



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره چهارم، شماره دوم، تابستان ۹۵

<http://jair.gonbad.ac.ir>

مروری بر روش‌های متداول تعیین جنسیت و مراحل رسیدگی جنسی تاس‌ماهیان (Acipenseridae): مزایا و معایب

رضوان‌اله کاظمی^{۱*}، مهتاب یارمحمدی^۱، علی حلاجیان^۲

^۱استادیار پژوهشی مؤسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران
^۲کارشناس ارشد مؤسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران
تاریخ ارسال: ۹۵/۵/۴؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۱۸

چکیده

مطالعات مختلف در خصوص تعیین جنسیت و مراحل رسیدگی جنسی ماهیان خاویاری به‌ویژه در مراحل اولیه زندگی نشان داد که برخی از روش‌ها مانند تکه‌برداری، سوند و آندوسکوپی علاوه بر هزینه بالا، سبب آسیب‌های شدید فیزیکی به ماهی می‌شوند. روش‌های مختلف ژنتیکی نیز فاقد کارایی لازم جهت تشخیص جنسیت تاس‌ماهیان می‌باشند. روش‌هایی چون اندازه‌گیری صفات مورفومتریک و تصویربرداری از سوراخ تناسلی از دقت اندازه‌گیری مناسب برخوردار نیستند. همچنین استفاده از الگوی هورمون‌های استروئیدی جنسی و دیگر پارامترهای بیوشیمیایی خون و نیز سونوگرافی اگرچه تا حدی می‌توانند در مراحل بالای رسیدگی جنسی، سبب جداسازی نر و ماده از یکدیگر شوند، اما در مراحل پایین فاقد این دقت بوده، روش‌هایی زمان‌بر، هزینه‌بر و نیازمند تخصص و نیروی ماهر می‌باشند. مطالعات نشان داده است که بر پایه اهداف مورد نظر و شرایط سنی و وزنی ماهی، روش‌های مختلف تشخیص جنسیت و تعیین مراحل رسیدگی جنسی، می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند. به‌طور کلی، روش‌های لاپاراسکوپی و اولتراسوند که به‌ترتیب از گروه روش‌های کم‌تهاجم و غیرتهاجمی می‌باشند، فناوری‌های بسیار مناسب برای جداسازی ماهیان نر از ماده در گروه‌های مختلف سنی تاس‌ماهیان محسوب می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: Acipenseridae، تعیین جنسیت، تکه‌برداری، اولتراسوند، لاپاراسکوپی

*مسئول مکاتبه: Rezkazemi2000@yahoo.com

مقدمه

افزایش فزاینده جمعیت انسانی کره زمین از یک سو سبب برداشت بیش از حد، تخریب و تصرف زیستگاه‌های طبیعی به‌ویژه مکان‌های زادآوری جوامع گیاهی و جانوری و در نتیجه کاهش شدید تولید طبیعی و از سوی دیگر باعث افزایش تقاضا به‌ویژه پروتئین و به‌طور خاص پروتئین سفید شده است (FAO, 2010).

تاس‌ماهیان از کهن‌ترین و اقتصادی‌ترین ماهیان آب‌های نیمکره شمالی هستند که به گروه ماهیان غضروفی - استخوانی تعلق دارند (Dettlaff *et al.*, 1993). این گروه از ماهیان در دوره کربونیفر، پا بر عرصه وجود نهادند (McEnroe and Ceeh, 1985). کاهش شدید جمعیت ماهیان خاویاری به دلایل مختلف از جمله صید بی‌رویه، آلودگی منابع زیستگاهی و آب‌ها، تخریب مناطق طبیعی تخم‌ریزی و فعالیت‌های انسانی (Chebanov and Billard, 2001)، محققین را بر آن داشته است تا به تکثیر مصنوعی و رهاسازی آن‌ها به دریا و پرورش گونه‌های مختلف در آب‌های داخلی و استخرها بپردازند. در دو دهه اخیر، پرورش ماهیان خاویاری در کشورهای روسیه، ایالات متحده آمریکا، چین، آلمان، مجارستان، رومانی، ایتالیا، فرانسه، اسپانیا، پرتغال، شیلی، آرژانتین، جمهوری چک، اروگوئه و ایران توسعه یافته است (Speer *et al.*, 2000) و اکنون ده‌ها تن گوشت و خاویار پرورشی در کشورهای مختلف جهان تولید می‌شود.

آگاهی از جنسیت انفرادی ماهیان برای آبی‌پروری و حفاظت از ذخایر، امری بسیار کاربردی است. با توجه به طولانی بودن سن بلوغ و نیز چرخه تولیدمثلی ماهیان خاویاری و به‌منظور کاهش هزینه‌های نگهداری، راهبرد مدیریت تاس‌ماهیان به جداسازی ماهیان نر از ماده وابسته می‌باشد و به همین دلیل محققین روش‌های گوناگونی را جهت تشخیص جنسیت و مراحل رسیدگی جنسی به‌کار گرفته‌اند (Bahmani and Kazemi, 1998; Hallajian *et al.*, 2014). در پرورش تاس‌ماهیان با جداسازی ماهیان نر و ماده از یکدیگر در کم‌ترین زمان و استرس می‌توان از هزینه‌های سنگین پرورش کاست. با خروج ماهیان نر از چرخه پرورش و فروش گوشت آن‌ها در بازار، هزینه‌های نیروی کارگری، غذا، سطوح و امکانات پرورشی، تقریباً به نصف تقلیل می‌یابد، زیرا معمولاً تاس‌ماهیان از نسبت جنسی ۱ به ۱ برخوردارند (Chapman and Park, 2005).

گروهی از پژوهشگران معتقدند که از طریق برخی از ویژگی‌های ریختی در فصل تخم‌ریزی می‌توان در تعدادی از گونه‌های خاویاری، جنسیت را تعیین نمود. مثلاً ماهیان ماده در زمان اوولاسیون نسبت به مراحل رسیدگی پایین‌تر از شکمی برجسته‌تر، ساقه دمی بیضوی شکل‌تر، پوزه تیزتر و پوستی با موکوس بیشتر (Milshtein, 1982) برخوردار هستند. همچنین در مرحله چهارم رسیدگی جنسی، تیره‌تر بودن بخش شکمی (Billard, 2002) و باله‌های سینه‌ای کوتاه‌تر و مدور (Podushka, 2008) از

نشانه‌های ماده بودن ماهی خاویاری است. اما به‌طور کلی ماهیان خاویاری در طول دوره زندگی خود، حتی پس از بلوغ نیز فاقد نشانه‌های ریختی جنسیت (نر یا ماده) بوده، دارای چالش‌های فراوان برای جدایی جنسی می‌باشند (Scott and Crossman, 1973; Doroshov *et al.*, 1983). این مطالعه مروری تلاش می‌کند ضمن بررسی روش‌های مختلف جداسازی جنسی و مراحل رسیدگی ماهیان نر و ماده تاس‌ماهیان، مناسب‌ترین روش را با توجه به مزایا و معایب موجود در این زمینه، معرفی نماید.

روش‌های مختلف تعیین جنسیت در تاس‌ماهیان: یکی از نخستین روش‌های تعیین جنسیت و مراحل رسیدگی جنسی، روش تکه‌برداری از گناد و مطالعات بافت‌شناسی است (Bahmani and Kazemi, 1998; Hallajian *et al.*, 2007, 2011; Hedayati *et al.*, 2008; Kazemi *et al.*, 2008, 2010, 2011; Romanov and Shevelva, 1993; Chapman and Park, 2005; Bahmani *et al.*, 2005). در این روش با توجه به سن و اندازه ماهی برش کوچکی به اندازه ۱-۰/۶ سانتی‌متر در قسمت شکمی و بین پلاک‌های ۲ و ۳ (پلاک‌های شکمی از سمت دم به سر ماهی) به وسیله اسکالپل تیز ایجاد می‌شود و سپس تکه‌ای از بافت گناد با قیچی از گناد جدا و در ماده فیکساتیو مناسب تثبیت می‌شود. سپس با استفاده از روش‌های استاندارد نسبت به تهیه اسلایدهای بافتی و مطالعه و شناسایی گندهای نر و ماده اقدام می‌گردد.

در سال‌های اخیر با پیشرفت فناوری، روش‌های دیگر تعیین جنسیت و مراحل رسیدگی جنسی نیز مورد استفاده قرار گرفته‌اند. آنالیز لیپوپروتئین‌های پلاسما (Thurston, 1967; Craik and Harvey, 1984)، غلظت ویتلوژنین پلاسمای خون (Mojazi Mojazi Amiri *et al.*, 1996; Sullivan *et al.*, 1991; Tao *et al.*, 1992) و غلظت هورمون‌های جنسی استروئیدی (Webb and Feist, 2002; Craig *et al.*, 2009; Esmaeili, 2014b; Mola *et al.*, 2011; Kazemi *et al.*, 2014b) از جمله این روش‌ها هستند. در این روش‌ها ابتدا با استفاده از پلاسمای خون و از طریق کیت‌های اختصاصی، نسبت به سنجش سطوح لیپوپروتئین، پروتئین و هورمون‌های استروئیدی اقدام می‌شود. سپس بر اساس میانگین غلظت پاراسنجه‌های بیوشیمیایی و هورمونی پلاسمای خون، جنسیت و مرحله رسیدگی جنسی مشخص می‌گردد. یکی دیگر از روش‌های تعیین جنسیت ماهیان خاویاری، روش بیومتریک است. در روش بیومتریک (Maltsev and Merkulov, 2006) پس از زیست‌سنجی بخش‌های مختلف بیرونی سر و جمجمه مانند فاصله‌های بین اسپیراکولوم و سوراخ پیشین‌بینی، اسپیراکولوم و نوک پوزه، چشم و نوک پوزه، چشم و سوراخ پیشین‌بینی، اندازه‌های سرپوش برانشی، مجرای اسپیراکولوم، چشم‌ها، سوراخ پیشین‌بینی، استخوان ترقوه، فاصله بین وسط استخوان ترقوه و نوک پوزه، فاصله بین وسط سقف غضروفی دهان و نوک پوزه و اندازه باله‌های سینه‌ای و آنالیز آماری داده‌ها، جداسازی و تفکیک جنسیت ماهیان صورت می‌گیرد. همچنین با عکس‌برداری از بخش خارجی سوراخ‌های تناسلی-ادراری (Vecsei *et al.*, 2003) می‌توان جنسیت ماهیان خاویاری را تشخیص داد. در این روش با استفاده از دوربین‌های ویژه از سوراخ ادراری-تناسلی عکس‌برداری می‌شود. سپس با آنالیز عکس‌ها و از روی تفاوت‌هایی که در ظاهر بخش خارجی سوراخ تناسلی وجود دارد، جنس ماده را از نر جدا می‌کنند.

روش‌های سونوگرافی و آندوسکوپی (Hurvitz et al., 2007; Bryan et al., 2007; Divers et al., 2009)، فراصوتی (Evans, 2004; Colombo et al., 2004; Wildhaber et al., 2005; Masoudifard et al., 2011, Vajhi et al., 2011) و لاپاراسکوپی (Hurvitz et al., 2007; Matsche et al., 2011; Kazemi et al., 2014a) نیز از دیگر روش‌های تعیین جنسیت و گاه تفکیک مراحل رسیدگی جنسی تاس‌ماهیان می‌باشند. در روش اولتراسوند از دستگاه سونوگراف و براساس امواج صوتی ارسالی از دستگاه و بازگشت آن، نسبت به تعیین جنسیت ماهیان اقدام می‌شود. در این روش‌ها امواج صوتی و فراصوتی از طریق کاوشگر دستگاه و از روی سطح پوست به داخل حفره شکمی ارسال می‌گردد (کاوشگر معمولاً در ناحیه پلاک‌های استخوانی سوم و چهارم شکمی قرار می‌گیرد). این امواج بعد از برخورد به بافت‌های مختلف بدن بازتابیده شده و امواج بازتابش شده مجدداً توسط همان دستگاه دریافت می‌شود. سپس با آنالیز امواج دریافتی به جنسیت ماهی پی می‌برند (بازتاب امواج در گناد نر یکنواخت و در گناد ماده غیر یکنواخت است). اما در روش لاپاراسکوپی با ایجاد یک سوراخ نیم سانتی‌متری، کاوشگر دستگاه به داخل حفره عمومی بدن فرستاده می‌شود و سپس از روی تصاویر ارسالی به نمایشگر تلسکوپ، تشخیص جنسیت و نیز مراحل رسیدگی جنسی صورت می‌گیرد.

از دیگر روش‌های نوین تعیین جنسیت می‌توان به طیف‌سنجی مادون قرمز بر اساس جذب تابش و بررسی جهش‌های ارتعاشی مولکول‌ها و یون‌های چنداتمی یا اسپکتروسکوپ مادون قرمز (Webb et al., 2009; Lu et al., 2010) اشاره کرد که بر پایه ریزپردازنده‌های دستگاه، طیف‌های حاصل تجزیه و تحلیل می‌شوند. این روش بر پایه آنالیز نمونه‌های زیستی و آبیان در طی دوره بلوغ و با نزدیک شدن ماهی ماده خاویاری به بلوغ جنسی که تغییرات مختلف بیوشیمیایی و فیزیولوژیک در تخمک‌ها روی می‌دهد و با رسیدگی تخمک‌ها و مراحل رسیدگی جنسی ارتباط مستقیم دارد، استوار می‌باشد. بنابراین با کمک فناوری طیف‌سنجی مادون قرمز می‌توان تمایز دقیق مراحل تولید مثلی ماهیان ماده را تعیین کرد.

از کاربردی‌ترین روش‌های تعیین جنسیت ماهیان به‌ویژه ماهیان استخوانی، می‌توان به فناوری‌های مختلف ژنتیکی رایج (Hett et al., 2005; Wuertz et al., 2006; Keyvanshokoo et al., 2007 and 2009; Yarmohammadi et al., 2011, 2012 and 2016) مانند روش‌های سیتوژنتیک، تکنیک‌های مولکولی تعیین مارکرهای جنسی، رویکرد ژن‌های کاندید، پروتئومیکس، RAPD، AFLP اشاره کرد.

نتایج و بحث

اگرچه بهترین و آسان‌ترین راه تشخیص جنسیت و مراحل رسیدگی جنسی گناد تاس‌ماهیان استفاده از نشانه‌های بافت‌شناسی شیار بخش میانی گناد و حضور یا خسته‌های گامتوژنیک از طریق روش تهاجمی تکه‌برداری است، اما استفاده از این روش تهاجمی در تعیین جنسیت می‌تواند ضمن آسیب فیزیکی شدید

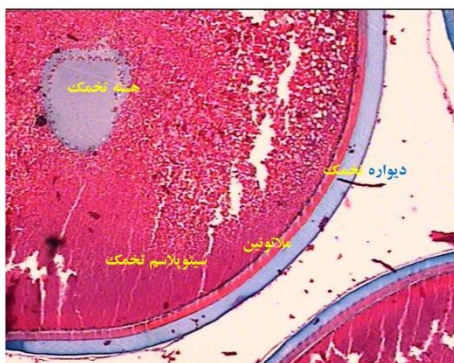
به ماهی، هزینه‌های گزافی را نیز به پرورش‌دهندگان تحمیل کند (Kazemi *et al.*, 2010). در این روش، جنسیت و مراحل رسیدگی جنسی مستقیماً با مطالعه بافت‌های گنادی تعیین می‌شوند (شکل ۱) که روشی زمان‌بر، پرهزینه و تهاجمی است. روش تکه‌برداری اگرچه یکی از دقیق‌ترین روش‌های تعیین جنسیت و مراحل رسیدگی جنسی تاس‌ماهیان است که می‌توان حتی در سنین زیر یک سال نیز نسبت به جدایی جنسی آن‌ها اقدام کرد (Hallajian *et al.*, 2014)، اما به دلیل استفاده از وسایل جراحی در محفظه داخلی حفره عمومی بدن برای برداشت نمونه گناد و امکان آلوده شدن ماهی به عوامل بیماری‌زا، روشی کاملاً تهاجمی و استرس‌زاست. همچنین دوره زمانی طولانی تشخیص جنسیت و مراحل رسیدگی و نیز ایجاد آسیب، زخم و جراحت فراوان به ماهی و حتی مرگ آن از چالش‌های بزرگ روش تکه‌برداری است (Vecsei *et al.*, 2003).



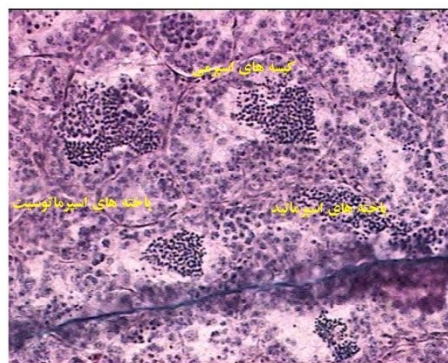
ب



الف



د



ج

شکل ۱- تعیین جنسیت و مراحل رسیدگی جنسی به روش بیوپسی و بافت‌شناسی، الف: ایجاد شکاف در ناحیه شکمی ب: بخیه کردن محل جراحی ج: اسلاید بافتی گناد نر فیل‌ماهی و د: اسلاید بافتی گناد ماده فیل‌ماهی (برگرفته از Kazemi *et al.*, 2012)

در روش آندوسکوپی (شکل ۲) جنسیت و مراحل رسیدگی جنسی با چشم مسلح صورت می‌گیرد و از روش‌های پیشرفته در مطالعه جنسیت گناد ماهیان خاویاری محسوب می‌شود، ولی دارای خطای اندازه‌گیری بالا در تشخیص هم‌آوری، حجم تخمدان و مراحل جنسی به‌ویژه در مراحل اولیه رسیدگی جنسی، می‌باشد (Ortenburger *et al.*, 1996). بررسی‌های مختلف نشان داد که اگرچه این روش در مقایسه با روش تکه‌برداری، دارای مزایای بهتری همچون آسیب کمتر در زمان تماس کاوشگر با ماهی، امکان استفاده از دستگاه در شرایط کارگاهی، کوتاه‌تر بودن زمان بررسی و تشخیص و نیز سهولت انجام کار با دستگاه می‌باشد؛ ولی ارزیابی تعیین جنسیت از طریق مشاهده گنادها، امکان‌پذیر نبودن تشخیص گنادهای نر از ماده در مراحل اولیه رشد و نمو، استفاده از ماده بیهوشی در هنگام بررسی گناد، ایجاد زخم و جراحات زمانی که کاوشگر از مجرای تناسلی وارد بدن می‌شود و نیز تأثیر نامناسب بر وضعیت فیزیولوژیک ماهی از مهم‌ترین نکات منفی این روش می‌باشد (Chebanov and Galich, 2013)، هرچند همان‌گونه که پیش‌تر بیان شد در مراحل بالای رسیدگی جنسی، آندوسکوپی از مناسب‌ترین، کاربردی‌ترین، سریع‌ترین و بهترین روش‌های تعیین جنسیت ماهیان خاویاری به‌ویژه برای ماهیان ماده بالغ در فصل تولید مثل جهت تعیین دقیق میزان تخم‌ریزی و رسیدگی جنسی تخمک‌ها است (Divers *et al.*, 2009; Chebanov and Galich, 2009).



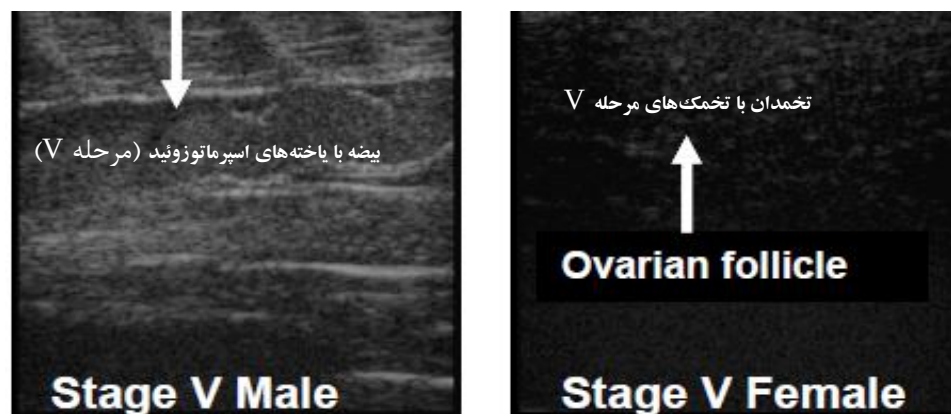
شکل ۲- تعیین جنسیت و مرحله جنسی به روش آندوسکوپی (برگرفته از Divers *et al.*, 2009)

استفاده از اسپکتروسکوپی مادون‌قرمز که بر پایه تغییرات هورمون‌های استروئیدی به‌ویژه تستوسترون، ۱۷ بتا استرادیول و ۱۱-کتوتستوسترون، کلسیم کل و میزان پروتئین و چربی پلاسما و یا استفاده از فناوری غیر تهاجمی اسپکتروسکوپی نزدیک مادون‌قرمز با طول موج کوتاه که بر اساس طیف‌سنجی گنادها و اسکن ناحیه شکمی عمل می‌کند، می‌تواند ما را در پیش‌بینی مرحله رسیدگی جنسی تخمدان کمک کند (Webb *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2010). این روش‌ها اگرچه از گروه

روش‌های غیرتهاجمی تعیین جنسیت محسوب می‌شوند، اما به دلیل برخی محدودیت‌ها از جمله نیاز به نیروی کار زیاد، صید چندباره و اشتباه در علامت‌گذاری ماهیان و عدم امکان استفاده از ماهیان نر که همگی ناشی از ساختار و ماهیت روش اسپکتروسکوپی سرچشمه می‌گیرد و نیز عدم امکان جداسازی در مراحل اولیه جنسی، هزینه بالا و آنالیز پیچیده طیف‌سنجی پلاسما، نمی‌تواند روش مناسبی برای تعیین جنسیت و مراحل رسیدگی جنسی ماهیان خاویاری باشد. توجه به این نکته ضروری است که این روش با تعیین موقعیت یاخته زایشی یا (GV) تخمک ماهی ماده و برآورد اندازه آن به جداسازی ماهیان نر و ماده می‌پردازد، بنابراین اسپکتروسکوپ مادون قرمز فقط می‌تواند تخمک ماهی ماده را آنالیز و برآورد اندازه کند و به همین دلیل در این روش علاوه بر استفاده از نیروی کارگری فراوان و صید چندباره به‌منظور دسترسی به ماهی ماده، ممکن است در تکرار صیدها، علامت‌گذاری ماهیان نیز دچار اشتباه شود. درواقع این روش نمی‌تواند عملی روی ماهیان نر جهت جداسازی آن‌ها از ماهیان ماده انجام دهد.

پیدایش روش‌های بدون درد مانند اولتراسوند با کاربرد وسیع در علوم دامپزشکی و شیلات که اندام‌های داخلی را اسکن می‌کنند، محققین زیست‌شناسی را به خود جذب کرده است (Karlsen and Holm, 1994; Chebanov and Galich, 2009). اولتراسونوگرافی اگرچه روشی غیرتهاجمی با سرعت تشخیص بالا و کاربرد وسیع است ولی استفاده از آن به‌علت نمایش غیر مشخص از ساختار گناد، وابستگی به میزان مهارت فرد پژوهشگر و هزینه بالا، چالش برانگیز است. اما دقت تشخیص جنسیت با این روش بسته به مرحله رسیدگی جنسی گناد و مهارت پژوهنده، بین ۸۰ درصد (Williot, 2002; Munhofen, 2012) تا ۹۰-۸۰ درصد (Billard, 2002) متغیر می‌باشد (شکل ۳). این روش که دقت و خطر آن کمتر از روش آندوسکوپی است، برای مراحل اولیه و مرحله I رسیدگی جنسی که تفاوت‌های ریختی و یاخته‌ای گندهای نر و ماده هنوز به‌وضوح قابل تشخیص نیست، مناسب نمی‌باشد (Chapman and Van Evenennaam, 2009). در مرحله IV رسیدگی جنسی نیز به‌دلیل جذب کامل امواج اولتراسوند به وسیله تخمک‌های منفرد و هم‌اندازه تخمدان، بخش میانی گناد ماهی ماده و اندام‌های زیرین آن قابل تشخیص نخواهند بود (Chebanov and Galich, 2009).

ریخت‌شناسی سوراخ تناسلی (شکل ۴) نظریه عدم وجود تفاوت‌های ظاهری بخش خارجی سوراخ ادراری- تناسلی و تک‌شکلی بودن آن‌ها را در دو جنس نر و ماده تاس‌ماهیان رد کرد (Vecsei et al., 2003).



شکل ۳- تعیین جنسیت ماهی‌های خاویاری به روش اولتراسونوگرافی (برگرفته از Wildhaber et al., 2005). گناد مرحله ۵ رسیدگی جنسی ماده (سمت راست) و نر (سمت چپ)؛ تراکم، اندازه و رنگ یاخته‌ها در دو جنس نر و ماده کاملاً مشهود است.

مطالعات نشان داد که دقت جداسازی این روش در مولدین گونه‌های مختلف خاویاری بین ۲۹-۸۲ درصد و به‌طور میانگین ۷۱ درصد در نوسان بود (Vecsei et al., 2003). این روش اگرچه برای تعیین جنسیت مراحل بالای رسیدگی جنسی مناسب و امکان‌پذیر است، اما درصد مرگ و میر بالا (به‌دلیل دستکاری زیاد ناحیه تناسلی ماهی و نگهداری آن در خارج از آب و ...) و عدم تعیین جنسیت در مراحل قبل از رسیدگی جنسی نهایی از چالش‌های بزرگ این روش می‌باشد. باید توجه داشت که دقت این روش که تقریباً کم‌هزینه و کم‌تهاجمی‌تر است، در ماهیان زنده همواره بیش‌تر از ماهیان مرده بود. زیرا ریخت‌شناسی بخش بیرونی سوراخ تناسلی- ادراری ماهیان خاویاری همانند ماهیان الاسمویرانش بزرگ، پس از مرگ دچار بدشکلی، انحراف می‌شود (Clark and Castro 1995) که تشخیص و جداسازی ماهیان نر و ماده را با مشکل روبرو می‌سازد. مثلاً دقت تشخیص در مولدین گونه تاس‌ماهی سبز (*Acipenser medirostris*) مرده در تحقیقی صفر بود (Vecsei et al., 2003). البته منظور از دقت تعیین جنسیت در ماهیان مرده، اثبات تعیین جنسیت ماهی از طریق تفاوت‌های شکل ظاهری و بیرونی سوراخ تناسلی در زمان بلوغ و نیز مشخص کردن ماهی نر از ماده مرده در مطالعات میدانی و پژوهشی بدون برش ناحیه شکمی و تأکید بر تعیین جنسیت آن‌ها در شرایط بهینه زیستی است. زیرا پژوهش‌ها نشان داده است که حتی بی‌حالی و خروج از ماهی از وضعیت طبیعی می‌تواند درصد دقت جداسازی ماهیان نر از ماده را در این روش به‌شدت کاهش دهد. بنابراین در صورت استفاده از این روش برای جداسازی ماهیان نر از ماده، باید حتماً از زنده و عادی بودن وضعیت عمومی ماهی مطمئن بود.

نتایج نشان داد که تعیین جنسیت تاس‌ماهیان بر اساس شکل ظاهری برآمدگی اندام تناسلی-ادراری که می‌تواند سبب آسیب‌های فیزیکی و مرگ‌ومیر به دلیل دستکاری ماهی جهت عکس‌برداری از ناحیه سوراخ تناسلی شود، روش دقیق و فراگیری نیست. این روش نمی‌تواند در سال‌های نخست زندگی، تفکیک جنسیتی و مراحل رسیدگی جنسی و نیز زمان دقیق تکثیر در زمان بلوغ و رسیدگی کامل را مشخص نماید (Kazemi et al., 2014a).

زیست‌سنجی نیز از دیگر روش‌های تعیین جنسیت است که با ویژگی‌های کمی تعریف می‌شود؛ اما شالوده این روش بر ویژگی‌های مورفومتریک و مریستیک تاس‌ماهیان و بر پایه روش سنتی کارشناسان روسیه بنیان نهاده شده است که روش دقیقی برای تشخیص دو جنس نر و ماده نبوده، آنالیز داده‌ها، نتایج ضعیفی را در بر خواهد داشت (Maltsev and Merkulov, 2006).

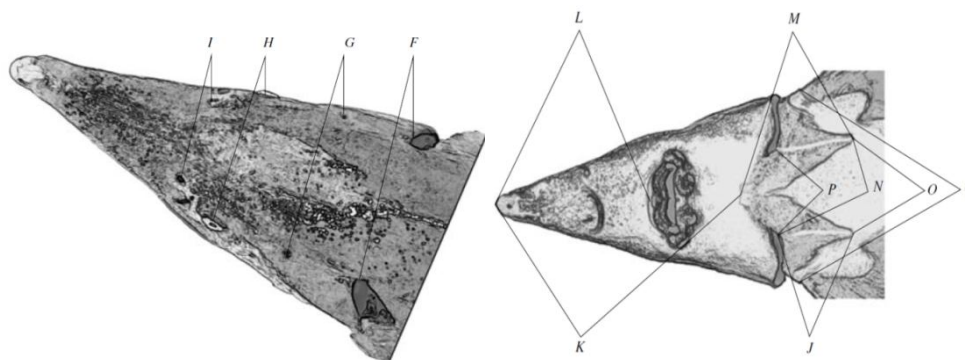
بسیاری از محققین بر این باورند که به‌جز مرحله نهایی رسیدگی جنسی، نمی‌توان از طریق زیست‌سنجی، دو جنس نر و ماده ماهیان خاویاری را از یکدیگر جدا کرد؛ زیرا اگرچه این روش نیز از گروه روش‌های کم‌خطر تعیین جنسیت است، اما آنالیز آماری نشانه‌های ریختی بخش‌های مختلف سر و بدن تاس‌ماهیان (شکل ۵)، نتایج متفاوتی را در ماهیان نر و ماده هم‌سن و هم مرحله جنسی نشان داد، به‌طوری‌که نمی‌توان با نتایج آن داده‌ها، جنسیت و مرحله جنسی را مشخص کرد.



شکل ۴- ریخت بیرونی سوراخ ادراری- تناسلی ماهی نر (سمت راست) که به شکل حرف Y و ماده خاویاری (سمت چپ) که به شکل حرف O می‌باشد (برگرفته از Vecsei et al., 2003).

برخی از شاخص‌های اندازه‌گیری سطح بیرونی ناحیه سر تاس‌ماهیان حاوی اطلاعات مفیدی است که از دیدگاه آماری فقط می‌تواند سبب تشخیص جنسیت ماهیان ماده خاویاری در مرحله پیش از بلوغ شود (Maltsev and Merkulov, 2006). اما فناوری ریخت‌شناسی هنوز به اندازه کافی توسعه نیافته

است و با وجود سادگی کاربرد آن نمی‌توان این روش را در مزارع پرورش ماهیان خاویاری به‌طور گسترده توصیه نمود.

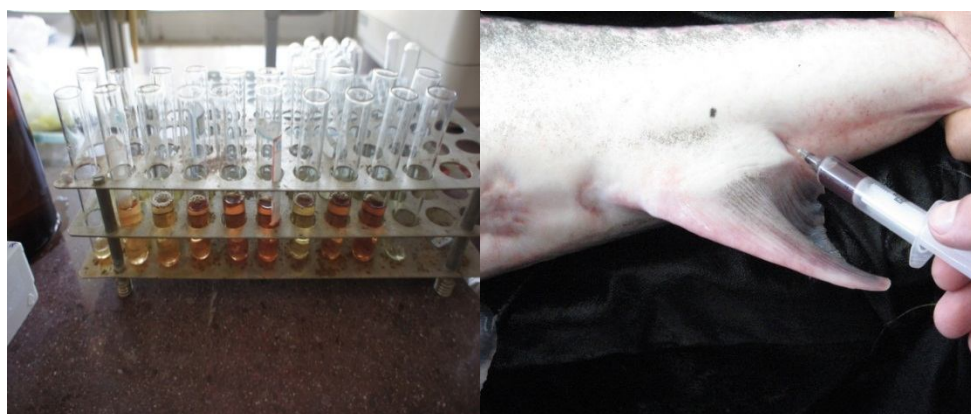


شکل ۵- تعیین جنسیت از طریق نشانه‌های خارجی (زیست‌سنجی) (برگرفته از Maltsev and Merkulov, 2006). I: فاصله سوراخ پیشین بینی، H: فاصله بین دو چشم، G: فاصله اسپیراکولوم، F: فاصله لبه فوقانی سرپوش آبششی، L: فاصله بین وسط سقف غضروفی دهان و نوک پوزه، K: فاصله بین وسط استخوان ترقوه و نوک پوزه، (J, M, N, O, P): استخوان‌های ترقوه.

استفاده از سطوح مختلف غلظت هورمون‌های استروئیدی جنسی (استروژن، پروژسترون، استرادیول، ۱۱-کتوتستوسترون، تستوسترون و ...) یا مواد متابولیک مانند پیش‌ساز زرده و ویتلوژنین پلاسمای خون (شکل ۶) و نیز موکوس و ادرار، جهت تعیین جنسیت و مرحله جنسی ماهیان خاویاری اگرچه روشی به نسبت کم‌تهاجم‌تر است، اما نمونه‌برداری و آنالیز آن‌ها در آزمایشگاه، علاوه‌بر صرف هزینه گزاف، زمان‌بر بوده، امکان انتقال دستگاه‌های آزمایشگاهی اندازه‌گیری هورمون‌های جنسی به منطقه میدانی، مقدور نمی‌باشد (Vecsei et al., 2003; Chapman and Van Eenennaam, 2009).

سطوح هورمون تستوسترون که پایه بسیاری از هورمون‌های استروئیدی در سطوح بالاتر است و نیز ۱۱-کتوتستوسترون و ۱۷ به تا استرادیول در هر دو جنس نر و ماده، می‌تواند به‌عنوان هورمون‌های شاخص در جداسازی جنسیت و نیز مراحل رسیدگی جنسی مورد استفاده قرار گیرد (Chang et al., 1999; Ceapa et al., 2002; Zhang et al., 2011; Kazemi et al., 2014b). مثلاً غلظت هورمون تستوسترون پلاسمای خون تاس‌ماهیان طبیعی مهاجر به رودخانه جهت تولید مثل نسبت به قبل از مهاجرت و نیز در مولدین نر و ماده پرورشی بالغ نسبت به مولدین نابالغ بیش‌تر بود، یعنی غلظت این هورمون در هر دو جنس (در نرها همواره بیش‌تر از ماده‌ها) در طی فرآیند گامتوژنیز

افزایش، اما پس از رسیدگی جنسی نهایی و تخم‌ریزی و اسپرم‌ریزی به شدت کاهش می‌یابد (Barannikova et al., 2004; Bahmani et al., 2012; Kazemi et al., 2012; Kazemi et al., 2014b).



ب

الف

شکل ۶- تعیین جنسیت بر اساس غلظت هورمون‌های جنسی (برگرفته از Kazemi et al., 2012). الف: نحوه برداشت نمونه خون از ماهی، ب: پلاسمای خون.

در این روش استفاده از مقادیر کمی دامنه غلظت هورمون‌های جنسی در جنس‌های نر و ماده و در مراحل مختلف رسیدگی جنسی از ضروریات تشخیص جنسیت و مراحل رسیدگی جنسی است که در گونه‌های مختلف و در شرایط پرورشی و یا طبیعی متفاوت می‌باشد. بنابراین قبل از انجام تعیین جنسیت باید استانداردهای غلظت هورمون موردنظر در دسترس باشد.

در ماهیان ماده نابالغ نیز سطوح استروئیدهای جنسی بسیار پایین است و بلوغ جنسی با افزایش سطوح پلاسمایی این هورمون‌ها همراه می‌باشد. اگرچه هورمون ۱۷- به تا استرادیول از هورمون‌های جنسی اصلی در پلاسمای خون ماهیان ماده است، اما سطوح معنی‌داری از هورمون‌های تستوسترون و پروژسترون نیز در پلاسمای خون وجود دارد، زیرا این هورمون‌ها پیش‌ساز تولید هورمون استرادیول هستند (Dahle et al., 2003; Barannikova et al., 2004) و رابطه مثبتی بین غلظت این هورمون‌ها در خون (Nazari and Ghomi, 2010) وجود دارد. بنابراین تعیین شاخص‌های هورمونی جنسی سرم خون می‌تواند با حداقل آسیب به ماهی به ویژه در مراحل میانی و انتهای رسیدگی جنسی، جنسیت و مرحله جنسی را مشخص نماید. اما همان‌گونه که پیش‌تر بیان شد، باید توجه داشت که غلظت هورمون‌های استروئیدی جنسی و دیگر شاخص‌های بیوشیمیایی خون در گونه‌های مختلف ماهیان خاویاری و حتی در یک گونه در شرایط اقلیمی، رشد و نمو (پرورشی یا طبیعی) و جغرافیایی

متفاوت، متغیر می‌باشد (Webb et al., 2002; Barannikova, 2003). همچنین استفاده از روش‌های مختلفی مانند الایزا، ریا، توربیدی‌متری و غیره برای اندازه‌گیری هورمون‌ها می‌تواند نتایج مختلفی را از یک نمونه خاص تولید کند. از طرف دیگر، کیت‌های سنجش هورمون‌های جنسی باید برای هرگونه اختصاصی باشد. استفاده از کیت‌های تشخیصی متفاوت، یافته‌های ناهمسانی را سبب خواهد شد. مسایل عنوان شده از مهم‌ترین مشکلاتی است که سبب محدودیت استفاده از این روش برای جداسازی ماهیان نر و ماده و مراحل مختلف جنسی از یکدیگر می‌شوند. بنابراین نمی‌توان با یک الگوی هورمونی و بیوشیمیایی خاص، جنسیت و مرحله جنسی را تعیین نمود و باید وضعیت تولیدمثلی و هورمون‌های جنسی را در ماده‌ها و نرهای با سنین متفاوت و در مزارع مختلف پایش کرد (Semenkova et al., 2005). از طرف دیگر به نظر می‌رسد که غلظت هورمون‌های استروئیدی یا دیگر ترکیبات بیوشیمیایی خون تاس‌ماهیان که می‌توانند در تعیین جنسیت و مراحل رسیدگی جنسی مورد استفاده قرار گیرند، هنوز از دیدگاه علمی به‌طور دقیق و کامل به اثبات نرسیده‌اند. نگهداری ماهی، ایجاد زخم در هنگام خون‌گیری از ماهی و سپس تفسیر توالی پیچیده آنالیزهای اندازه‌گیری مواد شیمیایی خاص نیز از دیگر عوامل محدودکننده این روش می‌باشد (Doroshov et al., 1997). ممکن است با توجه به پیشرفت فناوری و دانش فیزیولوژی تولیدمثل تاس‌ماهیان در سال‌های اخیر و نیز آتی، این روش بتواند در آینده نزدیک تحولی در تعیین جنسیت و مراحل رسیدگی جنسی ماهیان خاویاری ایجاد نماید (Kazemi et al., 2014b).

از دیگر روش‌های سریع و کاربردی تشخیص جنسیت در مراحل اولیه زندگی بسیاری از ماهیانی که یکی از دو جنس‌ها (نر یا ماده) دارای کروموزوم‌های مشخص و یا توالی DNA وابسته به جنس باشند، روش ژنتیکی است که بر پایه استفاده از مارکرهای DNA و فنون PCR استوار می‌باشد (Delvin and Nagahama, 2002). در این راستا روش مولکولی تفاوت طول قطعه‌های حاصل از تکثیر یا AFLP به‌دلیل عملکرد بالا در تکرارپذیری و قدرت تفکیک بالا و نیز تعداد مارکرهای قابل اندازه‌گیری، مناسب‌تر و دقیق‌تر از سایر روش‌های مولکولی در تعیین جنسیت بسیاری از ماهیان به‌ویژه ماهیان استخوانی است (Yarmohammadi et al., 2011). اما هنوز وجود کروموزوم‌های جنسی هترومورفیک در ماهیان خاویاری به‌دلیل حضور تعداد زیاد کروموزوم و میکروکروموزوم، به‌طور دقیق گزارش نشده است (Van Eenennaam, 1996). مثلاً مشاهده الگوی باندهای یکسان در جنس‌های نر و ماده تاس‌ماهی ایرانی نشان از آن دارد که احتمالاً در این گونه، کروموزوم‌های جنسی وجود ندارد و یا در صورت موجود بودن، هنوز مورد شناسایی قرار نگرفته است. این دستاورد، نظریه "در گونه‌های مختلف تاس‌ماهیان کروموزوم‌های هومولوگوس که حامل فاکتورهای تعیین جنسیت هستند، به‌طور کامل تمایز نیافته‌اند" را تأیید می‌کند. مطالعه ژنوم گونه‌های دیگر خاویاری به‌منظور یافتن توالی‌های وابسته به جنس بی‌نتیجه بود. البته این نتایج ممکن

است به‌دلیل بیان ژن جنسی در مراحل اولیه تمایز جنسی و یا به‌علت حساسیت پایین روش‌های مورد استفاده به‌دلیل وجود مقادیر کم محصولات ژنی وابسته به جنس باشد (Yarmohammadi et al., 2011). مطالعات وورتز و همکاران (Wuertz et al., 2006) روی چندگونه از ماهیان خاویاری مانند تاس‌ماهی ایتالیایی (*Acipenser naccarii*)، تاس‌ماهی سیبری (*Acipenser baerii*) و تاس‌ماهی روسی (*Acipenser gueldenstaedtii*) به روش‌های AFLP و پرایمرهای لنگردار تحلیل رفته (ISSR) و در تاس‌ماهی ایتالیایی، تاس‌ماهی سیبری و استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) به روش RAPD و همکاران (Keyvanshokoo et al., 2007) در فیل‌ماهی (*Huso huso*) به روش RAPD، در تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) به روش‌های پروتئومیکس (Keyvanshokoo et al., 2009) و AFLP (Yarmohammadi et al., 2011)، نتوانستند مارکر جنسی جداسازی جنس‌های نر و ماده گونه‌های یاد شده را شناسایی کنند. محققین فوق بر این باور بودند که احتمالاً فیل‌ماهی یا فاقد کروموزوم‌های جنسی است و یا در صورت دارا بودن چنین کروموزوم‌هایی، نقاط متمایز بسیار کمی روی آن‌ها قرار دارد. همچنین ممکن است این گروه از ماهیان دارای قابلیت ژنتیکی هم‌زمان برای دو جنس باشند. از طرف دیگر، محققین نتوانستند به روش پروتئومیکس، جنسیت تاس‌ماهی ایرانی را از طریق نقاط پروتئینی وابسته به ژن‌های تعیین کننده جنسیت، تعیین کنند (Keyvanshokoo et al., 2009). اگرچه از طریق مطالعات سیتوژنتیک و تهیه کاریوتایپ (Delvin and Nagahama, 2002)، جنسیت بسیاری از ماهیان استخوانی مشخص گردید، اما همان‌گونه که پیش‌تر بیان شد در تاس‌ماهیان به‌دلیل وجود تعداد زیاد میکروکروموزوم‌ها این روش نمی‌تواند دو جنس را از هم جدا کند (Blacklidge and Bidwell, 1993). بنابراین بر اساس نتایج مطالعات انجام یافته با روش‌های ژنتیکی یاد شده نیز نمی‌توان مارکر وابسته به جنسیت جهت جداسازی ماهیان نر و ماده ماهیان خاویاری را شناسایی کرد. از لحاظ تئوری، نیافتن نشانگرهای جنسی می‌تواند دلیلی بر عدم وجود سیستم‌های تعیین جنسیت ژنتیکی و فعال بودن سیستم تعیین جنسیت محیطی باشد (Li et al., 2002). معمولاً در چنین شرایطی عوامل متعدد محیطی مانند؛ شوری، pH، دما، مدت زمان تابش نور و دیگر متغیرهای فیزیکی، می‌توانند جنسیت یک فرد را به‌صورت انفرادی تعیین کنند (Delvin and Nagahama, 2002). کاظمی و همکاران (Kazemi et al., 2014a) در مطالعه‌ای، موفقیت روش لاپاراسکوپی در تعیین جنسیت و مراحل رسیدگی جنسی فیل‌ماهی پرورشی را در سنین اولیه با کم‌ترین آسیب فیزیکی و هزینه در کوتاه‌ترین زمان ممکن نشان دادند (شکل ۷) به‌طوری که تنها دو درصد از ماهیان سه‌ساله مورد مطالعه، قابلیت جداسازی جنسی را نداشتند.



ب

الف



ج

شکل ۷- تعیین جنسیت به روش لاپاراسکوپی (برگرفته از Kazemi et al., 2014a). الف؛ نحوه استفاده از کاوشگر لاپاراسکوپ، ب؛ گناد ماده و ج؛ گناد نر فیل ماهی پرورشی در نمایشگر لاپاراسکوپ.

بررسی گناد ماهیانی که تعیین جنسیت نشدند نیز نشان داد که علت اصلی عدم تشخیص جنسیت به دلیل تغذیه نادرست، کاهش شدید رشد گناد و نیز احاطه شدن گناد رشد نیافته در پوششی از چربی بود. تعیین جنسیت با استفاده از لاپاراسکوپ اگرچه سبب آسیب فیزیکی اندک به ماهی می‌شود، اما به دلیل دقت بالا، سهولت انجام کار، قابلیت آسان جابجایی دستگاه، کوتاه بودن زمان تشخیص، کم‌هزینه بودن عملیات به ازای هر ماهی، قابلیت جداسازی گناد نر از ماده و مراحل رسیدگی جنسی حتی در مراحل پایین رسیدگی، اکنون از متداول‌ترین، مناسب‌ترین و مقبول‌ترین روش‌های تعیین جنسیت و

مراحل رسیدگی جنسی ماهیان خاویاری به‌ویژه برای ماهیان بیش از ۲/۵ سال (Hallajian et al., 2014) می‌باشد.

در همه روش‌های بیان شده به‌ویژه در روش‌های تهاجمی به‌منظور کاهش استرس‌های فیزیکی و دستکاری، استفاده از مواد بیهوشی باید مدنظر قرار گیرد. برای بیهوشی ماهی از موادی مانند MS222، فنوکسی اتانل، بنزوکائین، دی اکسید کربن، کلرال هیدراته، کتامین، گزیلازین، پودر گل میخک و غیره استفاده می‌شود. نکته قابل ذکر برای همه مواد بیهوشی، رعایت غلظت موردنظر به‌منظور ایجاد حداقل عوارض جانبی برای ماهی است. هر ماده بیهوشی دارای ماهیت شیمیایی خاصی است که می‌تواند سبب آرام‌بخشی موجود زنده شوند، ولی همه آن‌ها برای همه گونه‌های جانوری نمی‌توانند مفید باشند. بنابراین آگاهی از نوع ماده بیهوشی و غلظت بهینه آن برای کاهش استرس روی ماهی دستکاری شده بسیار مهم است. غلظت بهینه و مناسب ماده بیهوشی با توجه به گونه، وزن، سن، شرایط اقلیمی و دمای آب می‌تواند متفاوت باشد. بنابراین اگرچه استفاده از مواد بیهوشی برای کاهش استرس ماهی در حال تعیین جنسیت، ضرورتی اجتناب‌ناپذیر است، اما در صورت عدم رعایت نوع و غلظت مناسب ماده بیهوشی، ممکن است به ماهی آسیب‌های فیزیکی و زیستی غیر قابل جبران وارد شود.

نتیجه‌گیری کلی

روش‌های تعیین جنسیت و مراحل رسیدگی جنسی ماهیان خاویاری از تنوع زیادی برخوردار است؛ اما تاکنون هیچ یک از آن‌ها نتوانسته است به تنهایی این مشکل را حل نماید. شناخت علمی و دقیق از روش‌های مورد بحث و نیز مدیریت بهینه به‌کارگیری آن‌ها و پژوهش جهت دستیابی به روش‌های بهینه جداسازی جنسی تاس‌ماهیان می‌تواند با کمینه هزینه و بیشینه بهره‌وری همراه باشد. تعیین جنسیت و مراحل رسیدگی جنسی به روش لاپاراسکوپی که در واقع روشی سریع، کم هزینه، کاربردی با حداقل آسیب‌های فیزیکی و استرس‌زایی است و اولتراسوند که روشی غیر تهاجمی، سریع با دقت تشخیص بالاست، نسبت به سایر روش‌ها، برای ماهیانی که در مراحل بالاتر جنسی قرار دارند، مناسب‌تر و مقرون به صرفه‌تر می‌باشد. زیرا دیگر فناوری‌های قابل دسترس برای تعیین جنسیت، اغلب زمان‌بر، تهاجمی و تهدید کننده سلامت و گاه غیرکارا می‌باشند. اغلب فناوری‌ها به جمع‌آوری چندباره خون و بافت گناد نیاز دارند که می‌توانند ماهیان را دچار استرس کنند و یا عوامل بیماری‌زا را به ماهی معرفی و سبب مرگ و میر آن‌ها شوند. استفاده درست و بهینه از روش‌ها و مواد بی‌هوشی مناسب در تعیین جنسیت و مراحل رسیدگی جنسی ماهیان خاویاری، تلفاتی را در بر نخواهد داشت. مرگومیر ماهی در حد بسیار پایین زمانی رخ می‌دهد که دستکاری ماهی در دمای بالا یا در آب با کیفیت پایین صورت گیرد. البته باید توجه داشت که دیگر فناوری‌های تعیین جنسیت نیز برای موارد خاص مثلاً

تعیین زمان دقیق تکثیر و یا تأیید نهایی مطالعات تحقیقاتی بسیار مناسب خواهند بود. به نظر می‌رسد در آینده با استفاده از روش‌های کم‌تهاجمی دیگر مانند تعیین غلظت فرمون‌های ادراری، موکوس و ... و یا فناوری‌های نوین مانند بیان ژن و تعیین توالی نسل‌های بعدی و یا بهره‌گیری از دستگاه‌های مدرن، بتوان به راحتی و با کم‌ترین آسیب و هزینه در کم‌ترین زمان ممکن، جنسیت و مراحل رسیدگی جنسی ماهیان خاویاری را تعیین کرد.

منابع

- Bahmani M., Kazemi R. 1998. Histological study on the gonads of reared juvenile sturgeon. Iranian Fisheries Scientific Journal, 7(1): 1-16. (In Persian).
- Bahmani M., Kazemi R., Hallajian A. 2005. Sturgeon Sexing and Gonad Staging. Workshop on 5th international symposium on sturgeon. Ramsar, Iran. 20P. (In Persian).
- Bahmani M., Kazemi R., Yousefi Jourdehi A., Yazdani M.A., Pourdehghani M., Hallajian A., Dezhandian S., Mohseni M. 2012. Final project reports of Study on the possibility of artificial propagation in farmed *Acipenser nudiiventris* and *A. persicus*. Iranian Fisheries Research Organization (IFRO), 85P. (In Persian).
- Barannikova I.A., Baunova L.V., Gruslova A.B., Semenkova, T.B. 2003. Steroids in sturgeon, migration regulation. Fish Physiology and Biochemistry, 28: 263-264.
- Barannikova I.A., Bayounova L.V., Semenkova T.B. 2004. Serum levels of testosterone, 11-ketotestosterone and estradiol -17 in three species of sturgeon during gonadal development and final maturation induced by hormonal treatment. Journal of Fish Biology, 64(5): 1330-1338.
- Billard R. 2002. Esturgeons et caviar (Tec. and Doc). (Aquaculture-Pisciculture), Paris, pp: 91-106.
- Blacklidge K.H., Bidwell C.A. 1993. Threeploidy levels indicated by genome quantification in *Acipenseriformes* of North America. Journal of Heredity, 84: 427-430.
- Bryan J.L., Wildhaber M.L., Papoulias D.M., DeLonay A.J., Tillitt D.E., Annis M.L. 2007. Estimation of gonad volume, fecundity, and reproductive stage of shovelnose sturgeon using sonography and endoscopy with application to the endangered pallid sturgeon. Journal Applied Ichthyology, 23: 411-419.
- Ceapa C., Williot P., LeMenn F., Davail-Cuisset B. 2002. Plasma sex steroids and vitellogenin levels in stellate sturgeon (*Acipenser stellatus* Palas) during spawning migration in the Danube River. Journal of Applied Ichthyology, 18: 391-396.

- Chang C.F., Hung C.Y., Chiang M.C., Lan, S.C. 1999. The concentrations of plasma sex steroids and gonadal aromatase during controlled sex differentiation in grey mullet, *Mugil cephalus*. *Aquaculture*, 177(1): 37–45.
- Chapman F.A., Park Ch. 2005. Comparison of sutures used for wound closure in sturgeon following a gonad biopsy. *North American Journal of Aquaculture*, 67: 98–101.
- Chapman A.F., Van Eenennaam J.P. 2009. Sturgeon aquaculture-specialized techniques: determining the sex of sturgeon by direct examination of the gonad using a minimally invasive surgical procedure. University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences, 83: 1-5.
- Chebanov M., Billard R. 2001. The culture of sturgeons in Russia: production of juveniles for stocking and meat for human consumption. *Aquatic Living Resource*, 14: 375-381.
- Chebanov M.S., Galich E.V. 2009. Ultrasound diagnostics in sturgeon broodstock management. 6th International symposium on sturgeon 2009, Wuhan, China: Workshop on sturgeon sexing and gonad staging. 47P.
- Chebanov M.S., Galich E.V. 2013. Sturgeon hatchery manual. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) Fisheries and Aquaculture technical paper (558), Ankara. 338P.
- Clark E., Castro J. 1995. 'Megamamma' is a virgin: dissection of the first female specimen of *Megachasma pelagios*. *Environmental Fish Biology*, 43: 329–332.
- Colombo R., Wills P.S., Garvey J. 2004. Use of ultrasound imaging to determine sex of shovelnose sturgeon. *North American Journal of Fisheries Management*, 24: 322–326.
- Craig J.M., Papoulias D.M., Thomas M.V., Annis M.L., Boase J. 2009. Sex assignment of lake sturgeon (*Acipenser fluvescens*) based on plasma sex hormone and vitellogenin levels. *Journal of Applied Ichthyology*, 25: 60–67.
- Craik J.C.A., Harvey S.M., 1984. A biochemical method for distinguishing between the sexes of fishes by the presence of yolk protein in the blood. *Journal of Fish Biology*, 25: 293-303.
- Dahle R., Taranger G.L., Karlsen P., Kjesbu O.S., Norberg B. 2003. Gonadal development and associated changes in liver size and sexual steroids during the reproductive cycle of captive male and female Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 136: 641-653.
- Delvin R.H., Nagahama Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208: 191-364.
- Dettlaff T.A., Ginzburg A.S., Schmalgauzen O.I. 1993. Sturgeon fishes, developmental biology and aquaculture. Springer Verlag, Berlin. 300P.
- Divers S.J., Boone S.S., Hoover J.J., Boysen K.A., Killgore K.J., Murphy C.E., George S.G., Camus A.C. 2009. Field endoscopy for identifying gender,

- reproductive stage and gonadal anomalies in free-ranging sturgeon (*Scaphirhynchus* sp.) from the lower Mississippi River. *Journal of Applied Ichthyology*, 25(2): 68-74.
- Doroshov S.I., Clark H., Lutes P.B., Swallow R.L., Beer K.E., Mc Guire A.B., Cochran M.D. 1983. Artificial propagation of white sturgeon, *Acipenser transmontanus* Richardson. *Aquaculture*, 32: 93-104.
- Doroshov S.I., Moberg G.P., Van Eenennaam J.P. 1997. Observations on the reproductive cycle of cultured white sturgeon *Acipenser transmontanus*. *Environmental Biology of Fishes*, 48: 265-278.
- Esmaili Mola A., Hovannisyan H.G., Nazari R.M., Ovissipour M.R. 2011. Early sex identification in cultured beluga (*Huso huso*) using plasma steroid hormones. *African Journal of Biotechnology*, 10(10): 1959-1965.
- Evans A.F. 2004. Use of ultrasound imaging and steroid concentrations to identify maturational status in adult steelhead. *North American Journal of Fisheries Management*, 24: 967-978.
- FAO. (2010). FishStat Plus statistical database.
- Hallajian A., Kazemi R., Mohseni M., Bahmani M., Yousefi A. 2007. Determination of sex and sexual maturation stages in cultured *Acipenser nudiventris* using biopsy method. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 16(3): 65-72. (In Persian).
- Hallajian A., Kazemi R., Mohseni M., Dejandian S., Yousefi Jourdehi A., Bahmani M., Pourdehghani M., Yazdani M.A., Yeganeh H. 2011. Biopsy and histological study of gonads from farmed *Acipenser persicus*. *Journal of Veterinary Research*, 66(3): 229-233. (In Persian).
- Hallajian A., Kazemi R., Yousefi Jourdehi A., Pourdehghani M. 2014. Applied of some methods for sex staging in sturgeon. *Journal of Fisheries*, 8(1): 19-28. (In Persian).
- Hedayati S.A.A., Yavari V., Bahmani M., Alizadeh M., Kazemi R., Hallajian A. 2008. Study of annual gonadic development in Great sturgeon (*Huso huso*) cultured in brackish water. *Journal of Scientific and Technology of Agriculture and Natural Resources*, 11(42 B): 641-65. (In Persian).
- Hett A.K., Pitra C., Jenneckens I., Ludwig A. 2005. Characterization of Sex in European Atlantic sturgeon (*Acipenser sturio*). *Journal of Heredity*, 96: 150-154.
- Hurvitz A., Jackson K., Degani G., Levavi-Sivan B. 2007. Use of endoscopy for gender and ovarian stage determinations in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) grown in aquaculture. *Aquaculture*, 270: 158-166.
- Karlsen O., Hol J.C. 1994. Ultrasonography, a non-invasive method for sex determination in cod (*Gadus morhua*). *Journal of Fish Biology*, 44: 965-971.

- Kazemi R., Dezhandian, S., Hallajian A. 2011. Microscopic study of farmed beluga gonads in 3 and 4 –year old, World of Aquatics Journal, 9(42): 27-36. (In Persian).
- Kazemi R., Hallajian A., Bahmani M., Dezhandian S., Yousefi Jourdehi A., Pourdehghani M. 2008. Sexing of farmed sturgeon in Fars province. International Sturgeon Research Institute. 21P. (In Persian).
- Kazemi R., Hallajian A., Pourdehghani M., Dezhandian S., Yousefi Jourdehi A. 2010. Sexing of farmed beluga (*Huso huso*) in Tehran and Karaj cities sturgeon farms, International Sturgeon Research Institute. 55P. (In Persian).
- Kazemi R., Hallajian A., Pourdehghani M., Yazdani Sadati M.A., Yousefi Jourdehi A., Shakorian, M., Pourali H.R., Paikaran Mana N., Seyed Hasani M.H., Nezami. 2014a. Final project report of "Sturgeon sexing (farmed Beluga, *Huso huso* Linnaeus, 1758) using Laparoscopy, Iranian Fisheries Research Organization (IFRO). 24P. (In Persian).
- Kazemi R., Pourdehghani M., Dezhandian S., Hallajian A., Yousefi Jourdehi A., Yarmohammadi M., Yazdani M.A., Mohseni M., Mohammadi pareshkoh H., Yeganeh H. 2012. Final project report's of 'Study on the propagation possibility in reared Great Sturgeon, *Huso huso* by GnRH synthetic hormone for production of fingerling', Iranian Fisheries Research Organization (IFRO). 80P. (In Persian).
- Kazemi R., Yousefi Jourdehi A., Pourdehghani M., Dezhandian S., Hallajian A., Bahmani M., Mohammadi Parashkoh H., Yarmohammadi M. 2014b. Classification of sex and maturity stages of farmed Great sturgeon (*Huso huso*) using blood plasma steroid hormone and calcium ion levels, Iranian Journal of Fisheries Science, 13(3): 597-607.
- Keyvanshokoo S., Kalbasi M.R., Hossinkhani S., Vaziri B. 2009. Comparative proteomics analysis of male and female Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) gonads. Animal Reproductive Science, 11: 361-368.
- Keyvanshokoo S., Pourkazemi M., Kalbasi M.R. 2007. The RAPD technique failed to identify sex- specific sequences in beluga (*Huso huso*). Journal of Ichthyology, 23: 1-2.
- Li Y., Hill J.A., Yue G.H., Chen F., Orban L. 2002. Extensive search does not identify genomic sex markers in Tetradon nigroviridis. Journal of Fish Biology, 61: 1314-1317.
- Lu X., Webb M., Talbott M., Van Eenennaam J., Palumbo A., Lunares-Casensve J., Doroshove S., Struffenegger P., Rasco B. 2010. Distinguishing ovarian maturity of farmed white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) by Fourier transform infrared spectroscopy: a potential tool for caviar production management. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(7): 4056-4064.
- Maltsev A.V., Merkulov Ya. G. 2006. A biometric method for determining the sex of Acipenserids, including the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*

- (Acipenseridae) of the Azov Population. Journal of Ichthyology, 46(6): 460-464.
- Masoudifard M., Vajhi A.R., Moghim M., Nazari R.M., Naghavi A.R., Sohrabnejad M. 2011. High validity sex determination of three years old cultured beluga sturgeon (*Huso huso*) using ultrasonography. Journal of Applied Ichthyology, 27: 643-647.
- Matsche M.A., Bakal R.S., Rosemary K.M. 2011. Use of Laparoscopy to determine sex and reproductive status of shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*) and Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*). Journal of Applied Ichthyology, 27: 627-636.
- McEnroe M., Ceeh J.J. 1985. Osmoregulation in juvenile and adult White sturgeon, *Acipenser transmontanus*. Environmental Fish Biology, 14: 23-30.
- Milshtein V.V. 1982. Sturgeon Culture. Moscow, Pishcheprom. 151P. (In Russian).
- Mojazi Amiri B., Maebayashi M., Hara A., Adachi S., Yamauchi K. 1996. Ovarian development and serum sex steroid and vitellogenin profiles in the female cultured sturgeon hybrid, the bester. Journal of Fish Biology, 48: 1164-1178.
- Munhofen J.L. 2012. Compariang ultrasonography and endoscopy for the identification of gender in juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). MS.c thesis, University of Georgia, Georgia. 66P.
- Nazari R.M., Ghomi M.R. 2010. Relationship between steroid hormones and maternal characteristics and larvae in Persian sturgeon *Acipenser persicus*. Italian Journal of Zoology, 77(4): 492-494.
- Ortenburger A.I., Jansen M.E., Whyte S.K. 1996. Nonsurgical videolaparoscopy for determination of reproductive status of the arctic charr. Canadian Veterinary Journal, 37: 96-100.
- Podushka S.B. 2008. Sexual differences in the shape of twin fins in Amur sturgeon, *Osetrovoe Khozyaistvo*, 2: 69-71. (In Russian).
- Romanov A.A., Shevelva N.N. 1993. Disruption of gonadogenesis in the Caspian sturgeon (Acipenseridae). Journal of Ichthyology, 33(3): 127-133.
- Scott W.B., Crossman E.J. 1973. Freshwater fish of Canada. Fisheries Research Board of Canada, Bulletin, 184 Ottawa. 966P.
- Semenkova T.B., Canario A.V., Bayunova L.V., Kolmakov N.N., Barannikova I.A. 2005. Sex steroids and oocyte maturation in the sterlet (*Acipenser ruthenus*). Journal of Applied Ichthyology, 22: 340-345.
- Speer L., Lauck L., Pikitch E., Boa S., Dropkin L., Spruill V. 2000. Roe to Ruin: The decline of sturgeon in the Caspian Sea and road to recovery. NRDC, WCS, Sea Web. 26P.
- Sullivan C.V., Tao Y., Hodson R.G., Hara A., Bennett R.O., Woods L.C. 1991. Vitellogenin and vitellogenesis in striped bass (*Morone saxatilis*) broodstock. In: Scott A.P., Sumpter J.P., Kime D.E., Rolfe M.S. (Eds). Non Reproductive

- Physiology of Fish. Proceeding of 4th International Symposium, Fish Symposium '91, Sheffield, UK. pp: 315-317.
- Tao H., Hara A., Hodson R.G., Woods R.G., Sullivan C.V. 1992. Purification, characterization, and immunoassay of striped bass (*Morone saxatilis*) vitellogenin. Fish Physiology and Biochemistry, 12: 31-46.
- Thurston R.V. 1967. Electrophoretic patterns of blood serum proteins from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 24: 2169-2188.
- Vajhi A.R., Masoodifar M., Moghim M., Veshkini A., Zehtabvar A. 2011. Ultrasonography of sturgeon. Tehran university publisher, 164P.
- Van Eenennaam J.P., Doroshov S.I., Moberg G.P., Watson J.D., Moore D.S., Linares J. 1996. Reproductive conditions of Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrhynchus*) in the Hudson River. Estuaries 19: 769-777.
- Vecsei P., Litvak M.K., Noakes D.L.G., Rienc T., Hochleithner M. 2003. A noninvasive technique for determining sex of live North American sturgeon. Environmental Biology of Fishes, 68: 333-338.
- Webb M.A.H., Feist G.W., Trant J.M., Van Eenennaam J.P., Fitzpatrick M.S., Schreck C.B., Doroshov S.I. 2002. Ovarian steriodogenesis in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) during oocyte maturation and induced ovulation. General and Comparative Endocrinology, 129: 27-38.
- Webb M.A.H., Feist G.W. 2002. Potential Classification of Sex and Stage of Gonadal maturity of wild White Sturgeon Using Blood Plasma Indicators. Transactions of the American Fisheries Society, 131: 132-142.
- Webb M.A.H., Doroshov S., Rasco R., Cavinato A., Sealey W., Fornshell G., Lemon L., Ray L. 2009. Determining ripeness in whitesturgeon females to maximize yield and quality of caviar. Annual Progress Report. Part II. Western Region Aquaculture Center, United States Department of Agriculture, Pp: 1-36.
- Wildhaber M.L., Papoulias D.M., Deloney A.J., Tillitt J.L., Bryan D.E., Annis M.L., Allert J.A. 2005. Gender identification of shovelnose sturgeon using ultrasonic and endoscopic imagery and the application of the method to the pallid sturgeon. Journal of Fish Biology, 67: 114-132.
- Williot P. 2002. "Reproduction" in Esturgeons et caviar (Tec et Doc). (Aquaculture-Pisciculture), Paris, pp: 63-90.
- Wuertz S., Gaillard S., Barbisan F., Carle S., Congiu L., Forlani A., Aubert J., Kirschbaum F., Tosi E., Zane L., Grillasca J.P. 2006. Extensive screening of sturgeon genomes by techniques revealed no sex-specific random screening marker. Aquaculture, 258: 685-688.
- Yarmohammadi M., Pourkazemi M., Chakmehdouz F., Kazemi R. 2012. Comparative study of male and female gonads in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) employing DNA-AFLP and CDNA-AFLP analysis. Journal of Applied Ichthyology, 27(2): 510-513.

- Yarmohammadi M., Pourkazemi M., Ghasemi A., Hasanzadeh Saber M., Nowrooz Fashkhami M.R., Bradaran Noveiri Sh. 2011. Investigation of sex markers in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) with using of AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) markers. Iranian Journal of Biology, 24(6): 935-943. (In Persian).
- Yarmohammadi M., Pourkazemi M., Kazemi R., Yazdani Sadati M.A., Hallajian A., Hassanzadeh Saber M. 2016. Sex steroid level and sexual dimorphism expression of genes in gonads of the great sturgeon *Huso huso* Linneaus, 1758 during maturity developmental stages. Aquaculture Research, 3: 1-17.
- Zhang Y., Doroshov S., Famula T., Conte F., Kueltz D., Linartes-Casenave J., Van Eenennaam J., Struffenegger P., Beer K., Murata K. 2011. Egg quality and plasma testosterone and estradiol- 17 β in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) farmed for caviar. Journal of Applied Ichthyology, 27: 558-564.