View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

عنوان:

تعیین بقایای هورمونی B- Estradiole در ماهیان قزل آلای رنگین کمان با هدف ارتقاء سلامت ماهیان

مجری :
همایون حسین زاده صحافی

شماره ثبت
٤٥٨٠٩

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری(یاسوج)

عنوان پروژه : تعیین بقایای هورمونی B- Estradiole در ماهیان قزل آلای رنگین کمان باهدف ارتقاء سلامت ماهیان
شماره مصوب پروژه : ۹۱۱۲۶-۱۲-۱۲-۲
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : همایون حسین زاده صحافی
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) :
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : همایون حسین زاده صحافی
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : طیبه باشتی ، داود ضرغام ،سهراب رضوانی گیل کلائی ، حسین عبدالحی، پریسا امانی نژاد، عین ا.. گرجی پور ، حبیب ا.. گندم کار، زهره مخیر، ابوالحسن راستیان نسب، میثم صلاحی
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : مصطفی شریف روحانی
محل اجرا : استان کهگیلویه و بویر احمد
تاریخ شروع : ۹۱/۶/۱
مدت اجرا : ۱ سال
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال ۱۳۹٤
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

پروژه : تعیین بقایای هورمونی B- Estradiole در ماهیان قزل آلای رنگـین کمان باهدف ارتقاء سلامت ماهیان

کد مصوب : ۹۱۱۲۶-۱۲-۱۲-۲

شماره ثبت (فروست) : ٤٥٨٠٩ تاریخ : ۹۳/٦/۲۵

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

پروژه توسط داوران منتخب بخش اصلاح نژاد و تکثیر و پرورش آبزیان در تاریخ ۹۳/۵/۲۰ مورد ارزیابی و رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد ■ پژوهشکده □ مرکز□ ایستگاه □

با سمت عضو هیئت علمی در موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور مشغول بوده است.

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱- کلیات ۲
۱-۱-مقدمه ۲
۱-۲- پیشینه تحقیق ۳
۱-۳- روند تولید ماهیان سردآب ۵
۱-۴- روش های هورمونی ماهیان تک جنس ۶
۱-۵- زمان های بحرانی در ماده سازی ماهیان ۶
۱-۶- انواع هورمون های موثر در ماده سازی ماهیان ۷
۱-۷- هورمون ۱۷ بتا استرادیول ۸
۱-۸- هورمون پروژسترون ۹
۱-۹- هورمون تستوسترون ۱۰
۱-۱۰- دوز مصرفی استروژن ها برای ماده سازی ۱۰
۱-۱۱- اهداف پروژه ۱۲
۲- مواد و روش ها ۱۴
۲-۱- شرایط اکولوژیک محل اجرای پروژه ۱۴
۲-۲- مشخصات مولدین و تخم های چشم زده ۱۴
۲-۳- نحوه ترکیب هورمون با غذا و عملیات هورمون تراپی ۱۵
۲-۴- انجام عملیات بیومتری و تگ زنی ۱۵
۲-۵- عملیات خونگیری ۱۶
۲-۶-روش سنجش هورمونی ۱۷
۲-۷- روش آماری ۱۸
۳-نتایج ۱۹
۳-۱- نتایج حاصل از تاثیر هورمون ۱۷ بتا استرادیول ۹
۳-۲- هورمون تستوسترون ۲۰
۳-۳- هورمون پروژسترون ۲۲
۴- بحث ۲۳
منابع ۲۷
چکیده انگلیسی ۲۹

چکیده

در این تحقیق بازماندگی سطح استروئید جنسی ۱۷ بتا استرادیول(E2)در پلاسمای ماهی قزل آلای رنگین کمان در دوره های زمانی مختلف (۰ ، ۰/۵ ، ۱،۲،۴،۸،۱۲،۲۴ و ۱۶۸ ساعت) مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور آزمایشات بر روی ۷۰ قطعه ماهی ماده با وزن تقریبی ۱۱± ۱۰۰ گرم در قالب ۷ گروه انجام و میزان هورمون ۱۷ بتا استرادیول در خون ماهی ها مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین به منظور ارزیابی تاثیر باقیمانده هورمونی ناشی از ماده سازی ماهیان در مرحله لاروی تعداد ۱۰ عدد ماهی بالغ ماده شده به طورجداگانه با گروه کنترل درقالب دو تیماردرنظر گرفته شد. پس از تجویزهورمون و براساس دوره های زمانی در نظر گرفته شده، ازآئورت شکمی ماهیان در تیمارهای زمانی مختلف خونگیری نموده و جهت سنجش هورمون ، پلاسمای خون جداسازی و با کیت مخصوص وبا روش رادیو ایمنو اسی(RIA) مورد سنجش قرار گرفتند .

نتایج آنالیز از نظر سطح هورمون ۱۷ بتا استرادیول در بین دوره های مختلف خونگیری اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد (P<۰/۰۰۱). سطح هورمون ۱۷ بتا استرادیول در دوره های زمانی ۰/۵ و ۱ ساعت بیشتر بود. همچنین در دوره های زمانی ۲ و ۱۲ ساعت سطح هورمون ۱۷ بتا استرادیول بیشتربود. بیشترین مقدار هورمون مربوط به ساعت ۰,۵ یعنی ۳۰ دقیقه پس از قطع دوره هورمون تراپی با مقدار ۹ ± ۱۲۱ نانوگرم بر میلی لیتر و کمترین آن مربوطه به تیمار ۱۶۸ ساعت و شاهد با مقدار متوسط ۰/۹ ± ۳ نانوگرم بر میلی لیتر بود. بین سطح پلاسمایی هورمون۱۷ بتا استرادیول در تیمار های شاهد و تیمار خونگیری شده در ساعت ۱۶۸ و همچنین سطح پلاسمایی این هورمون در ماهیان تک جنس شده ماده ۱۰۰ گرمی اختلاف معنی دار مشاهده نگردید. نوسانات هورمون پروژسترون محدود و در طیف ۰/۳ تا ۱/۱ نانوگرم بر میلی لیتر در نوسان بوده است.افزایش معنی دار در هورمون پروژسترون از ساعت ۴ تا ساعت ۲۴ پس از اتمام هورمون درمانی مشاهده شد (P<۰/۰۰۱). بیشترین میزان هورمون تستوسترون در دوره های زمانی ۰/۵ و ۱ ساعت و کمترین آن در تیمار ۱۶۸ ساعت مشاهده شد (P<۰/۰۰۱). میزان هورمون های مذکور بین ماهی های که جنس شده قبلی و ماهیهای قزل آلا در تیمار ۱۶۸ ساعت خونگیری پس از اتمام هورمون درمانی اختلاف معنی دارنداشت.درمجموع استفاده از هورمون برای انجام عملیات تک جنس سازی ماهی قزل نمی تواند بر سطوح هورمونی این ماهی در سنین بالاتر اثر گذاشته و تغییرات مربوطه در کمتر از یک هفته تعدیل و به سطح طبیعی برگشته و با احتساب ۶ ماه دوره پرورش بکارگیری هورمون در این امر تاثیر بر کیفیت نخواهد داشت.

واژه های کلیدی :۱۷ بتا استرادیول، قزل آلا ، کنترل جنسیت، باقیمانده هورمون

۱- کلیات

۱-۱-مقدمه

امروزه نقش آبزیان در تامین پروتئین حیوانی مورد نیاز مردم جهان از اهمیت بالایی برخوردار است و با توجه به‌محدود بودن میزان صید، پرورش آبزیان و بخصوص در محیط های مصنوعی بیش از بیش مورد توجه قرار می‌گیرد ، در سالهای گذشته پرورش ماهی یک شغل ضمنی در کنارکشاورزی محسوب می‌شد ، چرا که هنوز انسان کشاورزی وزراعت را چاره ساز مشکلات خوددر امرتغذیه می‌دید ولی امروزه پرورش ماهی از اساسی‌ترین و اصلی‌ترین شغل ه ادربسیاری از کشورها است، لذا در سالیان اخیر سعی گردیده است تا به نحوی از انحناء بر میزان تولید آبزیان در واحد سطح افزوده شود ،که این امر علم پرورش ماهی را با سرعتی زیاد متحول ساخته و امروزه شاهد افزایش نسبی تولید در پرورش ماهی هستیم .طی سال های اخیر ، روند صعودی میزان تولید ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در ایران پیشرفت بسیار قابل توجهی داشته است ، بطوری که میزان تولید سالانه این ماهی در سال ۱۳۷۴ ، از حدود ۵۰۰ تـن، به ۱۳۰۰۰۰ تـن در سـال ۱۳۹۲ رسـیده است(سالنامه آ ماری شیلات ایران ، ۱۳۹۲).

فرآیند بلوغ جنسی در ماهی قزل آلای رنگین کمان که ماهی پرورشی غالب درمناطق معتدل وسردسیر 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 نرخواهد بود وازطرفی 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 Cumaranatunga,1988).

این تغییرات در جنس نر قزل آلای رنگین کمان بارزتر بوده و زودترآشکار می‌شود ،زیرا جنس نرحداقل یک سال زودتراز جنس ماده (جنس نردر سن ۲ سالگی وجنس ماده درسن ۳ سالگی) بالغ می گردد (Simpson et al., 1979: Solar et al., 1987).

از آنجا که عمده مصرف کنندگان به مصرف ماهی های بالای ۲۵۰ گرم علاقه دارند ، بنابراین درصد قابل توجهی از ماهیان نر قبل از آن که به اندازهٔ بازاری برسند ، به سن بلوغ رسیده و علاو ه بر رشد کمی که دارند ، به دلیل کیفیت نامطلوب گوشت، بازار پسندی آنها نیز کاهش می یابد (Solar et al., 1987; Bye and Lincoln,1986) .

بدین ترتیب تغییر جنسیت گونه های پرورشی به سمت تولید جنس بهتر و جمعیت های تک جنس یکی از روش های اصلاح

نژاد ماهیان به حساب می آید .

۲-۱-بیشینه تحقیق

- Zou و Zhai درسال ۲۰۰۶ درتحقیقی بر روی ماهی کاراس (Carassius Carassius) به ارزیابی بقایای هورمونی با استفاده از روش کروماتوگرافی پرداختند (Zhai and zou ,2006).

- Rothbard و همکارانش در سال ۱۹۹۹ به بررسی بقایای هورمون ۱۷ – آلفا – متیل – تستوسترون در ماهیان پرداختند (Rothbard et al.,1999)..

- Habibi در سال ۲۰۰۴ به ارزیابی زمان پاکسازی هورمونی در خون ماهیان پرداخت (Habibi,2004).

- Piferre درسال 2001 به بررسی زمان پاکسازی هورمونی در ماهی قزل آلای رنگین کمان (Onchorhynchus mykiss) پرداخت(piferre,2001).

- Torresو همکارانش در سال ۲۰۱۲ با استفاده از تکنیک HPLC –DAD به ارزیابی بقایای هورمون ها ی ۱۷ –آلفا –اتینیل استرادیول ، استریول و ۱۷ –بتا – استرادیول در آب پرداختند (Torres et al.,2012) .

- wagdy و همکارانش در سال ۲۰۱۱ به ارزیابی اثرات هورمون ۱۷ – آلفا – متیل تستوسترون بر روی رشد ، تجمع هورمونی و تغییرا ت بافت شناسی در بافت بیضه و ماهیچه ماهی تیلاپیای نیل (Oreochromis niloticus) پرداختند (Wagdy et al., 2011).

-waffa و همکارانش در سال ۲۰۱۱ به بررسی هورمون ۱۷ - آلفا – متیل – تستوسترون بر روی تغییرات بیوشیمیایی سلولی و بافت شناسی در کبد ماهی تیلاپیای نیل (Oreochromis niloticus) پرداختند (Waffa et al.,2011).

- Lam و همکارانش در سال ۲۰۰۵ به بررسی بقایای تستوسترون نسبت به تستوسترون کل و همچنین تستوسترون باند شده به ایمونوگلوبین (Ig) خون پرداختند (lam et al., 2005).

-Moura و همکارانش در سال ۲۰۱۰ به بررسی اثرات هورمون ۱۷ –بتا –استرادیول در ویتلوژنز و دیگر پاسخ های

فیزیولوژیکی ماهیان نر آب شیرین(Rhamdia quelen) پرداختند (Moura et al., 2010) .

-cooke و Hinton در سال ۱۹۹۹ به بررسی نقش هورمون ۱۷-بتا –استرادیول ، بتا هگزا کلر و سیکلو هگزان در تومورهای سلول های کبدی در ماهی مداکا (Oryzias latipes) پرداختند (Hinton ana cooke , 1999) .

-Tilton و همکارانش در سال ۲۰۰۱ به ارزیابی سرم ۱۷ –بتا –استرادیول در گربه ماهی کانالی (Channel catfish) پس از تزریق هورمون ۱۷ -بتا –استرادیول ، اتینل استرادیول ، استرون ، استریول و ۱۷ – بتا – استرادیول گلوکورونیده پرداختند(Tilton et al., 2001).

-Kimura و همکارانش در سال ۲۰۰۴ به بررسی اثرات پرتو درمانی ، بر میزان بقایای هورمون ۱۷-بتا- استرادیول در آب پرداختند(kimura et al., 2004).

– kalab و Skadal در سال ۲۰۱۲ به ارزیابی بقایای هورمون ۱۷-بتا –استرادیول درآب با استفاده از روش ایمنوسنسور های آمپرومتریک پرداختند (Skadal and kalab,2012).

- Doyle در سال ۲۰۰۰ به ارزیابی بقایای هورمون های ۱۷-بتا –استرادیول ،پروژسترون وتستوسترون در حیوانات اهلی مانند گاو ، گوسفند و اسب پرداخت (Doyle,2000) .

-Velly در سال ۲۰۰۸ به بررسی استفاده از هورمون ها در تولید حیوانات وارزیابی خطرات احتمالی بقایای هورمونی در بافت حیوانات پرداخت(Velly,2008).

- Zhihong و همکارانش در سال ۲۰۰۹ به بررسی بقایای هورمونی استروژن وآنتی بیوتیک کلرومفنیکل در بافت جوجه پرداختند(Zhihong etal.,2009).

-مرکز مطالعات علمی پایش های زیستی و آلودگی های محیطی در کالیفرنیا در سال ۲۰۰۸ به ارزیابی اثر هورمون های مصنوعی در بافت حیوانات پرداخت.

-رعنای اخوان ، در سال ۱۳۹۰ ، به تاثیر کاشت سطوح مختلف ۱۷- بتا-استرادیول بر رشد و توسعه گنادی ومتابولیت های سرم در فیل ماهی پرورشی پرداخت (رعنای اخوان ، ۱۳۹۰).

۳-۱- روند تولید ماهیان سرد آبی

آبزی پروری را میتوان فعالیتی باهدف پرورش انواع گیاهان و جانوران آبزی درمحیط های آبی تعریف کرد که شامل پرورش در سیستمهای مختلف استخری، پرورش در قفس و پرورش درآبهای کم‌عمق ساحلی می‌گردد .پرورش ماهی درمنابع آبهای داخلی ، در دنیا از قدمتی بیش از ۳۰۰ سال برخوردار است . (Pillay and Kutty,2005)پرورش انواع آبزیان ازاواخر دهه ۱۹۷۰ ، به دلیل کاهش نرخ رشد صید ازدریاها ، بصورت روزافزونی مورد توجه قرارگرفته است .این فعالیت به دلیل کاهش صید دریایی و افزایش جمعیت جهان وتقاضای فزاینده همواره روندی رو به رشد داشته است .آبزی‌پروری طی دهه ۲۰۰۹ - ۱۹۹۶(بدون در نظر گرفتن گیاهان آبزی) از رشد سالیانه حدود ۹/۵ درصد برخوردار بوده است . (FAO,2009)شایان ذکراست که اکثر فعالیت‌های آبزی‌پروری درسطح جهان، از طریق مزارع متوسط و کوچک و عمدتا توسط خانوارهای تولید کننده ، انجام می‌گیرد. رشد سریع پرورش آبزیان ، عمدتاً نتیجه افزایش چشمگیر تولید ماهیان به ویژه کپورماهیان بوده است (FAO,2009) .درسال۲۰۰۹، میزان تولید آزاد ماهیان درجهان حدود ۲۵۰۰۰۰۰ تن بوده است .(Fish Stat, 2009) ایران درهمین سال با تولید ۹۰۰۰۰ تن ماهی قزل‌آلای رنگین کمان، ۲/۱ درصداز تولید جهانی آزاد ماهیان را بخود اختصاص داده است ضمن آنکه مقام اول جهان را درزمینه میزان تولید قزل آلا در آب شیرین را دارا می باشد . از سوی دیگر ، طی ده سال اخیر، روند صعودی ی میزان تولید ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در ایران پیشرفت بسیار قابل توجهی داشته است. بطوریکه میزان تولید سالانه این ماهی در سال ۱۳۷۴، از مقدار ۱۳۷۱ تن، به مرز ۷۴۰۰۰ تن درسال ۱۳۸۸رسیده است .(Fish Stat, 2009)ازمهمترین کشورهای تولید کننده ماهیان خانواده سالمونیده می توان به نروژ وشیلی با تولید ۶۴۱۱۷۴ و۵۹۸۲۵۱ تن درسال ۲۰۰۵ اشاره نمود. شایان ذکر است که بخش مهم تولیدات این دو کشور شامل پرورش ماهی آزاد اقیانوس اطلس در قفس های دریایی می باشد. مهمترین کشور های تولید کننده ماهیان سرد آبی شامل نروژ، شیلی ،انگلستان ،کانادا،ترکیه، دانمارک،امریکا،فرانسه،ایران، ایتالیا می باشند .حضور ماهی قزل‌آلای رنگین کمان به عنوان تنها گونه اصلی متعلق به خانواده آزادماهیان در کارگاههای پرورش ماهیان سردآبی در کشور و رشد روز افزون تولید این ماهی در ایران سبب شده است تا کشورمان درمجموع همه محیط های پرورشی دررتبه چهارم و در آب شیرین در رتبه اول کشورهای تولید کننده ماهی قزل آلای رنگین کمان درجهان قرار گیرد.(Fish Stat, 2009) این فعالیت از دهه ۴۰ به بعد با واردات تخم چشم زده قزل‌آلای رنگین کمان از کشور دانمارک و سپس با واردکردن لارو و مولدین ماهی گرمابی از کشورهای مختلف و با احداث مراکز تکثیر و

پرورش ماهی بخش خصوصی و دولتی شکل گرفت اما تا قبل از انقلاب پرورش ماهی در آبهای داخلی گسترش چندانی نیافت . رشد آبزی پروری در کشور ما مؤید دو فرآیند عملکردی مثبت است . اول این که تلاش شیلات در توسعه آبزی پروری به خصوص درآب های داخلی موفقیت آمیز بوده ودوم این که آبزی پروری به علت توجیه اقتصادی مطلوب مورد قبول سرمایه گذاران بخش خصوصی قرار گرفته است(علیزاده ،۱۳۸۹).

٤-١-روش های هورمونی تولید ماهیان تک جنس

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

تابحال ۳ ترکیب طبیعی و۹ ترکیب مصنوعی درمطالعات برای ماده سازی مورد استفاده قرار گرفته است. تفاوت استروژن های طبیعی و مصنوعی درسرعت متابولیسم (Folmar et al., 2000)، میزان توانایی آنها در فعال سازی گیرنده های استروژنی و تنظیم نسخه برداری ژن های ویژه استروژنی خواهد بود (Kavumpurath and Pandian, 1993). مهمترین متغیرهای کمی درکنترل جنسیت و ماده سازی ماهیان با استفاده از استروژن ها شامل زمان درمان ، طول دوره درمان و میزان هورمون مصرفی خواهد بود.

٥-١- زمان های بحرانی در ماده سازی ماهیان

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 . زمان یکی از مهمترین متغیرها برای استفاده از استروژن می باشد.

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).بدین ترتیب اگرهورمون درمانی درطول دوره labile انجام شود به حدّاقل زمان و کمترین میزان استروئید برای دستیابی به جنس مورد نظر نیازمی باشد.وقوع دوره labile بیانگر حوادث پیچیده در گونادها است که نمی توان آن را ازلحاظ هیستولوژیک مشاهده نمود، (Nagahama, 2000)زیرا این حوادث جزء اولین علائم هیستولوژیک تمایزجنسی محسوب می گردد(Nakamura et al.,1973).بدین ترتیب این دوره باید مترادف مرحله ای باشد که ،گاهی ازآن به نام تمایز جنسی فیزیولوژیک یاد می شود (Piferrer, 2001). بررسی ها بر روی دو گونه غیرخویشاوند kisutch Onchorhincus و Hermihaplochromis multicolor نشان می دهد حدّاکثر حساسیت نسبت به استروژن ها ، زودتراز 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 sphenopsاین دوره به حدود سی روز پس از تولد نوزادان بر می گردد ، در حالیکه در گونه Poecilia reticulate این دوره در زمان جنینی قراردارد(Kavumpurath and Pandian, 1993).

٦-١-انواع هورمون های موثر در ماده سازی ماهیان:

امروزه هورمونهای متعددی در تغییر جنسیت ماهیان تاثیر گذار بوده،که مهمترین آنها هورمونهای استروئیدی وبویژه استروئید های جنسی می باشند. در این راستا انواع هورمونها و دارو ها نظیر استرادیول و مشتقات مربو طه و نیز انواع داروهای گیاهی و دارو هایی نظیر، تا موکسی فن می توانند ، تغیر جنسیت در ماهی را تشدید نمایند(Piferrer and Donaldson,1993) . بسیاری از انواع استروئید های ماده ساز درجدول 1 آورده شده است.

جدول ۱ – انواع هورمون های موثر در ماده سازی

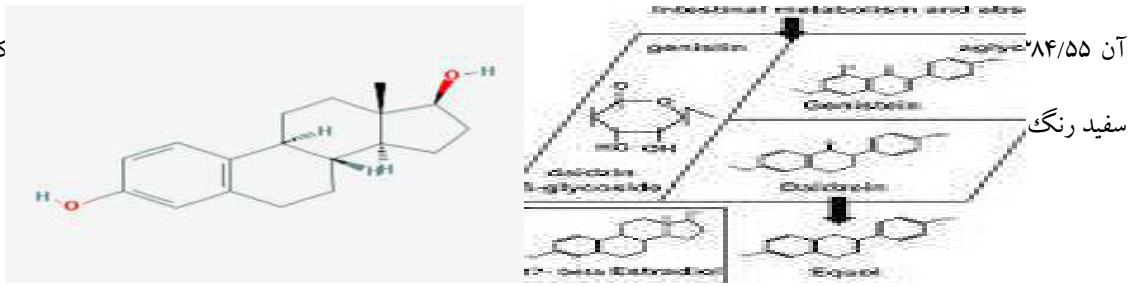
chemicals Synthetic(ترکیبات سنتتیک)	Natural oestrogens(استروژن های طبیعی)
Diethylstilbestrol (DES)(دی اتیل استیبسترول)	Oestrone (E1)(استرادیول)
Diethylstilbestrol diphosphate (DES-DP) Diethylstilbestrol dipropionate (Euvestin) Dihydrodiethylstilbestrol9(Hexestrol)	Oestradiol17b (E2)(۱۷ بتا استرادیول
17a-ethynyloestradiol (EE2)(۱۷ اتینیل استرادیول)	Oestriol (E3)(استرادیول)
14,15-methylene oestradiol (ME2)(متیلن استرادیول	
Oestradiol benzoate (EB)(استرادیول بنزوات)	
Oestradiol butyryl acetate (EBA)(استرادیول بوتریل تستات)	
Oestradiol propionate (EP)(استرادیول پروپیونات)	Comparative average potencies مقاسیه میزان اثر بخشی
S (~1.5) > E2(~3) > E1 (~12) > E3 (75)	

استرادیول مانند دیگراستروئیدها 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 نروماده موجود است. در جنس ماده به عنوان هورمون رشد بافت های تولیدمثلی عمل کرده وترکیبی ضروری برای تولید تخمک در تخمدان ها می باشد. در نرها استرادیول، (استروژن ها) درسلول های سرتولی تولید می شود. شواهدی وجود دارد که نشان می دهد که استرادیول ، مرگ طبیعی اسپرم ها را به تعویق می اندازد. این هورمون در مطالعات مربوط به تغییر جنسیت دارای بیشترین پیشینه تحقیق بوده وبه دلیل آنکه ترکیبی طبیعی محسوب می گردد. در مقایسه با هورمون های ماده ساز دیگر (استرون یا ۱۷الفا اتینیل استرادیول)ا که برای تغییرجنسیت گونه های آزادماهیان به کار می رود، این ترکیب دارای اثرات جانبی کمتری می باشد(Pentikainen et al., 2006) .

۷-۱- هورمون ۱۷ بتا- استرادیول

درطی قرن های متمادی ،استروژن جز هورمون های اولیه جنس ماده در نظر گرفته شده است.تحقیقات اخیر حاکی از آن است که استروژن می‌تواند در جنس نر ماهی نیز نقش داشته باشد (Fredrick and Goetz,1979). قوی‌ترین استروژن، ۱۷β- استرادیول می‌باشد، که مطالعات حاکی از این است که E_2 به سطح اسپرم باند می‌شود (۵۶)، که فرمول مولکولی آن $C_2H_5K_{36}O_3$، وزن مولکول

آن ۲۸۴/۵۵ کریستالی و سفید رنگ



شکل ۱- ساختار مولکولی هورمون ۱۷ بتا استرادیول

سه تا استروژن، 17β- استرادیول، استرون، استریول با مقادیر قابل ملاحظه‌ای در پلاسمای خون جنس مؤنث وجود دارند که اثر استروژنی 17β- استرادیول ۱۲ برابر استرون ۸۰۰ برابر استریول است. در نتیجه اثر استروژنی بتااسترادیول چندین برابر مجموع آثار دو هورمون دیگر است و به همین خاطر، بتااسترادیول به عنوان استروژن اصلی در نظر گرفته می‌شود (Ng et al.,1997) .در کبد استرادیول و استروژن به ترتیب طی واکنش‌های کربوکسیلاسیون و هیدروکسیلاسیون به استریول که یک استروژن تقریباً به طور کامل بی اثر استروژن، تبدیل می‌شوند. علاوه بر این، کبد توسط آنزیم‌هایی استروژن‌ها را با اسید گلوکورونیک و یا سولفوریک کونژوگه می‌کند و بدین صورت به شکل گلوکورونات و یا سولفات در می‌آیند و از آنجایی که فاقد فعلیت فیزیولوژیک بوده و با پروتئین‌های حاصل ترکیب نمی‌شوند، در آب محلول هستند و حدود ۱/۵ این فراورده‌های خروجی از صفرا و قسمت اعظم باقیمانده آنها از طریق ادرار دفع می‌شود (Ng et al.,1997) .

۸-۱-هورمون پروژسترون

این هورمون یکی از هورمون‌های استروئیدی در جنس ماده است. هورمون پروژسترون یک استروئید بیست و یک کربنه است. پروژسترون در طی فرآیند بیوسنتز از کلسترول مشتق شده و از سلول های فولیکولی گرانولوزا ترشح می گردد.پروژسترون و مشتقات آن در رسیدگی نهایی تخمک در ماهی نقش داشته و در عین حال در زمان تخم ریزی ماهی ها به اوج خود می رسد (Korach ,1999).مشتقات پروژسترون در مسیر بیوسنتز به تستوسترون تبدیل شده و زمینه ساز تولید استرادیول در سلول های تکا می باشد.این هورمون نیز بواسطه وجود پروتئین های حامل در خون جریان می یابد (Ng et al.,1979).

۹-۱-هورمون تستوسترون

تستوسترون از هورمون‌های استروئیدی است ،که ساختمان اصلی سازنده آن کلسترول تشکیل می‌دهد. این هورمون از سلول‌های لیدیگ در بافت بیضه ترشح می‌شود و ترشح آن توسط هورمون دیگری کـه از سـلول‌هـای قـدامی هیپـوفیز ترشـح مـی‌شـود, کنتـرل مـی‌شـود. تستوسترون برای اثرگذاری در بافت هدف و جلوگیری از کاهش اثرش، با برخی پروتئین‌های ساخته شده در کبد ترکیب شده و بعـد از انتقال به اعضاء هدف یا گیرنده‌های موجود در بافت ترکیب شده و از جدار سلول عبور کرده و آثارش را ایجاد می‌کند. بسیاری عقیـده دارند که این هورمون عامل اصلی در تمایل افراد به پرخاشگری است. به طور کلی مدل‌های زیست‌شناسی و فیزیولـوژیکی و تحقیقـاتی که درباره جانوران انجام می‌شود حاکی از این است که تستوسترون نقش کلیدی در تعاملات اجتماعی بازی می‌کند. میزان نرمال ترشـح طبیعی تستوسترون در بدن مردان بالغ حدود ۴ تا ۹ میلی‌گرم در روز می‌باشد. بعد از تولید تستوسترون از طریـق فعـل و انفعـالات داخـل بدن، این هورمون با تأثیر بر غده‌های مؤثر در تولیـد خـود هیپوتـالاموس و هیپوفیزموجـب محدودسـازی ترشـح هورمـون‌هـای محـرک گونادوتروپین‌ها (LH . FSH) می‌گردد. این عمل باعث خواهد شد تا سطح تستوسترون در بدن به طور خودکار توسط این انفعـالات بـه صورت خود کار تنظیم گردد (Korach,1999).

۱۰-۱- دوز مصرفی استروژن ها برای ماده سازی (Feminisation)

اگه بچه ماهیانی که تازه شروع به تغذیه فعال نموده اند ، با غذای حاوی۱۷ –بتا استرادیول تغذیه شوند ،ماده خواهند شد.استرادیول و استرون جز استروئید هایی هستند که به طور طبیعی در ماهیان وجود دارند. غالبا القای تغییر جنسیت درماهیان موثرتر از استرون می باشد(Piferrer , 2001). تاکنون دوزهای مختلفی از استرادیول مورد استفاده قرار گرفته اند که دوزهای توصیه شده برای تعدادی از ماهیان در جدول ۲ نشان داده شده است.۲۰ میلی گرم هورمون استرادیول در هر کیلوگرم غذای مورد استفاده ، باعث ایجاد لارو و آزاد ماهیانی می شود که اکثرا ماده هستند. در آزاد ماهیان دوره تمایز جنسی در دمایC ۱۰ آب ، ۷۰-۵۰ روز بعد از اولین تغذیه می باشد.در خصوص قزل آلای رنگین کمان موفق به تولید بچه ماهیان ۱۰۰ درصد ماده در آزمایشگاه شده اند(Piferrer , 2001).البته این نتیجه عمومی نبود و جهت دستیابی به میزان ۱۰۰ درصد ماده باید غذای حاوی هورمون حداقل به مدت ۱۶ ساعت در روز به ماهیان خورانده شود.در صورتی که میزان یا مدت تغذیه کاهش یابد ، ماده زایی نیز به

صورت ناقص انجام خواهد شد. تجربیاتی که در مورد آزاد ماهیان اقیانوس اطلس و دو گونه از ماهیان آقیانوس آرام بدست آمده ، نشان می دهد که با غوطه وری آلوین ها در محلول ۵۰- ۵ میکرو گرم در لیتر استرادیول ، درصد ماده زائی بهبود یافته است.در مورد به کارگیری استرون ها باید دقت لازم مبذول شود تا مقدار آن از دوز توصیه شده تجاوز ننماید ، چون که کاربرد استرون ها در سطوح بالا باعث آسیب دیدگی کبد و مرگ ومیرآزاد ماهیان می گردد ولی کپورماهیان نسبت به استرون ها بسیار مقاوم تر هستند ، به همین دلیل به مقدار بیشتری استرون جهت ماده زایی نیازمند هستند. ماهیان تیلاپیا اصولا کمتر به استرون ها پاسخ می دهند ، به استثنای تیلاپیای موزامبیک که با میزان ۵۰ میلیگرم در کیلوگرم هورمون درغذای مصرفی می توان اقدام به ماده زایی نمود.اصولا استرون ها درهرمیزانی که برای ماده زایی به کار روند، نرخ رشد را اندکی کاهش میدهند ولی به محض اتمام دوره مصرف هورمون ، ماهیان فوق وزن از دست رفته خود را باز خواهند یافت (حسینی ،۱۳۷۳).

جدول۲ : دوز مصرفی ۱۷ بتا استرادیول برای ماده سازی گونه های مختلف ماهیان

نوع ماهی	دوز مصرفی میلی گرم در کیلوگرم غذای ماهی	مدت زمان کاربرد هورمون از شروع تغذیه بر حسب روز
آزاد ماهی اقیانوس اطلس	۲۰ (۲ بار غوطه وری آلوین در محلول ۲۵۰ میکروگرم در لیتر)	۱۲۰
قزل آلای ببری	۲۰ (۲ بار غوطه وری آلوین در محلول ۲۵۰ میکروگرم در لیتر)	۶۰
گربه ماهی کانالی	۶۰ (۲ بار غوطه وری آلوین در محلول ۲۵۰ میکروگرم در لیتر)	۲۱
آزاد ماهی کوهو	۱۰ (٤ بار غوطه وری آلوین در محلول ۵۰ میکروگرم در لیتر)	۷۰
ماهی طلایی	۱۰۰ (٤ بار غوطه وری آلوین در محلول ۵۰ میکروگرم در لیتر)	۲۸
Medaka	۱۲۵ (٤ بار غوطه وری آلوین در محلول ۵۰ میکروگرم در لیتر)	۶۰
قزل آلای رنگین کمان	۲۰ (٤ بار غوطه وری آلوین در محلول ۵۰ میکروگرم در لیتر)	۶۰
تیلاپیا	۵۰ (٤ بار غوطه وری آلوین در محلول ۵۰ میکروگرم در لیتر)	۲۰

۱۱-۱- اهداف پروژه

پرورش جمعیت های مخلوط از ماهی قزل آلای رنگین کمان دارای راندمان تولید گوشت کمتری از جمعیت های تک جنسی است. پرورش جمعیت های تک جنسی از ماهی قزل آلای رنگین کمان می تواند به میزان قابل توجهی تولید را بالا برده و امر پرورش را سودآورتر نماید. در کنترل جنسیت ماهیان هدف اصلی ، افزایش سوددهی درمراحل مختلف پرواربندی ماهیان میباشد که در کنارسایر تکنولوژی های جدید زیستی جمعیت های تک جنسی از ماهی قزل آلای رنگین کمان می تواند به میزان قابل توجهی تولید را بالا برده وامر پرورش را سودآورتر نماید. درکنترل جنسیت ماهیان هدف اصلی، افزایش سوددهی درمراحل مختلف پرواربندی ماهیان میباشد .در بسیاری ازگونه ها ی ماهیان پرورشی ، جنس ماده دارای میزان رشد و اندازه بزرگتری می باشد. علاوه بر این در برخی از گونه ها ، جنس نر قبل از اینکه به اندازه مناسب برای خریدو فروش برسد، بالغ میشوند .این دوعامل باعث تنوع بسیار زیادی دراندازه ماهیان و کاهش میزان تولید میگردد.به همین دلیل موسسات خصوصی پرورش ماهی تمایل بسیار زیادی برای تولید جمعیتهای یکنواخت از ماهیان ماده دارند(Piferrer,2001).فرآیند بلوغ جنسی در ماهی قزل آلای رنگین کمان که از ماهی پرورشی در مناطق معتدل دنیا می‌باشد ، به دلیل صرف انرژی جهت تولید مواد تناسلی و در نتیجه عدم استفاده از انرژی برای تولید گوشت ماهی ، موجب کاهش میزان رشد به ویژه درجنس نر می‌گردد. بلوغ جنسی این ماهی، باعث کاهش کیفیت گوشت و بروز اثرات نامطلوب در بافت و رنگ آن می‌گردد(Bromage and Cumaranatunga,1988). به علاوه به هنگام بلوغ جنسی، حساسیت ماهی نسبت به عوامل بیماریزا افزایش می‌یابد .این تغییرات در جنس نر ماهی قزل آلای رنگین کمان بارزتر بوده و زودتر آشکار می‌شود ، زیرا جنس نر حداقل یک سال زودتر از جنس ماده بالغ می‌گردد .(جنس نر در سن ۲ سالگی و جنس ماده در سن۳ سالگی). بنابراین درصد قابل توجهی از ماهیان نر قبل از آن که به اندازهٔ بازاری برسند، بالغ می‌گردند و علاوه بررشدکمی که دارند،به دلیل کیفیت نامطلوب گوشت،بازارپسندیآنها نیزکاهش می‌یابد(SolarandDonaldson,1987)حال آن که پرورش دهندگان ماهی قزل‌آلا ترجیح می‌دهند ، ماهیانی با اندازهٔ بزرگتر تولید کنند تا بتوانند آنها را با قیمت بیشتری بفروشند. درکل دو روش اصلی برای ماده سازی ماهیان وجود دارد که شامل هورمون درمانی و درمان درطول ماده زایی می باشد که ماده سازی هورمونی با هدف استفاده از استروئیدهای جنسی در برخی گونه ها مانند آزادماهیان آزمایش شده و به نتیجه مطلوب رسیده است و دیگر اینکه کنترل جنسیت با استفاده از هورمون ها بدون هیچ گونه تاثیری بر تعیین جنسیت ، فقط بر روی مراحل تمایز جنسی اثر گذار است

. بنا براین استفاده از استروئیدها درگونه هایی که در آنها سیستم تعیین جنسیت به صورت کروموزومی است ، مثل ماهی قزل آلا و آزاد باعث نرسازی و ماده سازی می شود(تغییر فنوتیپ بدون اینکه ترکیب کروموزوم های جنسی آنها دچارتغییرشود(عدم تغییرژنوتیپ)در حقیقت این عمل اساس روشهای مستقیم ماده سازی است (Piferrer,2001).درحال حاضر با افزایش تقاضا برای ماهیان بزرگ و هم اندازه جهت مصارف خوراکی نیاز به کنترل بلوغ جنسی درماهیان محسوس می باشد وروشهای کنترل جنسیت درآزادماهیان به عنوان یک ابزار مهم مدیریتی درصنعت پرورش آبزیان دارای اهمیت است. به طور کلی نتایج حاصل از کنترل جنسیت درماهیان با استفاده از هورمون ها را میتوان موارد زیرذکر نمود: (الف) افزایش میزان تولید تخم ازطریق پرورش ماده های واقعی (ب) جداکردن جنسی که دارای بالاترین میزان رشد می باشد ،به عنوان مثال جنس ماده درآزادماهیان وکپورماهیان وجنس نردرسیکلیدها(پ)جلوگیری ازبلوغ زودرس درماهیان که باعث ازبین رفتن وکاهش وزن لاشه می شود(ت)افزایش میزان وفروش ماهی درتمام طول سال وبالابردن کیفیت گوشت ماهیان تولیدی(Piferrer,2001). در این راستا موضوع باقیمانده های هورمونی یکی از دغدغه های مصرف کنندگان محسوب شده که در این پژوهش به بررسی زمان ماندگاری هورمون در بدن ماهی و نیز به میزان هورمون E2 در مقایسه با شاهد پرداخته خواهد شد .با توجه به این امر مهم اهداف تحقیق به شرح زیر می باشند:

۱-تعیین زمان پاکسازی هورمونی در خون ماهی

۲-تعیین بقایای هورمون ۱۷بتا استرادیول درماهی قزل آلای رنگین کمان

۳-مقایسه میزان هورمون ۱۷بتا استرادیول درماهی قزل آلای رنگین کمان غذا دهی شده با هورمون و شاهد

۲- مواد و روشها

۲-۱-شرایط اکولوژیک محل اجرای پروژه

کلیه مراحل میدانی ومراحل آزمایشگاهی پروژه در ایستگاه اصلاح و ژنتیک ماهیان سردابی یاسوج انجام شد.این مرکز در ۲۰ کیلومتری جنوب شهر یاسوج می باشد و دارای زمستان های سرد و تابستان های معتدل است. منبع آب این مرکزچشمه ای می باشد که در طول سال دارای دبی نسبتاً ثابت و دمای ۱۲-۱۰ درجه سانتی گراد است. این مرکز در ارتفاع ۱۸۵۰ متراز سطح دریا واقع شده و مقدار اکسیژن آب به هنگام اشباع ،۹-۷ میلی گرم در لیتر می باشد (شکل۲) .دبی آب مرکز بین ۱۵۰ تا ۳۵۰ لیتر در ثانیه متغیر می باشد. تعدادسالن های پرورش نیز ۳ سالن به استعداد تولید ۲۰ میلیون تخم چشم زده درسال است.مراحل میدانی (هورمون درمانی و نگهداری تیمارها) ومراحل آزمایشگاهی (تشریح و بررسی بافتی وگنادی) پروژه در مرکز ژنتیک واصلاخ نژاد ماهیان سردآبی یاسوج (سالن تکثیر ماهی شهید مطهری) انجام گرفت.

۲-۲-مشخصات مولدین و تخم های چشم زده

مولدینی که در فصل تکثیر در این مزرعه برای عملیات تخم کشی انتخاب شدند بین ۳ تا ۵ سال سن داشته و وزن آنها بین۴ تا ۶ کیلوگرم بود .از تعداد ۲ ماده و ۵ نر برای انجام عملیات لقاح استفاده شد و پس از لقاح ٪ ۸۰ تخم‌های سبز ، به تخم چشم‌زده تبدیل‌شد . بازماندگی تخم های سبز تا مرحله چشم زدن کاملاً عادی بوده تخم های چشم زده حاصل از تکثیر اواسط فصل ، انتخاب شدند تا کیفیت مطلوبی داشته باشند . در طی دوره انکوباسیون، برای جلوگیری از ظهور قارچ ساپرولگنیا ، تخم های سبز با بتادین ٪۱۰ بدون ید روزانه ضدعفونی شده و تا مدّتی پس از تخم گشایی از نور مستقیم محافظت می شدند. میانگین قطرتخم‌های‌چشم‌زده حدود 5mm ۰/± ۵/۵ است و وزن هر ۱۱-۱۰عدد آنها یک گرم بود . وزن لاروهای دارای کیسه زرده بعد از تخم‌گشایی mg ۱۲۵-۱۲۰ و با میانگین ۲± ۱۲۲ بود.

۳-۲- نحوه ترکیب هورمون با غذا و عملیات هورمون تراپی

غذای مورد نیاز خوراک آبزیان در اوزان مختلف از کارخانجات تولید غذای کنستانتره تهیه گردید . لاروها تا رسیدن به وزن ۲ گرم از غذای شرکت بیومار محصول کشور فرانسه استفاده کرده و در اندازه‌های انگشت قد ، پیش پرواری خوراک ماهی از کارخانه چینه تهیه شد. آرد ماهی ، روغن ماهی ، آرد کریل ، پروتئین های هموژنیزه شده ماهی ، آرد گندم ، لسیتین ، نشاسته ، ویتامین ها و مواد معدنی و آنتی اکسیدان ها مواد تشکیل دهنده خوراک گروه Bio-optimal شرکت بیومار است. برای تغذیه مرحله لاروی از سه اندازه غذای 03،05،1.1 استفاده شد (www.biomar.net).بدین ترتیب ،مقدار ۴۰ میلی گرم ازهورمون ۱۷ بتا استرادیول مورد نیاز به صورت پودر خالص از شرکت داروسازی ابوریحان تهیه می شود. غذای مورد نیاز برای تغذیهٔ ماهیان ، از غذای اکسترود بیومار استفاده می شود .در این پروژه برای با استفاده از هورمون۱۷ بتا استرادیول در غذای ماهیان تجویز هورمون خوراکی انجام می شود (حسین زاده صحافی و همکاران ،۱۳۹۰). برای این منظور مقدار هورمون مورد نیاز با ترازوی آنالیتیکال (دقت:یک دهم هزارم گرم)توزین شده در ۳۰۰ سی سی الکل اتیلیک حل می گردد ، سپس محلول الکل و هورمون توسط اسپری دستی به دقت بر روی غذای کنسانتره اسپری می شود. این کار چندین دفعه صورت گرفت تا هورمون کاملاً با تمام غذا مخلوط گردد. پس از تبخیر الکل، غذای حاوی هورمون در ظروف درب‌داراریخته شده و پس ازاتمام این مرحله غذا کاملاً درهوای اتاق خشک گردیده و داخل ظروف دربسته در یخچال نگهداری شد (حسین زاده صحافی و همکاران ،۱۳۹۰).

شکل۳- مراحل اضافه نمودن هورمون به غذا

٤-۲-انجام عملیات بیومتری و تگ زنی

آزمایشات بر روی ۷۰ قطعه ماهی ماده با وزن تقریبی ۱۱± ۱۰۰ گرم درقالب ۷ تیمار زمانی(۰ ، ۰/۵ ، ۱،۲،۴،۸،۱۲،۲۴ و ۱۶۸ ساعت) که با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت صدم گرم توزین گردیدند و از نظر وضعیت ظاهری و سلامت کاملا سالم بودند انجام شد.

همچنین تعداد ۱۰ عدد ماهی بالغ ماده شده تگ دار با تگ های الاستومر که در سال گذشته تکثیر شده بودند و تحت تاثیر هورمون ۱۷ بتا استرادیول تک جنس شده و در مرکز نگهداری می شدند نیز بعنوان گروه هورمون درمانی شده در گذشته صید و توزین گردیده ، به طور جداگانه با گروه کنترل درقالب دوتیماردر نظر گرفته شد. تعداد ۱۰ عدد ماهی نیز به عنوان گروه شاهد و بدون هیچ گونه تجویز هورمونی برای سنجش هورمون ۱۷ بتا استرادیول و مقایسه با ماهیان تحت تاثیر هورمون در نظر گرفته شد.

شکل۵- ماهیان صید شده از مزارع پرورشی دارای تگ های الاستومر

۵-۲- عملیات خونگیری

ماهیان پس از غذا دهی با هورمون در طی یک دوره ۳۰ روزه (متناسب با زمان تاثیر پذیری در روش تک جنس سازی) و بلا فاصله پس از قطع غذا بر اساس جدول زمان بندی زیر مورد خون گیری قرار گرفت(جدول ۳) .

جدول ۳- عملیات خونگیری

تعداد نمونه	ساعت پس از زمان پایان تجویز هورمون	محل خونگیری	مقدار دوز تجویز شده خوراکی میلی گرم/کیلوگرم غذا
۷۰	۰/۵	خونگیری از آئورت پشتی	٤۰
۷۰	۱	خونگیری از آئورت پشتی	٤۰
۷۰	٤	خونگیری از آئورت پشتی	٤۰
۷۰	۸	خونگیری از آئورت پشتی	٤۰
۷۰	۱۲	خونگیری از آئورت پشتی	٤۰
۷۰	۲٤	خونگیری از آئورت پشتی	٤۰
۷۰	۱٦۸	خونگیری از آئورت پشتی	٤۰
۱۰	تک جنس ماده ۱۰۰ گرمی	خونگیری از آئورت پشتی	٤۰
۱۰	۰ (شاهد)	خونگیری از آئورت پشتی	٤۰

در هر تیمار ۱۰ ماهی انتخاب و در دوره های زمانی مختلف مورد خونگیری قرار گرفتند. خونگیری از سرخرگ ساقه دمی و به میزان ۲ سی سی با سرنگ هپارینه انجام پذیرفت . سپس خون را به آرامی به لوله های مایکرو سانتریفیوژ ml ۱/۵ منتقل گردید. نمونه های خون نیز تا پایان خون گیری و قبل از سانترفیوژ در کنار یخ نگه داری شدند . در پایان برای جداسازی سرم از دستگاه سانترفیوژ مدل(Labofuga ۲۰۰) ساخت کشور آلمان با دور ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد و پس از شماره گذاری با مشخصات کامل ، تا زمان سنجش پارامترها در دمای ۲۰- درجه نگه داری شدند(Pottinger,. and Carrick, 1991). بررسی های سرولوژیک (شامل اندازه گیری هورمون ها) در آزمایشگاه دکتر فدایی در رشت صورت گرفت.

شکل٦- عملیات خونگیری

٦-۲- روش سنجش هورمونی

غلظت هورمون‌های (تستوسترون، ۱۷ بتا استرادیول و پروژسترون) در پلاسما به روش رادیوایمونواسی (RIA) با استفاده از کیت تجاری ImmunoTech (I^{125} RIA kit، فرانسه) اندازه‌گیری شد (Ottobre et all, 1989).برای این کار ابتدا نمونه‌ها و مواد کیت را حداقل یک ساعت قبل از شروع کار از یخچال خارج کرده تا به دمای اتاق برسند. تمامی مواد را قبل از استفاده با تکان دادن، یکنواخت شد. ۱۰ میکرو لیتر از نمونه پلاسما یا استاندارد، به اضافه ۵۰۰ میکرو لیتر هورمون نشان دار ، به تیوب های موجود در کیت، (که از قبل آنتی بادی هورمون های مورد سنجش به دیواره آن ها متصل شده است) اضافه شد. همان طورکه مشاهده میشود ، تیوب‌ها پس از ورتکس نمودن، به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق نگه داری شدند و سپس محتوای تیوب‌ها خالی و با سر و ته قرار دادن آن ها بر روی کاغذ خشک‌کن به مدت ۲دقیقه ، اجازه داده شد مایع درون آن ها کاملاً خارج گردد. پس از خشک شدن تیوب‌ها ، مقدار تشعشعات گامای آن ها در دستگاه شمارنده گاما مدل LKB2 (فنلاند) اندازه‌گیری شد. دستگاه پس از قرار دادن تیوب‌ها در محل

تعبیه شده به صورت کاملاً خودکارآن را جا به جا و به داخل دستگاه منتقل نموده و میزان تشعشع گاما از هر تیوب را به صورت مجزا می‌سنجید. داده‌ها بر روی سیستم رایانه ای متصل به دستگاه قابل مشاهده و چاپ بود.

رادیوایمونواسی از اولین تکنیک های ایمونواسی محسوب میشود که برای اندازه‌گیری غلظت مواد بیولوژیک از جمله هورمون‌ها، در مقادیر بسیارکم (نانو و پیکو) استفاده گردیده و توسعه یافته است. اساس این روش بر رقابت بین هورمون موجود در نمونه (مجهول) و هورمون نشان دار شده (با غلظت معلوم) بر سر اتصال به تعداد مشخصی از آنتی بادی هورمون مورد نظر در دیواره تیوب‌ها است.

معمول ترین رادیوایزوتوپ استفاده شده در RIA، عنصر ید۱۲۵ (^{125}I)می باشد. اگر چه ایزوتوپ‌های دیگری مانند کربن۱۴ (^{14}C) و تریتیوم (^{3}H) هم استفاده می‌شود. آنتی‌ژن نشان دار باید فعالیت زیستی یا واکنش پذیری ایمنی آنتی‌ژن اصلی را داشته باشد.

پس از اعمال شرایط بهینه انکوباسیون همچون بافر، اسیدیته، زمان و دما، آنتی‌ژن نشان دار متصل‌شده به آنتی بادی از آنتی‌ژن نشان دار آزاد جدا می‌شود. میزان آنتی‌ژن نشان دار متصل‌شده به آنتی بادی هنگامی کاهش می‌یابد که غلظت آنتی‌ژن غیر نشان دار بالا باشد و برعکس. لذا نسبت میزان هورمون پلاسما به هورمون نشان دار تعیین می کند که چه مقدار اشعه گاما از تیوب‌ها ساطع شود.

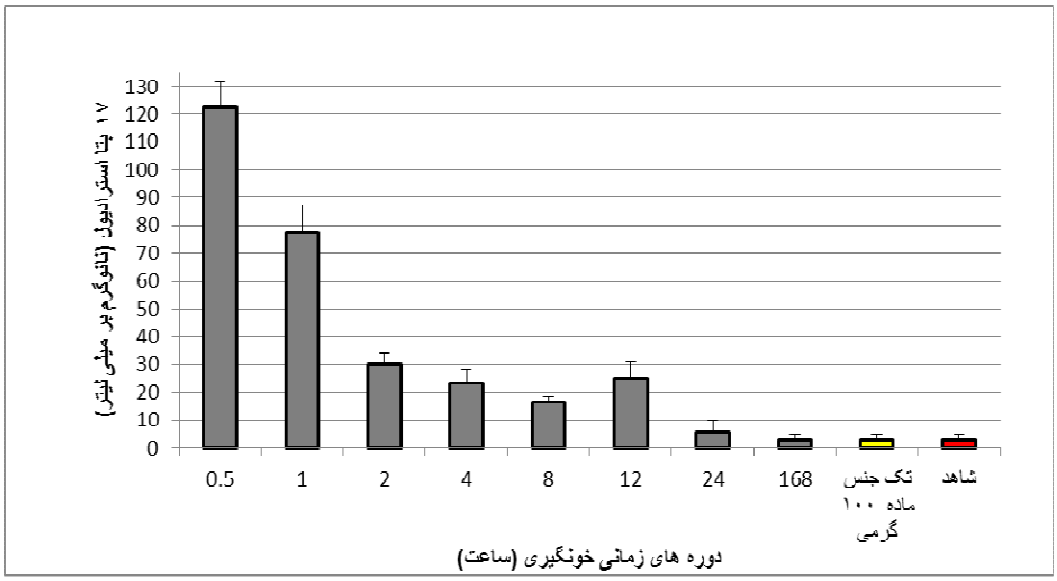
۷-۲- روش آماری

اطلاعات بدست آمده از سنجش هورمون ها در پلاسمای خون ماهیان پس از ورود درمحیط نرم افزاری Excell 2007 توسط برنامه آنالیز آماری SPSS 17 و روش آنالیز و واریانس یک طرفه (one way Anova) برای مقایسه اختلاف بین گروه های آزمایشی (۰/01 $\geq p$) مورد استفاده قرار گرفت .همچنین برای مقایسه ، جهت بررسی اختلاف و برتری آماری فاکتورهای محاسبه شده از آزمون Duncan استفاده گردید(zar,1999) .

۳- نتایج

۱-۳- نتایج حاصل از تأثیر هورمون ۱۷ بتا استرادیول

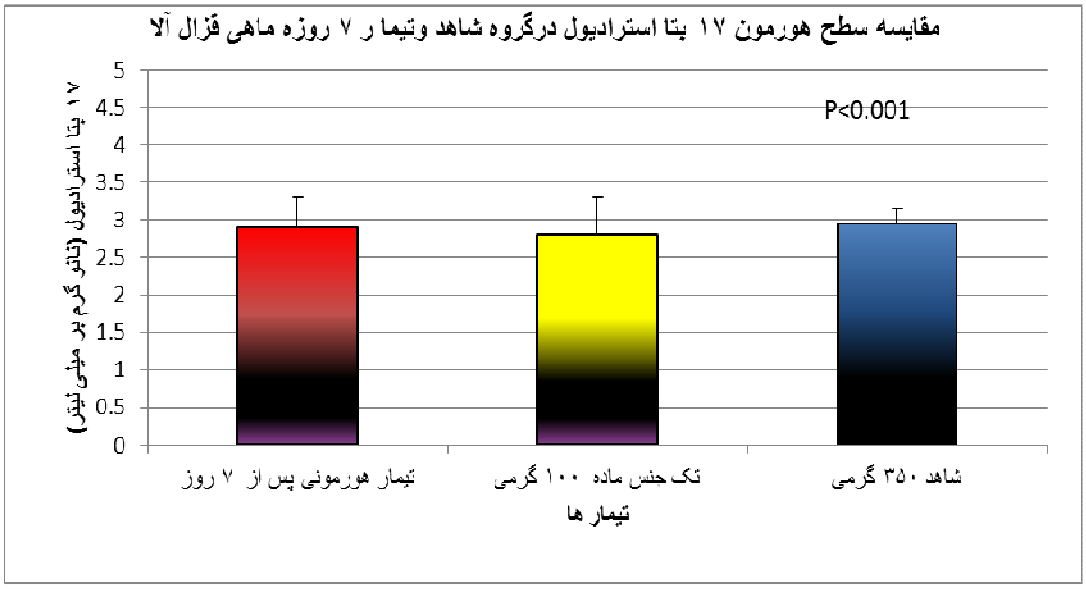
نتایج حاصل از سنجش هورمون ۱۷ بتا استرادیول در دوره ۳۰ روز آزمایش در نمودار ۱ آمده است. نتایج نشان داد، که مقدار هورمون ۱۷ بتا استرادیول در دوره های زمانی ۰/۵ و ۱ افزایش معنی داری در مقایسه با گروه شاهد دارد($P<0.001$).



نمودار ۱- تغییرات هورمون ۱۷ –بتا –استرادیول

نتایج بدست آمده در این بررسی نشان داد، که بیشترین مقدار هورمون مربوط به ساعت ۰,۵ یعنی ۳۰ دقیقه پس از قطع دوره هورمون تراپی با مقدار ۹ ± ۱۲۱ نانوگرم بر میلی لیتر و کمترین آن مربوطه به تیمار ۱۶۸ ساعت و شاهد با مقدار متوسط ۰,۹ ± ۳ نانوگرم بر میلی لیتر بود. مقدار هورمون ۱۷ بتا استرادیول در چهار ساعت اولیه به شدت کاهش یافته و به کمتر از ۲۵ درصد (۲ ± ۲۳ نانوگرم بر میلی لیتر) و سپس با روند آهسته تری تا ۱۶۸ ساعت بعدی کاهش نشان می دهد (۰,۹ ± ۳ نانوگرم بر میلی لیتر) که کاهش معنی دار در سطح پلاسمایی هورمون ۱۷ بتا استرادیول با گذشت زمان در ماهی قزل آلای رنگین کمان مشاهده شد واختلاف معنی دار بین تیمار های زمانی نمونه برداری مشاهده شد($P<0.001$).

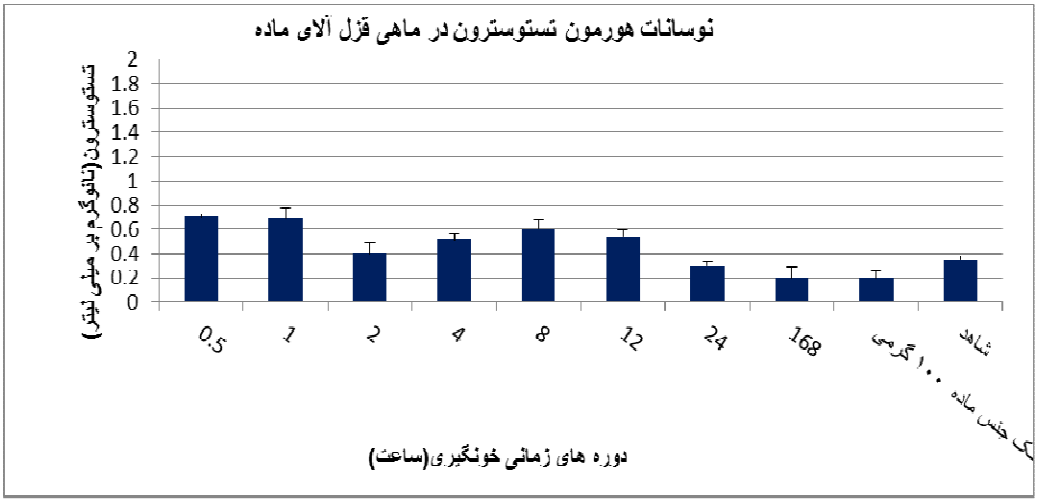
در این بررسی بین سطح پلاسمایی هورمون ۱۷ بتا استرادیول در تیمار های شاهد و تیمار خونگیری شده در ساعت ۱۶۸ و همچنین سطح پلاسمایی این هورمون در ماهیان تک جنس شده ماده ۱۰۰ گرمی اختلاف معنی دار مشاهده نگردید(P>0.001).



نمودار۲-مقایسه سطح هورمون ۱۷-بتا -استرادیول با گروه شاهد(n=10)

۲-۳- هورمون تستوسترون

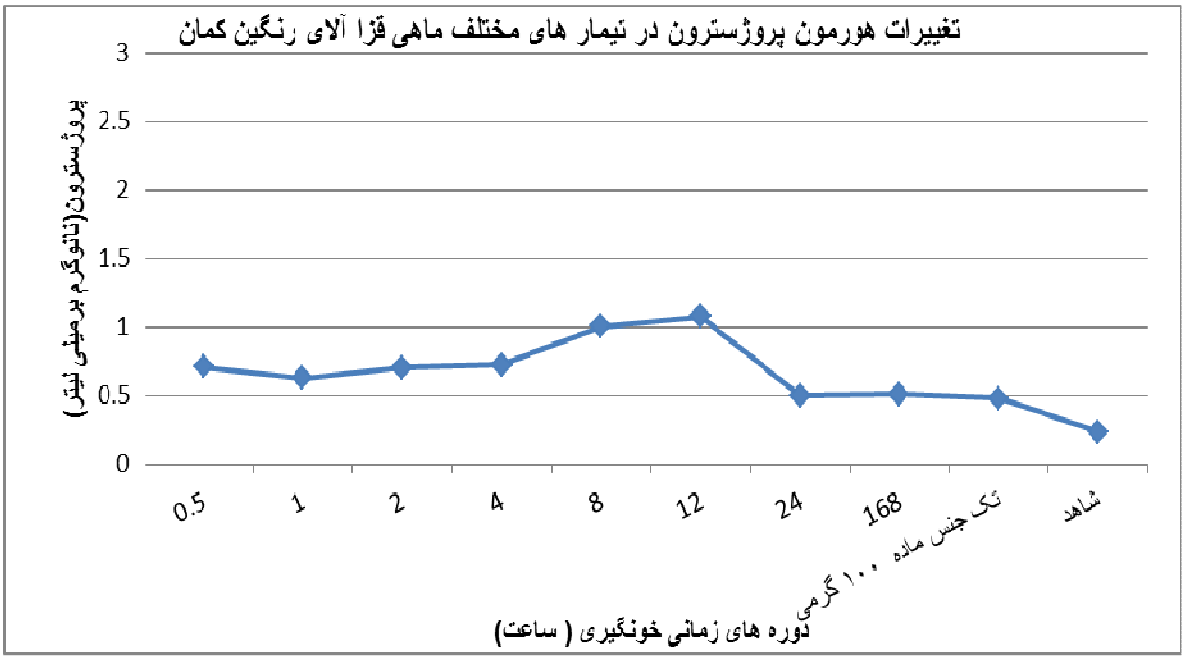
نتایج حاصل از سنجش هورمون تستوسترون در دوره ۳۰ روز آزمایش در نمودار۲ آمده است. نتایج نشان داد، که مقدار هورمون تستوسترون در دوره های زمانی ۰/۵ و ۱ اختلاف آماری معنی داری در مقایسه با گروه شاهد دارد(P<0.001).



نمودار۳-نوسانات هورمون تستوسترون(n=10)

نتایج بدست آمده در این بررسی نشان داد، که بیشترین مقدار هورمون مربوط به ساعت ۰,۵ با مقدار ۰/۷ نانوگرم بر میلی لیتر و کمترین آن مربوطه به تیمار ۱۶۸ ساعت و شاهد به ترتیب با مقدار متوسط ۰/۲ و ۰/۳ نانوگرم بر میلی لیتر بود ($P<0.001$). میزان هورمون تستوسترون بین ماهی های تک جنس ۱۰۰گرمی و ماهیهای قزل آلا در تیمار ۱۶۸ ساعت خونگیری پس از اتمام هورمون تراپی اختلاف معنی دار نداشت($P>0.001$).

۳-۳- هورمون پروژسترون



شکل ٤- تغییرات هورمون پروژسترون(n=10)

در مجموع نشان می دهد که نوسانات هورمون پروژسترون محدود و در طیف ۰,۳ تا ۱,۱ نانوگرم بر میلی لیتر در نوسان بوده است . میزان هوزمون مذکور بین ماهی های تک جنس شده قبلی و ماهی های قزل آلا در تیمار۱۶۸ ساعت خونگیری پس از اتمام هورمون تراپی اختلاف معنی دار نداشت ($P<0.001$) . افزایش معنی دار در هورمون پروژسترون از ساعت ۴ تا ساعت ۲۴ پس از اتمام هورمون تراپی مشاهده شد($P<0.001$).

٤- بحث

نیمه عمر و بازماندگی بقایای هورمونی در بهداشت و سلامت عمومی:

در مصرف استروئید های جنسی درآبزی پروری این نگرانی وجود دارد که بقایای هورمونی درماهیانی که تحت تجویز هورمون قرار داشته اند ،به مصرف کنندگان منتقل می شود و یا اینکه این امر باعث آزاد شدن مقادیر هورمون در سطحی غیرقابل قبول به محیط زیست گردد(Johnston et al., 1983).

جانستون و همکاران در سال ۱۹۸۳ نشان دادند که بیش از ۹۹ درصد هورمون تجویز شده از طریق غذا به ماهی تیلاپیا (Orechromis mossambicus) و قزل آلای رنگین کمان (Oncorhynchus mykiss) در مدت کمتر از ۲۴ ساعت در آب آزاد گردید.دراین آزمایش ماهیان جوان تیلاپیا و قزل آلای رنگین کمان را با هورمون ۱۷- آلفا – متیل تستوسترون که توسط ترتیوم نشان دارشده بود تغذیه نموده و مقادیر کاهش رادیواکتیویته از بافت های بدن آنها را اندازه گیری نمودند . میزان رادیواکتیویته باقی مانده ۸، تا ۱۲ساعت بعد از خاتمه تجویز هورمون زیاد بوده و تا اندازه زیادی (بیش از ۹۵ درصد) منحصر به امعا واحشا بود.پس ازآن مقدار آن هم از بافت و هم از گوشت به سرعت کاهش یافته و بعد از ۱۰۰ ساعت فقط کمتر از ۱ درصد مقداراولیه در تمام بدن باقی ماند.

از طرفی مقایسه مقادیر۱۷-آلفا –تستوسترون موجود درداروهای انسانی به میزان ۱۰ تا ۵۰ میلی گرم درروز با مقادیرمصرفی جهت تغییر جنسیت ماهیان،نشان می دهد که بیان خطرناک بودن مصرف ماهیان بالغی که در دوره جوانی و درشرایط طبیعی تحت تجویز این استروئید قرار داشته اند منطقی نباشد،مگراینکه مقادیری ازهورمون که از طریق غذای خورده نشده وترشحات ادرار و مدفوع به مقداری هم پس مانده هورمون که ازمراحل غوطه وری در تانک ها به سیستم آبی رها می شوند. هم اکنون در بسیاری از کشور ها تجویز مواد مختلف به حیواناتی که به مصرف انسان می رسند،با نظارت قانون انجام می شود.به این ترتیب پرورش دهندگان فقط با تجویز دامپزشک می توانند مواد مختلف را مورد استفاده قرار دهند (Johnston et al., 1983).

جدول٤: سطوح رادیواکتیویته Bq/100 mg در بافت احشایی و لاشه در قزل آلای رنگین کمان پس ازتجویز خوراکی M-17(اقتباس از (Johnston etal., 1983).

ساعت ۰	۴	۸	۱۸	۵۳	۱۲۰	۳۰۰
۲۰۴۶	۲۳۷۵	۱۹۸۷	۵۷۰	۵۵	۵/۷	۱/۲
۱۹۹۷	۱۸۲۹	۱۳۱۷	۳۷۰	۳۰	۴/۵	۰/۷۵
۱۸۹۹	۱۵۵۸	۱۲۶۰	۳۴۵	۲۲	۳/۵	۰/۶۳
۱۸۰۰	۱۴۸۴	۱۲۳۸	۲۶۰	۱۸	۳	۰/۳۵
۱۶۰۷	۱۲۸۴	۱۲۳۸	۲۱۵	۱۵	۲/۸	۰/۲۵
۱۰۸۴	۱۰۱۳	۱۰۴۰	۱۹۴	۱۲	۱/۵	۰/۱۸
۱۰۸۳	۸۲۵	۷۲۰	۱۹۲	۷/۳	ND	۰/۱۲
۱۶۰۶	۱۴۴۳	۱۲۴۳	۲۹۴	۲۲	۲/۹	۰/۴۷
۱۴۲	۱۷۴	۱۲۶	۴۶	۵/۴	۰/۶۲	۰/۱۳

ND: مقادیرغیرقابل اندازه گیری

در اواخر دهه ۱۹۳۰ و اوایل 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 درپرورش ماهیان مزایای فراوانی به دنبال داشته باشد (Schreck, 1974). برخی از نتایج حاصل از کنترل جنسیت (ماده سازی) درماهیان 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 گوشت 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 تفکیک جنسیت شده (Gonochorist) مطالعه صورت گرفته است گرچه نمونه‌هایی از تاثیر استروژن ، برماهی دهان گرد رودخانه‌ای و ماهی استرلیاد وجود دارد (Yamazaki, 1983).

ثبات پایداری جنسیت در ماهیان تغییر جنسیت یافته از نظر وضعیت پرورش ماهی دارای اهمیت بسیار زیادی است.بنا برگزارش یامازاکی ثبات جنسیت درماهیان تغییرجنسیت یافته قزل آلای رنگین کمان را تا سن ۲ سالگی گزارش نموده اند.بنا برگزارش ناگی ثبات جنسی در ماهیان کپورمعمولی که به وسیله هورمون تغییرجنسیت می یابند،دائمی است (Yamazaki,1983).

جنین از لحاظ فنوتیپی نه دارای سلول های جنسی نر و نه دارای سلولهای جنسی ماده می باشد . در یک زمان خاص از رشد جنین ، پیام های شیمیایی از ژن یا سری های ژنی صادرمی گردد که این پیام ها سبب رشد و تکامل سلولهای زایگرا اولیه می شود . در این زمان بافت ها به رشد و نمو خود ادامه داده و ماهی از لحاظ فنوتیپی جنسیت نر یا ماده پیدا می کند. لذا تغییرجنسیت ماهی تنها در یک محدوده زمانی ، قابل اجراست و درخارج ازاین محدوده ی زمانی تغییرجنسیت فنوتیپی امکان پذیر نخواهد بود. تجویزهورمونی در ماهیان به روش های محتلفی انجام می گیرد(ابراهیم زاده ۱۳۸۶). این روش ها به دو گروه سریع و مدت دار یا کند تقسیم بندی می شوند .روش سریع معمولا برای گونه هایی مورد استفاده قرارمی گیرد که فرآیند تمایز جنسی کمی بعد ازتخم گشایی به وقوع میپیوندد، مانند اکثرآزاد ماهیان(Crim,1985).

مطالعات نشان می‌دهد ماهی آزاد چینوک درزمان تخم گشایی به هورمون های با منشا خارجی حساس نیست (Baker et al., 1987). این موضوع نشان می‌دهد حتی درگونه‌هایی که خویشاوندی نزدیکی با یکدیگر دارند دوره "labile" می‌تواند متفاوت باشد. Piferrer (2001) معتقد است دوره "labile" درقزل آلای رنگین کمان همزمان با شروع جذب کیسه زرده وشروع شنای فعال همراه خواهد بود. بدین ترتیب ، مصرف خوراکی هورمون همزمان باشروع 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 ازماهیان می‌باشد و نسبت به استرون (E_1) و۱۷آلفا اتینیل استردیول (EE_2) دارای اثرات ماده سازی موثرتر بوده وبه اندازه این دوهورمون تاثیرات منفی بر میزان بازماندگی ندارد. نتایج تحقیقات قبل نشان داد، دوز بهینه(۴۰ میلی‌گرم بر کیلو گرم غذا) ازهورمون E_2 تا ۹۴ درصد بازده تولید (با بازماندگی ۹۰ درصد) ماهیان تک جنس را در بر داشته است (حسین زاده و همکاران ،۱۳۹۰).

مطالعات بسیاری درمورد از بین رفتن و رفع استروئیدهای خارجی که درمراحل تمایز جنسی استفاده می‌شود انجام گرفته است .استروئیدهای جنسی پس ازمتابولیسم درکبد، دفع می شوند(Piferrer, 2000). درآزمایش دیگری که ماهیان تیلاپیای بالغ تحت تزریق وریدی H-17-MT قرارگرفته بودند،بیشترین مقدارهورمون درکیسه شنا وکبد وجود داشت (Johnston,1983).همچنین درمطالعات مربوط به استفاده از۱۷- آلفا –متیل –تستوسترون به عنوان یک عامل آنابولیک درپرورش ماهی آزاد کوهو Oncorhynchus Kisutch که توسط Fugerlund و Dye در سال ۱۹۷۹ انجام گرفت ، مشاهده گردید که مقدار رادیواکتیویته در تمام بافت ها

به کمتر از ۱ میلی گرم در گرم کاهش یافته و بیشترین مقدار ، معادل ۰/۹۸ میلی گرم در گرم در کبد موجود بود (,.etal Fugerlund 1979). درحقیقت مقادیرهورمون ۱۷-بتا –استرادیول و ۱۷-آلفا – متیل تستوسترون که رایج ترین هورمون های مورد استفاده برای تغییر جنسیت درماهیان می باشند، فقط ۵ روز پس ازقطع هورمون از غذا ،به حدی کاهش می یابدکه مقدارآن قابل اندازه گیری نمی باشد (Bromag and cumarantungo,1988). به علاوه استروئید ها را نوعا در ماهیان جوان و سال ها قبل ازمصرف تجویزمی کردند و همچنین مقادیراستروئید استفاده شده کم و نیمه عمرشان نیز کوتاه است. نیمه عمر استرادیول درماهی قزل آلای رنگین کمان یک ساله ، کمتر ۱۲ساعت (Hunter & Donaldson,1983) ونیمه عمر تستوسترون ، ۲/۵ تا ۳/۵ ساعت گزارش شده است (فرهمند ،۱۳۷۲).

با وجود اینکه تعداد هورمون مصرفی توسط هرماهی کم بوده وسریعا ازبدن ماهی دفع می گردد وازاین لحاظ مصرف این گونه ماهیها توسط انسان مشکل خاصی را بوجود نمی آورد (Thomasوهمکاران ، ۲۰۰۳).ولی به دلیل مخالفت های متعددی که در زمینه درمان هورمون ماهیها صورت گرفته (ستاری و معتمد ، ۱۳۷۶) ، از برنامه های ژنتیکی برای کاهش این مشکل استفاده شده است.

Table 2. Linearity and LODs of Hormones.

No.	Compound	Regression equation	coefficient	Correlation (mg/kg)	LOD
1	Estriol	Y = 8.096 × –0.824	0.9998		0.5
2	Prednisolone	Y = 17.418 × –2.088	0.9999		0.2
3	Hydrocortisone	Y = 15.746 × –1.518	0.9999		0.3
4	Prednisone	Y = 20.192 × –2.152	0.9998		0.2
5	Methylprednisolone	Y = 16.986 × –1.894	0.9999		0.4
6	Betamethasone	Y = 20.439 × –1.106	0.9997		0.2
7	Dexamethasone	Y = 20.176 × –2.176	0.9999		0.2
8	Triamcinolone acetate	Y = 16.374 × –1.558	0.9997		0.4
9	Gestrinone	Y = 6.370 × –0.668	0.9998		1.0
10	Prednisolone acetate	Y = 15.589 × –1.627	0.9999		0.4
11	Hydrocortisone acetate	Y = 15.051 × –1.584	0.9999		0.4
12	Prednisone acetate	Y = 24.106 × –2.401	0.9997		0.2
13	Estradiol	Y = 8.709 × –0.635	0.9999		0.8
14	Cortisone acetate	Y = 19.826 × –2.336	0.9996		0.4
15	Methyltestosterone	Y = 19.980 × –2.209	0.9996		0.3
۱۶	Estrone	Y = 10.701 × –0.847	0.9999		0.4

منابع

- سالنامه آماری شیلات ،۱۳۹۲.
- ستاری و معتمد ،۱۳۷۶.بیوتکنولوژی در آبزی پروری ،تغییر جنسیت ماهی .مرکز نشر دانشگاهی.
- علیزاده م. ،۱۳۸۹، برنامه راهبردی ماهیان سرد آبی ، موسسه تحقیقات شیلات ایران.
- فرهمند،ح.۱۳۷۲.ایجاد تغییر جنسیت در ماهی کپور معمولی ،پایان نامه کارشناسی ارشد،دانشگاه منابع طبیعی نور،۱۰۱ص.
- حسینی ،ا.۱۳۷۳.بررسی کاربرد هورمونها در تغییر جنسیت قزل آلا ی رنگین کمان .پایان نام کارشناسی ارشد .دانشگاه آزاد اسلامی .۱۰۴ص.
- حسین زاده صحافی، ه.، ۱۳۸۰ . بیولوژی تولید مثل ماهی با تأکید بر ماهیهای ایران . مؤسسه نشر جهاد وابسته به جهاد دانشگاهی واحد تهران ، ۲۷۲ص.
- حسین زاده صحافی، ه وهمکاران، ۱۳۹۰ .ایجاد تک جنس ماده قزل آلای رنگین کمان به روش مستقیم با استفاده ازهورمون ۱۷ بتا استرادیول ، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور .
- رعنای اخوان ،س وهمکاران ،۱۳۹۰.تاثیرکاشت سطوح مختلف هورمون ۱۷ بتا استرادیول،بر روند رشد وتوسعه گنادی ومتابولیت های سرم درفیل ماهیان پرورشی،پایان نامه کارشناسی ارشد،دانشگاه گیلان، ۸۲ص.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Fagerlund, U.H.M ,McBride, J.R., 1979. The use of 17a-methyltestosterone for promoting weight increases in juvenile Pacific salmon. J. Fish. Res. Board Can. 30, 1099–1104.
- 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 Oariegatus), vitellogenin bioassay. Aquat. Toxicol. 49, 77–88
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- Hunter, G.A., Donaldson, E.M., 1983. Hormonal sex control and its application to fish culture. In: Hoar, W.S.,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.
- Hunter, G.A.,and Solar,I.I.,1986.Feminization of coho salmon(Oncorhynchus kisutch) and Chinook salmon (Oncorhynchus tshawytcha) by immersion of alevins in a solution of estradiol -17-b.Aquaculture,vol,53,Issues 3-4 ,pp:243-302.
- 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.
- 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.
- Nagahama, Y. 1994, Endocrine regulation of gametogenesis in fish.Int. J. Biol. 38:217-229.
- Pandian, T.J., 1995. 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.
- Pentikäinen V, Erkkilä K, Suomalainen L, Parvinen M, Dunkel L..۲۰۰۶ Estradiol Acts as a Germ Cell Survival Factor in the Human Testis in vitr.The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism ,57-67.
- 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.
- 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.
- Piferrer , F., 2001 . Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish . Aquaculture , Vol. 197, pp: 229-281.
- 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.
- 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.
- 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.
- Thomas P.C., Rath S.C., Mohapatra D.K. 2003, Breeding and seed production of Fin fish and Sellfish. Daya puplishing house.
- Tyler.J., 1991, research on fossil fishes in New Delhi, Calcutta, Lucknow, and Chandigarh, with associated excavations at selected Eocene sites India.
- Yamamoto, T., 1969. Sex differentiation. In: Hoar, W.S., Randall, D.J.ŻEds.., Fish Physiology, vol. III, Reproduction, Academic Press, New York, pp. 117–175.
- Yamazaki, F., 1983. Sex control and manipulation in fish. Aquaculture 33, 329–354.
- Zhai ,C. Q.,Wu, H. Zou., Tan, P. B., Chi, Y. S., Yang, H. Q., 2006. optimal dietary methionine requirement for juvenile cobia (Rachycentron canadum). Aquaculture, 258,pp 551-557.
- Zar J.H .1999. Blostatistical Analysis .Prentic Hall.(4th Edition) New Jersey.pp:663.

Abstract

Residual level of 17- Beta Stradiol and progesterone hormones in rainbow trout fish plasma were measured during different period using RIA method. Blood sampling from abdominal aorta were taken from 70 individual of female fishes (100±11 g) which had been exposed to hormone at 0.5, 1,2,4,8,12,24 and 168 h (7 groups) compared with control group which was not exposed to this hormone .Results showed that plasma hormones measurement in different fish groups after exposing had significant differences ($P<0.01$) and the highest and lowest 17-Beta Stradiol hormone residue were observed in fishes that exposed 0.5h and 168h to hormone respectively (121±9 ng. ml^{-1} and 3±0.9 ng. ml^{-1}) but there is no any differences between fishes exposed 168h to hormone and control group. Also the highest progesterone hormone level were measured in fishes 0.5 an 1h exposed and the lowest one was in fishes 168 h exposed. The range of progesterone hormone were between 0.3 to 1.1 ng .ml^{-1} and significant increasing of this hormone levels were obtained in fishes exposed to hormone 4 to 24h ($P<0.01$). As consequence these hormone can not residue in fishes for a long time and maximum after one week the levels back to the normal.

Keywords: 17- Beta Stradiol, Rainbow trout, Hormone residue

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES SCIENCE RESEARCH INSTITUTE – Cold water Fishes Genetic Research Center

---

Project Title : Estimation of Hormone Residuals(B- Estradiole) in Rainbow Trout
Approved Number:2-12-12-91126
Author: Homayoon Hoseinzadeh Sahafi
Project Researcher : Homayoon Hoseinzadeh Sahafi
Collaborator(s) *:* Tayebe Bashti,Davood zargham,Sohrab Rezvani,Hossein Abdolhi,Habib Rastiannasab,
Parisa Amaninekhad,Eynolah Gorjipor ,Habibolah Gandomkar,Zohre Mokhayyr,Maysam Salahi
Advisor(s):-
Supervisor: Mostafa Sharifrohani
Location of execution : Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad Province
Date of Beginning : 2010
Period of execution : 1 Year
Publisher : ***Iranian Fisheries Science Research Institute***
Date of publishing : 2015
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 & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES SCIENCE RESEARCH INSTITUTE

Project Title :

Estimation of Hormone Residuals(B- Estradiole) in Rainbow Trout

Project Researcher :
Homayoon Hoseinzadeh Sahafi

Register NO.
45809