دو فصلنامه
بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی
سال پنجم، شماره ۱ و ۲، بهار و تابستان ۱۳۹۵

کاربرد روش مولکولی PCR_RAPD در تشخیص جنسیت ماهی سفید (*Rutilus frisii Kutum*)

ساره رضی کاظمی[۱]، مینا رمضانی*[۲]، محمد پور کاظمی[۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد پیام نور، تهران، ایران
[۲] دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز، تهران، ایران
[۳] مرکز تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت، ایران

چکیده

جهت شناسایی و تفکیک جنسیت ماهی سفید، تعداد ۵ نمونه از باله دمی ماهیان نر و ماده بالغ نمونه برداری شد و DNA آنها به روش استات آمونیوم استخراج گردید. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز (۱٪) و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید تعیین شد. جهت مطالعه ساختار ژنومی ماهی سفید و تکثیر ژن‌های هسته ای، واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از ۱۲۴ پرایمر ۱۰ نوکلئوتیدی انجام شد و محصول PCR با ژل پلی آکریل آمید ۶٪ الکتروفورز شد و سپس با نیترات نقره رنگ آمیزی گردید. باندهای DNA به تفکیک شمارش گردید و سپس به روش RAPDPLOT مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که از ۱۲۴ پرایمر استفاده شده، تعداد ۴۴ پرایمر، هیچ گونه باندی تولید نکرد، در حالیکه ۸۰ پرایمر دیگر باندهای DNA به طور واضح و مشخص تولید کردند. در این بررسی مجموعا ۱۶۰۰ عدد باند شمارش گردید که در مقایسه بین نمونه های ماهیان نر و ماده الگوی باندی یکسان در هر دو جنس مشاهده شد. با توجه به نتایج حاصله و محاسبات آماری، مشخص گردید که روش RAPD قادر به جداسازی و معرفی نشانگر مولکولی برای تمایز جنسیت این گونه نبود. عدم شناسایی نشانگر جنسیت در ماهی سفید می‌تواند احتمالا به دلیل عدم وجود کروموزومهای جنسی در این گونه باشد و یا اینکه ژنهای کنترل کننده جنسیت بر روی کروموزومهای اتوزومی مختلف پخش شده اند که با عوامل محیطی به طور مشترک در بروز تعیین جنسیت ماهی سفید دخالت دارند.

واژه‌های کلیدی: تعیین جنسیت، نشانگر مولکولی، ماهی سفید *Rutilus frisii Kutum*، دریای خزر

مقدمه

ماهی سفید با نام علمی *Rutilus frisii* Kutum، ماهی استخوانی نیمه مهاجر و آنادروموس است که برای تخم ریزی از دریای خزر به رودخانه‌های مختلف شمال کشور مهاجرت می کند و به عنوان یکی از ماهیان مهم اقتصادی و تجاری بومی دریای خزر جنوبی به شمال می‌رود. علاوه بر دریای خزر، ماهی سفید در رودخانه های کرانه های شمالی دریای سیاه نیز پراکنش دارد. اهمیت اقتصادی صید این

* **مسئول مکاتبات:** Mina.ramezani@gmail.com

ماهی در میان صیادان بسیار زیاد بوده به طوریکه نزدیک به ٦٠٪ درآمد صیادان را تامین می‌کند (۲). طی دهه‌های گذشته در اثر برداشت بی رویه از ذخایر این گونه، هم چنین افزایش تقاضا برای آبرسانی مزارع برنج که منجر به کاهش سطح آب رودخانه در زمان تخم ریزی و مهاجرت این ماهیان شده است (۱)، احداث پل، سد و رود، ورود انواع آلاینده های شیمیایی و تخریب مناطق تخم ریزی، سبب شده که ذخایر این ماهیان روند کاهشی را طی نماید. سازمان شیلات ایران با توجه به اهمیت این ماهی اقدام به بازسازی ذخایر آن نموده و سالانه بیش از ۲۵۰ میلیون عدد بچه ماهی از این گونه را تکثیر و به رودخانه‌های منتهی به دریای خزر رهاسازی می کند (۳).

تا کنون نشانگرهای جنسیت در ماهیان به چند روش مطالعه و شناسایی شده است. از جمله استفاده از نشانگرهای فنوتیپی در ماهی گوپی *(P.reticulate)*، نظیر نشانگرهایBcp و Rtd صفت غالب وابسته به کروموزوم Y (۱۱)، نشانگرها پروتئینی، جایگاه HEX-2 و SOD_1sدر قزل آلای رنگین کمان (۵)، نشانگرهای سیتوژنتیکی و کاریوتایپ ماهیان و مشاهده کروموزوم‌های جنسی هترومورفیک در ماهی مداکا *(oryzas latupes)*(۱۸)، محاسبه نسبت جنسی نتایج حاصل از تلاقی‌های مختلف و انجام دستکاری‌های کروموزومی نظیر ماده‌زایی (۹)، تعیین جنسیت به روش کلون سازی جایگاهی در ماهی زیفوروس (*X. maculates*)، نشانگرهای مولکولی از قبیل هیبریداسیون DNA در قزل آلای رنگین کمان و ماهی آزاد کوهو (*Oncorynchus kisutch*) (١٤)، روش Amplified fragment Length Polymorphism (AFLP)، دو نشانگر جنسی کروموزوم Y در ماهی سه خاره *(Gasterostevs aculea)* (۱۳). معرفی نشانگرهای جنسیت با استفاده از روش تکثیر چند شکلی تصادفی (Random Amplified Polymorphic DNA) یا RAPD در تیلاپیای نیل *(Oreochromis niloticus)*، قزل آلای رنگین کمان، گربه ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*)، ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*)، پف ماهی (*Tetradon nigrovirids*) و فیل ماهی (*Huso huso*) را نام برد (٤، ٦،١٦،١٧ و ٢٤).

روش رپید کابردهای متعددی در علوم مختلف و همچنین علوم شیلاتی دارد، از جمله برای شناسایی نشانگرهای جنسی در آبزیان (١٤)، تهیه نقشه های ژنتیکی و نقشه جایگاه مقاومت به سرما در ماهی (۲۱)، شناسایی گونه ها، تعیین تنوع و فاصله ژنتیکی جمعیت های مختلف آبزیان (۸ و ۱۵)، روابط فیلوژنتیکی (۷)، تشخیص بیماری و شناسایی عامل بیماریزای ماهی را می توان نام برد. به منظور شناسایی نشانگرهای جنسی، حداقل از ٤٠ پرایمر ۱۰ نوکلئوتیدی که دارای توالی تصادفی و حاوی ۵۰ تا ۷۰٪ G+C هستند استفاده می شود. از مزیت‌های این روش می توان به سرعت بالا، عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد ردیف DNA جهت طراحی آغازگر، عدم به کارگیری مواد رادیواکتیو، نیاز به مقدار ناچیزی DNAو به کار بردن آغازگرهای یکسان برای گونه های مختلف اشاره کرد. از معایب آن، تکراری پذیری ضعیف باندهای ایجاد شده، حساسیت فوق العاده به آلودگی و غالب بودن آن اشاره کرد (۲۲).

تا کنون ۹ دستگاه تعیین جنسیت در ماهیان گزارش شده است (۲٤). ولی علیرغم اهمیت شیلاتی، اقتصادی و تنوع زیستی ماهی سفید در یای خزر متاسفانه تاکنون مطالعه ای در خصوص سیستم دستگاه تعیین جنسیت این گونه صورت نگرفته است. از آنجائیکه تکثیر طبیعی ماهی سفید در رودخانه به حداقل رسیده و ذخایر این گونه عمدتا از طریق تکثیر مصنوعی و رهاسازی بچه ماهی بازسازی و احیا می گردد و با توجه به تغییر در نسبت جنسیت و کاهش طول مولدین ماهی سفید بویژه در جنس نر ضروری است مکانیسم تعین جنسیت در این گونه بطور کامل مورد مطالعه قرار گیرد تا مشخص شود که تغیر در نسبت جنسیت مولدین ماهی سفید (کاهش شدید مولدین نر در برخی رودخانه ها) در اثر تلاقی خویشاوندی (Inbreeding) است و یا در اثر سایر عوامل از جمله عوامل محیطی و یا ترکیبی از این دو در این امر نقش دارند.

هدف از این بررسی، شناسایی و امکان جداسازی نشانگر مولکولی مبتنی بر DNA برای تشخیص جنسیت ماهی سفید دریای خزر با استفاده از روش PCR-RAPD می باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری ازبافت باله دمی ۵ عدد ماهی سفید نر و ۵ عدد ماهی سفید ماده بالغ در فصل تکثیر در مرکز تکثیر و پرورش ماهی سفید شهید انصاری رشت انجام شد. بدین منظور مقدار ۳-۲ گرم از بافت نرم باله دمی با قیچی بریده داخل تیوپ های ۱/۵ میلی لیتری حاوی الکل ۹٦٪ قرار داده شد. بمنظور ارزیابی مارکر جنسیت احتمالی بچه ماهیان، تعداد ۱۰ عدد مولد نر با تعداد ۱۰ عدد مولد ماده ماهی سفید تلاقی داده شد و از هر یک از مولدین نمونه باله جمع‌آوری گردید. تخم های لقاح یافته مراحل رشد را در انکوباسیون طی کرده و پس از طی ۷۲ تا ۹٦ ساعت، لاروها تخم گشایی شدند و از هر عدد لارو تعداد ۲۰ نمونه جمع آوری و در الکل اتیلیک ۹٦٪ قرار داده شد. کلیه نمونه ها جهت استخراج DNA به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان (وافع در رشت- جوار سد سنگر) منتقل گردید. در این بررسی از روش استات آمونیوم برای استخراج DNA استفاده گردید (۱۹). به منظور سنجش کمیت و کیفیت DNAاستخراج شده از روش اسپکتروفوتومتری نانودراپ مدل (ND1000) در طول موج‌های ۲٦۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ استفاده گردید. پس ازآن تنظیم غلظت نمونه های DNAبه میزان ۵۰ نانو گرم در میکرولیتر با استفاده از آب مقطر دو بار تقطیر انجام شد. درآزمایشات PCR از ۱۲٤ پرایمر تصادفی ده نوکلئوتیدی استفاده شد. در هر واکنش حجم نهاییPCR معادل ۵۰ میکرولیتر از 5u/µl آنزیم Taq DNA پلیمراز (سیناژن)، Mgcl2 50mM، PCR Buffer در غلظت ۱۰x، dNTP Mix ۱۰ میلی مولار، آب مقطر دو بار تقطیر و ۵۰ نانوگرم DNA استفاده شد. سپس چرخه‌های حرارتی در دستگاه PCR در سه دما: واسرشته سازی اولیه، ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه، واسرشته سازی،۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال پرایمرها ۳۳ درجه سانتی‌گراد به مدت نیم دقیقه، بسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه انجام

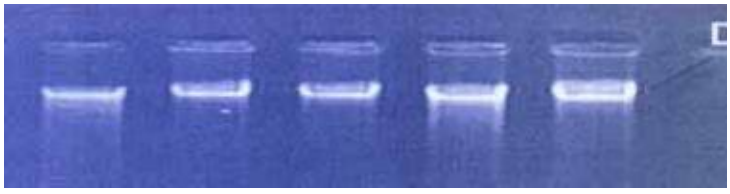
شد. جهت ارزیابی محصول PCR و تفکیک باندهای DNAتولید شده از ژل پلی آکریل آمید ٦٪ و رنگ آمیزی با نیترات نقره استفاده شد (۲۰۱۵).

پس از پایان الکتروفورز، ژل های پلی آکریل آمید با استفاده از روش نیترات نقره و سه بافر A,B,C رنگ آمیزی شدند. در صورت وجود باندهای DNA امتیاز ۱ و در صورت عدم وجود امتیاز صفر داده شد. برای مقایسه شباهت و تفاوت بین ماهیان نر و ماده از باندهای شمارش شده روش RAPDPLOT و با بهره گیری از برنامه کامپیوتری RAPDBIOSYS برای آنالیز آماری استفاده شد.

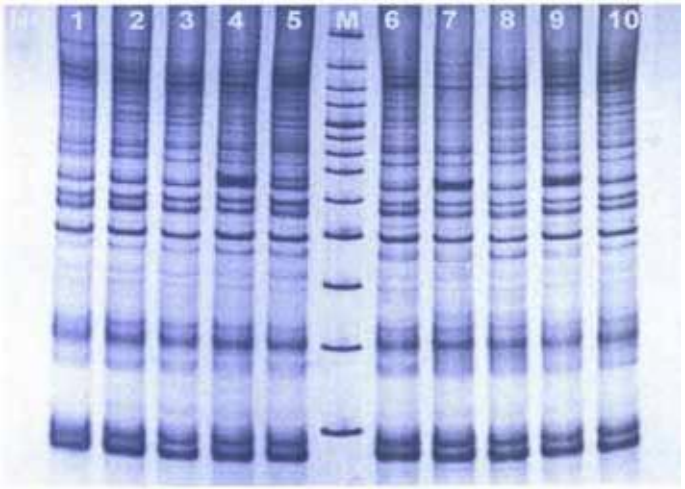
نتایج

میزان جذب DNA در تمام نمونه های استخراج شده در طول موج ۲٦۰ نانومتر و طول موج ۲۸۰ نانومتر مشخص نمود که نسبت آنها بالاتر از ۱/۷ و کمتر از ۱/۹ بود و برای انجام مطالعات RAPD مناسب می باشند. بررسی باندهای DNA بر روی ژل آگارز و مشاهده وضوح باندهای تولید شده نشان داد که نمونه های DNA از کیفیت و کمیت قابل قبولی برای استفاده در آزمایشات PCR برخوردار هستند (شکل ۱).

از ۱۲٤ پرایمر استفاده شده تعداد ٤٤ عدد از آنها هیچ گونه باندی تولید نکردند. سایر پرایمرهای آزمایش شده باندهای مشخصی تولید نمودند که اندازه تقریبی آنها بین ۱۰۰ تا ۲۵۰ جفت باز بود (شکل ۲ و ۳). در مجموع ۱٦۰۰ باند شمارش گردید. پرایمر شماره ۳۰ کمترین تعداد باند DNA(۲ باند) پرایمر D8 بیشترین تعداد باند (۳۰ باند) را تولید نمودند. هر پرایمر به طور متوسط ۱۳ باند تولید کرد.



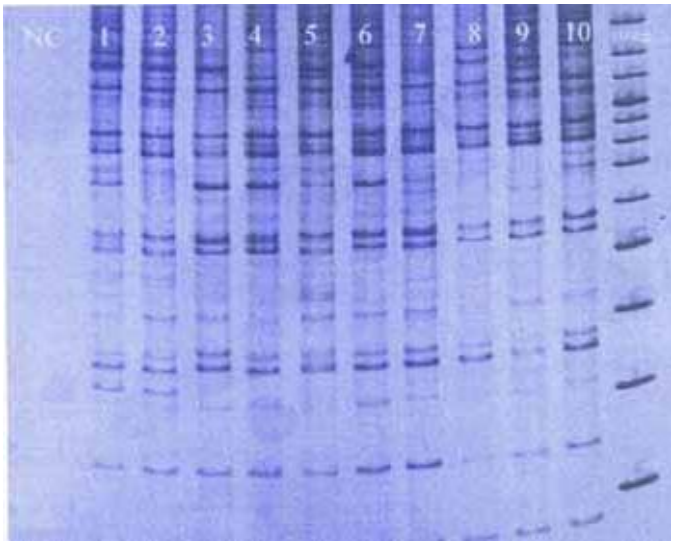
شکل ۱: DNA ماهی سفید، الکتروفورز شده بر روی ژل آگارز ۱٪



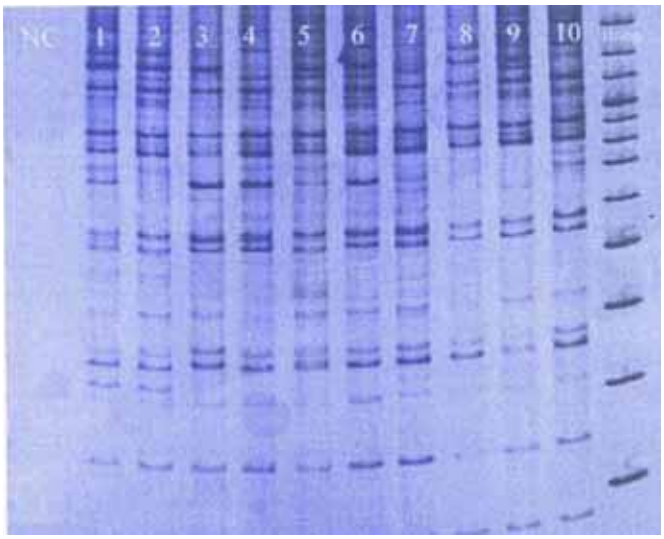
شکل ۲: محصول PCR با استفاده از آغازگر A7، ستون‌های ۱ تا ۵ نمونه ماهی سفید نر، ستون‌های ٦ تا ۱۰ نمونه ماهی سفید ماده، NC نمونه کنترل منفی و M مارکر مولکولی (۱۰۰ جفت باز) است.

الگوی باندی کلیه آغازگرهای مورد بررسی به جز آغازگر شماره ٥٤ در دو جنس نر و ماده یکسان بود، پرایمر ٥٤ تنها پرایمری بود که باندی با اندازه تقریبی ۳۵۰ جفت باز در DNAافراد ماده تولید نمود که در الگوی باندی جنس نر مشاهده نشد ولی با تکرار آزمایش این روند تداوم نداشت و عملا مارکرDNA جهت تمایز ماهیان نر و ماده ماهی سفید دریای خزر مشاهده نشد (شکل ٤).

با توجه به یکسان بودن باندهای شمارش شده در جنس نر و ماده، آنالیز آماری RAPDPLOT تمایز در حد صفر را برای تفکیک دو جنس نشان داد.



شکل ۳: محصول PCR با استفاده از آغازگر N15، ستونهای ۱ تا ۵ نمونه ماهی سفید نر، ستونهای ٦ تا ۱۰ نمونه ماهی سفید ماده، NC نمونه کنترل منفی و M مارکر مولکولی (۱۰۰ جفت باز) است.



شکل ٤: محصول PCR با استفاده از آغازگر ٥٤، ستون‌های ۱ تا ۵ نمونه ماهی سفید نر و ستون‌های ٦ تا ۱۰ نمونه ماهی سفید ماده، NC نمونه کنترل منفی و M مارکر مولکولی (۱۰۰ جفت باز) است.

بحث

مارکرهای DNA ابزار مفیدی برای ارزیابی پیوستگی جنسیت در آبزیان فراهم می نماید، زیرا ساختار ژن و DNA با تغییر شرایط فیزیولوژیک یا محیطی تغییر نمی‌کند. تحقیقات زیادی جهت مشخص شدن مکانیسم تعیین جنسیت در ماهیان استخوانی انجام شده است که دلیل آن وجود انواع مختلفی از مکانیسم‌های تعیین جنسیت است. طبق مطالعات انجام شده، در حال حاضر دو سیستم تعیین جنسیتXY و ZW در کپور ماهیان گزارش شده است(۹).

تا کنون روش RAPDدر بیش از ۱۰۰ گونه برای تعیین مارکر تشخیص جنسیت به کار رفته است. به عنوان مثال در گونه های تیلا پیای نیل *Oreochromi niloticus* (٦) و گربه ماهی *Clarias gariepinus* (١٦) و قزل آلای رنگین کمان *Oncoryhnchus mykiss* (١٤) و گوپی *Poecilia reticulate*. (١٠). همچنین چندین نشانگر وابسته به کروموزوم Y در گونه‌های مختلفی از پرندگان و پستانداران با این روش شناسایی شده است (٢٣).

در این بررسی با ارزیابی محصول PCR و باندهای واضح با اکثر پرایمرها مشخص شد که نمونه‌های DNA استخراج شده از کیفیت مناسبی برخوردار بوده و استات آمونیوم روش مناسبی برای استخراج DNA در آزمایشهای RAPD است. در مطالعه حاضر از ١٢٤ پرایمر استفاده شده ٨٠ پرایمر باندهای واضح تولید نمودند و ٤٤ پرایمر هیچ گونه باندی را تولید نکردند. عدم تولید باند توسط پرایمرهای مذکور می تواند دلایل مختلفی از جمله نا مناسب بودن شرایط واکنش داشته باشد. از آنجائیکه آزمایش PCR در سه دمای متفاوت (٣٣،٣٦ و٣٨ درجه سانتی‌گراد) تکرار شد و در هر سه دمای مورد آزمایش باند DNA تولید نگردید و در هر سه تکرار نمونه حاوی کنترل مثبت باند DNA تولید نمود، لذا به نظر می‌رسد شرایط واکنش مطلوب بوده و علت عدم تولید باند می‌تواند به خاطر عدم پهلوگیری پرایمرها باشد که ٤٤ پرایمر چنین شرایطی را داشتند.

با توجه به شناسایی سیستم تعیین جنسیت در تعدادی از ماهیان استخوانی و برخی از خانواده کپور ماهیان، انتظار بر آن بود که بتوان با ١٢٤ پرایمر (معمولا بین ٣ تا٤٠٠ پرایمر استفاده می‌شود) و با استفاده از روش رپید، مارکر تعیین جنسیت را در گونه ماهی سفید دریای خزر شناسایی کرد. ولی با شمارش حدود ١٦٠٠ باند DNA حاصله مشخص شد که هیچکدام مربوط به ژن مارکر مولکولی تعیین جنسیت نبوده است. کیوان شکوه و همکاران (١٣٨٣) با استفاده از ٣٠٠ پرایمر مختلف و شمارش حدود ٤١٤٦ باند مربوط به گونه فیل ماهی (*Huso huso*)، تفاوتی را در جنس نر و ماده این ماهی مشاهده نکردند (٤). Wurtz و همکاران (٢٠٠٦)، با همکاری سه موسسه و چهار آزمایشگاه تحقیقاتی از سه کشور اروپایی، ژنوم نر و ماده ٤ گونه ماهی خاویاری را با تکنیک های مختلف از جمله روش رپید مورد بررسی قرار دادند ولی هیچ مارکر جنسیتی مشاهده نشد (٢٥).

در این بررسی تعداد ١٢٤ پرایمر استفاده شد که جزء مطالعات با تعداد زیاد پرایمر به شمار می‌رود و نشان دهنده اینست که از تعداد کافی و لازم برای شناسایی مارکر جنسی ماهی سفید استفاده شده است. به عنوان مثال Congiu در سال ٢٠٠٠ از ٦ پرایمر

(۸)، Callejas در سال ۲۰۰۲ از ۱۰ پرایمر (۷) و Bardakci در سال ۲۰۰۰ از ۱٤۰ پرایمر (٦) استفاده نمودند.

از لحاظ تئوری، علت عدم شناسایی و جداسازی مارکر مولکولی تعیین جنسیت در ماهی سفید دریای خزر می‌تواند عدم وجود سیستم تعیین جنسیت ژنتیکی و فعال بودن سیستم تعیین جنسیت محیطی در این گونه باشد که در این حالت عوامل متعددی نظیر درجه حرارت، مدت زمان تابش نور، شوری، pH و سایر متغیرهای فیزیکی می‌تواند جنسیت یک فرد را تعیین کند. از علل دیگر می‌توان به وجود ضعفهایی در روش رپید از جمله حساسیت بسیار به آلودگی، دشواری امتیاز دهی به باندهای ایجاد شده بر روی ژل، غالب بودن نشانگرها و عدم امکان تشخیص سیستم آللی، نا معلوم بودن جایگاه نشانگرهای رپید بر روی نقشه های ژنتیک، نامعلوم بودن قرابت و شباهت باندهایی که بر روی ژل الکتروفورز مهاجرت مشابهی دارند بر شمرد که همه موارد موجب محدودیت روش رپید به موارد خاص می‌شود. لذا جهت اعلام دلیل قطعی، نیاز به مطالعات دقیق و جامع تری از لحاظ ژنتیکی و محیطی است. لذا پیشنهاد می گردد از سایر روش‌های مولکولی نظیر AFLP ،روش ساترن بلات و استفاده از توالی‌های جنسی شناخته شده در ماهیان و سایر گونه‌های جانوری به عنوان کاوشگر، مانندکاوشگر P9 در ماهی آزاد کوهو (*Oncorynchus kisutch*) (١٤) و روش کلونینگ نقطه ای در ماهی زیفوفوروس (*X. maculatus*) (۱۲)، در تشخیص جنسیت ماهی سفید دریای خزر استفاده گردد. روش تلاقی و شمارش نسبت جنسیت در فرزندان در ۲۰ تا ۵۰ خانواده قویا توصیه می گردد تا نتایج این بررسی با نتایج مطالعات مولکولی با همدیگر مورد مقایسه و تطبیق قرار گیرد.

نتیجه گیری

در جمع‌بندی می‌توان اعلام نمود که نتایج حاصل از اجرای این پژوهش نشان داد که تفکیک جنسیت ماهی سفید نر و ماده با استفاده از ١٢٤ جفت پرایمر به کار رفته در این تحقیق امکان پذیر نشد که با توجه به الگوی باندی یکسان در هر دو جنس نر و ماده به نظر می رسد احتمالا کروموزوم‌های جنسی در ماهی سفید وجود نداشته و یا در صورت وجود، نقاط بسیار کمی بر روی آنها قرار دارد. حالت دیگر اینکه ژن‌های کنترل کننده جنسیت ماهی سفید را می‌توان بر کروموزوم‌های مختلف پخش شده فرض نمود که به صورت مشارکتی در بروز جنسیت دخالت می‌نمایند. با توجه به نتایج این بررسی، پیشنهاد می‌گردد که در صورت استفاده از روش RAPD از پرایمرهای بیشتری به منظورشناسایی شناسایی نشانگرهای جنسی ماهی سفید دریای خزر استفاده گردد.

منابع

۱- آذری تاکامی، ق. (۱۳۷۸). اصول تکثیر و پرورش ماهی، انتشارات معاونت شیلات آبزیان، سازمان تکثیر و توسعه آبزیان، ۱۵۲ص.

۲- رضوی صیاد، ب.ع. (۱۳٦۹). ارزیابی و مدیریت ذخایر ماهیان اقتصادی دریای مازندران. سازمان تحقیقات شیلات گیلان، بندر انزلی، ۸٦ص.

۳- عبدالملکی، ش و غنی نژاد، د. (۱۳٦۸). رهاکرد بچه ماهی سفید و نقش آن در بازسازی ذخایر این ماهی در سواحل ایرانی دریای خزر، ماهنامه آبزیان، سال هشتم، ١٤-٨ ص.

٤- کیوان شکوه، س. پورکاظمی، م و کلباسی، م.ر. (۱۳۸۳). بررسی امکان تشخیص جنسیت فیل ماهی(*Huso huso*) با استفاده از روش PCR-RAPD . مجله علمی شیلات ایران، شماره ۱، سال سیزدهم، ١٦٢-١٤٩ ص.

5- Allendorf F.W., Gellman W.A. Thorgard G.H. 1994. Sex-linkage of two enzyme loci in *Oncorhynchus mykiss* (Rainbow trout). *Heredity* 72,498-507.

6- Bardakci F. 2000. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in sex discrimination in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichelida). Turk J Biol, 24(2), 169-75.

7- Callejas C, Ochando MD. 2002. Phylogenic relationships among Spanish barbus species (pisces, Cyprinidae) shown by RAPD markers. Heedity 89, 36-43.

8- Congiu L, Rossi R, Colom G. 2002. Population analysis of the sand smelt *Altherina boyeri* (tleostei, altherinidae), from Italian coastal logoons by random amplified polymorphic DNA. Marine Eccology, 1, 229,279-89.

9- Devlin R.H., Nagahama Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental in fluencies. *Aquaculture*, 208,191-394.

10- Dinesh K.R., Pang V.P., Lim T.M., Chua L., Tan T.W. 1994. DNA amplification fingerprinting in the Guppy (Poecilia reticulate). Asian fisheries society, p. 504-507.

11- Fernando A.A., Phang V.P.E. 1989. Inheritance of the tuxedo and blond tuxedo color pattern phenotypes of guppy, Poecilia *reticulate*. Proceeding of the Second Asian Fisheries Forum, Tokyo, Japan. P.487-90.

12- Fernando A., Kortin C., Aoki T., Asakawa S. 2005. Construction and initial analysis of bacteria artificial chromosome (BAC) Cotig from the sex determination region of the platyfish *Xiphophoorus maculates*. *Gene*, 295, 247-54.

13- Griffiths R., Orr K.J., Adam A., Barber I. 2000. DNA sex identification in the three-spine stickleback. *J Fish Biol*, 57, 1331-34.

14- Itura P., Lam N., Fuente M., Vergara N., medrano J.F. 2001. Characterization of sex chromosomes in rainbow trout and coho salmon using fluorescent in situ hybridization (FISH). *Genetica*, 111, 125-31.

15- Keynanshokooh S., Kalbasi M.R. 2006. Genetic variation of *Rutilus caspicus* (Jakowlew 1870) population in Iran based on random amplified polymorphic DNA markers: *Aquaculture research*, 37, 1437-40.

16- Kovacs b., Egedi S., Bartfai R., Orban L. 2001. Male-specific DNA markers from African cat fish (*Clarias gariepinus*). *Genetica*, 110, 267-76.

17- Li Y., Hill J.A., Yue G.H., Chen F., Orban L. 2002. Extensive search does not identify genomic sex markers in *Tetradon nigroviridis*. *J* of *Fish Biol*, 61, 1314-17.

18- Matsuda M., Matsuda C., Hamaguchi S., Sakaizumi M. 1998. Identification of the sex chromosomes of the medaka, *Oryzias latipes*, by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 82, 275-62.

19- Mc Quown E.A., Destombe C., Quillet M.C., Valero M. 1999. Identification of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers highly linked to sex determination in the red alga *Gracilaria gracilis*. Molecular Ecology. 8, 1533-38.

20- Pourkazemi M. 1996. Molecular and biochemicalgenetic analysis of sturgeon stocks from the sought Caspian Sea. PhD thesis, University of Wales, Swansea.

21- Sun X., Liang L. 2003. A genetic linkage map of common carp *(Cyprinus carpio* L.) and mapping of a locus associated with cold tolerance. *Aquaculture*, 238, 165-72.

22- Tave D. 1993. Genetics for fish hatchery managers 2nd ed. Van Nostrand Reinhold Press, Newyork. P.415.

23- Wardell B., Sudweeks J.D., Meeker N.D., Estes S.S., Woodward S.R., Teuscher C.

1993. The identification of Y chromosome-linked markers with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18, 7213-18.

24- Welsh J., Mc Clelland M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acid Research, 18, 7213-18.

25- Wurtz S., Gaillard S., Barbisan F., Carle S., Cogiu L., forlani A., et. al 2006. Extensive screening of sturgeon genomes by random screening techniques revealed no sex-specific marker. *Aquaculture*, 258, 685-88.