وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران – پژوهشکده آبزی‌پروری آبهای داخلی –
مرکز تحقیقات ژنتیک ماهیان سردآبی شهید مطهری

عنوان:

ایجاد تک جنس ماهی قزل‌آلا به روش مستقیم از هورمون ۱۷ بتا استرادیول

مجری:
همایون حسین‌زاده‌صحافی

شماره ثبت
۸۹/۱۱۶۶

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

مؤسسه تحقیقات شیلات ایران پژوهشکده آبزی‌پروری آبهای داخلی – مرکز تحقیقات ژنتیک ماهیان سردآبی شهید مطهری

- **عنوان پروژه/ طرح :** ایجاد تک جنس ماهی قزل آلا به روش مستقیم از هورمون ۱۷ بتا استرادیول
- **شماره مصوب:**۸۷۰۴۶-۱۲-۱۲-۴
- **نام و نام‌خانوادگی نگارنده/ نگارندگان:** همایون حسین‌زاده صحافی
- **نام و نام‌خانوادگی مجری مسئول(اختصاص به پروژه‌ها و طرحهای ملی و مشترک دارد):-**
- **نام و نام‌خانوادگی مجری/ مجریان:** همایون حسین‌زاده صحافی
- **نام و نام‌خانوادگی همکاران:** طیبه باشتی- داود ضرغام- کمیل رزمی- حسین عبدالحی- جلیل معاضدی- حبیب‌اله گندمکار- میثم صلاحی - حسین مرادیان- عین‌اله گرجی‌پور
- **نام‌ونام‌خانوادگی مشاور(ان):** -
- **محل اجرا:** استان گیلان- استان چهارمحال و بختیاری
- **تاریخ شروع:**۸۷/۱۱/۱
- **مدت اجرا:**۱ سال و ۶ ماه
- **ناشر: مؤسسه تحقیقات شیلات ایران**
- **شمارگان(تیتراژ):۲۰ نسخه**
- **تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۰**

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است- نقل مطالب تصاویر،جداول،منحنی‌ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است.

«سوابق طرح یا پروژه و مجری»

پروژه : ایجاد تک جنس ماهی قزل‌الا به روش مستقیم از هورمون ۱۷ بتا استرادیول

کد مصوب :۸۷۰۴۶-۱۲-۱۲-۴

شماره ثبت (فروست) :۸۹/۱۱۶۶ تاریخ:۸۹/۱۰/۵

با مسئولیت اجرایی جناب آقای همایون حسین زاده صحافی دارای مدرک تحصیلی دکترا در رشته بیولوژی آبزیان می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش اصلاح نژاد و تکثیر و پرورش آبزیان در تاریخ ۱۳۸۹/۵/۹ مورد ارزیابی و با نمره ۱۹و رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد ■ پژوهشکده □ مرکز □ ایستگاه □

با سمت رئیس بخش اصلاح‌نژاد و تکثیر و پرورش آبزیان ستاد موسسه مشغول بوده است.

به نام خدا

عنوان	«فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱- مقدمه ۲
۱-۱- مکانیسم ظهور جنس ۲
۱-۲- روشهای ماده سازی در ماهیان ۳
۱-۳- روش های بکارگیری هورمون ۳
۱-۴- زمان‌بندی دوره درمان ۳
۱-۵- میزان هورمون و طول دوره درمان ۷
۲- مواد و روش کار ۷
۲-۱- محل اجرای پروژه ۷
۲-۲- مشخصات مولدین و تخم‌های چشم زده ۷
۲-۳- معرفی هورمون ۸
۲-۴- مراحل تحقیق ۹
۲-۵- مشخصات خوراک ۹
۲-۶- اضافه نمودن هورمون به غذا ۱۰
۲-۷- تشریح و تشخیص جنسیت ۱۱
۲-۸- شاخص های مورد بررسی ۱۲
۳- نتایج ۱۳
۴- بحث و نتیجه‌گیری ۱۹
پیشنهادها ۲۳
منابع ۲۴
چکیده انگلیسی ۲۶

چکیده

در بسیاری از گونه های پرورشی، جنس ماده نسبت به جنس نر دارای رشد بهتری بوده و در زمان مشخص اندازه بزرگتری دارد، بعلاوه در برخی از گونه ها قبل از رسیدن به اندازه بازاری بالغ می شوند. از این رو علاقه فراوانی در تولیدکنندگان برای تولید جمعیت تمام ماده به وجود می آید. در این پروژه سعی می گردد با استفاده از هورمون ۱۷بتا استرادیول ، جنسیت لاروهای قزل آلای رنگین کمان کنترل گردیده و یک جمعیت تک جنس ماده از قزل آلای رنگین کمان تولید گردد و مشخص گردد دوز بهینه این هورمون طبیعی که به عنوان استروژن این تحقیق مورد استفاده قرار گرفته است برای تولید جمعیت تمام ماده قزل آلای رنگین کمان به چه میزان است. از بین چهار تیمار هورمونی، تیمارD (40 mg/kgf) دارای ٪۹۶ جمعیت ماده بوده و بهترین رشد را در مقایسه با تیمارهای دیگر داشته است.

کلمات کلیدی: قزل آلای رنگین کمان، کنترل جنسیت،۱۷ بتا استرادیول، گوناد

۱- مقدمه

فرآیند بلوغ جنسی در ماهی قزل آلای رنگین کمان که ماهی پرورشی غالب در مناطق معتدل و سردسیر دنیا می‌باشد، به دلیل صرف انرژی جهت تولید مواد تناسلی و در نتیجه تقسیم انرژی بین فعالیت های تولیدمثلی و تولید لاشه میگردد. نتیجه این تقسیم انرژی، کاهش میزان رشد به ویژه در جنس نر خواهد بود و از طرفی دیگر بلوغ جنسی قزل آلای رنگین کمان ، باعث کاهش کیفیت گوشت و بروز اثرات نامطلوب در بافت و رنگ آن می‌گردد. به علاوه به هنگام بلوغ جنسی، حساسیت ماهی نسبت به عوامل بیماریزا و استرس های محیطی افزایش می‌یابد (Bromage and Cumaranatunga1988).

این تغییرات در جنس نر قزل آلای رنگین کمان بارزتر بوده و زودتر آشکار می‌شود، زیرا جنس نر حداقل یک سال زودتر از جنس ماده (جنس نر در سن ۲ سالگی و جنس ماده در سن ۳ سالگی بالغ می‌گردد (Simpson *et al.*, 1979, in: Solar *et al.*, 1984). از آنجاکه مصرف کنندگان علاقه به مصرف ماهی های بالای ۲۵۰گرم دارند، بنابراین درصد قابل توجهی از ماهیان نر، قبل از آن که به اندازهٔ بازاری برسند، به سن بلوغ می رسند و علاوه بر رشد کمی که دارند، به دلیل کیفیت نامطلوب گوشت، بازارپسندی آنها نیز کاهش می‌یابد (Donaldson) (Bye and Lincoln, 1986) (and Solar 1987. بدین ترتیب تغییر جنسیت گونه های پرورشی به سمت جنس بهتر و تولید جمعیت های تک جنس یکی از روش های اصلاح نژاد ماهیان به حساب می آید.

۱-۱- مکانیسم ظهور جنس

مکانیسم ظهور جنس در ماهیان به دو فرایند تعیین جنسیت و تمایز جنسی بستگی دارد. تعیین جنسیت پاسخگوی صفات ژنتیکی جنس (ژنوتیپ) و تمایز جنسی مشخص کننده نوع تکامل گونادها، بیضه یا تخمدان (جنسیت گونادی یا فنوتیپی)خواهد بود1989) (,Billard. تمایز جنسی شامل مهاجرت سلول های بنیادی جنینی (PGCs) استقرار غدد تولیدمثلی و تمایز گونادها به صورت بیضه و تخمدان می باشد.تمایز جنسی ابتدا در ماده ها و سپس در نرها به وقوع می پیوندد (Baker, 1987). تمایز جنسی در ماهیان به دو طریق انجام می گیرد: در نوع اول، گونادهای مستقیماً به یک تخمدان یا بیضه تبدیل میشود. چنین گونه هایی گونه های تمایز یافته نام دارند، آزاد کوهو (Piferrer and Donaldson, 1989)، کپور معمولی (Komen *et al.*, 1992) و باس دریایی اروپایی(Bla´zquez *et al.*, 1995) . در

نوع دوم، ابتدا در تمامی افراد یک غده شبه تخمدانی تشکیل می شود سپس تقریباً در نیمی از آنها در نتیجه از بین رفتن علائمی که باعث بروز صفات مادگی می شود، تمایز بیضوی رخ می دهد.این گونه ها، گونه های تمایز نیافته نام دارند. ماهی گوپی (Yamamoto, 1969) هگ فیش (Gorbman, 1990) و مارماهی اروپایی (Colombo and Grandi, 1990; 1995) مثال هایی از این نوع گونه ها هستند.

۲-۱ - روش های ماده سازی در ماهیان

ماده سازی (feminization) گونه های گونوکوریست به دو طریق امکان پذیر است که شامل روش های مستقیم و غیرمستقیم می باشد (Piferrer, 2001).

در روش اول، کنترل جنسیت با استفاده از هورمون ها بدون هیچ گونه تاثیری بر تعیین جنسیت فقط بر روی مراحل تمایز جنسی تاثیرگذار است. بنابراین در گونه هایی مانند قزل آلا که سیستم تعیین جنسیت به صورت کروموزومی است این روش باعث ماده سازی و نرسازی (masculinization) می شود، بی آنکه نوع کروموزوم های جنسی پس از درمان دچار تغییر گردد(Hendry et al.,2003).

روش غیر مستقیم، برای آن دسته از گونه هایی مناسب است که در سیستم تعیین جنسیت ماده ها به صورت هوموگامتیک باشد. در این روش ابتدا ماده های XX بوسیله هورمون های نرساز به جنس نر تبدیل می شوند، سپس اسپرم این نرهای جدید (Neomale) که فقط کروموزوم X دارند، با تخمک های نرمال آمیزش داده می شوند (Hendry *et al.*, 2003) .

این دو روش با یکدیگر تفاوت هایی دارند. در روش اول از استروژن استفاده می شودو در نسل اوّل جمعیت تک جنس ایجاد خواهد شد، امّا در روش دوّم از آندروژن استفاده می شود و برای تولید جمعیت تک جنس به دو نسل نیاز می باشد، در ضمن مصرف کنندگان نیز دغدغه استفاده از ماهی هایی که در فرایند رشد هورمون مصرف کرده اند را ندارند. گرچه دانشمندان بر این عقیده اند که این دغدغه مبنای علمی ندارد، زیرا مطالعات نشان می دهد پس از گذشت چند ساعت از مصرف خوراک هورمونی، سطح هورمون در بدن به قدری کاهش می یابد که قابل اندازه گیری نیست.

۳-۱- روش های بکارگیری هورمون

روش های متعددی نیز برای استفاده از هورمون ها وجود دارد. Crim در سال ۱۹۸۵ این روش ها را به دو گروه اصلی حاد و مزمن تقسیم بندی نمود که می توان به روش هایی مانند تزریق، حمّام، رژیم غذایی و استفاده از کپسول های silastic اشاره نمود. حال اگر استفاده از هورمون ها در سطح تجاری باشد، در انتخاب روش درمان، باید ملاحظات عملی و اقتصادی را نیز در نظر گرفت. بدین ترتیب فقط دو روش غوطه وری یا حمام(حاد) و استفاده از غذای هورمون دار(مزمن) قابل استفاده خواهد بود (Crim, 1985).

ماهیت استروژن ها در نتیجه درمان موثر خواهد بود. تابحال ۳ ترکیب طبیعی و ۹ ترکیب مصنوعی در مطالعات برای ماده سازی مورد استفاده قرار گرفته است. تفاوت استروژن های طبیعی و مصنوعی در سرعت متابولیسم (Folmar *et al.*, 2000)، میزان توانایی آنها در فعال سازی گیرنده های استروژنی و تنظیم نسخه برداری ژن های ویژه استروژنی خواهد بود(Pandian, 1993). (Kavumpurath and مهمترین متغیرهای کمی در کنترل جنسیت و ماده سازی ماهیان با استفاده از استروژن ها شامل زمان درمان، طول دوره درمان و میزان هورمون مصرفی خواهد بود.

٤-۱- زمان بندی دوره درمان

یکی از مهمترین متغیرها زمان استفاده از استروژن می باشد. به طور کلی ماهیانی که از لحاظ جنسی تمایز نیافته اند در مقایسه با همنوعان تمایز یافته، نسبت به اثرات درمانی استروئیدها حسّاس ترند(Piferrer, 2001).

دانشمندان معتقدند، بسیاری از ماهیان زمانی که تمایز می یابند به درمان های استروئیدی پاسخ نمی دهند یا حدّاقل به دوزهای موثر در زمان تمایز نیافتگی، پاسخ ضعیف تری می دهند. این مطالب لزوم وجود مرحله ای را در دوره تکامل نشان می دهد که اصطلاحاً دوره حسّاس تمایز جنسی یا labile period نام دارد.

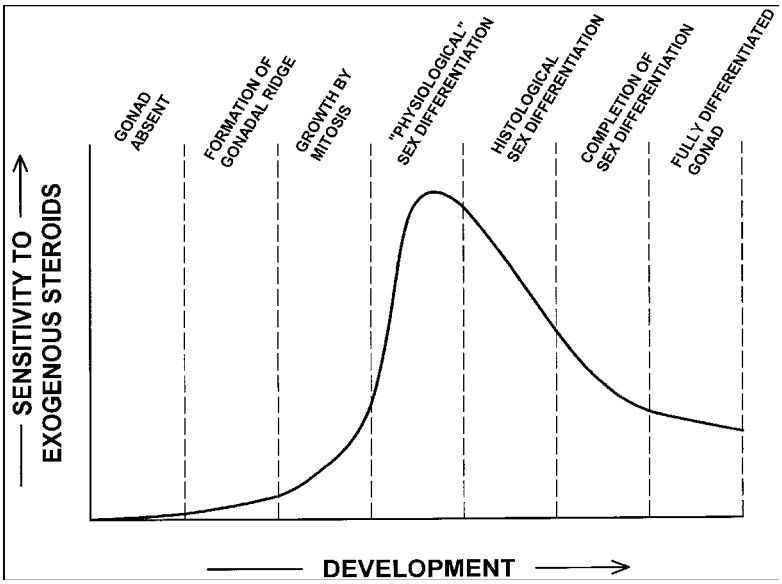
بدین ترتیب اگر هورمون درمانی در طول دوره labile انجام شود به حدّاقل زمان و کمترین میزان استروئید برای دستیابی به جنس مورد نظر نیاز می باشد. وقوع دوره labile بیانگر حوادث پیچیده در گونادها است که نمی توان آن را از لحاظ هیستولوژیک مشاهده نمود،(Nagahama, 2000) زیرا این حوادث جزء اولین علائم هیستولوژیک تمایز جنسی محسوب می گردد (Nakamura *et al.*, 1998). بدین ترتیب این دوره باید مترادف مرحله ای باشد

که گاهی از آن به نام تمایز جنسی فیزیولوژیک یاد می شود (Piferrer, 2001). بررسی ها بر روی دو گونه غیر خویشاوند *O. kisutch* و *Hermihaplochromis multicolor* نشان می دهد

جدول ۱-۱ استروژن های طبیعی و مصنوعی مورد استفاده در ماده سازی

chemicals Synthetic	Natural oestrogens
Diethylstilbestrol (DES)	Oestrone (E1)
Diethylstilbestrol diphosphate (DES-DP)	Oestradiol17b (E2)
Diethylstilbestrol dipropionate (Euvestin)	Oestriol (E3)
Dihydrodiethylstilbestrol (Hexestrol)	
17a-ethynyloestradiol (EE2)	
14,15-methylene oestradiol (ME2)	
Oestradiol benzoate (EB)	
Oestradiol butyryl acetate (EBA)	
Oestradiol propionate (EP)	
	Comparative average potencies
	EE2(1) > DES (~1.5) > E2(~3) > E1 (~12) > E3 (75)

حدّاکثر حساسیت نسبت به استروژن ها زودتر از حدّاکثر حساسیت نسبت به آندروژن ها رخ می دهد (Piferrer and Donaldson,) 1993. این امر نشان می دهد بدون در نظر گرفتن گونه ها، دوره labile در مورد استروژن ها زودتر از این دوره در آندروژن ها به وجود می آید (George and Pandian, 1995) . زمان وقوع دوره labile در گونه های مختلف متفاوت است. حتی در برخی گونه های خویشاوند نیز این دوره متفاوت می باشد. به عنوان مثال در گونه *Poecilia sphenops*این دوره به حدود سی روز پس از تولد نوزادان برمی گردد،در حالیکه در گونه *Poecilia reticulata* این دوره در زمان جنینی قرار دارد (Pandian, 1993) (Kavumpurath and.



نمودار ۱-۱ منحنی تغییرات میزان حسّاسیت نسبت به استروئیدهای جنسی اگزوژن در طول فرایند گونادوژنزیز (Piferrer, 2001)

۱-۵-میزان هورمون و طول دوره درمان

در فرایند کنترل جنسیت ماهیان با استفاده از هورمون ها،ارتباط معکوس میان طول دوره درمان و میزان هورمون مصرفی وجود دارد،امّا به دلایل بهداشتی و زیست محیطی برنامه های کنترل هورمونی جنسیت باید در جهت به حداقل رساندن میزان دارو در طول دوره درمان باشد. روش استفاده از هورمون طول دوره درمان را مشخص می نماید. در استفاده از روش های غوطه وری، ممکن است طول دوره درمان به کوتاهی چند ساعت باشد و در روش استفاده از رژیم غذایی هورمون دار درمان بین چند هفته تا چند ماه طول بکشد. با این حال، اکثر پرورش دهندگان ترجیح می دهند که طول دوره درمان، کوتاه و میزان هورمون مصرفی زیاد باشد.

بررسی کنترل جنسیت در خانواده آزاد ماهیان به عنوان یکی از مهمترین گونه های پرورشی از اهمیت خاصّی برخوردار است، و یافتن متغیرهای بهینه باعث موفّقیت در القای جنسیت خواهد شد. بر این اساس،اهداف پروژه را می توان این گونه تشریح نمود:

- افزایش راندمان تولید
- تولید جمعیت تک جنس ماده قزل آلای رنگین کمان
- جداکردن جنسی که دارای بالاترین میزان رشد می باشد

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- محل اجرای پروژه

مراحل میدانی (هورمون درمانی و نگهداری تیمارها) و مراحل آزمایشگاهی (تشریح و بررسی بافتی و گونادی) پروژه در مرکز ژنتیک و اصلاخ نژاد ماهیان سردآبی یاسوج انجام گرفت.

تصویر ۱-۲- نمایی از مرکز ژنتیک و اصلاخ نژاد ماهیان سردآبی یاسوج

این مرکز در ۲۰ کیلومتری جنوب شهر یاسوج می باشد و دارای زمستان های سرد و تابستان های معتدل است. منبع آب این مرکز چشمه ای می باشد که در طول سال دارای دبی نسبتاً ثابت و دمای ۱۲-۱۰ درجه سانتی گراد است. ارتفاع از سطح دریا در محل انجام پروژه ۱۸۵۰ متر و مقدار اکسیژن هنگام اشباع،۹-۷ میلی گرم در لیتر می باشد.

۲-۲- مشخصات مولدین و تخم های چشم زده

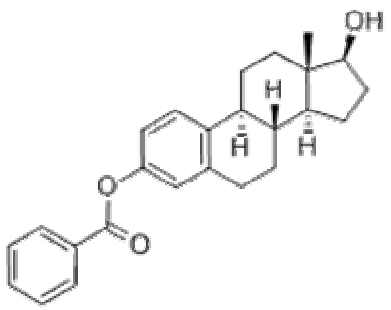
مولدینی که در فصل تکثیر در این مزرعه برای عملیات تخم کشی انتخاب می شوند بین ۳ تا ۵ سال سن دارند و وزن آنها بین۴ تا۶ کیلو است . پس از لقاح ٪ ۸۰ تخم‌های سبز ، به تخم‌چشم‌زده تبدیل‌می‌شود . بازماندگی تخم های

سبز تا مرحله چشم زدن کاملاً عادی بودهتخم های چشم زده از تکثیر اواسط فصل ، انتخاب شدند تا کیفیت مطلوبی داشته باشند . در طی دوره انکوباسیون، برای محافظت از قارچ ساپرولگنیا، تخم های سبز با بتادین ٪۱۰ روزانه ضدعفونی شده و تا مدّتی پس از تخمه گشایی از نور مستقیم محافظت می شدند.

میانگین‌قطرتخم‌های‌چشم‌زده حدودmm ۵/۵ است و وزن هر ۱۱-۱۰عدد آنها یک گرم می‌شود. وزن لاروهای‌دارای کیسه‌زرده بعد از تخمه‌گشایی mg ۱۲۵-۱۲۰ است .

۳-۲- معرفی هورمون

استرادیول مانند دیگر استروئیدها مشتقی از کلسترول می باشد. در فعل و انفعالات فیزیولوژیک، آندروستندیون به تستوسترون تبدیل شده و تستوسترون توسط آنزیم آروماتاز به استرادیول تغییر می یابد. در مسیر دیگر، آندروستندیون توسط آروماتاز به استرون و متعاقباً به استرادیول تبدیل می شود. این هورمون در هر دو جنس نر و ماده موجود است. در جنس ماده به عنوان هورمون رشد بافت های تولیدمثلی عمل کرده و ترکیبی ضروری برای تولید تخمک در تخمدان ها می باشد. در نرها استرادیول، (استروژن ها) در سلول های سرتولی تولید می شود. شواهدی وجود دارد که نشان می دهد که استرادیول، مرگ طبیعی اسپرم ها را به تعویق می اندازد (Pentikainen *et al.*, 2006).این هورمون در مطالعات مربوط به تغییر جنسیت دارای بیشترین پیشینه تحقیق بوده و به دلیل آنکه ترکیبی طبیعی محسوب می گردد، از نظر بهداشتی نیز مقبول تر است. در مقایسه با هورمون های ماده ساز دیگر که برای تغییر جنسیت گونه های آزادماهیان به کار می رود،(استرون یا ۱۷الفا اتینیل استرادیول)این ترکیب دارای اثرات جانبی کمتری می باشد.



تصویر ۲-۲- ساختار مولکولی هورمون ۱۷ بتا استرادیول

٤-۲- مراحل تحقیق

در این تحقیق از روش تجویز خوراکی هورمون برای تغییر جنسیت استفاده می شود، زیرا این روش به عنوان یک روش بهینه معرفی گردیده است (Pandian and Sheela, 1995). بلافاصله پس از شروع شنا و تغذیه فعّال لاروهای دارای کیسه زرده با غذای هورمون دار تغذیه می شوند. این پروژه دارای شش تیمار و سه تکرار و تیمار ها حاوی ۱۵۰۰ قطعه لارو می باشد. در شروع کار، جمعاً ۱۸ تراف مورد استفاده قرار گرفت، که در هر تراف سه سینی و در هر سینی ۵۰۰ قطعه لارو رهاسازی گردید. برنامه ریزی هورمون درمانی تیمارها در جدول ۱-۲ آمده است.

جدول ۱-۲: برنامه ریزی تیمارهای هورمونی

تیمارها	A	B	C	D	E	F
مقدار هورمون (µg/f)	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	-----	-----
دوره درمان (روز)	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	----	----

این پروژه دارای دو تیمار شاهد می باشد. تیمار E شاهد وضعیت طبیعی سالن تکثیر است. در تیمار F عملیاتی که بر روی تیمارهای هورمونی صورت می‌گیرد کاملاً بر روی تیمار F نیز انجام می‌شود ، تنها اختلاف در این است که عامل هورمون از تیمار F حذف گردیده است. اگر عواملی مانند وجود الکل در طول عملیات هورمون تراپی ، موجب ایجاد استرس و کاهش ایجاد بازماندگی تخمها شود ،این تیمار وجود این نوع خطاها را نشان می‌دهد .

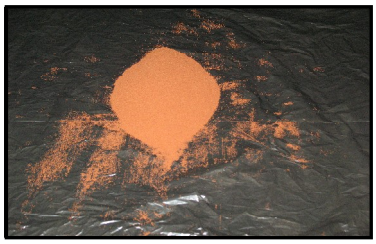
۵-۲- مشخصات خوراک

خوراک آبزیان در اوزان مختلف از کارخانجات تولید غذای کنستانتره تهیه می‌گردد . لاروها تا رسیدن به وزن ۲ گرم از غذای شرکت بیومار محصول کشور فرانسه استفاده می کنند و در اندازه‌های انگشت‌قد ، پیش پرواری خوراک ماهی از کارخانه چینه تهیه می‌شود . آرد ماهی ، روغن ماهی ، آرد کریل ، پروتئینهای هموژنیزه شده ماهی ، آرد گندم ، لسیتین ، نشاسته ، ویتامینها و مواد معدنی و آنتی اکسیدانها مواد تشکیل دهنده خوراک گروه Bio-optimal شرکت بیومار است برای تغذیه مرحله لاروی از سه اندازه ۰/۳، ۰/۵ و ۱/۱ استفاده شد (www.biomar.net).

٦-۲- اضافه نمودن هورمون به غذا

از آنجاییکه هورمون ها در الکل به صورت محلول در می آیند. بدین ترتیب، مقدار مشخصی از هورمون ۱۷ بتا استرادیول را برای هر تیمار در اتانول ۷۰ درجه حل نموده و به ازای هر کیلو غذا ۵۰ سی سی اتانول همراه با هورمون به غذا اسپری می شود (تصویر۳-۲). غذا باید بر روی پلاستیک و با قطر نازک و گسترده پهن شود. پس از اسپری، غذا مخلوط و دوباره اسپری انجام می شود. این کار چندین دفعه صورت می گیرد تا هورمون کاملاً با تمام غذا مخلوط گردد. پس از اتمام این مرحله غذا باید با باد سرد سشوار کاملاً خشک گردیده و داخل ظروف دربسته در یخچال نگهداری شود.

اسپری نمودن هورمون بر روی غذا



مخلوط

اسپری دوباره بر روی غذا

خشک کردن غذا پس از اضافه نمودن هورمون

تصویر ۳-۲- مراحل اضافه نمودن هورمون به غذا

تصویر ٤-۲- تجهیزات مورد نیاز برای آماده سازی غذای هورمون دار

هنگام شروع غذادهی، لاروها حدّاقل ۱۵ نوبت غذا دریافت می کنند. در خلال رشد، دفعات غذادهی کاهش یافته و پس از جذب کامل کیسه زرده با فرمالین هر ۳ روز یکبار (تا اندازه ۲ گرم) ضدعفونی میشوند. از شروع تغذیه فعّال، غذا با مکمل های ویتامینی و معدنی به طور منظم مخلوط و به مصرف ماهی ها می رسد. جیره های مکمل به بازماندگی تیمارهای هورمونی کمک فراوانی می نماید.

تصویر۵-۲- مراحل رشد تیمارهای هورمونی

پس از اتمام هورمون درمانی، شرایط تیمارها از نظر غذادهی، ضدعفونی، تراکم و نور کاملاً یکسان می باشد. بیومتری تیمارها پس از اتمام هورمون درمانی و هر پانزده روز یکبار و ثبت دما، اکسیژن محلول و Ph هر روز انجام می شود. تراکم تراف ها و تانک های نگهداری لارو بر اساس استانداردهای پرورش ماهیدار می شوند.

۷-۲- تشریح و تشخیص جنسیت

اندازه بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان برای تشخیص دقیق جنسیت، ۳۰ گرم می باشد (Piferrer & Donaldson, 1992). در این سایز با تشریح محوطه شکمی و یافتن گونادها که در دو طرف و جسبیده به کیسه شناهستند، آنها را خارج نموده و با مشاهده بوسیله میکروسکوپ، جنسیت بچه ماهی ها مشخّص می شود. برای تشریح از روش Hendryو همکاران استفاده شد(Hendry *et al.*, 2006). گونادهای استخراج شده پس از طی مراحل فیکس شدن، برای قالب گیری و برش به آزمایشگاه منتقل می شود. از هر تیمار ۴۰ عدد بچه ماهی تشریح و تعیین جنسیت گردید.

تصویر ٦-۲- مراحل بیومتری وتشریح تیمارها برای تشخیص جنسیت نهایی

۸-۲- شاخص های مورد بررسی

دراین آزمایشات شاخص های رشد و تغذیه ای بر اساس فورمول های زیر محاسبه می شوند:

الف) رشد ویژه Specific Growth Rate (SGR)

$$SGR = \frac{LnW2 - LnW1}{T2 - T1} * ۱۰۰$$

W1 = وزن اولیه

W2 = وزن ثانویه

T2-T1 = زمان پرورش

ب) Food Convertion Ratio (FCR)

$$FCR = \frac{\text{غذای مصرف شده}}{\text{افزایش وزن(گرم)}}$$

$$WG = \text{وزن نهایی} - \text{وزن اولیه}$$

کلیه اطلاعات حاصل از اندازه گیری های مختلف محاسبات آماری لازم با استفاده از نرم افزار Excel و SPSS انجام می گیرد و جهت آنالیز آماری داده های مربوطه از آنالیز واریانس ANOVA دو طرفه و یک طرفه استفاده می گردد، همچنین برای مقایسه ، جهت بررسی اختلاف و برتری آماری فاکتورهای محاسبه شده از آزمون Dunkan استفاده می گردد .و برای مقایسهٔ نسبت جنسی در نمونه های تیمـــارها با گروه شاهد، آزمون مربع کای مـــــورداستفاده قرار می گیرد.

۳- نتایج

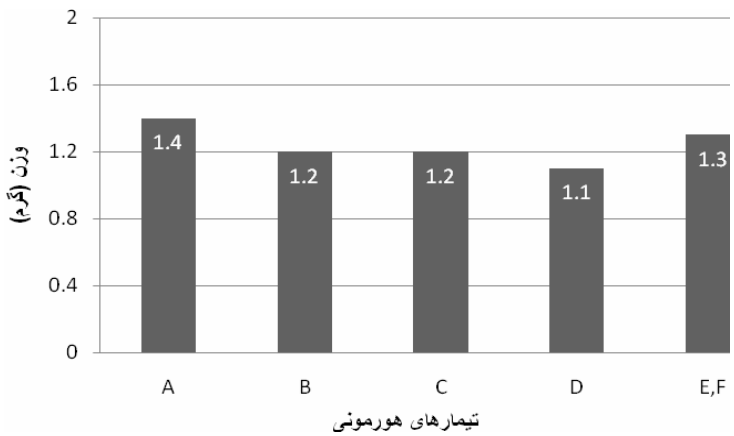
پس از رسیدن تیمارها به وزن دلخواه، نزدیک به ۵۰ قطعه بچه ماهی از هر تیمار به طور تصادفی جدا و تشریح شد. مقایسه مقادیر تغییر جنسیت بین تیمارهای هورمونی با شاهد نشان می دهد استفاده از هورمون E_2 به صورت خوراکی در مقادیر بیان شده بر روی جنسیت بچه ماهی ها تاثیرگذار بوده است. تیمار چهارم که بیشترین مقدار هورمون را مصرف نموده دارای بیشترین میزان تغییرجنسیت می باشد.

جدول ۱-۳- مقادیر تغییر جنسیت در تیمارهای هورمونی و شاهد

تیمار	تعداد کل	تعداد ماده	تعداد نر	درصد ماده سازی	میانگین وزنی(g)	میانگین طولی(cm)	تاریخ زیست سنجی
A	۵۸	۳۱	۲۷	٪۵۳/٤	۱٦,۹	۱۱,٤	۸۸/٦/۱۸
B	٤۲	۲۳	۱۹	٪۵٤/۷	۱۵,۹	۱۱,۸	۸۸/٦/۲۲
C	٤٦	۳۸	۸	٪۸۲/٦	۱۸,۵	۱۲,۱	۸۸/٦/۱٦
D	٤۹	٤٦	۳	٪۹٤	۳۲,۵	۱٤,۲	۸٦/٦/۱٦
شاهد (E,F)	٤۰	۱۵	۲۵	٪۳۷/۵	۲۳,٦	۱۳,۳	۸۸/٦/۲۳

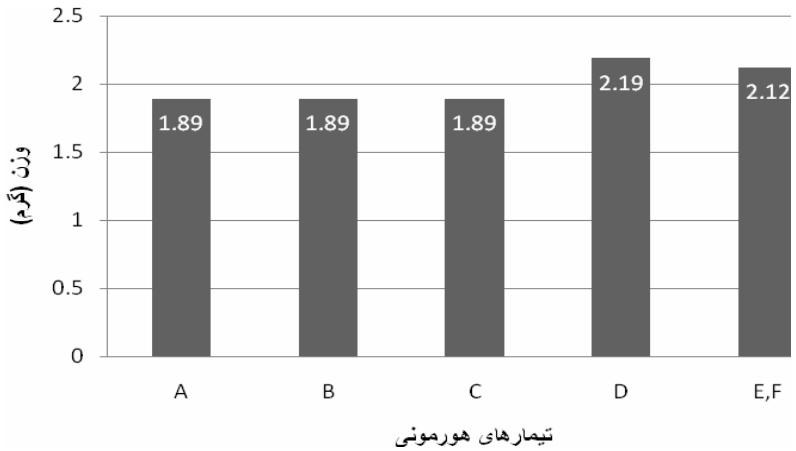
لاروها از تاریخ ۸۷/۱۲/۲۶ تا۸۸/۱/۲۵ به مدت یک ماه غذای هورمون دار مصرف کردند و پس از اتمام هورمون درمانی ثبت وزن و قد لاروها آغاز شد.

مقایسه میانگین وزنی تیمارها با یکدیگر ۳۰ روز پس از تخمه گشایی نشان داد، تیمار A با میانگین ۱/۴ گرم دارایی بالاترین میزان رشد وزنی بوده اند، اما تیمارهای هورمونی و شاهد تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشته اند.



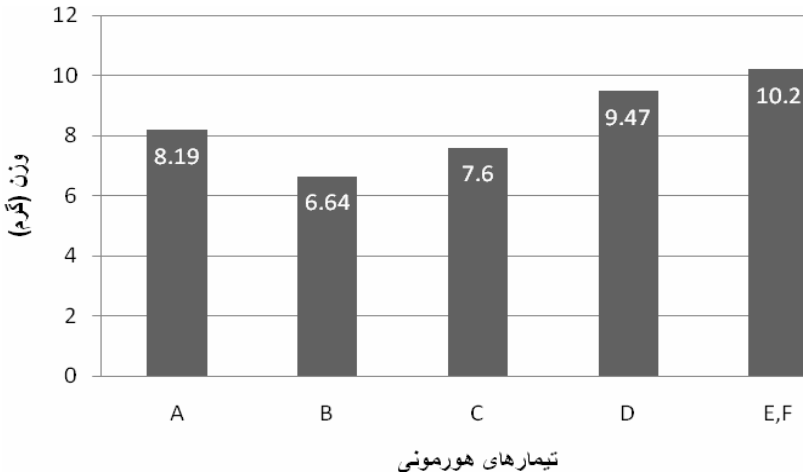
نمودار ۱-۳ - مقایسه میانگین وزنی بچه ماهیان ۳۰ روز پس از شروع شنای فعّال

مقایسه میانگین وزنی تیمارها با یکدیگر ۸۵ روز پس از تخمه گشایی نشان داد، تیمار D با میانگین ۲/۱۹ گرم دارایی بالاترین میزان رشد وزنی بوده اندو تیمارهای تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشته اند.



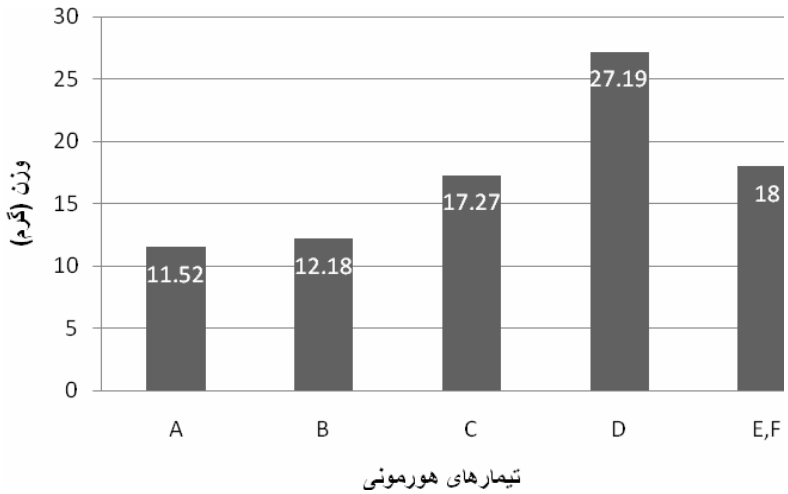
نمودار ۲-۳- مقایسه میانگین وزنی بچه ماهیان ۸۵ روز پس از شروع شنای فعّال

مقایسه میانگین وزنی تیمارها با یکدیگر ۱۲۰ روز پس از تخمه گشایی نشان داد، تیمارهای شاهد با میانگین ۱۰/۲ گرم دارایی بالاترین میزان رشد وزنی بوده اندو تیمارهای هورمونی تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشته اند.



نمودار ۳-۳ مقایسه میانگین وزنی بچه ماهیان ۱۲۰ روز پس از شروع شنای فعّال

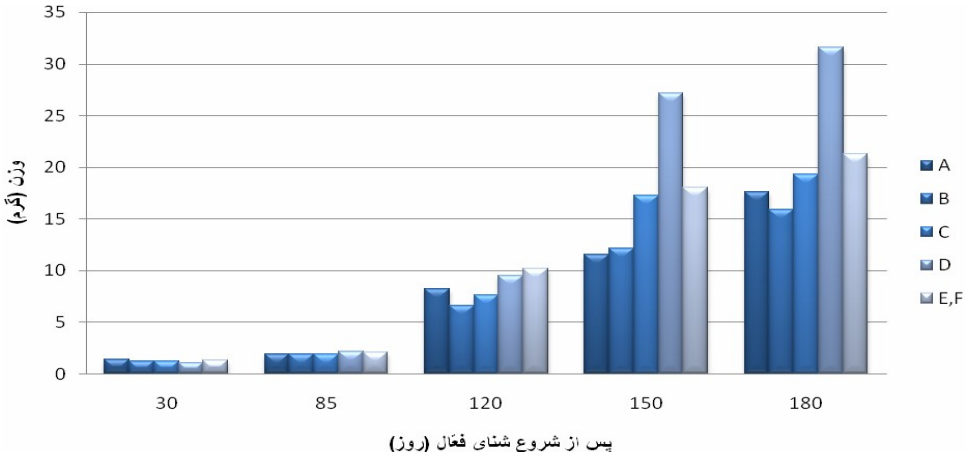
مقایسه میانگین وزنی تیمارها با یکدیگر ۱۵۰ روز پس از تخمه گشایی نشان داد، تیمار D با میانگین ۲۷/۱۹ گرم دارایی بالاترین میزان رشد وزنی بوده اند.



نمودار ٤-۳- مقایسه میانگین وزنی بچه ماهیان ۱۵۰ روز پس از شروع شنای فعّال

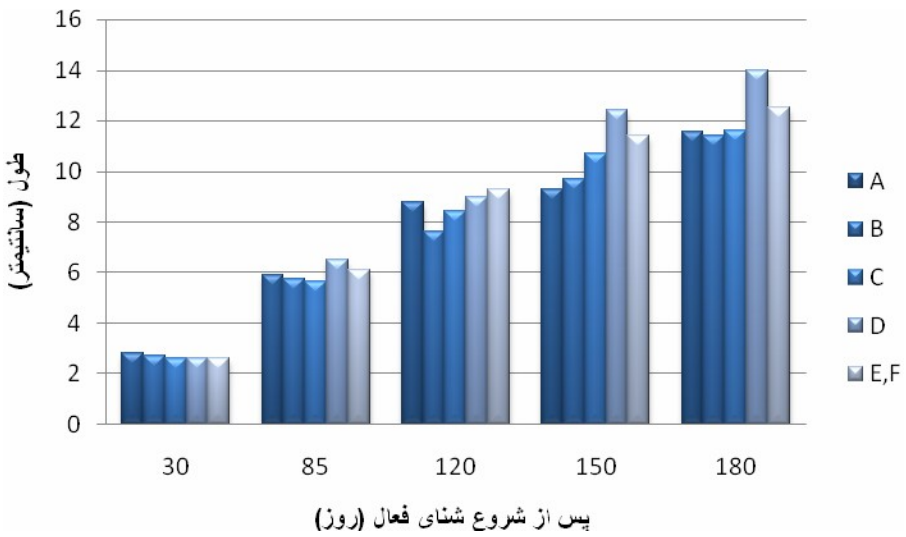
مقایسه میانگین وزنی تیمارها به یکدیگر ۱۸۰ روز پس از تخمه گشایی نشان داد، تیمار D با میانگین ۳۱/۶ گرم دارایی بالاترین میزان رشد وزنی بوده اند به نظر می رسد با توجه به بروز تلفات ناشی از مصرف هورمون در تیمارD و کاهش تراکم این تمیار در تانک های پرورش به رغم کم کردن حجم آب برای برابرشدن شرایط پرورش، رشد بیشتر ناشی از تراکم کمتر باشد.

نمودار ٥-۳ مقایسه میانگین وزنی بچه ماهیان ۱۸۰ روز پس از شروع شنای فعّال

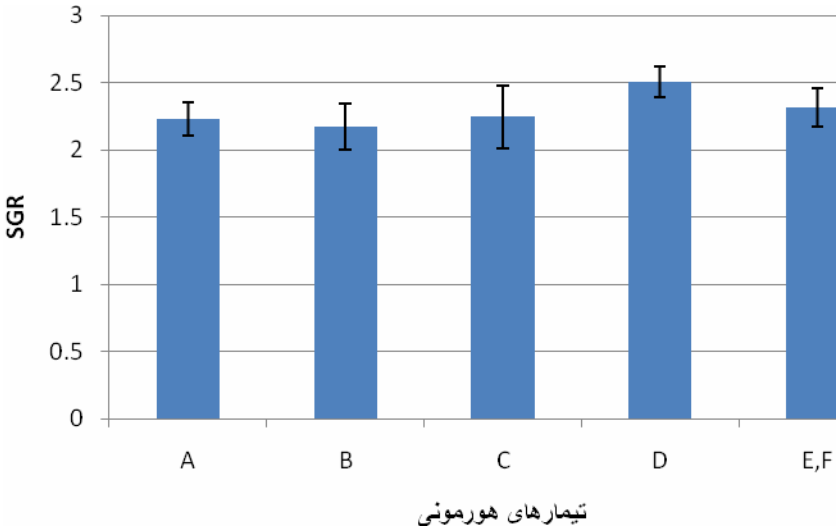


نمودار ٦-٣- روند افزایش وزن تیمارها در زمان های مختلف

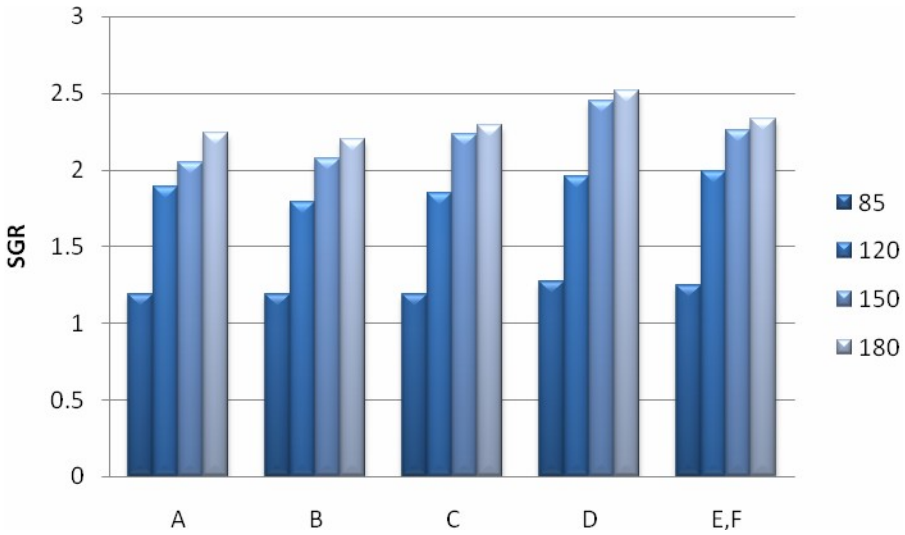
نمودارهای بیومتری نشان می دهد، تیمار D (40mg/k) دارای بیشترین رشد نهایی می باشد، گرچه در بیومتری های اولیه تفاوت بین تیمارها معنی دار نبوده است.



نمودار ۷-۳- روند رشد طولی تیمارها در زمان های مختلف

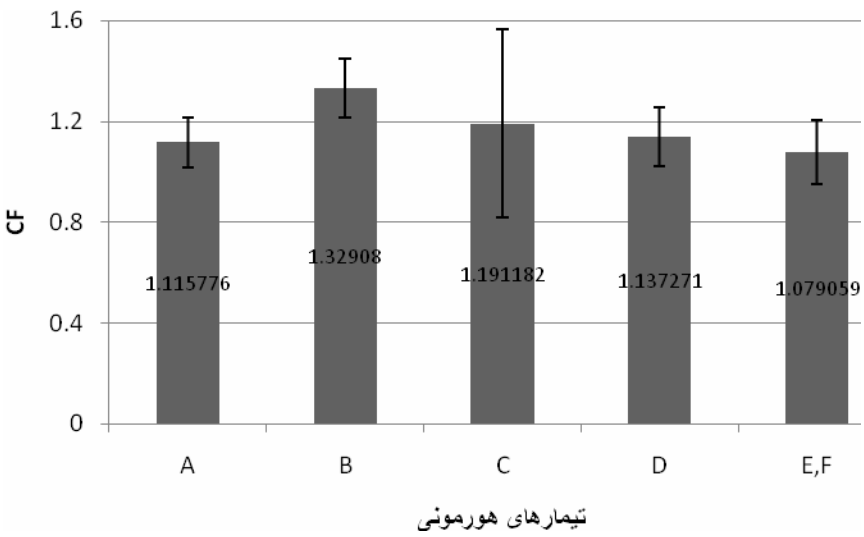


نمودار ۸-۳- ضریب رشد ویژه (SGR) در تیمارها

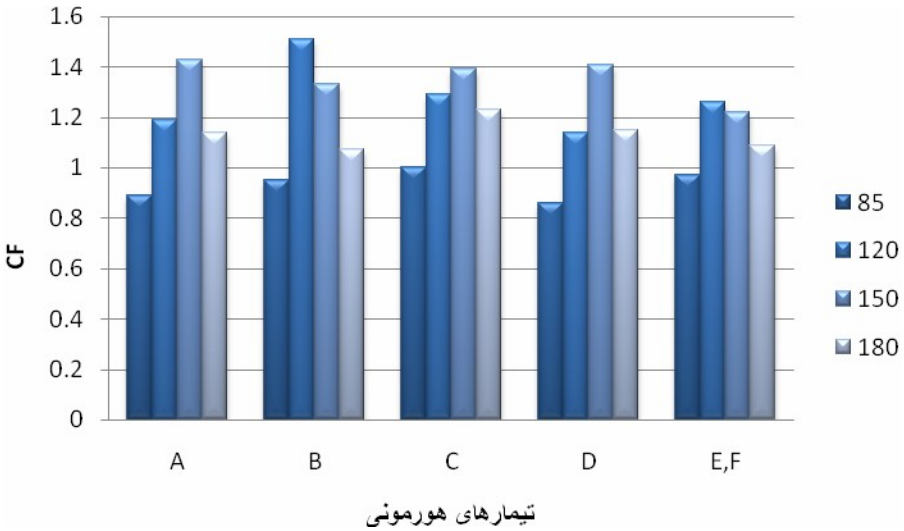


نمودار ۹-۳- مقایسه روند ضریب رشد ویژه تیمارها در زمان های مختلف

در نمودار ۷-۳ ضریب رشد ویژه در تیمارهای هورمونی ارائه گردیده است که بیشترین رشد مربوط به تیمار D (40 mg/kgf) می باشد.



نمودار ۱۰-۳- ضریب چاقی (CF) در تیمارها



نمودار ۱۱-۳- مقایسه روند ضریب چاقی تیمارها در زمان های مختلف

٤- بحث و نتیجه‌گیری

در اواخر دهه ۱۹۳۰ و واویل دهه ۱۹۴۰ میلادی مشخص گردید که غدد تناسلی ماهیان می‌تواند تحت تاثیر هورمون ها قرار گیرد. بدین صورت افزایش ظهور یک جنس با ویژگیهای خاص فیزیولوژیک ، مورفولوژیک و اتیولوژیک در پرورش ماهیان مزایای فراوانی به دنبال داشته باشد (Schreck, 1974). برخی از نتایج حاصل از کنترل جنسیت (ماده سازی) در ماهیان را می‌توان افزایش تعداد تخم و بچه ماهی در صورت ایجاد و پرورش ماده‌های واقعی ، یافتن جنس دارای مزایای بالای رشد ، جلوگیری از بلوغ زودرس و افزایش کیفیت داشتن بیان نمود (Hunter and Donaldson, 1983). کنترل جمعیت با استفاده از استروژن‌ها بیشتر محدود به ماهیان استخوانی است . زیرا بسیاری از ماهیان در فرآیند تعیین جنسیت در طول زندگی دارای ثبات جنسی بوده و از این رو بیشتر بر روی گونه‌های گونوکوریست مطالعه صورت گرفته است گرچه نمونه‌هایی از تاثیر استروژن ، بر ماهی دهان گرد روخانه‌ای و ماهی استرلیاد وجود دارد (Yamazaki, 1983).

همان طور که در مقدمه اشاره شده ماهیان تا قبل از تمایز جنسی ، نسبت به استروئیدهای خارجی ، حساسیت بیشتری دارند و بعد از این مرحله ، کنترل جنسیت به مقدار بالاتر استروئید و زمان بیشتر درمان نیازدارد (Nakamura and Takahshi,1973). بدین ترتیب دوره حساس تمایز جنسی "labile period" در موفقیت تغییر جنسیت بسیار با اهمیت می‌باشد و از آنجا که این مرحله از اولین علائم هسیتولوژیک می‌باشد و گاهی از آن به نام تمایز جنسی فیزیولوژیک نامبرده می‌شود. این واقعه قابل مشاهده نخواهد بود (Hackmano and Reinboth, 1974) و با آزمایش‌های پی درپی در زمانهای گوناگون تکامل می‌توان تا اندازه‌ای این مرحله را در گونه‌ها شناسایی نمود (Piferrer and Donaldson, 1989). عوامل مختلفی بر "labile period" تاثیرگذار است ، جنسیت یکی از این عوامل می‌باشد. در جنس ماده این دوره زودتر از جنس نر به وقوع می‌پیوندد(Bruśle and Bruśle, (1983. نوع و ماهیت هورمون ، دوره حساس تمایز جنسی را تحت تاثیر قرار می‌دهد و مقادیر بالاتر هورمون می‌تواند "labile period" را افزایش دهد. ناکامورا در سال ۱۹۸۴ ثابت کرد دوره "labile" در ماهی آزاد ماسو (*O. masou*) در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد بین ۲۲-۵ روز قبل از تخم گشایی می‌باشد (Piferrer and Donaldson, 1992) . مطالعات نشان می‌دهد ماهی آزاد چینوک در زمان تخم‌گشایی به هورمون های اگزوژن حساس نیست (Baker et al., 1988). این موضوع نشان می‌دهد حتی در گونه‌هایی که خویشاوندی نزدیکی با یکدیگر دارند دوره "labile" می‌تواند

متفاوت باشد. Piferrer (2001) معتقد است دوره "labile" در قزل آلای رنگین کمان همزمان با شروع جذب کیسه زرده و شروع شنای فعال همراه خواهد بود. بدین ترتیب ، مصرف خوراکی هورمون همزمان با شروع تغذیه فعال به مدت یک ماه ، همزمان با دوره حساس تمایز جنسی در قزل‌آلا می‌باشد.

هورمون ۱۷ بتا استرادیول (E_2) به عنوان یک استروئید طبیعی یکی از متداول ترین استروژن‌ها برای القای جنسیت ماده از ماهیان می‌باشد و نسبت به استرون (E_1) و ۱۷ آلفا اتینیل استردیول (EE_2) دارای اثرات ماده سازی موثرتر بوده و به اندازه این دوهورمون تاثیرات منفی بر بازماندگی ندارد. Okada و همکاران (۱۹۷۳) با استفاده از رژیم خوراکی استرون به مقدار mg / kgf ۱۰۰–۱۰ دارای تیمارهای با مرگ و میر زیاد و رشد کاهش یافته قزل‌آلای رنگین‌کمان بودند (Okada, 1973). Jalabert و همکاران (۱۹۷۵) با استفاده از رژیم خوراکی استرون ، ۳۰٪ جنسیت بنیابینی در تیمارهای قزل‌آلای رنگین‌کمان گزارش کردند (Jalabert et al., 1975). Piferrer و Donaldson (2001) پس از غوطه‌وری لاروهای ماهی آزاد کوهو با دوز ۴۰۰ میکروگرم در لیتر EE_2 بمدت ۴ ساعت ٪۱۰۰ تلفات گزارش کردند در صورتیکه استفاده از E_2 با مقدار ۴۰۰ میکروگرم بر لیترE_2 بمدت ۸ ساعت در این گونه نزدیک به ٪۱۰۰ جمعیت ماده تولید نموده و بازماندگی به طرز معنی‌دار کاهش نیافته بود.Jhonstone و همکاران (۱۹۷۵) با استفاده از رژیم خوراکی E_2 به مقد ار ۱۰ میلی گرم در کیلوگرم غذا بمدت ۳۰ روز ، ٪۱۰۰ جمعیت ماده تولید کردند ، گرچه رشد تیمارها پس از درمان کاهش یافته بود Hunter (Jhonstone et al., 1978). و همکاران (۱۹۶۸) با استفاده ازهر دو روش غوطه وری (100-400/mg) و خوراکی (5mg/kgf) هورمون E^2 توانستند ٪۱۰۰–۸۰ *O. kisutch* ماده به هنگام بلوغ تولید نمایند(al., 1982) (Hunter et. رزمی و همکاران با استفاده از رژیم خوراکی EE_2 به مقدار ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا موفق به تولید ٪۱۰۰ جمعیت ماده قزل‌آلا شدند.

نتایج تحقیقات فوق نشان می‌دهد، دوز بهینه (۴۰ میلی‌گرم غذا) هورمون E_2 تقریباً نزدیک به مطالعات و آزمایشات معتبر می‌باشد. این نکته قابل ذکر است که نحوه استفاده از استروئیدها در روش غوطه وری و خوراکی متفاوت می‌باشد . در روش غوطه وری جذب ، بیشتر از طریق پوست ، زرده و آبشش صورت می‌گیرد و در رژیم خوراکی بیشترین جذب هورمون در صورت مصرف غذا بوسیله سیستم گوارش انجام می پذیرد. بدین ترتیب عدم دریافت منظم غذا توسط لاروهای نورس در روزهای ابتدایی تغذیه مصرف استروئید را افزایش می‌دهد (رزمی وهمکاران.، ۱۳۸۶).

در بسیاری از گونه استروژن ها اثرات منفی بر بازماندگی دارد. به عنوان مثال در ماهی آزاد کوهو مشاهده گردید یک دوره درمانی با µg/lit ۸۰۰ هورمون استرادیول میزان تلفات را به شدت افزایش داده است . در آزمایشی دیگر ، در گونهٔ "*Cichlosoma nigrofasciatum*" پس از دریافت رژیم غذایی 200mg/kgf ۱۷ بتا استرادیول به مدت ۲۰ روز میزان بقاء بسیار کاهش پیدا کرد(George and Pandian,1996). به این نکته نیز باید اشاره نمود که میزان بازماندگی ارتباط نزدیکی با میزان هورمون مصرفی ، مدت زمان درمان و ماهیت هورمون دارد ، اما آنچا روشن است ، درمان با استروژن ها هیچ گاه باعث افزایش بازماندگی نخواهد شد(Piferrer, 2001). استفاده از هورمون در مقادیر بالا اغلب منتج به افزایش تلفات و کاهش رشد می‌شود. اما استفاده از استروئیدهای مصنوعی به میزان پایین ، رشد ماهیان را افزایش می‌دهد(McBride and Fagerlund, 1973).

Piferrer & Donaldson (1992) نشان دادند استفاده از EE_2 بمدت ۲ساعت از طریق غوطه وری با دوز 400 µg/lit باعث افزایش قد و وزن ماهی آزاد کوهو شده است. در حالیکه Goetz و همکاران 1979 دریافتند زمانی که مقادیر بالایی از استرادیول مورد استفاده قرار می‌گیرد میزان رشد کاهش می‌یابد. Blazques و همکاران نیز در سال 1998 تاثیر استرادیول را بر کاهش رشد باس اروپایی تائید نمودند. این مطالعات نشان می‌دهد حتی در گونه‌هایی که رشد جنس ماده سریعتر از جنس نر است استفاده از استروژن سرعت رشد را کاهش می‌دهد.

مطالعات بسیاری در مورد از بین رفتن و رفع استروئیدهای خارجی که در مراحل تمایز جنسی استفاده می‌شود انجام گرفته است . از آنجا که استروئیدهای جنسی پس از متابولیسم در کبد ، دفع می شوند(Piferrer, 2001). با صرف نظر از میسر استفاده استروئید های خارجی نیز طبیعتاً طی چند روز از بین می‌روند. کاربرد استروئیدها در کنترل جنسیت ماهیان با استروئیدهایی که در پروار کردن دام‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد تفاوت آشکار دارد. در دام‌هایی مانند گاو معمولاً استروئیدهای مصنوعی استفاده می‌شود، در حالیکه در ماهیان از نوع طبیعی استفاده می‌شود(Jhonstone et al., 1983). دلیل استفاده از هورمون در دام‌ها پروار کردن است و به این دلیل دوره درمان طولانی خواهد بود اما در ماهیان درمان به اندازه چندساعت یا چند روز به طول می‌انجامد(Rothbard *et al.*, 1990) دوره درمان در ماهی ، ماهها یا سالها تا قبل از رسیدن به اند ازه بازاری به پایان می‌رسد و هنگام صید هیچ مقادیری از این ترکیبات را در بدن خود ندارند. البته این امکان نیز وجود دارد که از روش‌های غیرمستقیم ماده سازی استفاده شود تا ماهیان خریداری شده در معرض مستقیم استروئیدهای خارجی قرار نگرفته باشند(Piferrer,2001).

پرورش ماهیان سرد آبی در کشور جمهوری اسلامی ایران در طی ۱۰ سال گذشته از رشد مضاعف بر خودار بوده به نحوی که از ۵۰۰تن به ۵۰۰۰۰ تن در سال ۸۶ رسیده است ، امروز در بسیاری از کشور های دنیا موضوع پرورش ماهیان تک جنس در دستور کار قرار دارد وبا توجه به کاهش فاصله در آمد وهزینه در پرورش قزل آلا ی گشور این پروژه در تقویت اقتصاد تولید عرضه گردیده است

پیشنهادها

- استفاده از آندروژن ها در دوزهای پائین و مدت های کوتاه به منظور بررسی تاثیرات بر روی رشد
- تولید جمعیت تک جنس به روش غیرمستقیم
- تولید کلون های تمام ماده از طریق ژینوژنز
- استفاده از استرادیول برای تغییر جنسیت گونه های جدید

منابع

۱. حسین‌زاده صحافی، ه.، ۱۳۸۰ . بیولوژی تولید مثل ماهی با تأکید بر ماهی‌های ایران . مؤسسه‌نشر جهاد وابسته به جهاد دانشگاهی واحد تهران ، ۲۷۲ص.

۲.رزمی، ک.، ۱۳۸۶ . بررسی تغییر جنسیت قزل آلای رنگین کمان بوسیله هورمون ۱۷ آلفا اتینیل استرادیول ، پایان نامه دوره کارشناسی‌ارشد ،دانشکده‌علوم‌وفنون‌دریایی، واحد تهران‌شمال، دانشگاه‌آزاداسلامی، ۱۴۳ ص.

3. Baker, I.J., 1987. Treatment protocols for hormonal sex control of salmonids in aquaculture. Program of technology transfer of sex control techniques for aquaculture under DFOrSyndel labs. Health and Welfare Canada, 10 pp.
4. Baker, I.J., Solar, I.I., Donaldson, E.M., 1988. Masculinization of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by immersion treatments using 17a-methyltestosterone around the time of hatching. Aquaculture 72, 359–367.
5. Billard,R.,1989. Endocrinology and fish culture. Fish Physiol. Biochem.7,49-58.
6. Bla´zquez, M., Piferrer, F., Zanuy, S., Carrillo, M., Donaldson, E.M., 1995. Development of sex controltechniques for European sea bass*ŽDicentrarchus labrax* L..aquaculture: effects of dietary 17a-methyltestosterone prior to sex differentiation. Aquaculture 135, 329–342.
7. Bromage, N. and K., Cumarantungo, 1988 . Egg production in the rainbow trout . Recent advances in aquaculture. Vol.3, F. Muir and J. Robert (Editors), Croom Helm . pp : 63-138.
8. Brusle´, J., Brulse´, S., 1983. La gonadogene`se des Poissons. Reprod., Nutr., De´v. 23, 453–491.
9. Bye, V.J., Lincoln, R.F., 1986. Commercial methods for the control of sexual maturation in rainbow trout(*Salmo gairdneri* R.). Aquaculture 57, 299–309.
10. Colombo, G., Grandi, G., 1990. Gonad sex differentiation of *Anguilla anguilla* by sex steroids. Int. Rev. Hydrobiol. 76, 763–773.
11. Colombo, G., Grandi, G., 1995. Sex differentiation in the European eel: histological analysis of the effects of sex steroids on the gonad. J. Fish Biol. 47, 394–413.
12. Crim, L.W., 1985. Methods for acute and chronic hormone administration in fish. In: Lee, C.S., Liao, I.C. ŽEds.., Reproduction and Culture of Milkfish. Oc. Institute and Tung Kang Mar. Lab., Hawaii and Taiwan, pp. 1–13.
13. Folmar, L.C., Hemmer, M., Hemmer, R., Bowman, C., Kroll, K., Denslow, N.D., 2000. Comparative estrogenicity of estradiol, ethynyl estradiol and diethylstilbestrol in an in vivo, male sheepshead minnow (*Cyprinodon* ? *ariegatus*), vitellogenin bioassay. Aquat. Toxicol. 49, 77–88
14. George, T., Pandian, T.J., 1995. Production of ZZ females in the female-heterogametic black molly, *Poecilia sphenops*, by endocrine sex reversal and progeny testing. Aquaculture 136, 81–90.
15. George, T., Pandian, T.J., 1996. Hormonal induction of sex reversal and progeny testing in the zebra cichlid *Cichlasoma nigrofasciatum*. J. Exp. Zool. 275, 374–382.
16. Goetz, F.W., Donaldson, E.M., Hunter, G.A., 1979. Effects of estradiol-17b and 17a-methyltestosterone on gonadal differentiation in the coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. Aquaculture 17, 267–278.
17. Gorbman, A., 1990. Sex differentiation in the hagfish *Eptatretus stouti*. Gen. Comp. Endocrinol. 77, 309–323.
18. Hackmann, E., Reinboth, R., 1974. Delimitation of the critical stage of hormone-influenced sex differentiation in *Hemihaplochromis multicolor* (Hilgendorf Cichlidae). Gen. Comp. Endocrinol. 22, 42–53.
19. Hendry. C.I., Martin-Ribochaud. D.J. and Benfey. T.J., 2003. Hormonal sex reversal of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus L.*). Aquaculture. 219 769–781.
20. Hendry. C.I., Martin-Ribochaud. D.J. and Benfey. T.J., 2003. Hormonal sex reversal of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus L.*). Aquaculture. 219 769–781.
21. Hunter, G.A., Donaldson, E.M., 1983. Hormonal sex control and its application to fish culture. In: Hoar, W.S.,

22. Hunter, G.A., Donaldson, E.M., Goetz, F.W., Edgell, P.R., 1982. Production of all female and sterile coho salmon, and experimental evidence for male heterogamety. Trans. Am. Fish. Soc. 111, 367–372.
23. Jalabert, B., Billard, R., Chevassus, B., 1975. Preliminary experiments on sex control in trout: production of sterile fishes and simultaneous self-fertilizable hermaphrodites. Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys. 15, 19–28.
24. Johnstone, R., Macintosh, D.J., Wright, R.S., 1983. Elimination of orally administered 17a-methyltestosterone by *Oreochromis mossambicus* (tilapia) and *Salmo gairdneri* (rainbow trout) juveniles. Aquaculture 35, 249–257.
25. Johnstone, R., Simpson, T.H., Youngson, A.F., 1978. Sex reversal in salmonid culture. Aquaculture 13, 115–134.
26. Komen, J., Yamashita, M., Nagahama, Y., 1992. Testicular development induced by a recessive mutation during gonadal differentiation of female common carp (*Cyprinus carpio* L.). De´velop Growth Differ. 34, 535–544.
27. McBride, J.R., Fagerlund, U.H.M., 1973. The use of 17a-methyltestosterone for promoting weight increases in juvenile Pacific salmon. J. Fish. Res. Board Can. 30, 1099–1104.
28. Nakamura, M., Takahashi, H., 1973. Gonadal sex differentiation in *Tilapia mossambica* with special regard to the time of oestrogen treatment effective in inducing feminization of genetic fishes. Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ. 24, 1–23.
29. Okada, H., 1973. Studies on sex differentiation of salmonidae. I. Effects of estrone on sex differentiation of the rainbow trout (*Salmo gairdneri irideus*, Gibbons). Sci. Rep. Hokkaido Fish Hatchery 28, 11–212.
30. Pandian, T.J., 1993. Endocrine and chromosome manipulations techniques for the production of all-male and all-female population in food and ornamental fishes. Proc. Indian Natl. Sci. Acad. B59, 549–566.
31. Pandian, T.J., 1993. Endocrine and chromosome manipulations techniques for the production of all-male and all-female population in food and ornamental fishes. Proc. Indian Natl. Sci. Acad. B59, 549–566.
32. Pentik?inen V, Erkkil? K, Suomalainen L, Parvinen M, Dunkel L. Estradiol Acts as a Germ Cell Survival Factor in the Human Testis *in vitro*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2006; 85:2057-67
33. Piferrer, F., and Donaldson, E.M., 1992. The comparative effectiveness of the natural and a synthetic estrogen for the direct feminization of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*).Aquaculture 106, 183–193.
34. Piferrer, F., Donaldson, E.M., 1989. Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after asingle treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. Aquaculture 77,251–262.
35. Piferrer, F., Donaldson, E.M., 1989. Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. Aquaculture 77, 251–262.
36. Piferrer, F., Donaldson, E.M., 1992. The comparative effectiveness of the natural and a synthetic estrogen for the direct feminization of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) Aquaculture 106, 183–193.
37. Rothbard, S., Zohar, Y., Zmora, N., Levavi-Sivan, B., Moav, B., Yaron, Z., 1990. Clearance of 17a-ethynyltestosterone from muscle of sex-reversed tilapia hybrids treated for growth enhancement with two doses of the androgen. Aquaculture 89, 365–376.
38. Schreck, C.B., 1974. Hormonal treatment and sex manipulation in fishes. In: Schreck, C.B. (Ed.), Control of Sex in Fishes. Virginia Polytechnic Institute and State University Sea Grant Program, pp. 84–106.
39. Simpson, T.H., 1976. Endocrine aspects of salmonid culture. Proc. R. Soc. Edinburgh (B) 75, 241–252.
40. Solar, I.I., Baker, I.J., Donaldson, E.M., 1987. Experimental use of female sperm in the production of monosex female stocks of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) at commercial fish farms. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. 1552, 14 pp.
41. Yamamoto, T., 1969. Sex differentiation. In: Hoar, W.S., Randall, D.J.ŽEds.., Fish Physiology, vol. III, Reproduction, Academic Press, New York, pp. 117–175
42. Yamazaki, F., 1983. Sex control and manipulation in fish. Aquaculture 33, 329–354.

Abstract
In many species of finfish, females exhibit higher growth rates than males and achieve larger sizes. In addition, in some species, males mature before reaching marketable size. Therefore, there is great interest from the fish farmers to produce all-female stocks. In this project tried to reversing the sex of rainbow trout larvae by 17β estradiol and direct method, further more finding the optimum dose of this natural estrogen for endocrine sex reversion of Rainbow trout (*O. mykiss*). Four experimental treatments were designed with doses of 10, 20, 30 and 40 mg/kgf. Trout which treated with 40 mg/kgf yielded 96% female and greatest growth.
Key words: rainbow trout, sex control, 17β estradiol, gonad

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION – Inland Waters Aquaculture Research Center - Cold water Fishes Genetic Research Center

---

Title : Production of Monosex Female Population of Rainbow Trout by Use of 17-B Estradiol as Direct Method
Apprpved Number: 4-12-12-87046
Author: Homayoon Hoseinzadeh Sahafi
Executor *:* Homayoon Hoseinzadeh Sahafi
Collaborator(s):T.Bashti,D.Zargham,K.Razmi,H.Abdolhai,J.Moazedi,,H.Gandomkar,M.Salahi,H.Moradian, E.Gorjipor
Advisor(s):-
Location of execution *:* Guilan & Charmahal-o-Bakhtiyari provinces
Date of Beginning : 2009
Period of execution : *1Year & 6 Months*
Publisher : ***Iranian Fisheries Research Organization***
Circulation : 20
Date of publishing : ***2011***
All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE

AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION

IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION - Cold water Fishes Genetic Research Center – Inland waters Aquaculture Research Center

Title:

Production of Monosex Female Population of Rainbow Trout by Use of 17-B Estradiol as Direct Method

Executor :

Homayoon Hoseinzadeh Sahafi

Registration Number

2010.1166