA	52	917	*Acipenser schrenckii, Acipenser sinensis, Acipenser dabryanus, Acipenser baerii, Acipenser gueldenstaedtii, Acipenser stellatus, Huso dauricus,*	C12265
AllWSex2	F: TGATCAACCTCTTCAGCAATGTC R: TGAGAGCCACTGTACTAACACA	56	100	*Huso huso, Acipenser ruthenus, Acipenser sturio, Acipenser oxyrinchus, Acipenser baerii, Acipenser gueldenstaedtii*	Chr 4

دومین مرحله از مراحل تشخیص جنسیت مولکولی ماهیان خاویاری انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از نشانگر معرفی شده می‌باشد. شرایط واکنش زنجیره ای پلیمراز با در نظر گرفتن ۲۵ میکرولیتر حجم واکنش بصورت زیر می‌باشد: ۳۰ الی ۱۰۰ نانوگرم DNA، 10x PCR buffer به میزان ۲/۵ میکرولیتر، DNTP (10 mμ) به میزان ۱ میکرولیتر، پرایمرهای رفت و برگشت هر کدام به میزان ۱ میکرولیتر (10 mμ)، آنزیم Tag DNA polymerase به میزان ۰/۲ میکرولیتر و آب مقطر دوبار تقطیر تا رسیدن به حجم ۲۵ میکرولیتر. مراحل انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بصورت واسرشت سازی (Denaturation) اولیه در دمای ۹۵ دجه سلسیوس به مدت ۳ الی ۵ دقیقه، سپس ۲۵ تا ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، اتصال دو رشته DNA بر اساس دمای بهینه (جدول ۱) به مدت ۳۰ ثانیه و بسط اولیه به مدت ۴۰ ثانیه و در نهایت پس از اتمام چرخه‌ها مرحله بسط نهایی به مدت ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد می‌باشد.

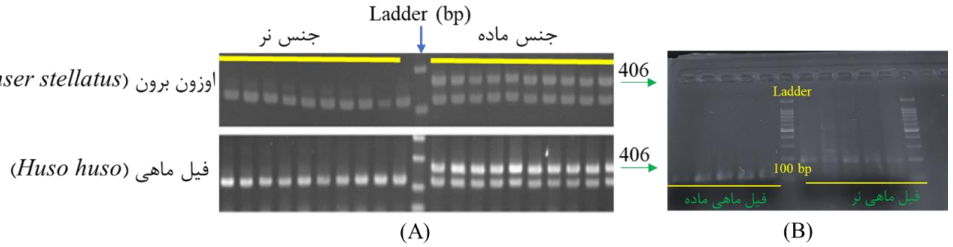
نتایج تعیین جنسیت بر روی ژل آگارز ۱ درصد

به منظور مصورسازی محصول PCR و تشخیص جنسیت نمونه‌های مورد بررسی از ژل آگارز ۱/۵ درصد و با استفاده از روش PCR معمولی استفاده می‌گردد. بر این اساس در نمونه‌های ماده باند DNA بطور مشخص در دامنه وزنی ذکر شده در جدول ۱ تشکیل می گردد و در جنس نر هیچ گونه باند DNA در محدوده مد نظر وجود ندارد (شکل ۱). همانگونه که در شکل ۱ (A) نشان داده شده است جنس ماده فیل ماهی و اوزون برون در دامنه وزنی ۴۰۰ جفت باز (bp) دارای باند واضح بوده درصورتیکه با استفاده از نشانگر AllWSex2 (شکل B) بانده اختصاصی جنس ماده فیل‌ماهی در محدوده ۱۰۰ جفت باز تشکیل شده است.

جمع بندی و ارایه راهکار ترویجی و پژوهشی

تعیین جنسیت ماهیان خاویاری یکی از مهم‌ترین چالش-های پیش روی آبزی‌پروران برای مدت طولانی بوده است چراکه تعیین جنسیت این ماهیان زمان‌بر بوده و در شرایط پرورشی بین ۲ تا ۳ سال زمان نیاز دارد. عمده پرورش دهندگان به دلیل ارزش ذاتی بالای خاویار، تمایل به پرورش جنس ماده این ماهیان دارند در حالیکه عدم اطلاع از جنسیت این ماهیان هزینه‌های هنگفتی را جهت نگهداری و تغذیه این ماهیان بر پرورش دهندگان تحمیل می‌نماید.

از آنجاییکه تعیین جنسیت ماهیان خاویاری به روش‌های سنتی و عمدتا تهاجمی در کشور انجام می‌پذیرد، پیشنهاد می‌شود از روش‌های غیر تهاجمی، آسان و قابل اعتماد مولکولی در این خصوص استفاده شود. از سویی جنسیت این ماهیان در طول زمان ثابت است لذا با تعیین جنسیت این ماهیان در سنین کمتر می‌توان از هدر رفت سرمایه جلوگیری و با تدوین استراتژی‌های مدیریتی و تغذیه‌ای در تولید خاویار با کیفیت بیشتر و سایز بالاتر اقدام نمود. شکل‌گیری مزارع اختصاصی پرورش گوشتی ماهیان خاویاری را می‌توان به عنوان یکی دیگر از مزایای تعیین جنسیت زودهنگام این ماهیان اشاره کرد که اثرات اقتصادی مربوط به خود را نیز در پی دارد. از بین هفت جفت نشانگر مولکولی معرفی شده در این مقاله، نشانگر AllWSex2 و SM4 از خاصیت عمومیت پذیری بیشتری برخوردار بوده و به خصوص در گونه فیل ماهی که به عنوان گونه اصلی ماهی خاویاری پرورشی در ایران می-باشد، پیشنهاد می‌گردد جهت اطمینان کامل از ترکیب هر دو نشانگر ذکر شده در تعیین جنسیت این ماهیان استفاده گردد. کاربرد سواب‌های پنبه‌ای پوستی به جای برش قسمتی از باله به عنوان منبعی از DNA ماهی در آینده می-تواند حتی میزان استرس را در تعیین جنسیت مولکولی ماهیان خاویاری بیش از پیش کاهش دهد. این روش همچنین با کاهش زمان و تلاش مورد نیاز برای پرورش ماهیان به منظور مولدسازی در برنامه‌های فیلدی (ex-situ)، باعث کاهش هزیه‌ها و ارتقای انتخاب مولدین بانک ژن زنده نه تنها بر اساس آلل های نادر بلکه بر اساس جنسیت می‌گردد. در این حالت، ماهی‌هایی که برای ایجاد مولدین انتخاب نشده‌اند، می‌توانند در سن پایین و در چارچوب برنامه‌های بازسازی رهاسازی شوند. از آنجاییکه در حال حاضر تجهیزات مولکولی در مزارع تکثیر و پرورش ماهیان در کشور وجود ندارد، لذا آینده پژوهشی در خصوص کشف متابولیت‌های اولیه و یا ثانویه تولیدی توسط مکان-های ژنتیکی مربوط به جنسیت می‌تواند باعث تولید کیت-های اختصاصی تعیین جنسیت در ماهیان خاویاری شود که به راحتی توسط مزرعه داران و بدون نیاز به تجهیزات خاصی قابل استفاده باشد. همچنین نشانگرهای ژنتیکی اختصاصی کشف شده در جنس ماده ماهیان خاویاری می-توانند نقش مهمی را در مطالعه تکامل کروموزوم جنسی و فرایندهای تعیین جنسیت و حفاظت بیولوژیکی این ماهیان ایفا کند. نسبت جنسیت جمعیت از اهمیت بالایی در جوامع اکولوژیست و حافظان محیط زیست برخوردار است، چراکه تغییرات نسبت جنسیت در جمعیت‌های وحشی دارای اثرات قابل توجهی در سازگاری، پویایی جمعیت و حفاظت تنوع زیستی دارد. پایش نسبت جنسی بطور ویژه از اهمیت بالایی در ارزیابی و مدیریت جمعیت-های وحشی ماهیان خاویاری که علیرغم ممنوعیت صید همچنان سایز جمعیت خود را احیا نکرده‌اند، برخوردار است. از اینرو نواحی ژنومیکی مربوط به جنسیت می‌توانند از کارایی بالایی در مباحث آبزی‌پروری و همچنین ارزیابی و مدیریت ذخایر ماهیان خاویاری برخوردار باشند.



شکل ۱- شناسایی جنس ماده در فیل ماهی و اوزون برون با استفاده از نشانگرهای ژنتیکی اختصاصی تعیین جنسیت (شکل A: نشانگر SM4 در اوزون برون و فیل ماهی؛ شکل B: نشانگر AllWSex2 در فیل ماهی)

منابع

1. Bachtrog, D., Mank, J.E., Peichel, C.L., Kirkpatrick, M., Otto, S.P., Ashman, T.L., Hahn, M.W., Kitano, J., Mayrose, I., Ming, R. and Perrin, N., 2014. Sex determination: why so many ways of doing it? PLoS Biol. 12(7): p.e1001899. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001899.

2. Chen, X.H., Wei, Q.W., Zhu, Y.J., Yang, D.G., Luo, G. and Liu, Y., 2004. Surgical techniques of sex determination in young *Acipenser sinensis*. Shuichan Xuebao. 11(4): 371-374.

3. Du, H., Zhang, X., Leng, X., Zhang, S., Luo, J., Liu, Z., Qiao, X., Kynard, B. and Wei, Q., 2017. Gender and gonadal maturity stage identification of captive Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*, using ultrasound imagery and sex steroids. Gen. Comp. Endocrinol. 245: 36-43. DOI: 10.1016/j.ygcen.2016.08.004.

4. Du, K., Stöck, M., Kneitz, S., Klopp, C., Woltering, J.M., Adolfi, M.C., Feron, R., Prokopov, D., Makunin, A., Kichigin, I. and Schmidt, C., 2020. The sterlet sturgeon genome sequence and the mechanisms of segmental rediploidization. Nat. Ecol. Evol. 4(6): 841-852. https://doi.org/10.1038/s41559-020-1166-x.

5. Feist, G., Van Eenennaam, J.P., Doroshov, S.I., Schreck, C.B., Schneider, R.P. and Fitzpatrick, M.S., 2004. Early identification of sex in cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus*, using plasma steroid levels. Aquaculture. 232(1-4):581-590. https://doi.org/10.1016/S0044-8486 (03)00486-1.

6. 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. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.09.016.

7. Fontana, F., Tagliavini, J., Congiu, L., Lanfredi, M., Chicca, M., Laurente, C. and Rossi, R., 1998. Karyotypic characterization of the great sturgeon, *Huso huso*, by multiple staining techniques and fluorescent in situ hybridization. Mar. Biol. 132(3): 495-501. https://doi.org/10.1007/s002270050415.

8. Fopp-Bayat, D., 2010. Meiotic gynogenesis revealed not homogametic female sex determination system in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt). Aquaculture. 305(1-4): 174-177. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.04.011.

9. Hassanzadeh Saber, M. and Hallajian, A., 2014. Study of sex determination system in ship sturgeon, *Acipenser nudiventris* using meiotic gynogenesis. Aquac Int. 22(1): 273-279. https://doi.org/10.1007/s10499-013-9676-z.

10. Havelka, M., Kašpar, V., Hulák, M. and Flajšhans, M., 2011. Sturgeon genetics and cytogenetics: a review related to ploidy levels and interspecific hybridization. J. Vertebr. Biol. 60(2): 93-103. https://doi.org/10.25225/fozo.v60.i2.a3.2011.

11. Keyvanshokooh, S., Pourkazemi, M. and Kalbassi, M.R., 2007. The RAPD technique failed to identify sex-specific sequences in beluga (*Huso huso*). J. Appl. Ichthyol. *23*(1): 1-2. https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2006.00798.x.

12. Keyvanshokooh, S. and Gharaei, A., 2010. A review of sex determination and searches for sex-specific markers in sturgeon. Aquaculture research, 41(9): 1-7. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02463.x

13. Kuhl, H., Guiguen, Y., Höhne, C., Kreuz, E., Du, K., Klopp, C., Lopez-Roques, C., Yebra-Pimentel, E.S., Ciorpac, M., Gessner, J. and Holostenco, D., 2021. A 180 Myr-old female-specific genome region in sturgeon reveals the oldest known vertebrate sex determining system with undifferentiated sex chromosomes. Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B. 376(1832), p.20200089. https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0089.

14. Li, X.Y. and Gui, J.F., 2018. Diverse and variable sex determination mechanisms in vertebrates. Sci. China Life Sci. 61(12): 1503-1514. DOI: 10.1007/s11427-018-9415-7.

15. Liu, X.Q., Li, S., Xiao, K., Zhao, X., Guo, B., Chen, L. and Du, H., 2015. Screening of sex-specific markers in *Acipenser sinensis* using AFLP. Sichuan Journal of Zoology. 34(5): 714-718. https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.11.012.

16. 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. DOI: 10.1093/genetics/158.3.1203.

17. McCormick, C.R., Bos, D.H. and DeWoody, J.A., 2008. Multiple molecular approaches yield no evidence for sex-determining genes in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). J. Appl. Ichthyol. 24(6): 643-645. https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2008.01156.x.

18. Mei, J. and Gui, J.F., 2015. Genetic basis and biotechnological manipulation of sexual dimorphism and sex determination in fish. Sci. China Life Sci. 58(2):124-136. DOI: 10.1007/s11427-014-4797-9.

19. 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. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.12.004.

20. Ruan, R., Feng, T., Li, Y., Yue, H., Ye, H., Du, H., Liu, Q., Ruan, J., Li, C. and Wei, Q., 2021.

Extensive screening of sturgeon genomes by techniques revealed no sex-specific random screening marker. Aquaculture. 258(1-4): 685-688. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.042.

24. Xiao, T.Q., Lu, C.Y., Li, C., Cheng, L., Cao, D.C. and Sun, X.W., 2014. An AFLP-based approach for the identification of sex-linked markers in Amur sturgeon *Acipenser schrenckii* Brandt, 1869. J. Appl. Ichthyol. 30(6): 1282-1285. https://doi.org/10.1111/jai.12553.

25. Yarmohammadi, M., Pourkazemi, M., Chakmehdouz, F. and Kazemi, R., 2011. Comparative study of male and female gonads in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) employing DNA-AFLP and CDNA-AFLP analysis. J. Appl. Ichthyol. 27(2): 510-513. https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01661.x.

26. Zhou, L. and Gui, J., 2017. Natural and artificial polyploids in aquaculture. Aquacult. Fish. 2(3):103-111. https://doi.org/10.1016/j.aaf.2017.04.003.

Screening and identification of female-specific DNA sequences in octaploid sturgeon using comparative genomics with high-throughput sequencing. Genomics. 113(6): 4237-4244. DOI: 10.1016/j.ygeno.2021.11.012.

21. 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. J. Hered. 90(1): 231-233. DOI:10.1093/jhered/90.1.231.

22. Wildhaber, M.L., Papoulias, D.M., DeLonay, A.J., Tillitt, D.E., Bryan, J.L., Annis, M.L. and Allert, J.A., 2005. Gender identification of shovelnose sturgeon using ultrasonic and endoscopic imagery and the application of the method to the pallid sturgeon. J. Fish Biol. 67(1): 114-132. https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2005.00719.x.

23. Wuertz, S., Gaillard, S., Barbisan, F., Carle, S., Congiu, L., Forlani, A., Aubert, J., Kirschbaum, F., Tosi, E., Zane, L. and Grillasca, J.P., 2006.

Report on the new set of sturgeons' sex determination molecular markers to identify sex in different age classes

Jafari O.[1*], Paknejad H.[2] and Nasrolahpourmoghadam M.[3]

[1] International Sturgeon Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Rasht, Iran

[2] Faculty of fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

[3] Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

[*]Jaafari.omid@yahoo.com

Abstract

Sex determination of sturgeons is one of the most appealing subjects towards both fisheries researchers and fish farmers. Molecular sex identification of these fishes using traditional methods have not had positive results, while due to the new advanced genome sequencing approaches known as NGS, it is now possible to detect and track the sexually divergent regions. Hence, based on the whole genome sequencing approach in two distinct studies, genomic regions harboring sex information in sturgeons were characterized and confirmed the ZZ/ZW sex-determination system in sturgeons. The presence of different sex-specific sequences in sturgeons indicates the presence of different sex-specific genomic regions for sturgeons. In the present paper, in addition to review the conducted studies on sturgeon's sex identification, an applicable list of newly found genetic markers in sex determination of sturgeons are presented towards the beneficiaries and to improve the aquaculture industry of sturgeons. Furthermore, considering the high-quality results obtained by molecular tools in one hand and non-invasive feature of this method during sampling on the other hand, the usage of new universal markers namely AllWsex2 and SM4 is highly suggested as a novel technique in sturgeons' sex determination in replace of traditional approaches such as ultrasonography and laparoscopy.

Keywords: Functional genomics, Molecular marker, Sex determination, Sex chromosome, Sturgeons.