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 – مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی
شهید مطهری یاسوج

عنوان:

تولید جمعیت تمام ماده قزل آلا رنگین کمان به روش ماده سازی غیر مستقیم

مجری:
طیبه باشتی

شماره ثبت
۵۱۱۰۶

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

عنوان پروژه : تولید جمعیت تمام ماده قزل آلا رنگین کمان به روش ماده سازی غیر مستقیم
شماره مصوب پروژه : ۸۹۰۱۱-۱۱-۱۲-۱۲-۲
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : طیبه باشتی
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) :
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : طیبه باشتی
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : منصور شریفیان، همایون حسین زاده صحافی، مرتضی نیکبخت، داود ضرغام،کیانوش کمائی، میثم صلاحی، کمیل رزمی، حسین عبدالحی، سیدحسین مرادیان، حبیب اله گندمکار، عین‌اله گرجی پور، ابوالحسن راستیان نسب، احمدرضا حسینی، محسن محمدپور
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -
محل اجرا : استان کهگیلویه و بویر احمد
تاریخ شروع : ۸۹/۱/۱
مدت اجرا : ۳ سال
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۶
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 : تولید جمعیت تمام ماده قزل آلا رنگین کمان به روش ماده سازی غیر مستقیم

کد مصوب : ۸۹۰۱۱-۱۱-۱۲-۱۲-۲

شماره ثبت (فروست) :۵۱۱۰۶ تاریخ : ۹۵/۴۴/۴

با مسئولیت اجرایی سرکار خانم طیبه باشتی دارای مدرک تحصیلی کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی ماهیان دریا می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش اصلاح نژاد و تکثیر و پرورش آبزیان در تاریخ ۹۵/۶/۱۵ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده □ مرکز ■ ایستگاه □

با سمت کارشناس اصلاح نژاد در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژآد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج مشغول بوده است.

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱- مقدمه ۲
۱-۱- روش های ماده سازی در ماهیان ۲
۱-۲- روش های هورمونی تولید ماهیان تک جنس ۳
۱-۳- زمان های بحرانی در ماده سازی ماهیان ۳
۱-۴- هورمون های موثر در ماده سازی ماهیان ۴
۲- مواد و روشها ۶
۲-۱- محل اجرای تحقیق ۶
۲-۲- مشخصات مولدین و تخم های چشم زده ۶
۲-۳- مشخصات خوراک ۷
۲-۴- تیمارهای آزمایشی ۸
۲-۵- اضافه نمودن هورمون به غذا ۸
۲-۶- تعیین جنسیت ۹
۲-۷- بررسی خصوصیات مورفولوژیک ماهیان نر معمولی و ماهیان ماده تغییر جنسیت یافته ۱۰
۲-۸- بررسی کیفیت اسپرم ماهیان ماده تغییر جنسیت یافته ۱۰
۲-۹-آزمون نتاج ۱۱
۲-۱۰- آزمون لقاح جهت ارزیابی کیفیت اسپرم ۱۱
۲-۱۱-آنالیز آماری ۱۲
۳- نتایج ۱۳
۳-۱- تاثیر هورمون تراپی بر تغییر جنسیت ۱۳
۳-۲- مقایسه رشد ماهیان تیمارهای مختلف ۱۵
۳-۳- بررسی خصوصیات مورفولوژیکی ماهیان نر معمولی و ماهیان ماده تغییر جنسیت یافته ۲۰
۳-۴- نتایج آزمون نتاج ۲۰
۴- بحث و نتیجه گیری ۲۱
۴-۱- تاثیر هورمون تراپی بر تغییر جنسیت ۲۱
۴-۲- مقایسه رشد ماهیان تیمارهای مختلف ۲۴
۴-۳- آزمون نتاج ۲۶
پیشنهادها ۲۷
منابع ۲۸
چکیده انگلیسی ۳۱

چکیده

در بسیاری از کشورها استفاده از روش تغییر جنسیت ماهیان برای تولید جمعیت تمام ماده قزل آلا معمول شده است. دلیل توسعه این روش بلوغ جنسی زودتر در ماهیان نر قزل آلای رنگین کمان نسبت به ماهیان ماده است. هدف از این تحقیق ایجاد ماهیان تمام نر XX با تجویز خوراکی هورمون ۱۷ آلفا متیل تستوسترون و در نهایت لقاح این مولدین با ماده های معمولی XX جهت تولید نسل تمام ماده است. در این تحقیق لاروهای ماهی قزل آلای رنگین کمان به مدت ۶۰ روز از شروع تغذیه فعال با غذاهای حاوی هورمون ۱۷ آلفا متیل تستوسترون (۰/۵، ۱/۵، ۳، ۶ و ۱۰ میلی گرم در کیلوگرم غذا) تیمار شدند. تعیین جنسیت با نمونه برداری تعداد ۲۰ عدد ماهی از هر گروه در دو زمان ۱۸۰ و ۶۸۰ روز بعد از لقاح و با مشاهده مستقیم گناد در زیر میکروسکوپ صورت گرفت. علاوه بر این، نسبت های ماهیان تغییر جنسیت یافته و عملکرد رشد نیز در تیمارهای مختلف بررسی شد. به منظور مولد سازی، ماهیان نرسازی شده تا زمان بلوغ پرورش داده شدند. در انتهای دوره پرورشی، تخم ماهیان ماده معمولی با اسپرم این ماهیان نرسازی شده لقاح داده شدند تا جمعیت تمام ماده ایجاد شود. بررسی نتایج نشاندهنده موثر بودن هورمون ۱۷ آلفا متیل تستوسترون در تمامی تیمارها بود. در گروه های تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۵، ۱/۵ و ۳ میلی گرم هورمون در کیلوگرم غذا، ۱۰۰ درصد ماهی نر حاصل شد. بیشترین میزان رشد در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۶ و ۰/۵میلی گرم هورمون در کیلوگرم غذا و همچنین تیمار شاهد مشاهده شد. در تمامی موارد که منجر به ایجاد نتاج شدند، جمعیت ۱۰۰ درصد ماده تولید شد. با توجه به اینکه ماهیان ماده تولید شده به طور مستقیم تحت تأثیر تیمار هورمونی قرار نمی‌گیرند بنابراین، تولید جمعیت تمام ماده با استفاده از این روش به عنوان مزیتی در پرورش ماهی قزل آلا مطرح است.

کلمات کلیدی: تمایز جنسی، قزل آلای رنگین کمان، تغییر جنسیت، تیمار هورمونی، هورمون ۱۷ آلفا متیل تستوسترون، جمعیت تمام ماده، استروئیدها

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، پرورش‌آبزیان و بخصوص در محیط های مصنوعی بیش از بیش مورد توجه قرار می‌گیرد. طی سال های اخیر، روند صعودی میزان تولید ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در ایران پیشرفت بسیار قابل توجهی داشته است، به طوری که میزان تولید سالانه این ماهی از حدود ۵۰۰ تـن در سال ۱۳۷۴، به ۱۴۳۰۰۰ تـن در سـال ۱۳۹۲ رسـیده است(سالنامه آماری شیلات ایران، ۱۳۹۳). با این حال میزان تولید این ماهی در سال ۱۳۹۳ با کاهشی محسوس به حدود ۱۲۵۰۰۰ تن رسید. یکی از دلایل اصلی کاهش تولید بروز بیماری مشکوک به VHS عنوان شده است که پیامد استفاده از تخم های چشم زده وارداتی توسط پرورش دهندگان می باشد. علت تمایل پرورش دهندگان به استفاده از تخم های چشم زده وارداتی رشد بیشتر این ماهیان در مقایسه با ماهیان حاصل از تخم های داخلی است. حال اگر بتوان در داخل کشور راهکارهایی برای تولید ماهیان با نرخ رشد بیشتر تولید نمود، می توان تا حدی از بروز چنین خساراتی به صنعت پرورش ماهی قزل آلا جلوگیری نمود. فرآیند بلوغ جنسی در ماهی قزل آلای رنگین کمان که ماهی پرورشی غالب در مناطق معتدل وسردسیر دنیا می‌باشد، به دلیل صرف انرژی جهت تولید مواد تناسلی، انرژی بین فعالیت های تولیدمثلی و تولید لاشه تقسیم می گردد. نتیجه این تقسیم انرژی،کاهش میزان رشد به ویژه در جنس نرخواهد بود و ازطرفی 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 بیماری زا، استرس های محیطی افزایش می‌یابد (Bromage and Cumaranatunga,1988). این تغییرات در جنس نر قزل‌آلای رنگین‌کمان بارزتر بوده و زودترآشکار می‌شود، زیرا جنس نرحداقل یک سال زودتر از 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 ماهی‌های 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 علاوه بر رشدکمی که دارند، به دلیل کیفیت نامطلوب گوشت، بازار پسندی آنها نیز کاهش می‌یابد (Solar *et al*., 1987; Bye and Lincoln,1986). بدین ترتیب ایجاد جمعیت های تک جنس از جمله تولید جمعیت تمام ماده قزل آلای رنگین کمان یکی از روش های اصلاح نژاد ماهیان به حساب می آید.

۱-۱- روش های ماده سازی در ماهیان

ماده سازی[1] گونه های تک گنادی[2] 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 تأثیری بر تعیین جنسیت فقط بر روی مراحل تمایز جنسی تأثیرگذار است. بنابراین در گونه هایی مانند قزل آلا که سیستم تعیین

[1] - feminization
[2] - gonochorism

جنسیت به صورت کروموزومی است این روش باعث ماده سازی و نرسازی[1] 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[2]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 شود و 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 (Pandian and Kirankumar, 2003).

۲-۱-روش های هورمونی تولید ماهیان تک جنس

روش های متعددی برای استفاده ازهورمون ها وجود دارد. Crim (1985)، 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 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).

تابه حال ۳ ترکیب طبیعی و ۹ ترکیب مصنوعی در مطالعات 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, 1993a,b,c). مهمترین متغیرهای کمی درکنترل جنسیت و ماده سازی ماهیان با استفاده از استروژن ها، زمان درمان، طول دوره درمان و میزان هورمون مصرفی خواهد بود.

۳-۱-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

[1] – masculinization

[2] - Neomale

را در دوره تکامل نشان می دهد که اصطلاحاً دوره حسّاس تمایز جنسی[1] نام دارد. این زمان یکی از مهمترین متغیرها برای استفاده از استروژن می باشد (Piferrer, 2001).

به طورکلی ماهیانی که از لحاظ جنسی تمایز نیافته اند در مقایسه با همنوعان تمایزیافته، نسبت به اثرات درمانی استروئیدها حسّاس ترند(Piferrer, 2001). بدین ترتیب اگر هورمون درمانی درطول دوره حسّاس تمایز جنسی انجام شود به حدّاقل زمان و کمترین میزان استروئید برای دستیابی به جنس مورد نظر نیازمی باشد. وقوع دوره حسّاس تمایز جنسی بیانگر حوادث پیچیده درگنادها است که نمی توان آن را از لحاظ 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 قزل آلای کوهو (*Onchorhincus kisutch*) و ماهی سیکلید دهان تفریخ مصری[2] (*Hermihaplochromis multicolor*) نشان می دهد حداکثر حساسیت نسبت به استروژن ها، زودتر از حداکثر حساسیت نسبت به آندروژن ها رخ می دهد (Piferrer and Donaldson, 1993). این امر نشان می دهد، بدون در نظرگرفتن گونه ها، دوره حسّاس تمایز جنسی در مورد استروژن ها زودتر از این دوره درآندروژن ها به وجود می آید (George and Pandian,1995).

زمان وقوع دوره حسّاس تمایز جنسی در گونه های مختلف متفاوت است. حتی در برخی گونه های خویشاوند نیز این دوره متفاوت می باشد. به عنوان مثال در گونه مولی (*Poecilia sphenops*) این دوره به حدود سی روز پس از تولد نوزادان بر می گردد، در حالی که در گونه گوپی (*Poecilia reticulate*) این دوره در زمان جنینی قراردارد (Kavumpurath and Pandian, 1993b).

۴-۱-هورمون های موثر در ماده سازی ماهیان

امروزه هورمونهای متعددی در تغییر جنسیت ماهیان تاثیر گذار بوده،که مهمترین آنها هورمونهای استروئیدی وبه ویژه استروئید های جنسی می باشند. در این راستا انواع هورمونها و دارو ها نظیر استرادیول و مشتقات مربوطه و نیز انواع داروهای گیاهی و دارو هایی نظیر، تا موکسیفن می توانند، تغیر جنسیت در ماهی را تشدید نمایند (Piferrer and Donaldson,1993).

۴-۱-۱- 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 که از سلول‌های

[1]- labile period
[2] - Egyptian Mouthbrooder

قدامی هیپوفیز ترشح می‌شود،کنترل می‌شود. تستوسترون برای اثرگذاری در بافت هدف و جلوگیری از کاهش اثرش، با برخی پروتئین‌های ساخته شده در کبد ترکیب شده و بعد از انتقال به اعضاء هدف یا گیرنده‌های موجود در بافت ترکیب شده و از جدار سلول عبور کرده و آثارش را ایجاد می‌کند. به طور کلی مدل‌های زیست‌شناسی و فیزیولوژیکی و تحقیقاتی که درباره جانوران انجام می‌شود حاکی از این است که تستوسترون نقش کلیدی در تعاملات اجتماعی بازی می‌کند. بعد از تولید تستوسترون از طریق فعل و انفعالات داخل بدن، این هورمون با تأثیر بر غده‌های مؤثر در تولید خود هیپوتالاموس و هیپوفیز موجب محدودسازی ترشح هورمون‌های محرک گونادوتروپین‌ها (FSH و LH) می‌گردد. این عمل باعث خواهد شد تا سطح تستوسترون در بدن به طور خودکار توسط این انفعالات به صورت خودکار تنظیم گردد (Couse and Korach, 1999).

در آزاد ماهیان دوره تمایز جنسی در دمای ۱۰ ^{o}C 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 سازی نیز به صورت ناقص انجام خواهد شد. اصولاً استرون ها در هر میزانی که برای ماده زایی به کار روند، نرخ رشد را اندکی کاهش می دهند ولی به محض اتمام دوره مصرف هورمون، ماهیان فوق وزن از دست رفته خود را باز خواهند یافت (حسینی،۱۳۷۳).

این طرح با هدف تولید جمعیت تمام ماده در ماهی قزل آلا رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به روش ماده سازی غیر مستقیم انجام می گیرد. در این پژوهش تولید جمعیت تمام ماده به روش ماده سازی غیر مستقیم از طریق تولید ماهیان نر تغییر جنسیت یافته بوسیله هورمون ۱۷ آلفا متیل تستوسترون[1] به روش تجویز خوراکی از زمان شروع تغذیه فعال لاروها صورت می گیرد. در ادامه اسپرم XX ماهیان تغییر جنسیت یافته با تخمک ماهیان ماده معمولی لقاح داده می شوند تا جمعیت ۱۰۰ درصد ماده حاصل شود.

[1] - 17- α-methyl testosterone (MT)

۲- مواد و روش ها

۲-۱-محل اجرای تحقیق

کلیه مراحل میدانی و مراحل آزمایشگاهی پروژه از بهمن ماه ۱۳۸۹ در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج انجام شد. این مرکز در ۲۶ کیلومتری جنوب شهر یاسوج می باشد و دارای زمستان های سرد و تابستان های معتدل است. منبع آب مرکز چشمه پیربولدوک می باشد که در طول سال دبی آب آن بین ۱۰۰۰-۱۵۰ لیتر در ثانیه متغیر می باشد. دمای آب 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 (تصویر ۲-۱). تعداد سالن های پرورش نیز ۳ سالن به استعداد تولید ۲۰ میلیون تخم چشم زده در سال است. مراحل میدانی (هورمون درمانی و نگهداری تیمارها) و مراحل آزمایشگاهی (تشریح و بررسی بافتی وگنادی) پروژه نیز در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج انجام گرفت.

تصویر ۲-۱: نمای محل اجرای پروژه

۲-۲- مشخصات مولدین و تخم های چشم زده

مولدینی که در فصل تکثیر در این مرکز برای عملیات تخم کشی انتخاب شدند بین ۵-۳ سال سن داشته و وزن آنها ۱۰۰± ۲۸۴۰ گرم بود. مولدهایی جهت استحصال تخم انتخاب شدند که از لحاظ ظاهری سالم و هیچ گونه علائمی از بیماری نداشتند. مراحل مختلف تکثیر از جمله تخم گیری، اسپرم گیری و لقاح بر اساس پروتکل تکثیر و پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان صورت گرفت. با توجه به نیاز پروژه تعداد ۶۰۰۰۰ عدد تخم از این مولدین انتخاب و به سالن انکوباسیون جهت طی دوره انکوباسیون انتقال داده شد. میانگین قطر تخم های چشم زده حدود ۰/۷۲± ۵/۵ میلی متر و وزن هر ۱۰ تا ۱۱ عدد آنها یک گرم بود. وزن لاروهای دارای کیسه زرده بعد از تخم گشایی ۱۲۵-۱۲۰ میلی گرم بود.

در طی دوره انکوباسیون، کنترل روزانه تخم ها و ثبت و حذف تخم های سفید صورت گرفت. برای محافظت از قارچ ساپرولگنیا، تخم های سبز به صورت روزانه با بتادین ۱۰٪ ضدعفونی شده و تا مدّتی پس از تخم گشایی از نور مستقیم محافظت می شدند.

جهت نگهداری و اعمال تیمارهای هورمونی، ابتدا نسبت به شستشوی ۱۸ عدد تراف و ۱۸ عدد سینی اقدام شد. پس از شستشو نسبت به ضدعفونی تراف ها و سینی ها با سولفات مس، تنظیم شیب تراف ها و قرار دادن یک عدد سینی در هر تراف اقدام شد. پس از رقم بندی و جداسازی تخم های سفید از تخم چشم زده سالم، تعداد ۶۰۰۰۰ عدد تخم جداسازی شد و تقریبا تعداد ۳۰۰۰ عدد تخم (با متوسط ۱۰ عدد در هرگرم) در هر سینی خوابانده شد. تلفات گیری و تمیز کردن تیمارها بصورت روزانه تا زمان شروع تغذیه فعال ادامه یافت (تصویر ۲-۲).

تصویر ۲-۲: مکان اجرای طول دوره هورمون درمانی

۳-۲-مشخصات خوراک

خوراک مورد نیاز برای هورمون تراپی و طی دوران مختلف پرورشی از کارخانجات تولید غذای کنسانتره تجاری تهیه گردید. جهت تغذیه لاروها تا رسیدن به وزن ۲ گرم از غذای شرکت اسکریتینگ (Skretting) استفاده شد و در اندازه های انگشت قد، پیش پرواری خوراک ماهی از کارخانه های داخلی تهیه شد.

۴-۲-تیمارهای آزمایشی

در این تحقیق از روش تجویز خوراکی هورمون برای تغییر جنسیت استفاده شد، زیرا این روش به عنوان روش بهینه جهت تغییر جنسیت معرفی گردیده است (Pandian and Sheela, 1995). بلافاصله پس از شروع شنا و تغذیه فعّال لاروهای دارای کیسه زرده با غذای هورمون دار تغذیه شدند. این پروژه دارای شش تیمار و هر تیمار با 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 زیر آمده است (جدول ۲-۱). غذادهی ماهیان از زمان تغذیه فعال شروع شد و برای مدت ۶۰ روز ادامه داشت(Kuzminski, and Dobosz, 2010; Feist *et al*., 1995). درصد غذادهی بر اساس جداول استاندارد غذایی محاسبه شد و همزمان با رشد ماهیان درصد غذادهی کاهش یافت. در ابتدا، غذادهی ۱۰ بار در روز و در انتها نیز ۶ بار در روز غذادهی صورت گرفت.

جدول ۲-۱: تیمارهای هورمونی جهت تولید ماهیان ماده تغییر جنسیت یافته (مقدار هورمون بر اساس میلی گرم در کیلوگرم (mg/kgf) غذا ارائه شده است).

تیمارها	A	B	C	D	E	F
مقدار هورمون (mg/kgf)	۰/۵	۱	۳	۶	۱۰	شاهد
دوره درمان (روز)	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰

۵-۲-اضافه نمودن هورمون به غذا

هورمون ها در الکل به صورت محلول تهیه شدند. بدین ترتیب، مقدار مشخصی از هورمون ۱۷ آلفا متیل تستوسترون 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 گردید (تصویر ۲-۳). غذا بر روی پلاستیک و با قطر نازک و گسترده پهن شد. پس از اسپری، غذا مخلوط و دوباره اسپری انجام شد. این کار چندین دفعه صورت گرفت تا هورمون کاملاً با تمام غذا مخلوط گردد. پس از اتمام این مرحله غذا با باد سرد سشوار کاملاً خشک گردیده و داخل ظروف دربسته در یخچال نگهداری شدند.

تصویر ۲-۳ نحوه اضافه نمودن هورمون به غذای استارتر

۶-۲-تعیین جنسیت

پنج ماه بعد از شروع تغذیه فعال تیمارهای هورمونی و تیمار شاهد جهت زیست سنجی و تعیین جنسیت مورد نمونه برداری قرار گرفت و برای تمامی تیمارها نمونه میکروسکوپی تهیه شد و از گناد ماهیان نر و ماده عکس و اسلاید تهیه شد. به این ترتیب فاز اول پروژه (تولید ماهیان نر تغییر جنسیت یافته) به اتمام رسید و فاز دوم پروژه تا رسیدن ماهیان نر تغییر جنسیت یافته به زمان بلوغ ادامه یافت.

شکل ۲- ۴ تعیین جنسیت ماهیها با میانگین وزن ۵ گرم

۲-۷-بررسی خصوصیات مورفولوژیکی ماهیان نر معمولی و ماهیان ماده تغییر جنسیت یافته

جهت ارزیابی ویژگی های مورفولوژیک ماهیان از چهار شاخص وزن گناد، وزن سوماتیک (غیر جنسی)، GSI و حجم کل میلت استفاده شد.

۲-۸- بررسی کیفیت اسپرم ماهیان ماده تغییر جنسیت یافته

۲-۸-۱- نحوه اسپرم گیری

مولدین نر معمولی (تیمار شاهد) پس از بررسی ظاهری و تایید سلامت، توسط پودر گل میخک (۱۵۰ ppm) (مهرابی، ۱۳۸۱) بیهوش شدند ابتدا زیست سنجی صورت گرفت و در ادامه گنادها و معده آنها جدا و وزن شدند. شاخص گنادوسوماتیک با محاسبه وزن بیضه ها به عنوان درصدی از وزن بدن به دست آمد (de Vlaming *et al.*, 1982). برای این منظور ابتدا لوله های آزمایشگاهی ۱۵ میلی لیتری با کاغذ آلومینیوم و پارافیلم خوب پوشانده شده، سپس اسپرم هر ماهی بطور جداگانه گرفته شد و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد. جهت ممانعت از بروز هر گونه آلودگی ناحیه شکمی توسط عواملی از قبیل آب، موکوس و ادرار، هر ماهی به دقت توسط حوله خشک شد (Dreanno *et al.*, 1998). اسپرم گیری از نرهای معمولی قبل از اینکه کشته شوند صورت گرفت، بنابراین GSI برای ماهیان نر معمولی شامل وزن بیضه ها منهای اسپرم گرفته شد (Geffen and Evans, 2000). ویسکوزیته میلت ماهیان نر معمولی خیلی کمتر از ماهیان ماده تغییر جنسیت یافته و کاملا روان بود، و بنابراین نیازی به رقیق کردن احساس نشد. علاوه بر این جهت مقایسه مستقیم ماهیان معمولی با ماهیان ماده تغییر جنسیت یافته، نمونه های اسپرم به صورت مستقیم از بیضه تعداد ۴ عدد ماهی نر معمولی گرفته شد. از آنجا که مجرای اسپرم بر ماهی های ماده تغییر جنسیت یافته اغلب تکامل نیافته بود و یا وجود نداشت، اسپرمی از این ماهیها به روش معمول استحصال نمی شد، درنتیجه اسپرم به طور مستقیم از بیضه های این ماهیان گرفته شد(Tsumura *et al.*, 1991). مقایسه مستقیم اسپرم به دست آمده به صورت اسپرم گیری و اسپرم بیضه ای نیز در ۲ عدد از این ماهیان صورت گرفت. هدف از این کار بررسی این مطلب بود که آیا علل اختلافات احتمالی میان اسپرم ماهیان نر معمولی و ماهیان ماده تغییر جنسیت یافته با بلوغ نهایی در مجرای اسپرم بر می باشد یا خیر.

ماهیان ماده تغییر جنسیت یافته در سن دوسالگی و با وزن متوسط ۱۰± ۷۰۰ جهت بررسی استفاده شدند. گنادها با عمل جراحی از ماهیان ماده تغییر جنسیت یافته تازه کشته شده خارج گردید (n=۲۰) و جهت اسپرم گیری با دست فشرده شد. بیضه با فشار از یک الک ۱ تا ۲ میلی متری عبور داده شد تا بافت های بیضه ای حذف شوند. منی ماهیان ماده تغییر جنسیت یافته دارای ویسکوزیته بسیار زیاد بود. در فعالیتهای تجاری این منی با یک رقیق کننده، رقیق می شود که این رقیق کننده معمولاً نقش ممانعت از تحرک را نیز ایفا می کند.

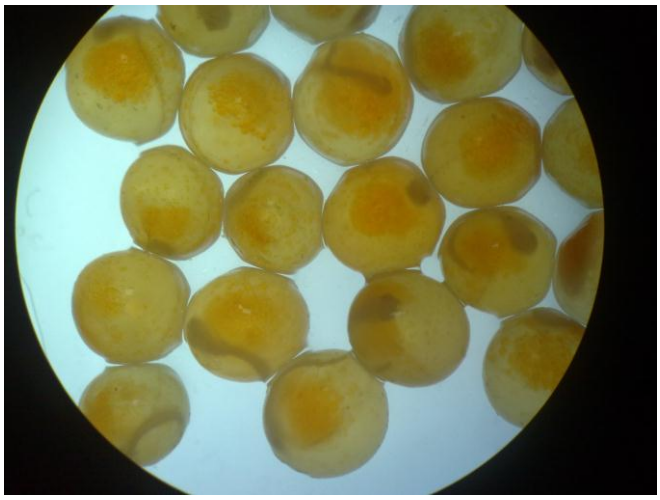
۹-۲-آزمون نتاج

در پایان دوره تخم های حاصل از ۱۰ عدد مولد ماده از مولدین مرکز گرفته شد. اسپرم ۵ عدد مولد مرکز، ۵ مولد شاهد و ۱۰ ماهی ماده تغییر جنسیت یافته نیز گرفته شد. لقاح بر اساس پروتوکل های لقاح ماهی قزل آلا صورت گرفت. و تخمهای لقاح یافته در شرایط یکسان مرکز دوره انکوباسیون را طی کردند. میزان بازماندگی تا زمان شروع تغذیه فعال کنترل شد. جنسیت لاروها در وزن ۲ گرم با بررسی گناد ۳۰ عدد ماهی در هر گروه تعیین شد.

۱۰-۲-آزمون لقاح جهت ارزیابی کیفیت اسپرم

هشت روز پس از عملیات تکثیر و لقاح، از تخم ها نمونه برداری صورت گرفت و درصد لقاح با استفاده از لوپ و برحسب رابطه ۲-۲ محاسبه گردید. بدین ترتیب که ۸ روز پس از لقاح تعداد ۳۰ عدد تخم از هر واحد آزمایشگاهی برداشته و در یک پتری دیش حاوی محلول اسید استیک، متانول و آب مقطر (با نسبت ۱:۱:۱) قرار داده و بعد از گذشت ۵ دقیقه به راحتی از طریق حضور یک کمربند عصبی واضح از تخم های لقاح نیافته تشخیص داده شدند (Ottesen *et al*. 2009., Geffen and Evans., 2000, Springate *et al*., 1984).

درصد لقاح = تعداد تخم های لقاح یافته/تعداد کل تخم ها×۱۰۰ (رابطه ۲-۲)



شکل۲-۵: تعیین میزان موفقیت لقاح بر اساس مشاهده کمربند عصبی در زیر استریومیکروسکوپ

۱۱-۲-آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزارهای Excel 2013 و SPSS 19 انجام گرفت. به این منظور از آنالیز واریانس ANOVA دو طرفه و یک طرفه استفاده شد. همچنین برای مقایسه میانگین‌ها، از آزمون Dunkan استفاده گردید. برای مقایسهٔ نسبت جنسی در تیمـــارها با گروه شاهد، آزمون مربع کای مـــــورد استفاده قرار گرفت.

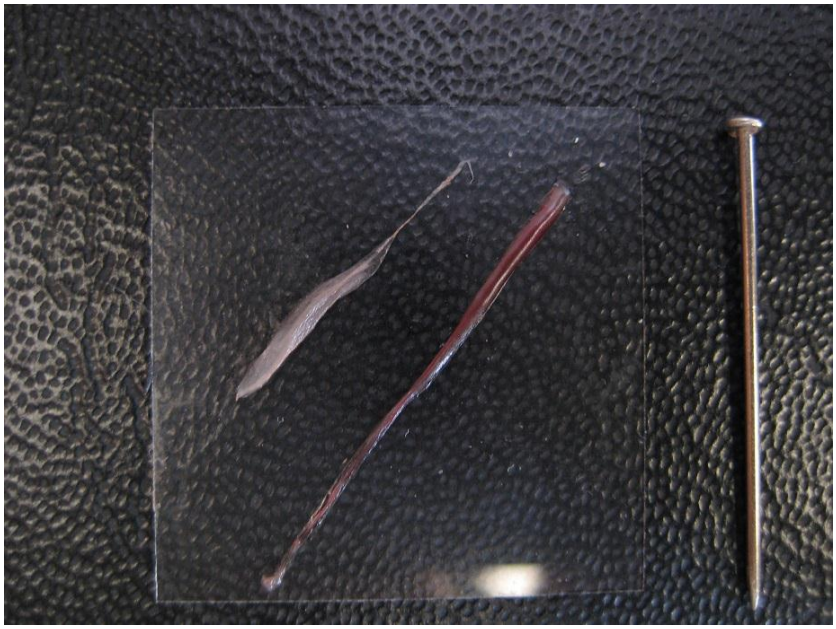
۳- نتایج

۱-۳-تاثیر هورمون تراپی بر تغییر جنسیت

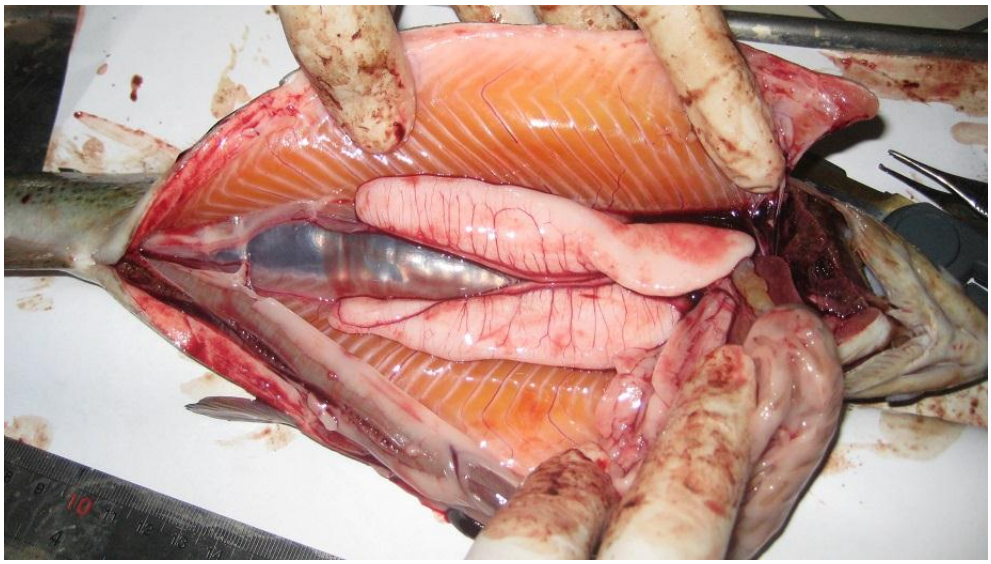
جدول شماره ۳-۱، نسبتهای جنسی در تیمارهای مورد آزمایش و گروه شاهد را نشان می‌دهد. در پنج ماهگی تجویز هورمون ۱۷ آلفا- متیل تستوسترون در تمامی دوز ها سبب ایجاد ۱۰۰ درصد نرسازی در تیمارهای مختلف گردیده است. در گروه F نیز ۵۳/۴ درصد ماهیان نر معمولی مشاهده شد. با این حال بررسی گنادها در ۲ سالگی نتایج متفاوتی ارائه داد. به طوری که در تیمارهای D و E میزان نرسازی کاهش داشت و چندین نمونه عقیم مشاهده شد.

جدول ۳-۱- نسبتهای جنسی در ماهیان مورد آزمایش

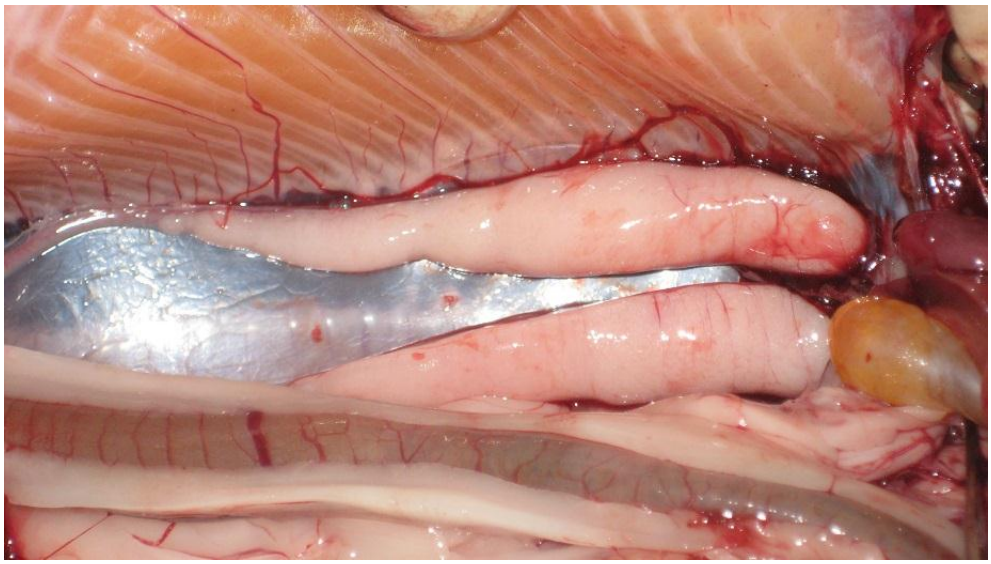
تیمارها	A	B	C	D	E	F
مقدار هورمون (mg/kgf)	۰/۵	۱/۵	۳	۶	۱۰	شاهد
دوره درمان (روز)	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰
درصد نرسازی در ۵ ماهگی	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۵۳/۴
درصد نر سازی در ۲ سالگی	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۰/۰۳	۸۶/۶۲	۵۴/۲۱



تصویر ۳-۱: گناد ماهیان نر و ماده در ۵ ماهگی

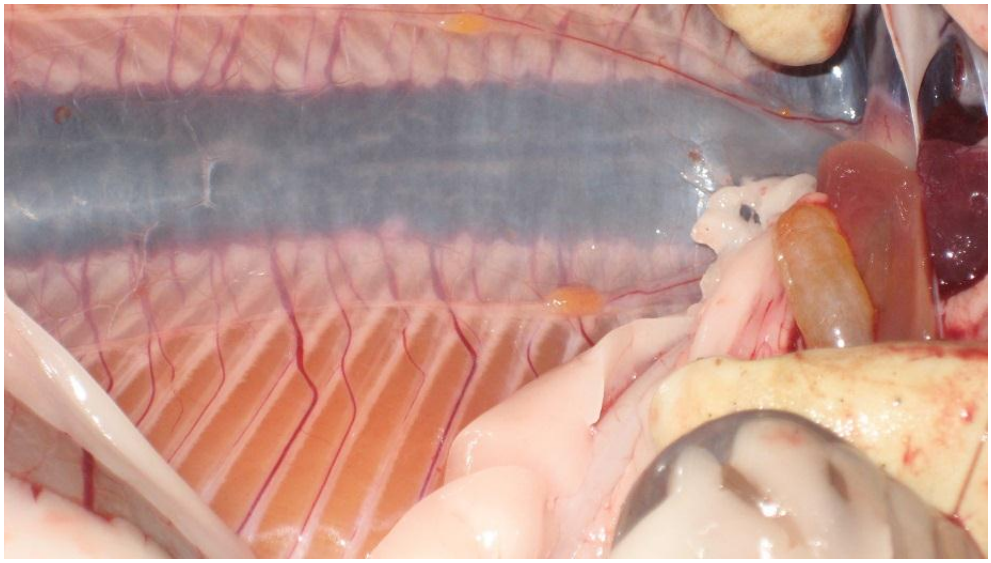


تصویر۳-۲: گناد نرهای XX تغییر جنسیت یافته با استفاده از هورمون ۱۷ آلفا- متیل تستوسترون در سن ۲ سالگی



تصویر۳-۳: گناد نرهای معمولی گروه شاهد در سن ۲ سالگی

تصویر۳-۴: گناد ماهیان استریل در سن ۲ سالگی

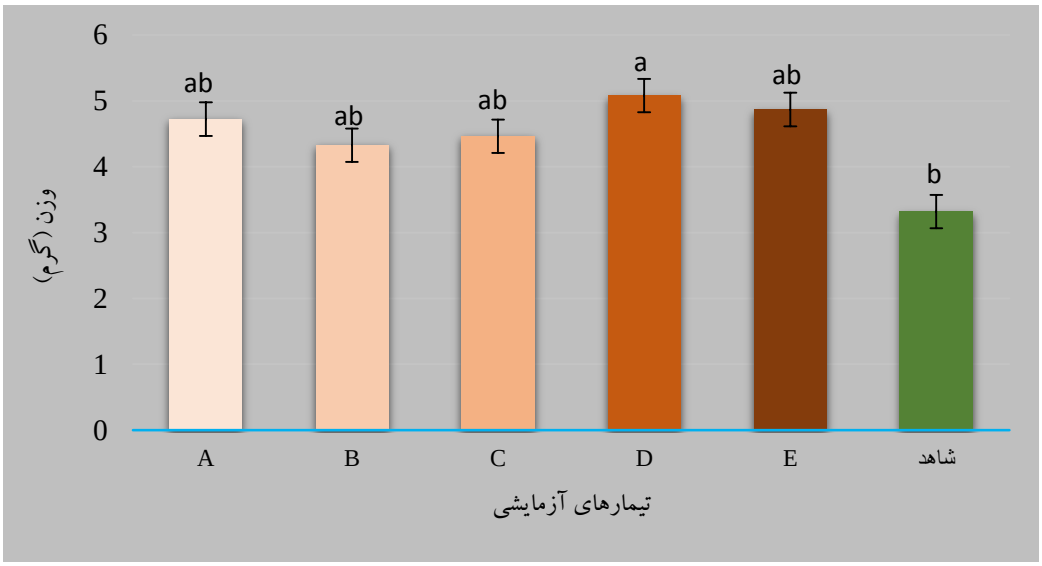


تصویر۳-۵: گناد ماهیان استریل در سن ۲ سالگی

۳-۲-مقایسه رشد ماهیان تیمارهای مختلف

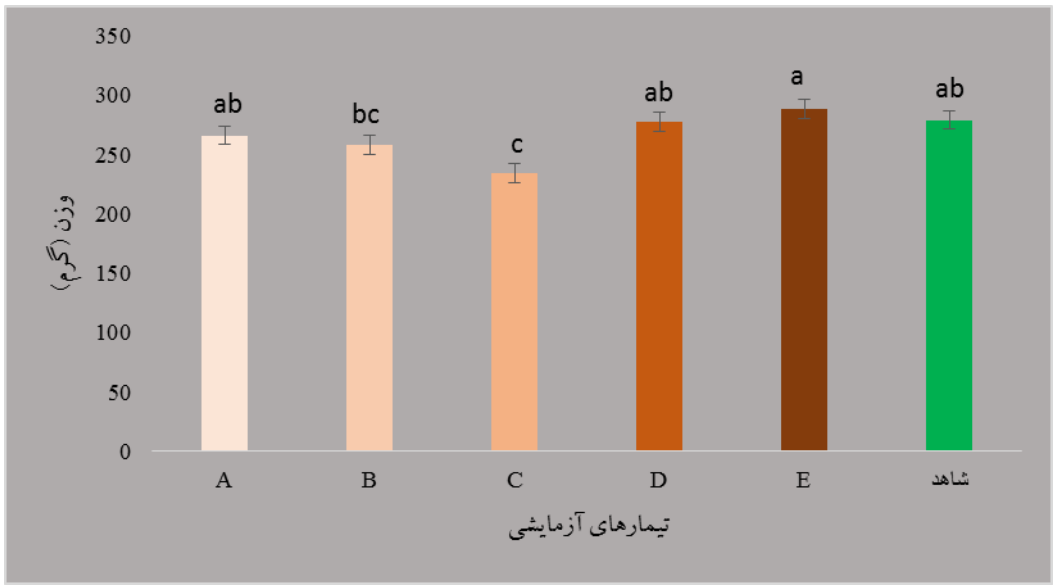
میزان رشد ماهیان قزل آلای رنگین کمان بعد از تجویز هورمون ۱۷ آلفا- متیل تستوسترون در نمودارهای ۳-۱ تا ۳-۸ ارائه شده است.

مقایسه میانگین وزنی بچه ماهیان ۱۰۵ روز پس از شروع تغذیه فعّال نشان داد که میانگین وزن ماهیان تیمار D (۰/۵۴ ± ۵/۰۸) به طور معنی داری بیشتر از تیمار شاهد بوده (۰/۳۴ ± ۳/۳۲) و اختلاف معنی داری را با سایر تیمارهای هورمونی نشان نداد (نمودار ۳-۱).



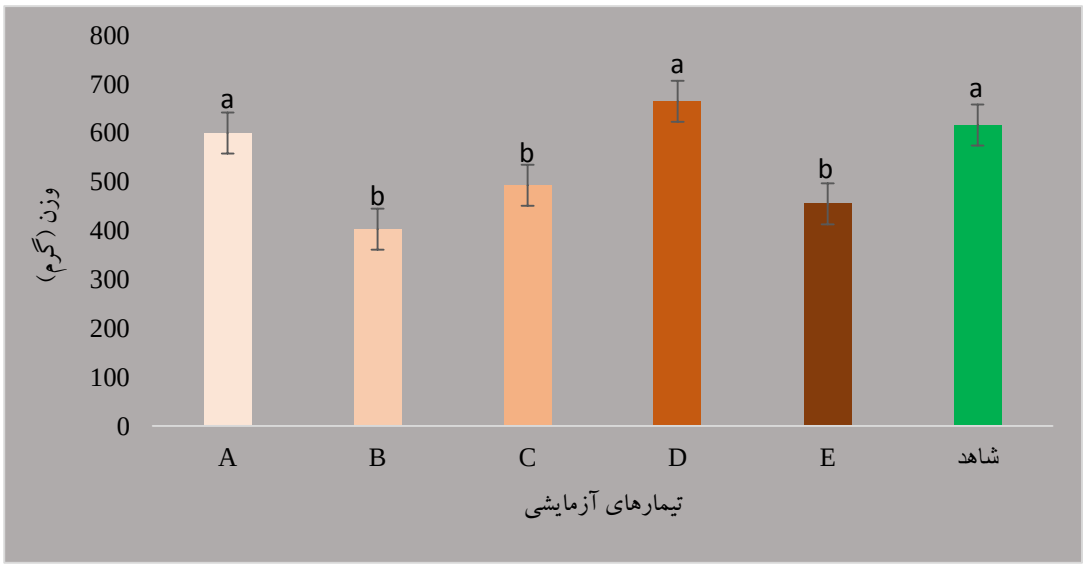
نمودار ۳-۱- مقایسه میانگین وزنی بچه ماهیان ۱۰۵ روز پس از شروع تغذیه **فعّال**

مقایسه میانگین وزنی بچه ماهیان ۴۰۰ روز پس از شروع تغذیه فعّال نشان داد که میانگین وزن ماهیان تیمار E (۱۳/۷۳ ± ۲۸۸/۰۰) به طور معنی داری بیشتر از تیمارB و C بوده (۸/۳۴ ± ۲۵۸/۰۰، ۱۱/۶۷ ± ۲۳۴/۰۰) و اختلاف معنی داری را با سایر تیمارهای هورمونی و همچنین تیمار شاهد نشان نداد(نمودار ۳-۲).



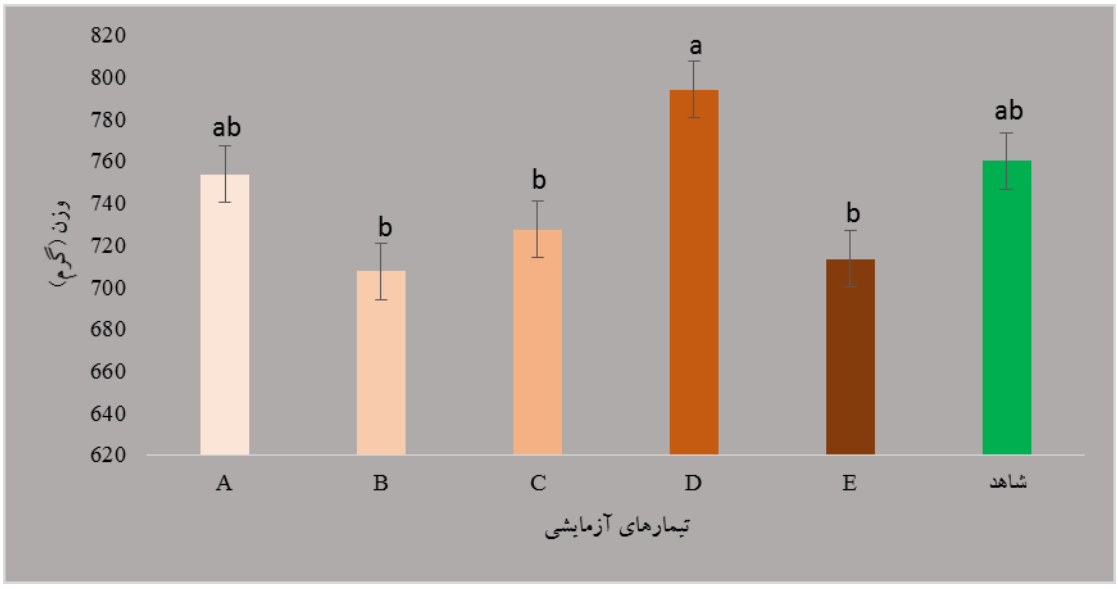
نمودار ۳-۲- مقایسه میانگین وزنی بچه ماهیان ۴۰۰ روز پس از شروع تغذیه **فعّال**

مقایسه میانگین وزنی بچه ماهیان ۵۲۰ روز پس از شروع تغذیه فعّال نشان داد که میانگین وزن ماهیان تیمار های D (۸/۹۸ ± ۶۶۵/۰۰)، شاهد (۶۹/۰۰ ± ۶۱۶/۶۷) و A (۴۱/۶۶ ± ۶۰۰/۰۰) با هم اختلاف معنی داری را نشان ندادند و با سایر تیمارها اختلاف معنی داری را نشان دادند (نمودار ۳-۳).

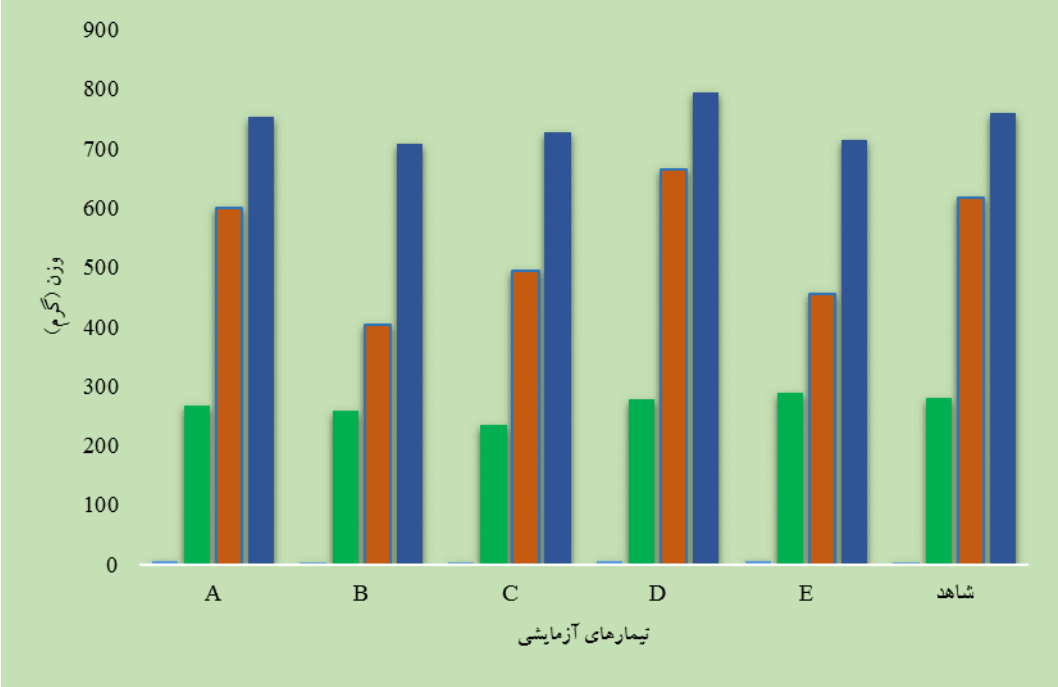


نمودار ۳-۳- مقایسه میانگین وزنی بچه ماهیان ۵۲۰ روز پس از شروع تغذیه فعّال

در نهایت، مقایسه میانگین وزنی بچه ماهیان ۶۸۰ روز پس از شروع تغذیه فعّال نشان داد که میانگین وزن ماهیان تیمار D (۱۶/۵۲ ± ۷۹۳/۸۹) بیشتر از سایر تیمارها بود. با این حال میانگین وزن ماهیان تیمار D اختلاف معنی داری را با تیمار شاهد (۱۷/۰۹ ± ۷۶۰/۰۰) و تیمار A (۱۷/۶۷ ± ۷۵۳/۶۱) نشان نداد، اگرچه با سایر تیمارها اختلاف معنی داری را نشان داد (نمودار ۳-۴).

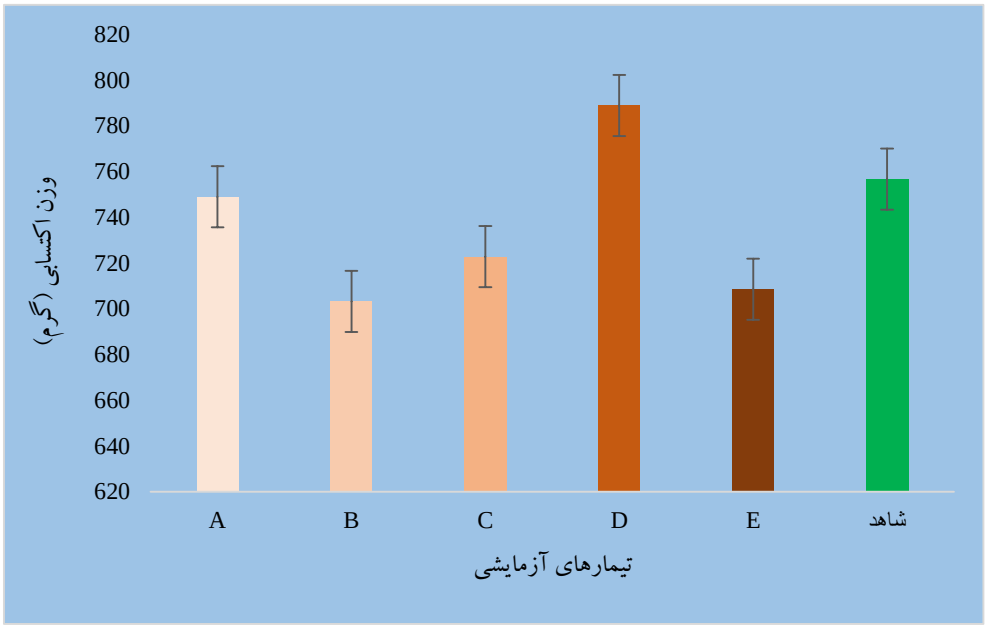


نمودار ۳-۴- مقایسه میانگین وزنی بچه ماهیان ۶۸۰ روز پس از شروع شنای فعّال



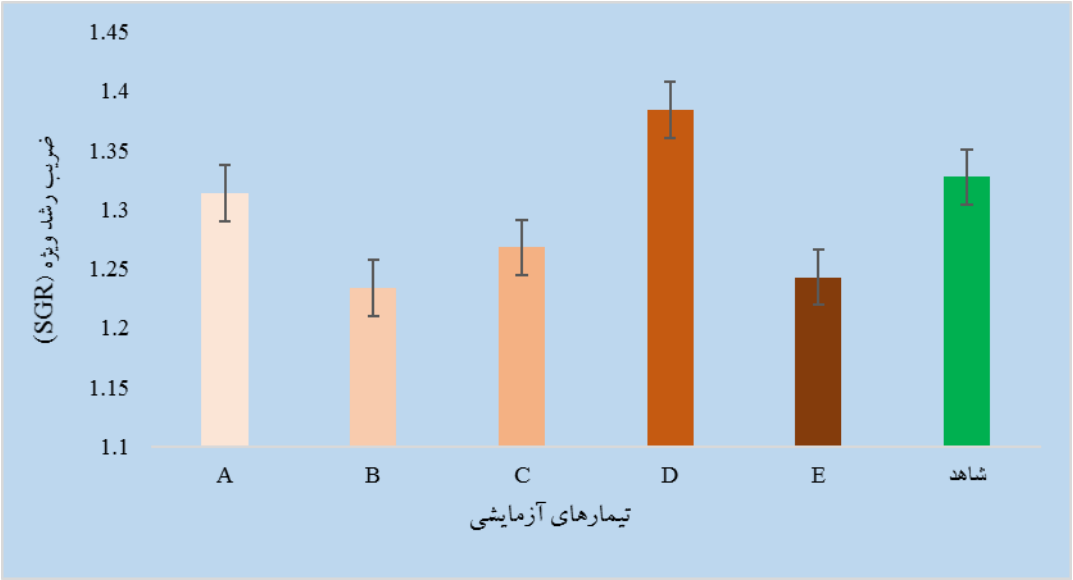
نمودار ۳-۵- روند رشد ماهیان طی دوره پرورش ۶۸۰ روزه

مقایسه افزایش وزن ماهیان ۶۸۰ روز پس از شروع تغذیه فعّال نشان داد که میانگین افزایش وزن ماهیان تیمار D (۷۸۸/۸۱ ± ۳/۱۳) بیشتر از سایر تیمارها بود. البته تفاوت معنی داری با تیمار های A (۷۴۸/۸۹ ± ۰/۸۳) و شاهد (۷۵۶/۶۸ ± ۲/۰۷) نشان نداد. از سوی دیگر میانگین افزایش وزن ماهیان تیمار B (۷۰۳/۱۷ ± ۳/۵۷) به طور معنی داری کمتر از تیمارهای D و شاهد بود و اختلاف معنی داری را با سایر تیمارها نشان نداد (نمودار ۳-۶).



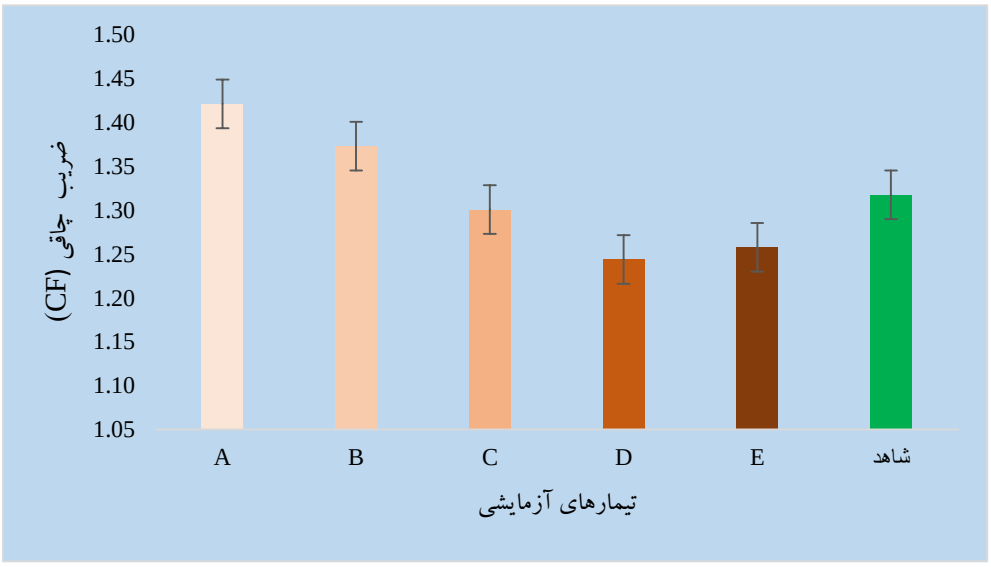
نمودار ۳-۶- افزایش وزن ماهیان طی دوره پرورش ۶۸۰ روزه

مقایسه ضریب رشد ویژه (SGR) در انتهای دوره نشان داد که میزان ضریب رشد ویژه از ۰/۳۶± ۱/۲۳ در ماهیان تیمار B تا ۰/۷۱ ± ۱/۳۸ در ماهیان تیمار D متغیر بوده است و هیچ گونه اختلاف معنی داری در میزان ضریب رشد ویژه در تیمارهای مختلف مشاهده نشد (نمودار ۳-۷).



نمودار ۳-۷ ضریب رشد ویژه (SGR) تیمارهای آزمایش در انتهای دوره

مقایسه ضریب چاقی (CF) در انتهای دوره نشان داد که میزان ضریب چاقی (CF) از ۰/۸۹ ± ۱/۲۴) در ماهیان تیمار D تا ۰/۲۵ ± ۱/۴۲ در ماهیان تیمار A متغیر بوده است. در مورد این شاخص نیز هیچ گونه اختلاف معنی داری در میزان ضریب چاقی در تیمارهای مختلف مشاهده نشد (نمودار ۳-۸).



نمودار ۳-۸- ضریب چاقی (CF) تیمارهای آزمایشی در انتهای دوره

۳-۳- بررسی خصوصیات مورفولوژیکی ماهیان نر معمولی و ماهیان ماده تغییر جنسیت یافته

جهت ارزیابی ویژگی های مورفولوژیک ماهیان از سه شاخص وزن گناد، وزن سوماتیک (غیر جنسی) و GSI استفاده شد (جدول ۳-۱). نرهای معمولی کوچکتر ولی دارای شاخص GSI بیشتری نسبت به ماده های تغییر جنسیت یافته بودند. ماهیان نر معمولی که از بیضه آنها اسپرم گیری شد وزن بدنی بالاتری داشتند، البته انتخاب این ماهیان بزرگ به طور تصادفی بوده است.

جدول ۳-۱- وضعیت شاخص های مورفولوژیک در گروه های مختلف ماهیان نر قزل آلای رنگین کمان

گروه های مختلف ماهیان نر	شاخص گنادوسوماتیک (GSI)	وزن گناد (گرم)	وزن سوماتیک (گرم)
ماهیان تغییر جنسیت یافته	۵/۰۰ ±۰/۴۶	۳۷/۲۷ ±۲	۷۵۳/۶۴ ±۱۰۱/۴۲
ماهیان نر معمولی (اسپرم گیری شده)	۵/۲۰ ±۰/۷۲	۳۹/۸۲ ±۴/۱۲	۷۷۳/۶۴ ±۶۹/۲۸
ماهیان نر معمولی (اسپرم بیضه ای)	۵/۲۳ ±۰/۷۳	۴۹/۱۸ ±۴/۳۵	۷۳۹/۵۵ ±۷۲/۰۶

۴-۳-نتایج آزمون نتاج

درصد بازماندگی، لقاح و ماهیان ماده تولید شده حاصل از اجرای آزمون نتاج گروه های مختلف ماهیان در جدول ارائه شده است. درصد بازماندگی در مقایسه با گروه شاهد از ۴۳/۱۴ تا ۹۱/۵۲ درصد متغییر بود.

از ۲۰ نمونه ماهی نر تغییر جنسیت یافته ۱۶ عدد منجر به تولید نتاج شدند، که همگی این ۱۶ عدد نسل ۱۰۰ درصد ماده تولید نمودند. گروه شاهد نیز ۴۷/۸ درصد ماده تولید نمود.

جدول ۳-۲- درصد لقاح، بازماندگی و ماهیان ماده نتاج ایجاد شده از ماهیان ماده تغییر جنسیت یافته XX..

نوعی ماهی	درصد لقاح	بازماندگی (درصد)	جنسیت ماده (درصد)
ماهیان ماده تغییر جنسیت	۸۷/۰۶	۷۴/۴۰	۱۰۰
ماهیان نر معمولی (گروه شاهد)	۹۴/۲۶	۷۹/۱۶	۴۷/۸

۴-بحث و نتیجه گیری

۴-۱-تاثیر هورمون تراپی بر تغییر جنسیت

یکی از تکنیک های ایجاد جمعیت تمام ماده، تغییر جنسیت ماهیان به منظور تولید ماهیان نر XX می باشد. استفاده از این جمعیت ها جهت ایجاد ماهیان تمام ماده به روش غیرمستقیم می تواند مشکل بروز تلفات در روش مستقیم تولید جمعیت تمام ماده یعنی دستکاری های کروموزومی (ژینوژنز) را برطرف نماید. این تکنیک که تنها مستلزم استفاده از هورمون ۱۷ آلفا متیل تستوسترون در جیره غذایی در دوره کوتاهی است، تکنیکی ساده، از لحاظ هزینه ای موثر و به راحتی در کارگاه های تکثیر قابل استفاده است. اگر ما بتوانیم جمعیتی از ماهیان نر XX را تولید کنیم، می توان طی سالهای متمادی از این تکنیک جهت ایجاد جمعیت تمام ماده استفاده نمود. (Feist *et al*., 1995).

نتایج بدست آمده از این بررسی، امکان تغییر نسبت جنسی در ماهی قزل آلای رنگین کمان با تجویز خوراکی هورمون ۱۷ آلفا- متیل تستوسترون را تایید می‌نماید. با مقایسهٔ نسبتهای جنسی در تیمارها و گروه شاهد، می‌توان چنین نتیجه گرفت که هورمون مذکور توانسته با افزایش درصد ماهیان نر و نیز تولید ماهیان عقیم، نسبت جنسی را تغییر دهد. نتایج این آزمایش نشان داد که تغییر نسبت جنسی به ۱۰۰ درصد نر در ماهی قزل آلای رنگین کمان را می‌توان با تجویز خوراکی هورمون ۱۷ آلفا- متیل تستوسترون به مقدار ۰/۵، ۱/۵ و ۳ میلی گرم در کیلوگرم غذا در طی دورهٔ بحرانی تمایز جنسی ایجاد نمود. در گروه شاهد نیز ۵۳/۴ درصد ماهیان نر معمولی مشاهده شد. در ماهی قزل آلای رنگین کمان و سایر ماهی ها از جمله مداکا، ماهی طلایی، تیلاپیا و گوپی نیز تولید ماهی نر کاری XX با استفاده از هورمون ۱۷ آلفا- متیل تستوسترون با موفقیت همراه بوده است (Okada *et al*., 1979).

اولین اطلاعات در خصوص نرسازی ماهی قزل آلای رنگین کمان توسط Jalabert و همکاران (۱۹۷۵) منتشر شده است و در ادامه مطالعات متعددی جهت بهینه سازی درصد تغییر جنسیت صورت گرفته شد. از آن جمله می توان به مطالعات Okada و همکاران (۱۹۷۹ و ۱۹۸۱ به ترتیب ۵۸ و ۶۰ روز)، Solar و همکاران ۱۹۸۴ (۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ روز)، Van den Hurk و Lambert (۱۹۸۲، ۵۸ روز)، Johnstone و همکاران (۱۹۷۸ و ۱۹۷۹، ۹۰ روز)، Johnstone و همکاران (۱۹۷۸ و ۱۹۷۹، ۳۰ روز) و Yamazaki (۱۹۷۶، ۱۸۰ روز) اشاره نمود.

محققین مختلفی جهت ایجاد ماهیان تغییر جنسیت یافته نر با استفاده از روش تجویز خوراکی دوزهای پایین تر هورمون ۱۷ آلفا- متیل تستوسترون تلاش کرده و به موفقیت هایی دست یافتند. در مطالعه Johnstone و همکاران (۱۹۷۸) نیز با غذادهی ماهیان قزل آلای رنگین کمان با هورمون ۱۷ آلفا- متیل تستوسترون با دوز ۳ میلی گرم در کیلوگرم غذا طی دوره ۹۰ روزه بعد از شروع تغذیه، تمامی ماهیان نمونه برداری شده در سن ۵، ۹ و ۱۲ ماهگی دارای گناد نخی شکل بودند. علاوه بر این ماهیان عقیم نیز مشاهده شد ولی هیچ گونه علائمی از تخمدان مشاهده نشد. با این حال در ۲۲ ماهگی تعداد ۲ نمونه از ۱۶ ماهی نمونه برداری علائم تخمدان را داشتند

و ۲ نمونه دیگر هم دارای بافت بیضه ای و هم تخمدان بودند. در آزمایشی دیگر این محققین تجویز خوراکی هورمون ۱۷ آلفا- متیل تستوسترون با دوز ۳ میلی گرم در کیلوگرم غذا را طی ۳۰ روز انجام دادند که ۷۹ درصد نمونه ها در سن ۲۲ ماهگی نر تشخیص داده شدند. البته در این بین ماهیان ماده و دوجنسی نیز مشاهده شد. در مطالعه Yamazaki (۱۹۷۶) نیز تجویز خوراکی هورمون ۱۷ آلفا- متیل تستوسترون با دوز ۱ میلی گرم در کیلوگرم غذا (طی دوره یک ماه تا هفت ماه بعد از تفریخ) باعث ایجاد ۸۷/۱ درصد ماهیان نر شد. Jalabert و همکاران (۱۹۷۵) در مطالعه خود بعد از تجویز خوراکی هورمون ماهیان عقیم و هرمافرودیت مشاهده نمودند.

غذادهی ماهیان قزل آلای رنگین کمان با هورمون ۱۷ آلفا- متیل تستوسترون با دوزهای ۰/۵ و ۱ میلی گرم در کیلوگرم غذا طی دوره ۶۰ روزه به ترتیب منجر به ایجاد ۸۲ و ۶۶ درصد ماهی نر در جمعیت ماهیان بالغ شد (Cousin-Gerber *et al*., 1989; Tsumura *et al*., 1991).Cousin-Gerber و همکاران (۱۹۸۹) با استفاده از هورمون متیل تستوسترون با دوزهای ۰/۵ تا ۳ میلی گرم در کیلوگرم غذا و طی دوره های ۶۰ و ۹۰ روزه بعد از شروع تغذیه فعال جمعیت تمام ماده به ۸۹ تا ۹۷ درصد نرسازی دست یافتند. Okada و همکاران (۱۹۸۱) با دوز ۰/۵کیلوگرم در کبلوگرم غذا ۸۴ درصد ماهی نر ایجاد نمودند. Hurk و Lambert (۱۹۸۲) با دوز ۰/۶کیلوگرم در کیلوگرم غذا ۹۹ درصد ماهی نر به دست آوردند و Solar و همکاران (۱۹۸۳) ۱۰۰ درصد ماهی نر تولید کردند.

بررسی تیمارهای تجویز خوراکی هورمون نشان داد که با افزایش مقدار هورمون، نرسازی کاهش می‌یابد. به نظر می‌رسد دور شدن از زمان شروع تغذیه فعال برای شروع تجویز هورمون نیز، میزان موفقیت در نرسازی را کاهش می‌دهد. بر اساس نتایج بدست آمده از بررسی حاضر، مقدار بهینهٔ هورمون برای ایجاد تغییر جنسیت به نر با روش خوراکی ۰/۵ میلی گرم در کیلوگرم غذا و زمان مؤثر برای شروع تجویز آن، از زمان شروع تغذیه فعال و دورهٔ تجویز مناسب، ۶۰ روز می باشد. نتایج بدست آمده توسط Yamazaki (۱۹۸۳) نیز با نتایج بررسی حاضر همسو می‌باشد. به نظر وی، تجویز خوراکی هورمون در قزل آلای رنگین کمان، زمانی که درست پس از شروع تغذیه فعال آغاز گردد، مؤثرتر است (Yamazaki, 1983). تغییر جنسیت ایجاد شده در بسیاری از گونه‌های ماهیان از جمله ماهی قزل آلای رنگین کمان دایمی است، زیرا اعتقاد بر این است که عمل ژنهای جنسی در گونه های تک جنسی تمایز یافته، محدود به یک دورهٔ نسبتاً کوتاه در هنگام رشد اولیهٔ غدد جنسی می باشد و بعد از آغاز تمایز جنسی گنادی، این ژنها پنهان یا غیر فعال می‌شوند (Piferrer, 2001; Yamazaki, 1983). Johnstone و همکاران (۱۹۷۸) با استفاده از دوز ۳ میلی گرم در کیلوگرم غذا به مدت ۹۰ روز به ۹۸ درصد ماهی نر، Solar و همکاران (۱۹۸۳) با دوز ppm ۳ در دوره ۶۰ و ۹۰ روزه به ۹۱ و ۸۶ درصد ماهی نر رسیدند. Okada و همکاران (۱۹۸۱) با تجویز ppm ۵ در مدت ۶۰ روز در یک جمعیت تمام ماده تنها به ۴۲ درصد ماهی نر رسید، که بیانگر این مساله است که دوزهای بالاتر از ppm ۳ ممکن است منجر به کارایی کمتر شود. تمامی مطالعات به جز مطالعه Okada و همکاران (۱۹۷۹) نشان داده اند که وقتی دوز به ۹ تا ۱۰ میلی گرم در کیلوگرم غذا برسد، کارایی کمتر خواهد شد. این کاهش کارایی به دلیل ایجاد ماهی های عقیم است. زیرا دوزهای بالا هورمون

بویژه در مورد هورمونهای آندروژن باعث اختلال در رشد و نمو گنادها و در نتیجه عقیمی آنها می شود (Piferrer, 2001).

از آنجا که تمایز جنسی ماهی قزل آلای رنگین کمان حدود ۴۸ روز بعد از شروع تغذیه فعال رخ می دهد (Okada, 1973)، بنابراین در مطالعه حاضر تجویز هورمون بلافاصله بعد از شروع تغذیه فعال تا ۶۰ روز بعد از تغذیه فعال صورت گرفت. دوزهای مورد استفاده هورمون ۱۷ آلفا- متیل تستوسترون در این تحقیق شامل ۰/۵، ۱/۵، ۳، ۶ و ۱۰ میلی گرم در کیلوگرم غذا بود. این دوزها در مقایسه با دوز های مصرفی در ماهیانی مثل مداکا، ماهی طلایی و تیلاپیا که ۲۰ تا ۳۰ ppm که منجر به تولید ۱۰۰ درصد ماهیان نر شده است، نسبتاً کمتر است (Okada *et al*., 1979). دلیل پایین بودن دوز مصرفی در ماهی قزل آلا را می توان به ارتباط معکوس میان طول دوره هورمون تراپی و دوز مورد نیاز جهت تغیر جنسیت عنوان نمود. بنابراین زمانی که سایر شرایط یکسان در نظر گرفته شوند هر چه طول دوره هورمون تراپی بیشتر باشد دوز مصرف هورمون جهت حصول تغییر جنسیت کمتر خواهد بود (Piferrer, 2001). طول دوره حساسیت گنادهای در حال تمایز نسبت به استروئیدهای خارجی، به دوره مورفوژنسیس گنادها و دما بستگی دارد (Yamamoto, 1969). ثابت بودن دمای آب بین تیمارهای مختلف سبب شده تا دما تاثیر بر میزان کارایی هورمون بین تیمارها نداشته باشد. با این حال نقش دما در دوره تکامل جنینی و لاروی می تواند طول دوره تمایز را متاثر ساخته و در نتیجه طول دوره غذادهی با هورمون نقش بسیار مهمی در کارایی هورمون خواهد داشت.

در مجموع نتایج مطالعات صورت گرفته شده در ماهی قزل آلای رنگین کمان موثرترین دوز را ۰/۵ تا ۵ میلی گرم در کیلوگرم غذا و مدت زمان هورمون درمانی را ۵۰ تا ۶۰ روز اعلام کردند. دوزهای بالاتر و دوره طولانی تر منجر به افزایش معنی دار نسبت ماهیان عقیم خواهد شد. با همه این تفاسیر دو مشکل اساسی حل نشده باقی ماند.

اول اینکه بیشتر این مطالعات بر روی جمعیت های دوجنسی اجرا شدند. افزایش نسبت نرها در اثر تیمار هورمونی می تواند هم ناشی از تاثیر مستقیم هورمون بر تمایز جنسیت باشد و یا اینکه می تواند ناشی از اختلافات احتمالی در میزان تلفات یکی از جنس ها بوده باشد. در نتیجه، در مطالعه Johnstone و همکاران (۱۹۷۹) ۹۸ درصد جمعیت نر ایجاد شد، اما یکی از ده عدد نر بررسی شده ماده ژنتیکی بود. تنها مطالعه ای که این انتقاد بر آن وارد نشد مطالعه Okada و همکاران (۱۹۸۱) بود که تغییر جنسیت واقعی صورت گرفته شده بود.

دومین مشکل بررسی تعیین جنسیت از طریق آزمایشات بافت شناسی در مراحل اولیه است. در صورتی که محققین متعددی (Johnstone و همکاران (۱۹۷۹)، Bye و Lincoln (۱۹۸۱) به غیرطبیعی و بدشکلی های مجرای تناسلی در مراحل بعدی اذعان داشته اند، که این مسئله احتمالاً در انزال مواد تناسلی اختلال ایجاد می کنند. در حالی که هیچ گونه اندازه گیری کمی دقیقی از این وقایع صورت نگرفته است.

نتایج حاصل از بررسی تاثیر هورمون ۱۷ آلفا- متیل تستوسترون روی شکل غدد جنسی و مجاری اسپرم‌بر در ماهی قزل آلای رنگین کمان، نشان داد که تمام تیمارها در مورفولوژی غدد جنسی و مجاری اسپرم‌بر تاثیر گذاشته بودند. مشاهدهٔ تعداد زیادی ماهی دارای غدد جنسی با شکلهای غیر طبیعی که در تمام تیمارها وجود داشتند، در مقابل تعداد اندکی ماهی دارای غدد جنسی طبیعی (بیضه یا تخمدان)، مؤید این موضوع می‌باشد. مشاهدهٔ شکلهای غیرطبیعی بیضه در ماهیان قزل آلای رنگین کمان تغییرجنسیت یافته، توسط Bye و Lincoln (۱۹۸۱) نیز تایید شده است. Bye گزارش کرد که تجویز خوراکی متیل‌تستوسترون به مقدار ppm ۳ به مدت ۹۰ روز، باعث تولید ۹۴ درصد ماهی نر گردید که ۵۵ درصد از این ماهیها دارای بیضه‌های غیرطبیعی بودند (Hunter and Donaldson, 1983). Tsumara و همکاران (۱۹۹۱) نیز در آزمایشی که به منظور نرسازی در ماهیان ماده‌زاد قزل آلای رنگین کمان انجام دادند، وجود بیضه‌های غیرطبیعی و کروی شکل را گزارش نمودند. Johnstone و همکاران (۱۹۷۸) ، در پی تجویز استرادیول یا متیل‌تستوسترون به ماهی قزل آلای رنگین کمان، هیچ الگوی مشخصی را در غدد جنسی با جنسیت بینابینی مشاهده نکردند (Hunter and Donaldson, 1983).

تحقیقات نشان داد که تعدادی از ماهیان در تیمارهای ۶ و ۱۰ میلی گرم هورمون در کیلوگرم غذا، دارای غدد جنسی نخی شکل عقیم بودند. احتمالا تغییر ساختار این غدد جنسی، به دلیل دریافت مقادیر زیاد هورمون بوده است. Chevassus و Krieg (۱۹۹۲) نیز در آزمایشی که از طریق تجویز هورمون ۱۷ آلفا- متیل تستوسترون به مقدار ppm۳ به مدت ۶۰ روز تا۹۰ روز در ماهی قزل آلای خال قرمز انجام دادند، تولید تعداد زیادی از ماهیان که دارای غدد جنسی عقیم نخی شکل بودند را گزارش نمودند. مشاهدهٔ این حالت در ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) (Jhonstone *et al*, 1978)، قزل آلای رنگین کمان (Jhonstone *et al*, 1978) و قزل آلای خال قرمز (*Salmo trutta*) (Quillet *et al*.,1991) نیز گزارش گردیده است (Chevassus and Krieg, 1992).

شاخص گنادوسوماتیک در تمامی گروه های هورمونی کمتر از گروه شاهد بود که Johnstone و همکاران (۱۹۷۸) و Bye و همکاران (۱۹۸۲)، نیز نتایج مشابهی ارائه داده اند.

۲-۴-مقایسه رشد ماهیان تیمارهای مختلف

یکی از ابزارهای مهم مدیریتی در پرورش آبزیان افزایش و یا کنترل رشد است. هورمون ۱۷ آلفا- متیل تستوسترون در انواع مختلف ماهیان استخوانی عالی از جمله کپور علفخوار (*Ctenopharyngdon idellus*)، کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، ماهی آزاد کوهو (*Oncorhynchus kistuch*)، ماهی قزل آلای رنگین کمان و مارماهی کانگر (*Anguilla anguillu*) منجر به بهبود رشد شده است (Fagerlund *et al*., 1979; Nagy *et al*., 1981; Boney *et al*., 1984; Degani and Dosoretz, 1986; Ostrowski and Garling, 1987; Manzoor Ali and Satyanarayana Rao, 1989). با این حال در برخی موارد مشخص نیست که آیا این هورمون به صورت مستقیم باعث افزایش وزن شده است و یا اینکه از طریق تغییر جنسیت ابن افزایش وزن حاصل شده است.

نتایج مطالعه حاضر، تفسیر مناسبی از تاثیر تجویز هورمون ۱۷ آلفا- متیل تستوسترون بر فاکتور رشد را نشان نمی دهند. به عبارت دیگر نوعی بی نظمی در روند رشد ماهیان تیمارهای مختلف مشاده شده است. به طوری که دوز ۶ میلی گرم در کیلوگرم غذا با اینکه بیشترین افزایش رشد را نشان داد ولی تفاوت معنی داری با تیمار mg/kg feed ۰/۵ و گروه شاهد نداشت. با این حال با سایر تیمارها اختلاف معنی داری داشت. از آنجاییکه این ماهیان در ردیفهای متوالی پشت سر هم پرورش داده شدند، بنابراین، این نتایج متناقض می تواند ناشی از شرایط متفاوت پرورشی باشد. از سوی دیگر Yamazaki (۱۹۷۶) اذعان داشته که افزایش رشد ماهی در نتیجه تیمار هورمونی، به میزان مصرف هورمون بستگی دارد. به طوری که در ماهی طلایی غلظت بالای ppm ۱۰ منجر به جلوگیری از رشد شده است. در مطالعه Yamazaki میزان ppm ۱ هورمون متیل تستوسترون بیشترین تأثیر را بر تحریک رشد داشته است.

Atar و همکاران (۲۰۰۹) در طی ۶۰ روز اول دوره اختلاف معنی داری در میزان رشد مشاهده ننمودند. با این حال در دوره ۶۰ تا ۱۸۰ روزگی اختلاف معنی داری در نرخ رشد مشاهده شد. بیشترین میزان رشد در ماهیان تغذیه شده با هورمون ۱۷ آلفا- متیل تستوسترون و ۱۷ آلفا- اتینیل تستوسترون حاصل شد.

با وجو د اینکه استفاده از هورمون های جنسی جهت افزایش رشد، ساخت پروتئین و کارایی موثر غذایی در پرورش دام و طیور بسیار موفقیت آمیز بوده است و صرفه جویی های زیادی در هزینه های تولید حاصل شده است، با این حال در پرروش ماهی کمتر مورد توجه واقع شده است. تحقیقات در ارتباط با پاسخ ماهیان به استروئیدهای جنسی عمدتاً به مطالعات تغییر جنسیت و ایجاد ماهیان عقیم محدود شده است (Clemens and Inslee, 1968; Chan *et al*., 1972; Takahashi, 1975). با این وجود گزارشاتی نیز در مورد پتانسیل استروئیدهای مصنوعی به عنوان محرک های رشد در ماهیان پرورشی ارائه شده است. Hirose و Hibiya (۱۹۶۸a،b) با تزریق دوزهای پایین هورمون ۴- کلروتستوسترون در ماهی طلایی و ماهی قزل آلای رنگین کمان افزایش قابل ملاحظه ای در میزان رشد مشاهده کردند. تجویز دوزهای بیشتر این هورمون منجر به کاهش رشد و هایپرتروفی کبد و کلیه و سرکوب گنادها شد. استفاده از هورمون استانازول[1] به عنوان مکمل در جیره غذایی گربه ماهی کانالی و ماهی طلایی، تنها رشد محدودی ایجاد نمود (Bulkley and Swihart, 1973). تجویز خوراکی اتیل استرنول به رشد ناچیز در ماهی تیلاپیا منجر شد (Hutchinson and Campbell, 1964). با این وجود ماهیان قزل آلای رنگین کمان و آزاد تغذیه شده با جیره حاوی اتیل استرنول افزایش معنی دار رشد و ضریب کارایی غذایی نشان دادند (Simpson *et al*., 1974). علاوه بر این گزارشات متعددی مبنی بر ارزش بالقوه هورمون ۱۷ آلفا- متیل تستوسترون در پرورش ماهی آزاد کوهو و چینوک (McBride and Fagerlund, 1973; Fagerlund and McBride,

[1] - stanozolol

1975a, b) و قزل آلای رنگین کمان (Yamazaki, 1976) ارائه شده است. Katz و همکاران (۱۹۷۶)، نیز اثرات آندرواسترون[1] را بر تیلاپیای نیل بررسی کردند و افزایش معنی دار رشد همراه با تحلیل گنادها مشاهده نمودند.
از آنجا که جمعیت ماهیان نر XX ایجاد شده در این مطالعه در جهت مصارف انسانی نبوده است و در راستای تولید جمعیت تمام ماده استفاده خواهند شد، در نتیجه می توان گفت اختلاف در میزان رشد ماهیان نر ایجاد شده تاثیری بر موفقیت کار نخواهد داشت. اگرچه تجویز هورمون ۱۷ آلفا- متیل تستوسترون در برخی تیمارها اثرات مثبتی بر افزایش رشد داشته است. Atar و همکاران (۲۰۰۹) نیز به اختلافات متناقض رشد در ماهیان تیمار شده با هورمون های مختلف اشاره نموده اند.

۳-۴-آزمون نتاج

یکی از روش های پر کاربرد دستکاری های جنسی در آزادماهیان استفاده از ماهیان ماده نرسازی شده (نرهای XX) است (Johnstone *et al*. 1979; Bye and Lincoln 1981; Hunter *et al*. 1982, 1983; Johnstone and Youngson 1984). با استفاده از اسپرم ماهیان ماده نرسازی شده و لقاح با ماهیان ماده معمولی می توان جمعیت تمام ماده ایجاد نمود (Johnstone *et al*. 1979). متعاقباً تعداد کمی از این نتاج تمام ماده جهت تامین مولدین نر XX سالیانه هورمون درمانی می شوند. در صورتی که اگر ماهیان تمام ماده با هورمون ۱۷ آلفا- متیل تستوسترون تیمار شوند، تمامی ماهیان باید به نرهای XX تبدیل شوند.
لقاح ماهیان نر تغییر جنسیت یافته XX با ماهیان ماده معمولی تقریباً منجر به ایجاد جمعیت ۱۰۰ درصد ماده شد. Okada و همکاران (۱۹۷۹) نیز به همین نتیجه رسیدند و جمعیت ۱۰۰ درصد ماده تولید نمودند. Bye و Lincoln (۱۹۸۶) نیز نتاج ماهیان ماده نرسازی شده را صرف نظر از شکل بیضه ها و عملکرد گناد نرهای XX، ۱۰۰ درصد ماده اعلام کردند. این نتایج نشان می دهند انتخاب نرهایی که تنها دارای شکل ظاهری بیضه معمول ماهیان تغییر جنسیت یافته هستند ضروری نیست. از سوی دیگر از طریق کاهش کشتن ماهیان جهت برداشتن گنادها در برخی نرها، تولید جمعیت های تک جنس را آسان تر می کند. Tsumara و همکاران (۱۹۹۱) نیز در یک مورد ۸۶ درصد و در سایر گروه ها ۱۰۰ درصد ماهی تمام ماده ایجاد نمودند. بر اساس نظر Bye و Lincoln (۱۹۸۶) و همچنین Tsumara و همکاران (۱۹۹۱) می توان با اصلاح دوره هورمون درمانی نسبت ماهیان ماده نرسازی شده دارای مجرای اسپرم بر کاری را افزایش داد.

[1] - androsterone

پیشنهادها

- تولید تمام ماده قزل آلا به روش ژینوژنز جهت حذف جمعیت های مخلوط نر و ماده
- استفاده از روش غوطه وری جهت تغییر جنسیت ماهیان ماده و نرسازی
- استفاده از استروژن های گیاهی جهت جایگزینی با استروژن های مصنوعی

منابع

- حسینی ، ا .، ۱۳۷۳. بررسی کاربرد هورمون ها در تغییرجنسیت قزل آلای رنگین کمان. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشکده علوم و فنون دریایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال . ۱۰۴ صفحه.
- سالنامه آماری شیلات ایران ، ۱۳۹۳ . معاونت برنامه ریزی وتوسعه مدیریت. دفتر برنامه و بودجه سازمان شیلات ایران، ۶۰ صفحه.
- مهرابی، ی . ۱۳۸۱. بیهوشی و روش عمل تکثیر دو بار در سال ماهی قزل آلای رنگین کمان، انتشارات اصلانی، ۱۰۰ صفحه.

- Atar, H.H., S. Bekcan, S., and Dogankaya, L. 2009 Effects of Different Hormones on Sex Reversal of Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss* Walbaum) and Production of All-Female Populations, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 23:4, 1509-1514.
- Boney, S.E., Shelton, W.L., Yang, S. and Wilken, L.O., 1984. Sex reversal and breeding of grass carp. Am. Fish. Sot., 113: 348-353.
- 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.
- Bulkley, R.V. and Swihart, G.L., 1973. Effects of the anabolic steroid, Stanozolol, in the growth of Channel catfish, *Ietalurus punctatus*, and goldfish, Caraseius auratus. Trans. Am Fish. Sot., 102: 444-476.
- Bye V. J., R. Lincoln, 1981. Get rid of the males and let the femalcs prospcr. Fish Farmer, 4, 1-3.
- 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.
- Chan, S.T.H., Tan, F. and Lofts, B., 1972. The role of sex steroids on natural sex reversal in *Monopterus afbus*. Excerpta Med. Int. Congr. Ser., 250: 139.
- Chevassus, B. and F. Krieg, 1992. Effect of the concentration and duration of methyltestosterone treatment on masculinization rate in the brown trout (*Salmo trutta*). Aquaculture, Vol. 5. No. 4, PP: 325-328.
- Clemens, H.P. and Inslee, T., 1968. The production of unisexual broods by Tilapia mossambica sex-reversed with methyltestosterone. Trans. Amer. Fish. Soc., 97(1): 18–21.
- Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? Endocr Rev 1999; 20:358- 417.
- Cousin-Gerber, M., Burger; G.: Boisseau, C. and Chevassus, B., 1989. Effect of methyltestosterone on sex differentiation and gonad morphogenesis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquat. Living Resour., 2: 255-230.
- Crim, L.W., 1985. Methods for acute and chronic hormone administration in fish. In: Lee, C.S., Liao, I.C. (Eds).., Reproduction and Culture of Milkfish. Oc. Institute and Tung Kang Mar. Lab., Hawaii and Taiwan, pp. 1–13.
- De Vlaming, V., Grossman, G., Chapman, F., 1982. On the use of the gonadosomatic index. Comparative Biochemistry and Physiology 73A 1. 31–39.
- Degani, G. and Dosoretz, C., 1986. The effect of 3,3',5-triiodo-L-thryronine and 17a-methyltestosterone on growth and body composition of the glass stage of the eel (*Anguilla Anguilla* L.) . Fish Physiol. Biochem., 1(3) : 145-l 5 1.
- Dreanno, C., Suquet, M., Desbruyeres, E., Cosson, J., Delliou, H., Billard, R., 1998. Effect of urine on semen quality in turbot, Psetta maxima. Aquaculture 169, 247–262.
- Fageriund, U.H.M. and McBride, J.R., 1975b. Potential for sex steroids as growth promoters in salmon culture. Proc. 13th Pacific Sci. Congr. Vancouver, Canada. Vol. 2: 139-145.
- Fagerlund, U.H.M. and McBride, J.R., 1975a. Growth increments and some flesh and gonad characteristics of juvenile coho salmon receiving diets supplemented with 17α-methyltestosterone. J. Fish Biob, 7: 305-314.
- Fagerlund, U.H.M., McBride, J.R. and Stone, E.T., 1979. A test of 17a-methyltestosterone as a growth promoter in a coho salmon hatchery. Am. Fish. Sci., 108: 467-472.
- Feist, G., Yeoh, C.G., Fitzpatrick, M.S., Schreck, C.B., 1995. The production of functional sex-reversed male rainbow trout with 17 alpha-methyltestosterone and 11 beta-hydroxyandrostenedione. Aquaculture 131, 1–2., 145–152.

- 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 Õariegatus*), vitellogenin bioassay. Aquat. Toxicol. 49, 77–88.
- Geffen, A.J., Evans, J.P., 2000. Sperm traits and fertilization success of male and sexreversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 182, 61–72.
- 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.
- 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.
- Hirose, K. and Hibiya, T., 1968a. Physiological studies on growth-promoting effects of protein anabolic steroids on fish. I. Effects on goldfish. Bull. Jpn Sot. Sci. Fish., 34: 466-472.
- Hirose, K. and Hibiya, T., 1968b. Physiologic studies on growth-promoting effect of protein anabolic steroids on fish. 11. Effects of 4-chloro~st~~rone acetate on rainbow trout. Bull. Jpn. Sot. Sci. Fish., 34: 473-479.
- Hunter G. A., E. hl. Donaldson, J. Stoss. 1. Baker, 1983. Production of monosex female groups of Chinook Salmon (*Onchorhjnchus tshawjtscha*) by the fertilization of normal ova with sperm from sex-reversed females. Aquaculture, 33, 355-363.
- Hunter, G.A., Donaldson, E.M., Goetz, F.W. and Edgell, P.R., 1982. Production of all-female and sterile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and experimental evidence for male heterogemety. Trans. Am. Fish. Sot. 111: 367-372.
- Hurk (Van den) R., J. G. D. Lambert, 1982.Temperature and steroid effects on gonadal sex differentiation in Rainbow Trout. Int. Symp. Reprod. Physiol. of Fish, Wageningen, 69-72.
- Hutchinson, R.E. and Campbell, G.D., 1964. An attempt to increase the weight of Tilapia melanopleura, a fish used in fish farming, with an anabolic steroid ethylestrenol. in: Handeilinge van die Kongres van kir Voendingvereniging van Suidebke Africa, Durban, 17-19 April 1963. Abstracted in S. Afr. Med. J., 38: 640.
- Jalabert H., R. Billard, B. Chevassus, 1975. Reliminary experiments on sex control in trout production of sterile fishes and sirnultaneous self-fertilizable hermaphrodites. Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys., 15, 19-28.
- Johnstone R., T. H. Simpson, A. F. Youngson, 1978. Sex reversal in Salmonid culture. Aquaculture, 13, 115-133.
- Johnstone R., T. H. Simpson, A. F. Youngson, C. Whitehead, 1979. Sex reversa1 in Salmonid culture. Part II. The progeny of sex-reversed Rainbow Trout. Aquaculture, 18, 13-19.
- Johnstone, R., Youngson, A.F., 1984. The progeny of sex-inverted female Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture 37, 179–182.
- Katz, Y., Abraham, M. and Eckstein, B., 1976. Effects of androsterone on gonadal and body growth in *Tilapia nilotica* (Teleostei, Cichlidae). Gen. Comp. Endocrinol., 29: 414-418.
- Kavumpurath, S., Pandian, T.J., 1993a. Production of an YY female guppy, Poecilia reticulata, by endocrine sex reversal and progeny testing. Aquaculture 118, 183–189.
- Kavumpurath, S., Pandian, T.J., 1993b. Determination of labile period and critical dose for sex reversal by oral administration of estrogens in *Betta splendens*. Indian J. Exp. Biol. 31, 16–20.
- Kavumpurath, S., Pandian, T.J., 1993c. Masculinization of Poecilia reticulata by dietary administration of synthetic or natural androgen to gravid females. Aquaculture 116, 83–89.
- Manzoor Ali, P.K.M. and Satyanarayana Rao, G.P., 1989. Growth improvements in carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus), sterilized with 17a-methyltestosterone. Aquaculture, 76: 157-167.
- McBride, J.R. and Fagerlund, U.H.M., 1973. The use of 17ru-methyltestosterone for promoting weight increases in juvenile Pacific salmon. J. Fish. Res. Board Can., 30: 1099-1104.
- Nagahama, Y., 2000. Gonadal steroid hormones: major regulators of gonadal sex differentiation and gametogenesis in fish. In: Norberg, B., Kjesbu, O.S., Taranger, G.L., Andersson, E., Stefansson, S.O. (Eds).., Proc. Sixth Int. Symp. Reprod. Physiol. Fish. Univ. Bergen, pp. 211–222.
- Nagy, A., Bercsenyi, M. and Csanyi, V., 1981. Sex reversal in carp (*Cyprinus carpio*) by oral administration of methyltestosterone. Can. J. Fish. Aquatic Sci., 38: 725-728.
- 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.
- Okada H., H. hlatumoto, Y. hlurakami, 1981. Ratio of induced males from genctic females at various dietary concentrations of methyltestosterone. Ann. hleet. Jap. Soc. Sci. Fish., Abstract, p. 33 [in Japanese].
- Okada H., H. hlatumoto, F. Yamazaki, 1979. Functional masculinization of genetic females in Rainbow Trout. Bull. Jap. Soc. Sc. Fish., 45, 413-4 19.

- 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.
- Ostrowski, A.C. and Garling, D.L., Jr., 1987. Changes in dietary protein to energy and total energy needs of 17a-methyltestosterone treated juvenile rainbow trout. J. World Aquacult. Sot., 18(2): 17-26.
- Ottesen, O.H., Babiak, I., Dahle, G., 2009. Sperm competition and fertilization success of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus L*.). *Aquaculture* 286, 240-245.
- Pandian, T.J., Sheela, S.G., 1995. Hormonal induction of sex reversal in fish. Aquaculture 138, 1 22.
- Piferrer, F., 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. Aquaculture, 197, 229– 281.
- Piferrer, F., Donaldson, E.M., 1993. Sex control in Pacific salmon. In: Muir, J.F., Roberts, R.J. (Eds).., Recent Advances in Aquaculture, vol. IV, Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 67–77.
- Quillet, E., L. Foisil, B. Chevassus, D. Chourrout, and F.G. Liu, 1991. Production of all female triploid and all female brown trout for aquaculture. Aquat Liv. Resources 4: 27–32.
- Simpson, T.H., 1976. Endocrine aspects of salmonid culture. Proc. R. Soc. Edinburgh) B (75, 241–252.
- Simpson, T.H., Wright, R.S. and Fraser, M.H., 1974. Some Observations on the use of Anabolic Steroids in the Culture of Salmonid Fish. Marine Laboratory, Department of Agriculture and Fisheries, Aberdeen, Great Britain. Report No. M.20, 7 pp.
- Solar 1. L., E. Donaldson, G. A. Iiunter, 1983. Optimization of treatment regimes for controled sex differentiation and sterilization in wild Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) by oral administration of 17 a-methyltestosterone. Aquaculture, 42, 129-1 39.
- 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.
- Springate, J.R.C., Bromage, N.R., Elliot, J.A.K., Hudson, D.L., 1984. The timing of ovulation and stripping and their effects on the rates of fertilization and survival to eyeing, hatch and swim-up in the rainbow trout (*Salmo gairdneri R*.). *Aquaculture* 43, 313–322.
- Takahashi, H., 1975. Masculinization of the gonad of juvenile guppy, Poecilia reticulata, induced by ll-ketotestosterone. Bull. Fat. Fish. Hokkaido Univ., 26: 11-22.
- Tsumura, K., Blann, V.E., Lamont, C.A., 1991. Progeny test of masculinized female rainbow trout having functional gonoducts. Progressive Fish Culturist 53 1, 45–47.
- Van den Hurk, R., Lambert, J.G.D., Peute, J., 1982. Steroidogenesis in the gonads of rainbow trout fry (*Salmo gairdneri*) before and after the onset of gonadal sex differentiation. Reprod. Nutr, Develop 22, 413–425.
- Yamamoto, T., 1969. Sex differentiation. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.., Fish Physiology, vol. III, Reproduction, Academic Press, New York, pp. 117–175.
- Yamazaki F. 1976. Application of hormones in Fish culture. J. Fish Res. Board Can., 33, 938-958.
- Yamazaki, F., 1983. Sex control and manipulation in fish. Aquaculture 33, 329–354.

Abstract:
The sex reversal technique in fish is widespread in many countries. The development of these techniques is desirable because rainbow trout males reach their gonad maturity earlier compared to the females. Rainbow trout alevins were treated with 17α-methyltestosterone incorporated in the diet (0.5. 1.5, 3, 6 and 10 mg/kg) for 60 days from the beginning of first feeding. Sex was determined at 180 and 680 dpf by sampling fish (n = 20) from each group and examining gross gonadal morphology under a dissecting microscope. Also sex reversal ratio and growth performance were determined in hormone-treated groups. These sex reversed functional males were reared for brood stock until they attained sexual maturity. At the end of experiment, normal rainbow trout eggs were fertilized with the sperms taken from sex reversed males for producing all-female populations. Examination of the results showed that 17α- methyltestosterone was effective in all treatment. The highest sex reversal ratio with 100% was observed in group treated with 0.5, 1.5 and 3 mg/kg 17α- methyltestosterone. The highest live weight ratios were observed in groups fed with 6, 0.5 17α-methyltestosterone and control group. Female progeny produced from the sex reversed males were 100 % in all males that sired offspring. All female trout stocks produced by this method have advantage in rainbow trout culture since the fish is not meant for direct human consumption and is used to generate brood stock, therefore, difference of growth parameters do not influence the success.

Keywords : sex differentiation. *Oncorhynchus mykiss*, sex reversal, hormone treatment, 17α-methyltestosterone, all-female population, steroids

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute – Shahid Motahary Cold water Fishes Genetic and breeding Research Center

---

Project Title : The production of all-female in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using indirect feminization
Approved Number: 2-12-12-11-89011
Author: Tayebeh bashti
Project Researcher : Tayebeh bashti
Collaborator(s) *:* M. Sharifian, D. zargham, H. Abdolhi, K. Kamaei , M. Salahi, K. Razmi, S.H. Moradyan, E. Gorjipor, H. Gandomkar, A. Rastiannasab, A.R. Hossini, H. Hoseinzadeh Sahafi , M. Nikbakht, M. Mohmmadpor
Advisor(s): -
Supervisor: -
Location of execution : Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad Province
Date of Beginning :
Period of execution :
Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute
Date of publishing : 2017

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 - Shahid Motahary Cold water Fishes
Genetic and breeding Research Center

Project Title :

The production of all-female in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using indirect feminization

Project Researcher :

Tayebeh bashti

Register NO.

51106