فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال هفتم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۸

مقاله پژوهشی

امکان‌سنجی تغییر جنسیت فنوتیپی در فیل‌ماهی و تاس‌ماهی ایرانی

ناصر آق[۱]*، عبدالجبار ایرانی[۲]

تاریخ دریافت: آذر ۹۷ تاریخ پذیرش: بهمن ۹۷

چکیده

فیل‌ماهی (*Huso hoso*) و تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) با ارزش‌ترین خاویار دنیا را تولید می‌کنند، به همین دلیل تولید ماهیان تمام ماده در این گونه‌ها اهمیت بسیار زیادی دارد. از این رو، در مطالعه حاضر تاثیر استفاده از هورمون ۱۷- بتا استرادیول در جیره غذایی بر رشد و ماده‌سازی دو گونه فیل‌ماهی و تاس‌ماهی ایرانی مورد بررسی قرار گرفت. میانگین وزن اولیه در فیل‌ماهی و تاس‌ماهی ایرانی به ترتیب ۱۷۲ و ۴۷ گرم بود. تراکم ذخیره‌سازی ۲۵ عدد فیل‌ماهی در هر مخزن ۱۰۰۰ لیتری و ۱۴ عدد تاس‌ماهی در هر مخزن ۲۰۰ لیتری بود. در هر دو گونه، هورمون استرادیول به مقدار ۰ (شاهد) و ۳۰ میلی‌گرم (تیمار هورمونی) به ازای هر کیلوگرم غذا اضافه شد و در قالب دو تیمار و دو تکرار در فیل‌ماهی و دو تیمار و سه تکرار در تاس‌ماهی ایرانی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در هر دو گونه فیل‌ماهی و تاس‌ماهی ایرانی به ترتیب بعد از ۴۰ و ۱۰۰ روز، رشد به شدت تحت تاثیر هورمون استرادیول قرار گرفت. بررسی برش‌های بافتی گنادها نشان داد که در هر دو گونه، درصد ماده‌ها در تیمار هورمونی بیش‌تر از شاهد بود. در تیمار هورمونی فیل‌ماهی ۷۲/۵ درصد ماده، ۱۷/۵ درصد نر و ۱۰ درصد با جنسیت نامشخص بودند. در تیمار هورمونی تاس‌ماهی ۸۵ درصد ماده، ۱۰ درصد نر و ۵ درصد با جنسیت نامشخص بودند. ولی در گروه شاهد هر دو گونه، ماده‌ها کمتر از ۶۰ درصد بودند. بنابراین استفاده از هورمون استرادیول در تغییر جنسیت گونه‌های بررسی‌شده، نسبتا موثر بود. هر چند به دلیل اثرات منفی آن بر رشد و سلامتی ماهیان، تعیین مقدار مناسب نیازمند مطالعات بیشتری است.

واژگان کلیدی: *تغییر جنسیت، استرادیول، فیل‌ماهی، تاس‌ماهی ایرانی.*

۱- دانشیار گروه بیولوژی و تکثیر و پرورش آبزیان، پژوهشکده آرتمیا و آبزی‌پروری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۲- استادیار گروه بیولوژی و تکثیر و پرورش آبزیان، پژوهشکده آرتمیا و آبزی‌پروری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

* نویسنده مسئول: n.agh@urmia.ac.ir

مقدمه

با وجود مطالعات زیادی که در رابطه با تمایز جنسی و فرآیند تعیین جنسیت در ماهیان مختلف انجام شده است، ولی هنوز بسیاری از جنبه‌های آن به صورت ناشناخته باقی مانده است. به همین دلیل امروزه بسیاری از پژوهشگران برای درک بهتر این پدیده از تجویز هورمون‌های استروئیدی خارجی استفاده می‌کنند (Devlin and Nagahama, 2002). از طرف دیگر بحث کنترل جنسیت و تغییر جنسیت امروزه به عنوان یک روش نوین برای افزایش راندمان تولید مراکز تکثیر و پرورش ماهیان مطرح است، چرا که در گونه‌های زیادی از ماهیان پرورشی یکی از جنس‌های نر یا ماده ارزش بیشتری نسبت به جنس دیگر دارد. این امر ممکن است به دلیل داشتن رشد بیشتر، دیررس بودن یکی از جنس‌ها و ارزش بالای تخم‌های جنس ماده باشد. در بسیاری از گونه‌ها مثل قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) جنس ماده رشد بهتری نسبت به نر دارد و یا در گروهی دیگر از ماهیان مثل بعضی از گونه‌های گربه‌ماهیان جنس نر دارای رشد سریع‌تری است. در بعضی از ماهیان به دلیل بلوغ زودرس در شرایط پرورشی بهتر است که از ماهیان عقیم استفاده شود. این امر باعث می‌شود که انرژی حاصل از غذا صرف رشد و نمو اندام‌های جنسی نشود (Devlin and Nagahama, 2002).

در رابطه با تغییر تمایز جنسی ماهیان به وسیله هورمون‌های استروئیدی خارجی مقالات زیادی منتشر شده است (Yamamoto, 1969; Hunter and Donaldson 1983; Yamazaki, 1983; Pandian and Sheela, 1995; Nakamura et al., 1998; Piferrer, 2001). در داخل کشور نیز مطالعات خوبی در این زمینه انجام شده است (موسوی ثابت و همکاران، ۱۳۸۹؛ حسین‌زاده صحافی و همکاران، ۱۳۹۲؛ خارا و همکاران، ۱۳۹۳؛ مکنت‌خواه و همکاران، ۱۳۹۴). بیشتر این مطالعات به منظور کنترل تولیدمثل گونه‌های پرورشی انجام شده است، هر چند تعداد کمی از آن‌ها به مطالعه مکانیسم‌های عملکرد استروئیدهای خارجی نیز پرداخته است. در این پژوهش‌ها از هورمون‌های آندروژن، استروژن‌ها و پیش‌ماده‌های استروئیدی استفاده شده است که به طریق غوطه‌وری یا اضافه کردن در جیره غذایی در مراحل رشدی متفاوتی تجویز شده‌اند. برای مشخص کردن مناسب‌ترین زمان تغییر جنسیت، مقدار مناسب هورمون، مقادیر

و طول مدت تجویز هورمون در مطالعات مختلف و توسط پژوهشگران متعدد مورد بررسی قرار گرفته است. به عنوان مثال، تیمار قزل‌آلای رنگین‌کمان با تستوسترون و استروژن بعد از شروع تمایز جنسی توانست جلوی گامتوژنز را بگیرد و باعث جلوگیری از اووژنز در ماده‌ها و پس‌رفت بیضه‌ها در نرها شود (Billard et al., 1982). همین نتایج در مورد ماهیان دیگر از جمله ماهیان خاویاری نیز گزارش شده است (Omomoto et al., 2002; Flynn and Benfey, 2007). ۱۷- بتا استرادیول یکی از مهم‌ترین هورمون‌هایی است که به منظور تولید ماهیان تمام ماده مورد استفاده قرار می‌گیرد، به طوری که موفقیت‌آمیز بودن تجویز خوراکی و یا حمام هورمونی آن در ماده‌سازی بسیاری از ماهیان مانند کپورماهیان، آزادماهیان و سیچلیدها گزارش شده است (Pandian and Sheela, 1995; Piferrer, 2001). ناجی و همکاران (۱۳۸۷) اثرات حمام هورمون استرادیول را بر تمایز گنادی قزل‌آلای رنگین‌کمان ارزیابی کردند. یافته‌های آن‌ها نشان داد که حداکثر ۵۹/۵ درصد ماده‌سازی صورت گرفت. خارا و همکاران (۱۳۹۳) اثرات هورمون ۱۷- بتا استرادیول را بر شاخص‌های خونی ماهی ازون‌برون (*Acipenser stellatus*) جوان مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که در ماهیان تیمار هورمونی، مقادیر گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت و میانگین مقدار هموگلوبین در هر گلبول قرمز کاهش یافت. مکنت‌خواه و همکاران (۱۳۹۴) تاثیر هورمون ۱۷- بتا استرادیول را با مقادیر ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا بر شاخص‌های بیوشیمیایی خون، استروئیدهای جنسی و ترکیب لاشه بچه‌ماهیان ازون‌برون بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که شاخص‌های بیوشیمایی خون و هورمون‌های استروئیدی تحت تاثیر تیمارهای هورمونی قرار گرفت.

ماهیان خاویاری به دلیل تولید خاویار و داشتن گوشت لذیذ و بدون تیغ از باارزش‌ترین ماهیان دنیا به حساب می‌آیند و به دنبال کاهش ذخائر آن‌ها در دریای خزر (Birstein, 1993) تقاضا برای گوشت و خاویار تاس‌ماهیان به شدت رو به افزایش بوده است (Omomoto et al., 2002). به دلیل گرانبها بودن خاویار در بازارهای جهانی و همچنین طولانی بودن سن بلوغ این ماهیان، تولید ماهیان تمام ماده و پرورش آن‌ها می‌تواند تحول بزرگی در این صنعت به وجود بیاورد. بنابراین در پژوهش حاضر امکان ماده‌سازی فنوتیپی دو گونه

فیل‌ماهی و تاس‌ماهی ایرانی که مرغوب‌ترین خاویار دنیا از آن‌ها استحصال می‌شود، به وسیله هورمون استرادیول مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ماهی و سیستم پرورش

لاروهای دارای کیسه زرده فیل‌ماهی (*Huso hoso*) و تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید رجایی به پژوهشکده آرتمیا و آبزی‌پروری دانشگاه ارومیه منتقل شدند و در داخل مخازن پلی‌اتیلن با غذای زنده (ناپلی آرتمیا) و سپس با غذای کنسانتره تجاری قزل‌آلا (چینه، ایران) پرورش داده شدند. فیل‌ماهی‌های ۵ ماهه با میانگین وزنی ۱۷۲ گرم به تعداد ۲۵ قطعه در مخازن پلی‌اتیلن مستطیل شکل ۱۵۰۰ لیتری با حجم آبگیری ۱۰۰۰ لیتر ذخیره‌سازی شدند. در هر مخزن دبی آب ۵ لیتر در دقیقه به همراه سیستم هوادهی برقرار بود. فیل‌ماهی‌ها در قالب دو تیمار شامل تیمار شاهد و تیمار هورمونی هر یک با دو تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. تاس‌ماهی‌های ایرانی ۵ ماهه با میانگین وزنی ۴۷ گرم به تعداد ۱۴ قطعه در مخازن پلی‌اتیلن گرد ۳۰۰ لیتری با حجم آبگیری ۲۰۰ لیتر و دبی آب ۲/۲ لیتر در دقیقه قرار داده شدند. این ماهیان نیز در قالب دو تیمار (شاهد و تیمار هورمونی) و سه تکرار برای هر تیمار مورد بررسی قرار گرفتند. هر دو گونه ماهی به مدت ۱۳۰ روز در تیمارهای آزمایشی پرورش داده شدند (Flynn and Benfey, 2007).

غذادهی و تهیه غذای هورمون‌دار

برای غذادهی فیل‌ماهی از غذای پرواری ۱ ماهی قزل‌آلا (GFT1، چینه، ایران) و برای غذادهی تاس‌ماهی ایرانی از غذای رشدی قزل‌آلا (FFT) استفاده شد. برای تیمار هورمونی، هورمون ۱۷- بتا استرادیول (ابوریحان، ایران) به مقدار ۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم غذا محاسبه شد و در ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد حل و سپس روی غذا اسپری شد (Flynn andBenfey, 2007). غذاهای هورمون‌دار پس از تبخیر الکل در داخل یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. غذادهی برای فیل‌ماهی با نرخ ۲ درصد (ایرانی و آق، چاپ نشده) و برای تاس‌ماهی با نرخ ۳-۲/۵ درصد وزن انجام شد (Irani and Agh, In Press). دفعات غذادهی

برای هر دو گونه، سه بار در شبانه روز بود (ساعت‌های ۸، ۱۴ و ۲۰).

نمونه‌گیری

برای بررسی رشد و اصلاح مقدار غذادهی روزانه، اوایل دوره پرورش، هر سه هفته یک‌بار و بعد از آن، هر چهار تا پنج هفته یک بار کل ماهیان هر مخزن توزین می‌شدند و میانگین وزن آن‌ها به دست می‌آمد. در پایان دوره آزمایش، رشد ویژه ماهیان (SGR) با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد.

رابطه ۱:

$$SGR\ (\%/day) = [(LnW_f - LnW_i) / t] \times 100$$

W_i: وزن اولیه (گرم)؛ W_f: وزن نهایی (گرم)؛ t: طول دوره پرورش (روز).

به منظور بررسی‌های بافت‌شناختی، از هر تیمار فیل‌ماهی و تاس‌ماهی ایرانی ۳۰ قطعه ماهی (۱۵ فیل‌ماهی و ۱۰ تاس‌ماهی ایرانی از هر تکرار) پس از بیهوش شدن با پودر گل میخک (۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) کشته و از گناد آن‌ها نمونه‌گیری شد.

بررسی بافت‌شناسی

نمونه‌های گناد پس از بیرون آوردن از بدن ماهی در فرمالین بافر فسفات ٪۱۰ گذاشته شد و به آزمایشگاه بافت‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه منتقل شد. از هر گناد نمونه‌ای به اندازه یک سانتی‌متر با قیچی بریده و در داخل فلاسک‌های استیل مخصوص پاساژ قرار داده شد و برای تثبیت شدن به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در داخل فرمالین بافر فسفات نگهداری شد. پس از تثبیت، آبگیری، شفاف سازی، آغشتگی با پارافین انجام و سپس با دستگاه میکروتوم برش‌های با ضخامت ۶-۴ میکرون تهیه شد. برش‌های تهیه شده پس از پارافین‌زدایی و آب‌دهی، با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی و توسط میکرسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند (حلاجیان و همکاران، ۱۳۸۷).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای سازماندهی داده‌ها و رسم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 و برای انجام تحلیل‌های آماری از نرم‌افزار SPSS 22 استفاده شد. وجود یا عدم وجود اختلاف بین میانگین‌ها با آزمون t برای نمونه‌های مستقل

در سطح اطمینان ٪۹۵ مورد بررسی قرار گرفت.

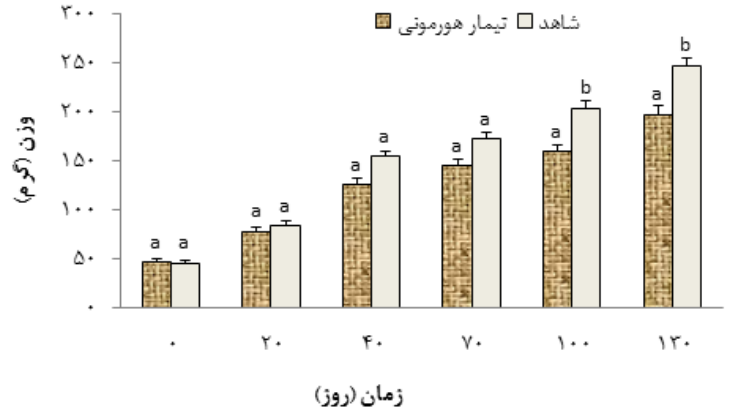
نتایج

رشد

وزن فیل‌ماهی‌ها در تیمار هورمونی و گروه شاهد بعد از ۱۳۰ روز پرورش در شرایط آزمایش به ترتیب ۲۵/۲±۴۴۲/۳ و ۱۸/۴±۵۹۹/۱ گرم بود و وزن نهایی ماهیان تغذیه شده با غذای هورمون‌دار به طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود (P<۰/۰۵). در طول دوره آزمایش تاثیر منفی هورمون استرادیول بر رشد فیل‌ماهی با گذشت زمان بیشتر شد (شکل ۱). به طوری که در ماه اول تیمار هورمونی و گروه شاهد اختلاف آماری باهم نداشتند (P>۰/۰۵)، ولی از روز ۴۰ به بعد اختلاف معنی‌داری بین دو گروه مشاهده شد (P<۰/۰۵).

در پایان دوره پرورش، وزن نهایی تاس‌ماهیان ایرانی در تیمار هورمونی (۸/۵±۱۹۷/۴ گرم) به طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد (۷/۴±۲۴۷/۳ گرم) بود (P<۰/۰۵). با وجود آن که کاهش رشد ناشی از هورمون استرادیول جیره غذایی در طول دوره آزمایش مشهود بود (شکل ۲)، ولی تحلیل‌های آماری نشان داد که اختلاف وزن بین دو تیمار هورمونی و شاهد در ماه سوم به بعد معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). حدود دو ماه بعد از شروع تیمار، فیل‌ماهی‌ها و تاس‌ماهی‌هایی که در به جیره غذایی آن‌ها هورمون اضافه شده بود، آثار و علایم بیماری را نشان دادند و به خاطر این مساله به تدریج تا انتهای دوره آزمایش تعدادی از ماهیان تیمار هورمونی تلف شدند. آب‌آوردگی شکم و وجود بوی نامطبوع مهم‌ترین عارضه ماهیان تیمار هورمونی بود که در نتیجه آن ماهیان به تدریج به پشت برگشته، قادر به تغذیه نبودند. مقدار بازماندگی در تیمار هورمونی و گروه شاهد فیل‌ماهی به ترتیب ۲/۸۳±۷۴ و ۱۰۰ درصد و مقدار بازماندگی در تیمار هورمونی و گروه شاهد تاس‌ماهی به ترتیب ۱۰/۸۱±۷۱/۹۵ و ۱۰۰ درصد بود.

شکل ۱: روند رشد فیل‌ماهی‌ها در تیمار هورمونی و گروه شاهد (میانگین ± خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).



شکل ۲: روند رشد تاس‌ماهی‌ها در تیمار هورمونی و گروه شاهد (میانگین ± خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

رشد ویژه فیل‌ماهی‌های تیمار هورمونی طی دوره پرورش ۱۳۰ روزه، ۰/۷۲±۰/۰۱۶ درصد در روز بود که به طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد (۰/۹۶±۰/۰۰۱) بود و رشد ویژه در تیمار هورمونی تاس‌ماهی‌ها نیز (۱/۱۲±۰/۰۲۰ درصد در روز) به طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد (۱/۳۰±۰/۰۱۷ درصد در روز) بود (P<۰/۰۵).

نسبت جنسی

در پایان دوره آزمایش، بررسی برش‌های بافتی نشان داد که در تیمار هورمونی فیل‌ماهی ۷۲/۵ درصد ماده، ۱۷/۵ درصد نر و ۱۰ درصد با جنسیت نامشخص بودند، ولی در گروه شاهد فیل‌ماهی ۵۵ درصد ماده، ۳۹/۳ درصد نر و ۵/۷ درصد با جنسیت نامشخص بودند (جدول ۱). تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که بین نسبت جنسی (ماده‌ها و نرها) تیمار هورمونی و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵). بررسی برش‌های بافتی گنادهای تاس‌ماهی‌ها نشان داد که در تیمار هورمونی ۸۵ درصد ماده، ۱۰ درصد نر و ۵ درصد با جنسیت نامشخص بودند، ولی در گروه شاهد تاس‌ماهی ۵۸ درصد ماده، ۳۸ درصد نر و ۴ درصد با جنسیت نامشخص بودند (جدول ۱). تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که در این گونه نیز بین نسبت جنسی (ماده‌ها و نرها) تیمار هورمونی و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵).

جدول ۱: نسبت جنسی تیمار هورمونی و گروه شاهد در فیل‌ماهی و تاس‌ماهی ایرانی در پایان دوره آزمایش (میانگین ± خطای استاندارد)

جنسیت (درصد)	فیل‌ماهی		تاس‌ماهی ایرانی	
	تیمار هورمونی	شاهد	تیمار هورمونی	شاهد
ماده	۷۲/۵±۴/۵۴ [b]	۵۵±۲/۶۸ [a]	۸۵±۴/۳۶ [b]	۵۸±۳/۱۲ [a]
نر	۱۷/۵±۲/۹۸ [a]	۳۹/۳±۳/۱۸ [b]	۱۰±۳/۰۳ [a]	۳۸±۴/۳۲ [b]
نا مشخص	۱۰±۳/۲۲ [a]	۵/۷±۲/۸۷ [a]	۵±۳/۶۸ [a]	۴±۳/۴۵ [a]

حروف متفاوت در هر ردیف برای هر گونه به صورت جداگانه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

بنابراین در هر دو گونه فیل‌ماهی و تاس‌ماهی که به مدت ۱۳۰ روز جیره حاوی هورمون استرادیول دریافت کرده بودند، نسبت ماده‌ها افزایش پیدا کرد ولی تاثیرگذاری آن در مورد تاس‌ماهی بیشتر بود.

بحث

در مطالعه حاضر در هر دو گونه فیل‌ماهی و تاس‌ماهی ایرانی، رشد به شدت تحت تاثیر هورمون استرادیول قرار گرفت، به طوری که چند هفته بعد از شروع تغذیه با غذای هورمون‌دار، اشتهای ماهیان کاهش یافت و غذاگیری کم شد. به همین دلیل مقادیر رشد ویژه و وزن نهایی ماهیان گروه شاهد اختلاف

معنی‌داری با ماهیان تیمار هورمونی نشان داد. نتایج مشابهی نیز توسط پژوهشگران دیگر گزارش شد. مکنت‌خواه و همکاران (۱۳۹۴) گزارش کردند که تغذیه بچه‌ماهیان ازون‌برون با جیره‌های حاوی هورمون استرادیول بر شاخص‌های رشد این ماهی تاثیر قابل توجهی داشت و باعث کاهش وزن و سایر شاخص‌های رشد شد. آن‌ها که مقادیر ۰، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم استرادیول در کیلوگرم غذا را به کار برده بودند، نتیجه گرفتند که با افزایش مقدار استرادیول تاثیر منفی آن بر رشد بیشتر می‌شود. بررسی اثرات هورمون استرادیول (با مقادیر ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا) در ماهی کاراس طلایی (*Carassius auratus*) نیز نشان داد که ماهیان دچار کاهش رشد و افزایش ضریب تبدیل غذایی شدند (ترخانی و همکاران، ۱۳۹۲). کاهش رشد ماهیان تیمار هورمونی را می‌توان به تداخل در ترشحات درون‌ریز ناشی از ورود هورمون خارجی و تغییر مسیر تمایز جنسی گنادها نسبت داد. در واقع با تغذیه جیره هورمون‌دار سطح هورمون استرادیول خون افزایش می‌یابد (مکنت‌خواه و همکاران، ۱۳۹۴) و این افزایش استرادیول با کاهش فعالیت تیروئید، محور رشد را تحت تاثیر قرار می‌دهد، چرا که فرآیندهای مربوط به رشد و تمایز اندام‌های جنسی و رشد بدن موجودات زنده هر دو بسیار انرژی‌بر هستند و افزایش هورمون‌های هر یک از این فرآینده‌ها، دیگری را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Cyr and Eales, 1996).

حدود دو ماه بعد از شروع آزمایش، فیل‌ماهی‌ها و تاس‌ماهی‌هایی که به جیره غذایی آن‌ها هورمون اضافه شده بود، آثار بیماری نشان دادند و به خاطر این مساله به تدریج تا انتهای دوره تیمار تعدادی از ماهیان تیمار هورمونی تلف شدند. آب‌آوردگی شکم و وجود بوی نامطبوع مهم‌ترین عارضه ظاهری ماهیان تیمار هورمونی بود که در نتیجه آن ماهیان به تدریج به پشت برگشته، قادر به تغذیه نبودند. نتایج مشابه آن برای تاس‌ماهی پوزه کوتاه (*Acipenser brevirostrum*) تغذیه شده با غذای حاوی هورمون استرادیول نیز گزارش شد (Flynn and Benfey, 2007). در این مطالعه هورمون استرادیول در دو آزمایش مجزا به غذای تاس‌ماهی پوزه کوتاه اضافه شد و برای تغذیه ماهیان مورد استفاده قرار گرفت. در آزمایش اول تاس‌ماهی‌های ۵ ماهه با جیره حاوی ۰ (شاهد)، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم استرادیول در هر کیلوگرم غذا به مدت ۹ ماه تغذیه شدند. در آزمایش دوم

ماهیان ۷ ماهه به مدت ۷ ماه با جیره حاوی ۰ (شاهد)، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم استرادیول در هر کیلوگرم غذا تغذیه شدند. در هر دو آزمایش، ماهیان شاهد و تیمار ۱۰ میلی‌گرم استرادیول در کیلوگرم غذا، فعال بودند و به خوبی تغذیه می‌کردند، اما در گروه‌های دیگر با افزایش مقدار هورمون فعالیت ماهیان و تغذیه آن‌ها کاهش یافت. بررسی‌های Flynn و Benfey (۲۰۰۷) نشان داد که در ماهیان تغذیه شده با غذای هورمون‌دار، کبد لکه لکه شده، کلیه‌ها متورم شدند و گنادها کوچک مانده بودند و با افزایش مقدار هورمون تعداد هپاتوسیت‌ها و مقدار پروتئین زرده افزایش یافت. بررسی‌های بافتی آن‌ها نشان داد که در هر دو آزمایش هورمون استرادیل تاثیر مثبتی بر ماده‌سازی داشت. هر چند در پایان آزمایش همانند مطالعه حاضر، بسیاری از ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی هورمون استرادیول به طور آشکاری آثار بیماری از خود نشان دادند (Flynn and Benfey, 2007). بنابراین استفاده از هورمون استرادیول در جیره غذایی بچه‌ماهیان به منظور تغییر مسیر تمایز جنسی می‌تواند تاثیر شدیدی بر وضعیت بیوشیمایی کل بدن و سلامتی ماهی بگذارد که بیشتر آن‌ها نتیجه زرده‌سازی ناشی از تحریک هورمون استرادیول است که به دلیل عدم توانایی فولیکول‌های تخمدانی در جذب و تبدیل مواد پروتئینی، چربی‌ها، قندها و املاح به مواد ذخیره‌ای تخم، در خون و کبد تجمع می‌یابد و باعث به هم خوردن تعادل فیزیولوژیک ماهی می‌شود (مکنت‌خواه و همکاران، ۱۳۹۴). با توجه به این یافته‌ها به نظر می‌رسد که در مورد زمان، مقدار و طول مدت تغذیه غذای هورمون‌دار باید مطالعات گسترده‌تری انجام شود.

در مطالعه‌ای، برای بررسی اثرات طول دوره تغذیه با جیره هورمون‌دار، لاروهای قزل‌آلای رنگین‌کمان و ماهی آزاد به ترتیب به مدت ۲۰ و ۳۰ روز با جیره حاوی ۲۰ میلی‌گرم استرادیول در کیلوگرم غذا پرورش داده شدند. ماهیانی که برای دوره کوتاه هورمون دریافت کرده بودند دارای درصد هرمافرودیت بیشتری بودند و در این ماهیان دوجنسی، رشد و نمو بیضه سریع‌تر از تخمدان بود (Johnstone et al., 1978). همانند نتایج مطالعات حاضر، Johnstone و همکاران (۱۹۷۸) گزارش کردند که ماهیان تغییر جنسیت یافته در طول دوره تغذیه با هورمون، رشد کمتری نسبت به گروه شاهد نشان دادند ولی بعد از ۱۵۰ روز هیچ

اختلاف رشدی بین گروهای آزمایشی و شاهد وجود نداشت.

بررسی برش‌های بافتی در پایان دوره مطالعه حاضر نشان داد که در هر دو گونه درصد ماده‌ها در تیمار هورمونی بیشتر از شاهد بود. در تیمارهای هورمونی و شاهد فیل‌ماهی به ترتیب ۷۲/۵ درصد و ۵۵ درصد ماده بودند. بررسی‌های برش‌های بافتی گنادهای تاس‌ماهی‌ها نشان داد که در تیمارهای هورمونی و شاهد به ترتیب ۸۵ درصد و ۵۸ درصد ماده بودند. بنابراین با توجه به داده‌های فوق، در هر دو گونه فیل‌ماهی و تاس‌ماهی که به مدت ۱۳۰ روز جیره حاوی هورمون استرادیول دریافت کرده بودند، نسبت ماده‌ها افزایش پیدا کرد، ولی تاثیرگذاری آن در تاس‌ماهی بیشتر بود. منشاء سلول‌های دخیل در تغییر تمایز جنسی از موضوعات بحث‌انگیز است. کاملا معلوم نیست که آیا خود سلول‌های تمایز یافته گناد (اسپرماتوگونیا یا اووگونیا) قادر به تغییر مسیر تکاملی خود به سمت تغییر جنسیت هستند یا جرم‌سل‌های تمایز نیافته موجود در گناد مسیر جدیدی را برای تمایز جنسی پیش می‌گیرند. مطالعات نشان داد که جرم‌سل‌های اولیه در طول زندگی ماهی در داخل تخمدان و بیضه وجود دارد (Brusle, 1988; Flores and Burns, 1993). این مطالعات فرضیه دوم را تایید می‌کنند. هورمون‌های استروئیدی نقش خیلی مهمی در تمایز اولیه گناد برای تبدیل شدن به نر یا ماده و همچنین در حفظ و نگهداری بعدی این شرایط ایفا می‌کند. از آنجا که مراحل ساخت استروئیدها و پذیرش آن‌ها توسط گیرنده‌ها به صورت پیوسته و وابسته به هم نیست، نظریه به کار بردن استروئیدهای خارجی برای تحت تاثیر قرار دادن مسیر تمایز جنسی شکل گرفت (Devlin andNagahama, 2002). هر دو گروه گیرنده استروژن و آندروژن در گنادهای اولیه ماهیان شناسایی شده‌اند (Fitzpatrick et al., 1994; Chang et al., 1995). وجود آن‌ها مشخص کننده مکانیسم عملکرد استروئیدهای خارجی در تمایز جنسی گناد است، به طوری که اگر مقادیر کافی از استروئیدهای جنسی به ویژه در مراحل اولیه تکامل گنادها که هنوز مسیرهای داخلی ترشح استروئیدها به طور کامل شکل نگرفته باشد، در اختیار ماهی قرار گیرد تغییر تمایز جنسی ممکن است اتفاق بیافتد. در بحث تغییر جنسیت ماهیان، مقدار مناسب، زمان مناسب و طول مدت تجویز هورمون استروئیدی سه پارامتر خیلی مهم به حساب می‌آید (Piferrer,

2001). به طور کلی دوره حساس برای تغییر جنسیت درست قبل یا همزمان با آغاز تمایز بافتی گناد اولیه است (Hunter and Donaldson, 1983). به خاطر تفاوت‌های زیادی که در میزان رشد گونه‌های مختلف ماهیان وجود دارد، مرحله ناپایدار جنسی (مرحله حساس به هورمون‌های استروئیدی خارجی) در گونه‌های مختلف در زمان‌های رشدی متفاوت است. به عنوان مثال در آزادماهیان این زمان به اواخر دوره جنینی تا مراحل لاروی محدود می‌شود، اما در گونه‌های دیگر مثل ماهیان خاویاری ممکن است مرحله ناپایدار خیلی دیرتر رخ دهد (Kavumpurath and Pandian, 1993; Blazquez et al., 2001; Piferrer, 2001; Flynn and Benfey, 2007).

بررسی اثرات هورمون استرادیول در دو دوره زمانی (در سن ۳۱-۱۴ ماهگی و ۱۸-۳ ماهگی) در ماهی بستر (هیبرید فیل‌ماهی و استرلیاد *Acipenser ruthenus*) نشان داد که در آزمایش اول ماده‌سازی انجام نشد و ماهیان تیمار هورمونی ۴۰ درصد تلفات داشتند، ولی در آزمایش دوم به طور موفقیت‌آمیزی ماده‌سازی صورت گرفت و بالای ۹۵ درصد ماده تولید شد (Omomoto et al., 2002).

در مطالعه‌ای دیگر، برای تولید ماهیان تمام ماده، لاروهای قزل‌آلای قهوه‌ای را به مدت ۶۰ روز با جیره حاوی ۲۰ میلی‌گرم استرادیول در کیلوگرم غذا، تغذیه کردند (Johnstone et al., 1979). نتایج نشان داد که تمامی ماهیانی که هورمون دریافت کرده بودند ماده شدند. بین ماهیان ماده شاهد و گروه هورمونی هیچ اختلافی از نظر شکل ظاهری تخمدان وجود نداشت. تجویز همین مقدار هورمون ولی به مدت ۴۰ روز باعث به وجود آمدن ۶۷ درصد ماده، ۲۱ درصد نر و ۱۲ درصد هرمافرودیت شد. در میان گروه شاهد، رشد نرها به طور معنی‌داری بیشتر از ماده‌ها بود. رشد ماهیان تمام ماده به طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد (نر و ماده) بود ولی بین ماهیان تمام ماده و ماده‌های گروه شاهد اختلاف رشدی معنی‌داری وجود نداشت (Johnstone et al., 1979). ناجی و همکاران (۱۳۸۷) اثرات حمام هورمون استرادیول را بر تمایز گنادی قزل‌آلای رنگین‌کمان ارزیابی کردند. یافته‌های آن‌ها نشان داد که حداکثر ۵۹/۵ درصد ماده‌سازی صورت گرفت (ناجی و همکاران، ۱۳۸۷). این مطالعات اهمیت بسیار بالای زمان شروع، طول مدت و روش هورمون‌دهی را در گونه‌های مختلف ماهیان نشان می‌دهند.

نتایج مطالعه حاضر و بررسی مطالعات پیشین نشان می‌دهد که برای تغییر جنسیت ماهیان آگاهی از خصوصیات فیزیولوژیک، زمان آغاز تمایز جنسی، زمان تفکیک کامل اندام‌های جنسی، مقدار مناسب هورمون، زمان شروع هورمون‌دهی، طول دوره هورمون‌دهی و حتی روش مناسب هورمون‌دهی (حمام یا تغذیه) بسیار مهم است. در مطالعه حاضر تیمار هورمونی فیل‌ماهی و تاس‌ماهی ایرانی با هورمون استرادیول اثرات مثبتی در ماده‌سازی هر دو گونه داشت، ولی با توجه به این که رشد و سلامتی تعدادی از ماهیان تحت تاثیر هورمون استرادیول قرار گرفت و با در نظر گرفتن اطلاعات به دست آمده از سایر مطالعات، در مورد مسائل مهم مربوط به تغییر جنسیت فنوتیپی از قبیل مقدار هورمون، زمان مناسب شروع هورمون‌دهی و طول دوره استفاده از هورمون در ماهیان خاویاری باید مطالعات جامعی انجام شود.

منابع

ایرانی ع. و آق ن. بهینه‌سازی نرخ‌های غذداهی برای فیل‌ماهی (*Huso huso*). (چاپ نشده).

ترخانی ر.، ایمانپور م. و تقی‌زاده و. ۱۳۹۲. بررسی اثرات ۱۷- بتا استرادیول روی رشد، شاخص‌های تغذیه‌ای و تغییر جنسیت در ماهی کاراس طلایی (*Carassius auratus*). بهره‌برداری و پرورش آبزیان، ۲(۳): ۳۵-۲۷.

حسین‌زاده صحافی ه.، اشجع اردلان آ. و سیفی ج. ۱۳۹۲. تاثیر هورمون ۱۷ آلفا متیل تستوسترون بر تغییر جنسیت ماهی کالیکو (*Labeotropheous foellobroni*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۲(۱): ۳۶-۲۷.

حلاجیان ع.، کاظمی ر.، دژندیان س.، یوسفی جوردهی ا.، پوردهقانی م. و توکلی م. ۱۳۸۷. بررسی بافت‌شناسی از رسیدگی جنسی در ماهیان خاویاری نابالغ طبیعی صید شده در پاییز ۸۲ با تاکید بر تاس‌ماهی ایرانی و ازون‌برون. امور دام و آبزیان، ۷۸: ۱۰۹-۱۰۳.

خارا ح.، فلاحتکار ب.، مکنت‌خواه ب.، رهبر م. و احمدنژاد م. ۱۳۹۳. اثرتزریق هورمون ۱۷- بتا استرادیول برتغییرات هماتولوژیک ماهی ازون‌برون جوان. مجله زیست‌شناسی دریا، ۶(۲۱): ۷۸-۷۳.

مکنت‌خواه ب.، فلاحتکار ب.، خارا ح. و عفت‌پناه ا. ۱۳۹۴. تغییرات بیوشیمی، استروئیدهای جنسی و ترکیب لاشه در بچه ماهیان ازون‌برون (*Acipenser stellatus*) تغذیه شده با هورمون ۱۷- بتا استرادیول. مجله علمی شیلات ایران، ۲۴(۱): ۷۴-۵۹.

موسوی ثابت ح.، زمینی ع. و وهاب‌زاده رودسری ح. ۱۳۸۹. نرسازی در ماهی سیچلاید گورخری *Cichlasoma nigrofasciatum* با استفاده از هورمون ۱۷ آلفا- متیل تستوستورون از طریق غذا و بررسی اثر آن بر میزان تلفات، عقیمی و جنسیت بینابینی. پژوهش‌های علوم و فنون دریایی، ۵(۳): ۲۹-۲۵.

ناجی ط.، نجات‌خواه معنوی پ. و شیرین‌آبادی م. ۱۳۸۷. بررسی اثرات هورمون ۱۷- بتا استرادیول والرات بر تمایز گونادی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). علوم و تکنولوژی محیط زیست، ۱۰(۲): ۱۱۲-۱۰۵.

Birstein V.J. 1993. Sturgeons and paddlefishes: Threatened fishes in need of conservations. Conservation Biology, 7: 773–787.

Billard R., Richard M. and Rombauts R. 1982. Inhibition of spermatogenesis and vitellogenesis in rainbow trout by hormonal additives in the diet. Progressive Fish-Culturist, 44: 15–18.

Blazquez M., Felip A., Zanuy S., Carrillo M. and Piferrer F. 2001. Critical period of androgen-inducible sex differentiation in a teleost fish, the European sea bass. Journal of Fish Biology, 58: 342–358.

Brusle S. 1988. Sex differentiation in teleosts: Primordial germ cells as stem cells. Reproduction in fish: Basic and applied aspects in endocrinology and genetics. Colloques Institut National de la Recherche Agronomique, 44: 21–24.

Chang C.F., Lau E.L. and Lin B.Y. 1995. Estradiol-17-beta suppresses testicular development and stimulates sex reversal in protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. Fish Physiology and Biochemistry, 14: 481–488.

Cyr D.G. and Eales J.G. 1996. Inter relationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 6: 165–200.

Devlin R.H. and Nagahama Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: An overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture, 208: 191–364.

Fitzpatrick M.S., Gale M.L. and Schreck C.B. 1994. Binding characteristics of an androgen receptor in the ovaries of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. General and comparative Endocrinology, 95: 399–408.

Flores J.A. and Burns J.R. 1993. Ultrastructural study of embryonic and early adult germ cells, and their support cells, in both sexes of *Xiphophorus* (Teleostei: Poeciliidae). Cell and Tissue Research, 271(2): 263–270.

Flynn S.R. and Benfey T.J. 2007. Effects of dietary estradiol-17β in juvenile shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum*, Lesueur. Aquaculture, 270: 405–412.

Hunter G.A. and Donaldson E.M. 1983. Hormonal sex control and its application to fish culture. Fish Physiology, 9: 223–303.

Irani A. and Agh N. Optimization of feeding rates for Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). Aquaculture, (In Press).

Johnstone R. Simpson T. and Walker A. 1979. Sex reversal in Salmonid culture: Part 3. The production and performance of all-female populations of brook trout. Aquaculture, 18: 241–252.

Johnstone R., Simpson T.H. and Youngson A.F. 1978. Sex reversal in Salmonid culture. Aquaculture, 13: 115–134.

Kavumpurath S. and Pandian T.J. 1993. Determination of labile period and critical dose for sex

reversal by oral administration of estrogens in *Betta splendens* Regan. Indian Journal of Experimental Biology, 31: 16–20.

Nakamura M., Kobayashi T., Chang X.T. and Nagahama Y. 1998. Gonadal sex differentiation in teleost fish. Journal of Experimental Zoology, 281: 362–372.

Omomoto N., Maebayashi M., Mitsuhashi E., Yoshitomi K., Adachi S. and Yamuchi K. 2002. Effects of estradiol-17b and 17a-methyltestosterone on gonadal sex differentiation in the F2 hybrid sturgeon, the bester. Fisheries Sciences, 68: 1047–1054.

Pandian T.J. and 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.

Yamamoto T. 1969. Sex differentiation. P: 117–175. In: Hoar W. and Randall D. (Eds.). Fish Physiology. Academic Press, USA.

Yamazaki F. 1983. Sex control and manipulation in fish. Aquaculture, 33: 329–354.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 7, No. 2, Summer 2019

Research Paper

Feasibility of phenotypic sex reversal in beluga and Persian sturgeon

Naser Agh[1]*, Abdoljabbar Irani[2]

Received: December 2018 Accepted: February 2019

Abstract

Caviar of beluga (Huso huso) and Persian sturgeon (Acipenser persicus) are the most expensive in the worldwide market. Because of that, all female production is very important in these species. In this research, the effects of dietary 17-β estradiol on growth performance and sex reversal of beluga and Persian sturgeon were investigated. Initial mean weights of beluga and Persian sturgeon were 172 and 47g, respectively and stocking densities were 25 individuals per 1000-liter tank and 14 individuals per 200-liter tank, respectively. In both species, fish were fed 0 (control) and 30 mg estradiol/kg with two replicates for beluga and three replicates for Persian sturgeon. Results showed that the growth performance of both species was significantly affected by dietary estradiol 40 and 100 days after the beginning of the experiment, respectively. Histological assessment of gonad tissue indicated that females were predominant in both species comparing with the control group. Sex composition was 72.5% female, 17.5% male, and 10% undetectable in the hormonal treatment of beluga and 85% female, 10% male and 5% undetectable in the hormonal treatment of Persian sturgeon, but females were lower than 60% in the control group of both species. In conclusion, the dietary administration of estradiol was relatively successful in sex reversal of both sturgeon species. However, determination of the optimum level of estradiol requires more studies because of its negative effects on growth performance and fish health.

Key words: *Sex Reversal*, *Estradiol*, Huso huso, Acipenser persicus.

1- Associate Professor in Artemia and Aquaculture Institute, Urmia University, Urmia, Iran.
2- Assistant Professor in Artemia and Aquaculture Institute, Urmia University, Urmia, Iran.
*Corresponding Author: n.agh@urmia.ac.ir