

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

عنوان:

**تعیین بقایای هورمونی B- Estradiol
در ماهیان قزل آلاي رنگين کمان
با هدف ارتقاء سلامت ماهیان**

مجری :

همایون حسین زاده صحافی

شماره ثبت

۴۵۸۰۹

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- Estradiol در ماهیان قزل آلاي رنگين 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 ۱۳۹۴

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 آلاى رنگین

کمان باهدف ارتقاء سلامت ماهیان

کد مصوب : ۹۱۱۲۶-۱۲-۱۲-۲

شماره ثبت (فروست) : ۴۵۸۰۹ تاریخ : ۹۳/۶/۲۵

با مسئولیت اجرایی جناب آقای همایون حسین زاده صحافی دارای مدرک

تحصیلی دکتری در رشته بیولوژی آبزیان می باشد.

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 آلا رنگین کمان در دوره های زمانی مختلف (۰، ۵، ۱۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۶۸ ساعت) مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور آزمایشات بر روی ۷۰ قطعه ماهی ماده با وزن تقریبی 110 ± 11 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 طور جداگانه با گروه کنترل در قالب دو تیمار در نظر گرفته شد. پس از تجویز هورمون و براساس دوره های زمانی در نظر گرفته شده، از آئورت 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 معنی داری را نشان می دهد ($P < 0/001$). 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 بیشتر بود. بیشترین مقدار هورمون مربوط به ساعت ۰/۵، یعنی ۳۰ دقیقه پس از قطع دوره هورمون تراپی با مقدار 121 ± 9 نانوگرم بر میلی لیتر و کمترین آن مربوط به تیمار ۱۶۸ ساعت و شاهد با مقدار متوسط $3 \pm 0/9$ نانوگرم بر میلی لیتر بود. بین سطح پلاسمایی هورمون ۱۷ بتا استرادیول در تیمارهای 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 ($P < 0/001$). بیشترین میزان هورمون تستوسترون در دوره های زمانی ۰/۵ و ۱ ساعت و کمترین آن در تیمار ۱۶۸ ساعت مشاهده شد ($P < 0/001$). 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 دار نداشت. در مجموع 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 به محدود بودن میزان صید، پرورش آبزیان و بخصوص در محیط های مصنوعی بیش از پیش مورد توجه قرار می گیرد، در سالهای گذشته پرورش ماهی یک شغل ضمنی در کنار کشاورزی محسوب می شد، چرا که هنوز انسان کشاورزی و زراعت را چاره ساز مشکلات خود در امر تغذیه می دید ولی امروزه پرورش ماهی از اساسی ترین و اصلی ترین شغل ه ادربسیاری از کشورها است، لذا در سالیان اخیر سعی گردیده است تا به نحوی از انحاء 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 قزل آلاي رنگین کمان در ایران پیشرفت بسیار قابل توجهی داشته است، بطوری که میزان تولید سالانه این ماهی در سال ۱۳۷۴، از حدود ۵۰۰ تن، به ۱۳۰۰۰۰ تن در سال ۱۳۹۲ رسیده است (سالنامه آماری شیلات ایران، ۱۳۹۲).

فرآیند بلوغ جنسی در ماهی قزل آلاي رنگین کمان که ماهی پرورشی غالب در مناطق معتدل و سردسیر دنیا می باشد، به دلیل صرف انرژی جهت تولید مواد تناسلی و در نتیجه تقسیم انرژی بین فعالیت های تولید مثل و تولید لاشه می گردد. نتیجه این تقسیم انرژی، کاهش میزان رشد به ویژه در جنس نر خواهد بود و از طرفی دیگر بلوغ جنسی قزل آلاي رنگین کمان، باعث کاهش کیفیت گوشت و بروز اثرات نامطلوب در بافت و رنگ آن می گردد. به علاوه به هنگام بلوغ جنسی، حساسیت ماهی نسبت به عوامل بیماریزا و استرس های محیطی افزایش می یابد (Bromage and Cumaranatunga, 1988).

این تغییرات در جنس نر قزل آلاي رنگین کمان بارزتر بوده و زودتر آشکار می شود، زیرا جنس نر حداقل یک سال زودتر از جنس ماده (جنس نر در سن ۲ سالگی و جنس ماده در سن 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 اندازه بازاری برسند، به سن بلوغ رسیده و علاوه 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 .

۱-۲- پیشینه تحقیق

- Zhai و Zou در سال ۲۰۰۶ در تحقیقی 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 در سال ۲۰۰۱ به بررسی زمان پاکسازی هورمونی در ماهی قزل آلا (*Onchorhynchus mykiss*) پرداخت (Piferre, 2001).

- Torres و همکارانش در سال ۲۰۱۲ با استفاده از تکنیک HPLC-DAD به ارزیابی بقایای هورمون های ۱۷-آلفا - تینیل - 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 تغییرات بافت شناسی در بافت بیضه و ماهیچه ماهی تیلاپای 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 تیلاپای 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 and 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 گلوکوکورونیده 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 در آب 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 و تستوسترون در حیوانات اهلی مانند گاو، گوسفند و اسب پرداخت (Doyle, 2000).
- Velly- در سال ۲۰۰۸ به بررسی استفاده از هورمون ها در تولید حیوانات و ارزیابی خطرات احتمالی بقایای هورمونی در بافت حیوانات پرداخت (Velly, 2008).
- Zhihong - و همکارانش در سال ۲۰۰۹ به بررسی بقایای هورمونی استروژن و آنتی بیوتیک کلرومفنیکل در بافت جوجه پرداختند (Zhihong et al., 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.
- رعناي اخوان، در سال ۱۳۹۰، به تاثیر کاشت سطوح مختلف ۱۷-بتا-استرادیول بر رشد و توسعه گنادی و متابولیت های سرم در فیل ماهی پرورشی پرداخت (رعناي اخوان، ۱۳۹۰).

۳-۱- روند تولید ماهیان سرد آبی

آبزی پروری را میتوان فعالیتی باهدف پرورش انواع گیاهان و جانوران آبزی در محیط های آبی تعریف کرد که شامل پرورش در سیستمهای مختلف استخری، پرورش در قفس و پرورش در آبهای کم عمق ساحلی می گردد. پرورش ماهی در منابع آبهای داخلی، در دنیا از قدمتی بیش از ۳۰۰ سال برخوردار است. (Pillay and Kutty, 2005) پرورش انواع آبزیان از اواخر دهه ۱۹۷۰، به دلیل کاهش نرخ رشد صید از دریاها، بصورت روزافزونی مورد توجه قرار گرفته است. این فعالیت به دلیل کاهش صید دریایی و افزایش جمعیت جهان و تقاضای فزاینده همواره روندی رو به رشد داشته است. آبزی پروری طی دهه ۲۰۰۹ - ۱۹۹۶ (بدون در نظر گرفتن گیاهان آبزی) از رشد سالیانه حدود ۹/۵ درصد برخوردار بوده است. (FAO, 2009) شایان ذکر است که اکثر فعالیتهای آبزی پروری در سطح جهان، از طریق مزارع متوسط و کوچک و عمدتاً توسط خانوارهای تولید کننده، انجام می گیرد. رشد سریع پرورش آبزیان، عمدتاً نتیجه افزایش چشمگیر تولید ماهیان به ویژه کپور ماهیان بوده است (FAO, 2009). در سال ۲۰۰۹، میزان تولید آزاد ماهیان در جهان حدود ۲۵۰۰۰۰۰ تن بوده است. (Fish Stat, 2009) ایران در همین سال با تولید ۹۰۰۰۰ تن ماهی قزل آلا ی رنگین کمان، ۲/۱ درصد از تولید جهانی آزاد ماهیان را بخود اختصاص داده است ضمن آنکه مقام اول جهان را در زمینه میزان تولید قزل آلا در آب شیرین را دارا می باشد. از سوی دیگر، طی ده سال اخیر، روند صعودی میزان تولید ماهی قزل آلا ی 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 ۷۴۰۰ تن در سال ۱۳۸۸ رسیده است. (Fish Stat, 2009) از مهمترین کشورهای تولید کننده ماهیان خانواده سالمونیده می توان به نروژ و شیلی با تولید ۶۴۱۱۷۴ و ۵۹۸۲۵۱ تن در سال 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 کشورهای تولید کننده ماهیان سرد آبی شامل نروژ، شیلی، انگلستان، کانادا، ترکیه، دانمارک، آمریکا، فرانسه، ایران، ایتالیا می باشند. حضور ماهی قزل آلا ی رنگین کمان به عنوان تنها گونه اصلی متعلق به خانواده آزاد ماهیان در کارگاههای پرورش ماهیان سرد آبی در کشور و رشد روز افزون تولید این ماهی در ایران سبب شده است تا کشورمان در مجموع همه محیط های پرورشی در رتبه چهارم و در آب شیرین در رتبه اول کشورهای تولید کننده ماهی قزل آلا ی رنگین کمان در جهان قرار گیرد. (Fish Stat, 2009) این فعالیت از دهه ۴۰ به بعد با واردات تخم چشم زده قزل آلا ی رنگین کمان از کشور دانمارک و سپس با وارد کردن 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 آبی پروری در کشور ما مؤید دو فرآیند عملکردی مثبت است. اول این که تلاش شیلات در توسعه آبی پروری به خصوص در آب های داخلی موفقیت آمیز بوده و دوم این که آبی پروری به علت توجه اقتصادی مطلوب مورد قبول سرمایه گذاران بخش خصوصی قرار گرفته است (علیزاده، ۱۳۸۹).

۴-۱- روش های هورمونی تولید ماهیان تک جنس

روش های متعددی نیز برای استفاده از هورمون ها وجود دارد. Crim در سال ۱۹۸۵ این روش ها را به دو گروه اصلی حاد و مزمن تقسیم بندی نمود که می توان به روش هایی مانند تزریق، حمام، 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 از غذای هورمون دار (مزمن) قابل استفاده خواهد بود (Crim., 1985).
تابحال ۳ ترکیب طبیعی و ۹ ترکیب مصنوعی در مطالعات برای ماده سازی مورد استفاده قرار گرفته است. تفاوت استروژن های طبیعی و مصنوعی در سرعت متابولیسم (Folmar et al., 2000)، میزان توانایی آنها در فعال سازی گیرنده های استروژنی و تنظیم نسخه برداری ژن های ویژه استروژنی خواهد بود (Kavumpurath and Pandian, 1993). مهمترین متغیرهای کمی در کنترل جنسیت و ماده سازی ماهیان با استفاده از استروژن ها شامل زمان درمان، طول دوره درمان و میزان هورمون مصرفی خواهد بود.

۵-۱- 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 حداقل 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 حساس 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 هموعان تمایز یافته ، نسبت به اثرات درمانی استروئیدها حساس ترند (Piferrer, 2001). بدین ترتیب اگر هورمون درمانی در طول دوره labile انجام شود به حداقل زمان و کمترین میزان استروئید برای دستیابی به جنس مورد نظر نیاز می باشد. وقوع دوره labile بیانگر حوادث پیچیده در گوناها است که نمی توان آن را از لحاظ هیستولوژیک مشاهده نمود، (Nagahama, 2000) زیرا این حوادث جزء اولین علائم هیستولوژیک تمایز جنسی محسوب می گردد (Nakamura et al., 1973). بدین ترتیب این دوره باید مترادف مرحله ای باشد که ، گاهی از آن به نام تمایز جنسی فیزیولوژیک یاد می شود (Piferrer, 2001). بررسی ها بر روی دو گونه غیرخویشاوند kisutch و Onchorhincus 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 نظر گرفتن گونه ها ، دوره labile در مورد استروژن ها زودتر از این دوره در آندروژن ها به وجود می آید (George and Pandian, 1995). زمان وقوع دوره labile در گونه های مختلف متفاوت است. حتی در برخی گونه های خویشاوند نیز این دوره متفاوت می باشد. به عنوان مثال در گونه Poecilia sphenops این دوره به حدود سی روز پس از تولد نوزادان بر می گردد ، در حالیکه در گونه Poecilia reticulata این دوره در زمان جنینی قرار دارد (Kavumpurath and Pandian, 1993).

۶-۱- انواع هورمون های موثر در ماده سازی ماهیان:

امروزه هورمونهای متعددی در تغییر جنسیت ماهیان تاثیر گذار بوده، که مهمترین آنها هورمونهای استروئیدی و بویژه 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 موکسی فن می توانند ، تغییر جنسیت در ماهی را تشدید نمایند (Piferrer and Donaldson, 1993). بسیاری از انواع استروئید های ماده ساز در جدول 1 آورده شده است.

جدول ۱ - انواع هورمون های موثر در ماده سازی

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

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

۲-۱- هورمون ۱۷ بتا- استرادیول

در طی قرن های متمادی، استروژن جز هورمون های اولیه جنس ماده در نظر گرفته شده است. تحقیقات اخیر حاکی از آن است که استروژن می تواند در جنس نر ماهی نیز نقش داشته باشد (Fredrick and Goetz, 1979). قوی ترین استروژن، 17β - استرادیول می باشد، که مطالعات حاکی از این است که E_2 به سطح اسپرم باند می شود (۵۶)، که فرمول مولکولی آن $C_{20}H_{34}O_2$ ، وزن مولکول

۹-۱-هورمون تستوسترون

تستوسترون از هورمون‌های استروئیدی است، که ساختمان اصلی سازنده آن کلسترول تشکیل می‌دهد. این هورمون از سلول‌های لیدینگ در بافت بیضه ترشح می‌شود و ترشح آن توسط هورمون دیگری که از سلول‌های 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. بسیاری عقیده دارند که این هورمون عامل اصلی در تمایل افراد به پرخاشگری است. 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. میزان نرمال ترشح طبیعی تستوسترون در بدن مردان بالغ حدود ۴ تا ۹ میلی گرم در روز می‌باشد. 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 (LH، FSH) می‌گردد. این عمل باعث خواهد شد تا سطح تستوسترون در بدن به طور خودکار توسط این انفعالات به صورت خود کار تنظیم گردد (Korach, 1999).

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

اگرچه بچه ماهیانی که تازه شروع به تغذیه فعال نموده اند، با غذای حاوی ۱۷-بتا استرادیول تغذیه شوند، ماده خواهند شد. استرادیول و استرون جز استروئیدهایی هستند که به طور طبیعی در ماهیان وجود دارند. غالباً القای تغییر جنسیت در ماهیان موثرتر از استرون می‌باشد (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 می‌شود که اکثراً ماده هستند. در آزاد ماهیان دوره تمایز جنسی در دمای ۱۰°C، ۷۰-۵۰ روز بعد از اولین تغذیه می‌باشد. در خصوص قزل آلاهی 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 اقیانوس آرام بدست آمده ، نشان می دهد که با غوطه وری آلون 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 و میر آزاد ماهیان می گردد ولی کپور ماهیان نسبت به استرون ها بسیار مقاوم تر هستند ، به همین دلیل به مقدار بیشتری استرون جهت ماده زایی نیازمند هستند. ماهیان تیلاپیا اصولاً کمتر به استرون ها پاسخ می دهند ، به استثنای تیلاپای موزامبیک که با میزان ۵۰ میلیگرم در کیلوگرم هورمون در غذای مصرفی می توان اقدام به ماده زایی نمود. اصولاً استرون ها در هر میزانی 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).

جدول ۲ : 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 آلون در محلول ۲۵۰ میکروگرم در لیتر)	۱۲۰
فزل آلا یبری	۲۰ (۲ بار غوطه وری آلون در محلول ۲۵۰ میکروگرم در لیتر)	۶۰
گره ماهی کانالی	۶۰ (۲ بار غوطه وری آلون در محلول ۲۵۰ میکروگرم در لیتر)	۲۱
آزاد ماهی کوهو	۱۰ (۴ بار غوطه وری آلون در محلول ۵۰ میکروگرم در لیتر)	۷۰
ماهی طلایی	۱۰۰ (۴ بار غوطه وری آلون در محلول ۵۰ میکروگرم در لیتر)	۲۸
Medaka	۱۲۵ (۴ بار غوطه وری آلون در محلول ۵۰ میکروگرم در لیتر)	۶۰
فزل آلا ی رنگین کمان	۲۰ (۴ بار غوطه وری آلون در محلول ۵۰ میکروگرم در لیتر)	۶۰
تیلاپیا	۵۰ (۴ بار غوطه وری آلون در محلول ۵۰ میکروگرم در لیتر)	۲۰

۱۱-۱- اهداف پروژه

پرورش جمعیت های مخلوط از ماهی قزل آلا ی رنگین کمان دارای راندمان تولید گوشت کمتری از جمعیت های تک جنسی است. پرورش جمعیت های تک جنسی از ماهی قزل آلا ی 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 در مراحل مختلف پروراندی ماهیان میباشد که در کنار سایر تکنولوژی های جدید زیستی جمعیت های تک جنسی از ماهی قزل آلا ی 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 در مراحل مختلف پروراندی ماهیان میباشد. در بسیاری از گونه های 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 خرید و فروش برسد، بالغ میشوند. این دو عامل باعث تنوع بسیار زیادی در اندازه ماهیان و کاهش میزان تولید میگردد. به همین دلیل موسسات خصوصی پرورش ماهی تمایل بسیار زیادی برای تولید جمعیت های یکنواخت از ماهیان ماده دارند (Piferrer, 2001). فرآیند بلوغ جنسی در ماهی قزل آلا ی رنگین کمان که از ماهی پرورشی در مناطق معتدل دنیا می باشد، 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 در جنس نر می گردد. بلوغ جنسی این ماهی، باعث کاهش کیفیت گوشت و بروز اثرات نامطلوب در بافت و رنگ آن می گردد (Bromage and Cumaranatunga, 1988). به علاوه به هنگام بلوغ جنسی، حساسیت ماهی نسبت به عوامل بیماریزا افزایش می یابد. این تغییرات در جنس نر ماهی قزل آلا ی رنگین کمان بارزتر بوده و زودتر آشکار می شود، زیرا جنس نر حداقل یک سال زودتر از جنس ماده بالغ می گردد. (جنس نر در سن ۲ سالگی و جنس ماده در سن ۳ سالگی). بنابراین درصد قابل توجهی از ماهیان نر قبل از آن که به اندازه بازاری برسند، بالغ می گردند و علاوه بر رشد کمی که دارند، به دلیل کیفیت نامطلوب گوشت، بازارپسند آنها نیز کاهش می یابد (Solar and Donaldson, 1987). حال آن که پرورش دهندگان ماهی قزل آلا ترجیح می دهند، ماهیانی با اندازه بزرگتر تولید کنند تا بتوانند آنها را با قیمت بیشتری بفروشند. در کل دو روش اصلی برای ماده سازی ماهیان وجود دارد که شامل هورمون درمانی و درمان در طول ماده زایی می باشد که ماده سازی هورمونی با هدف استفاده از استروئیدهای جنسی در برخی گونه ها مانند آزاد ماهیان 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 بر این استفاده از استروئیدها در گونه 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 دچار تغییر شود) عدم تغییر ژنوتیپ در حقیقت این عمل اساس روشهای مستقیم ماده سازی است (Piferrer, 2001). در حال حاضر با افزایش تقاضا برای ماهیان بزرگ و هم اندازه جهت مصارف خوراکی نیاز به کنترل بلوغ جنسی در ماهیان محسوس می باشد و روشهای کنترل جنسیت در آزاد ماهیان به عنوان یک ابزار مهم مدیریتی در صنعت پرورش آبزیان دارای اهمیت است. به طور کلی نتایج حاصل از کنترل جنسیت در ماهیان با استفاده از هورمون ها را میتوان موارد زیر ذکر نمود: (الف) افزایش میزان تولید تخم از طریق پرورش ماده های واقعی (ب) جدا کردن جنسی که دارای بالاترین میزان رشد می باشد، به عنوان مثال جنس ماده در آزاد ماهیان و کپور ماهیان و جنس نر در سیکلیدها (پ) جلوگیری از بلوغ زودرس در ماهیان که باعث از بین رفتن و کاهش وزن لاشه می شود (ت) افزایش میزان و فروش ماهی در تمام طول سال و بالا بردن 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 ۱۷ بتا استرادیول در ماهی قزل آلا ی رنگین کمان

۳- مقایسه میزان هورمون ۱۷ بتا استرادیول در ماهی قزل آلا ی رنگین کمان غذا دهی شده با هورمون و شاهد

۲- مواد و روشها

۲-۱- شرایط اکولوژیک محل اجرای پروژه

کلیه مراحل میدانی و مراحل 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 مرکز چشمه ای می باشد که در طول سال دارای دبی نسبتاً ثابت و دمای ۱۰-۱۲ درجه سانتی گراد است. این مرکز در ارتفاع ۱۸۵۰ متر از سطح دریا واقع شده و مقدار اکسیژن آب به هنگام اشباع، ۷-۹ میلی گرم در لیتر می باشد (شکل ۲). دبی آب مرکز بین ۱۵۰ تا ۳۵۰ لیتر در ثانیه متغیر می باشد. 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 و گنادی) پروژه در مرکز ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردابی 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 بین ۴ تا ۶ کیلوگرم بود. از تعداد ۲ ماده و ۵ نر برای انجام عملیات لقاح استفاده شد و پس از لقاح ۸۰٪ تخم های سبز، به تخم چشم زده تبدیل شد. 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 ساپروولگنیا، تخم های سبز با بتادین ۱۰٪ بدون ید روزانه ضد عفونی شده و تا مدتی پس از تخم گشایی از نور مستقیم محافظت می شدند. میانگین قطر تخم های چشم زده حدود ۵mm ± 0.5 است و وزن هر ۱۰-۱۱ عدد آنها یک گرم بود. وزن لاروهای دارای کیسه زرده بعد از تخم گشایی ۱۲۵-۱۲۰ mg و با میانگین 122 ± 2 بود.

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

غذای مورد نیاز خوراک آبزیان در اوزان مختلف از کارخانجات تولید غذای کنسانتره تهیه گردید. لاروها تا رسیدن به وزن ۲ گرم از غذای شرکت بیومار محصول کشور فرانسه استفاده کرده و در اندازه‌های انگشت قد، پیش پروراری خوراک ماهی از کارخانه چینه تهیه شد. آرد ماهی، روغن ماهی، آرد کریل، پروتئین‌های هموژنیزه شده ماهی، آرد گندم، لسیتین، نشاسته، ویتامین‌ها و مواد معدنی و آنتی اکسیدان‌ها مواد تشکیل دهنده خوراک گروه Bio-optimal شرکت بیومار است. برای تغذیه مرحله لاروی از سه اندازه غذای 1.1، 0.05، 0.03 استفاده شد (www.biomar.net). بدین ترتیب، مقدار ۴۰ میلی گرم از هورمون ۱۷ بتا استرادیول مورد نیاز به صورت پودر خالص از شرکت داروسازی ابوریحان تهیه می‌شود. غذای مورد نیاز برای تغذیه ماهیان، از غذای اکستروود بیومار استفاده می‌شود. در این پروژه برای استفاده از هورمون ۱۷ بتا استرادیول در غذای ماهیان تجویز هورمون خوراکی انجام می‌شود (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 می‌گردد، سپس محلول الکل و هورمون توسط اسپری دستی به دقت بر روی غذای کنسانتره اسپری می‌شود. این کار چندین دفعه صورت گرفت تا هورمون کاملاً با تمام غذا مخلوط گردد. پس از تبخیر الکل، غذای حاوی هورمون در ظروف درب‌دار ریخته شده و پس از اتمام این مرحله غذا کاملاً در هوای اتاق خشک گردیده و داخل ظروف دربسته در یخچال نگهداری شد (حسین زاده صحافی و همکاران، ۱۳۹۰).



شکل ۳- مراحل اضافه نمودن هورمون به غذا

۴-۲- انجام عملیات بیومتری و تگ زنی

آزمایشات بر روی ۷۰ قطعه ماهی ماده با وزن تقریبی 11 ± 10 گرم در قالب ۷ تیمار زمانی (۰، ۵، ۱۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۶۸ ساعت) که با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت صدم گرم توزین گردیدند و از نظر وضعیت ظاهری و سلامت کاملاً 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 در قالب 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.



شکل ۵- 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 آنورت پستی	۴۰
۷۰	۱	خونگیری از آنورت پستی	۴۰
۷۰	۴	خونگیری از آنورت پستی	۴۰
۷۰	۸	خونگیری از آنورت پستی	۴۰
۷۰	۱۲	خونگیری از آنورت پستی	۴۰
۷۰	۲۴	خونگیری از آنورت پستی	۴۰
۷۰	۱۶۸	خونگیری از آنورت پستی	۴۰
۱۰	تک جنس ماده ۱۰۰ گرمی	خونگیری از آنورت پستی	۴۰
۱۰	۰ (شاهد)	خونگیری از آنورت پستی	۴۰

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 میکرو سانتریفیوژ ۱/۵ ml منتقل گردید. نمونه های خون نیز تا پایان خون گیری و قبل از سانتریفیوژ در کنار یخ نگه داری شدند. در پایان برای جداسازی سرم از دستگاه سانتریفیوژ 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.



شکل ۶- عملیات خونگیری

۶-۲- روش سنجش هورمونی

غلظت هورمون های (تستوسترون، ۱۷ بتا استرادیول و پروژسترون) در پلاسما به روش رادیوایمونواسی (RIA) با استفاده از کیت تجاری ImmunoTech (RIA kit ^{125}I ، فرانسه) اندازه گیری شد (Ottobre et al, 1989). برای این کار ابتدا نمونه ها 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 طور که مشاهده میشود، تیوب ها پس از ورتکس نمودن، به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق نگه داری شدند و سپس محتوای تیوب ها خالی و با سروته قرار دادن آن ها بر روی کاغذ خشک کن به مدت ۲ دقیقه، اجازه داده شد مایع درون آن ها کاملاً خارج گردد. پس از خشک شدن تیوب ها، مقدار تشعشعات گامای آن ها در دستگاه شمارنده گاما مدل LKB2 (فنلاند) اندازه گیری شد. دستگاه پس از قرار دادن تیوب ها در محل

تعبیه شده به صورت کاملاً خودکار آن 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 اندازه گیری غلظت مواد بیولوژیک از جمله هورمون‌ها، در مقادیر بسیار کم (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 ید ^{125}I می باشد. اگر چه ایزوتوپ‌های دیگری مانند کربن ^{14}C و تریتیوم (^3H) 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 متصل شده به آنتی بادی از آنتی‌ژن نشان دار آزاد جدا می‌شود. میزان آنتی‌ژن نشان دار متصل شده 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 می‌کند که چه مقدار اشعه گاما از تیوب‌ها ساطع شود.

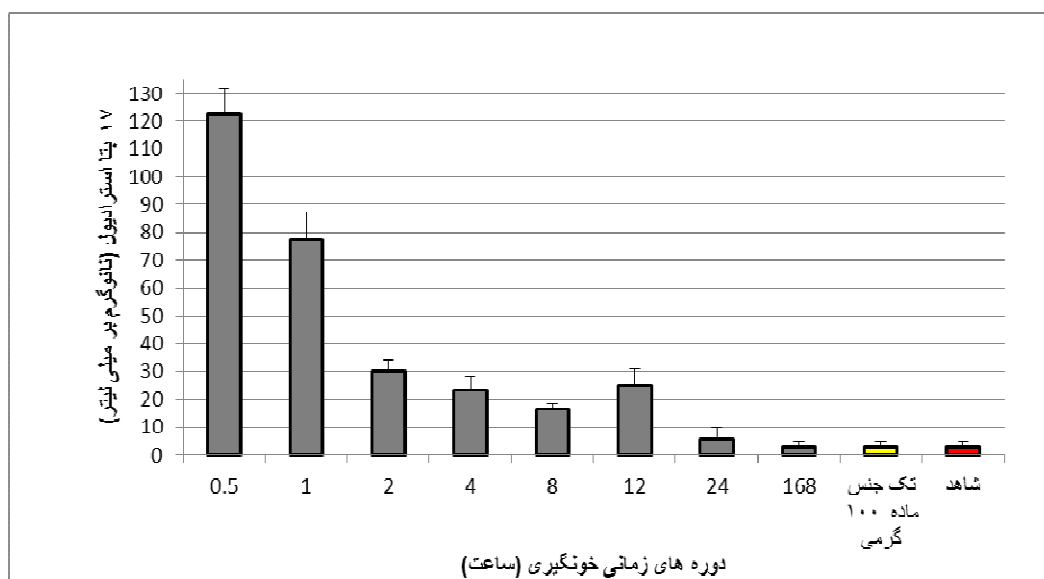
۲-۲- روش آماری

اطلاعات بدست آمده از سنجش هورمون‌ها در پلاسمای خون ماهیان پس از ورود در محیط نرم افزاری 2007 Excell توسط برنامه آنالیز آماری SPSS 17 و روش آنالیز و واریانس یک طرفه (one way Anova) برای مقایسه اختلاف بین گروه‌های آزمایشی (01/0) $p \leq$ 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

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

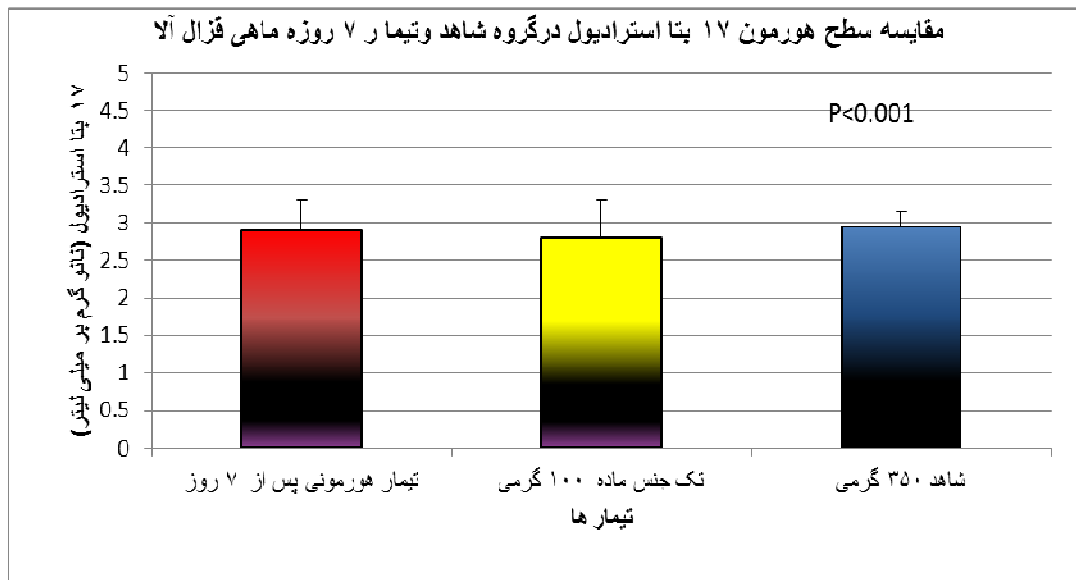
نتایج حاصل از سنجش هورمون ۱۷ بتا استرادیول در دوره ۳۰ روز آزمایش در نمودار ۱ آمده است. نتایج نشان داد، که مقدار هورمون ۱۷ بتا استرادیول در دوره های زمانی ۰/۵ و ۱ افزایش معنی داری در مقایسه با گروه شاهد دارد ($P < 0.001$).



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 9 ± 121 نانوگرم بر میلی لیتر و کمترین آن مربوطه به تیمار ۱۶۸ ساعت و شاهد با مقدار متوسط $0,9 \pm 3$ نانوگرم بر میلی لیتر بود. مقدار هورمون ۱۷ بتا استرادیول در چهار ساعت اولیه به شدت کاهش یافته و به کمتر از ۲۵ درصد (2 ± 23 نانوگرم بر میلی لیتر) و سپس با روند آهسته تری تا ۱۶۸ ساعت بعدی کاهش نشان می دهد ($0,9 \pm 3$ نانوگرم بر میلی لیتر) که کاهش معنی دار در سطح پلاسمایی هورمون ۱۷ بتا استرادیول با گذشت زمان در ماهی قزل آلا رنگین کمان مشاهده شد و اختلاف معنی دار بین تیمار های زمانی نمونه برداری مشاهده شد ($P < 0.001$).

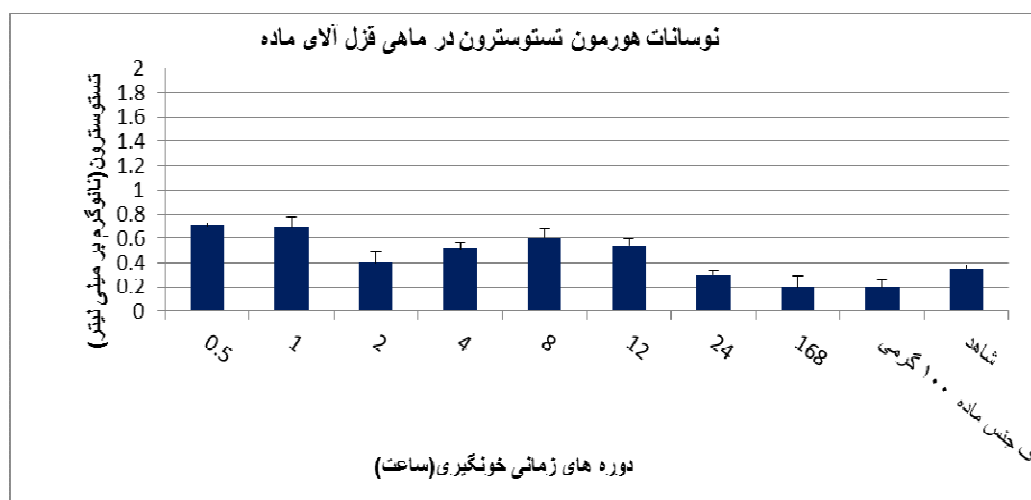
در این بررسی بین سطح پلاسمایی هورمون ۱۷ بتا استرادیول در تیمار های شاهد و تیمار خونگیری شده در ساعت ۱۶۸ و همچنین سطح پلاسمایی این هورمون در ماهیان تک جنس شده ماده ۱۰۰ گرمی اختلاف معنی دار مشاهده نگردید ($P>0.001$).



نمودار ۲-مقایسه سطح هورمون ۱۷-بتا -استرادیول با گروه شاهد (n=10)

۲-۳- هورمون تستوسترون

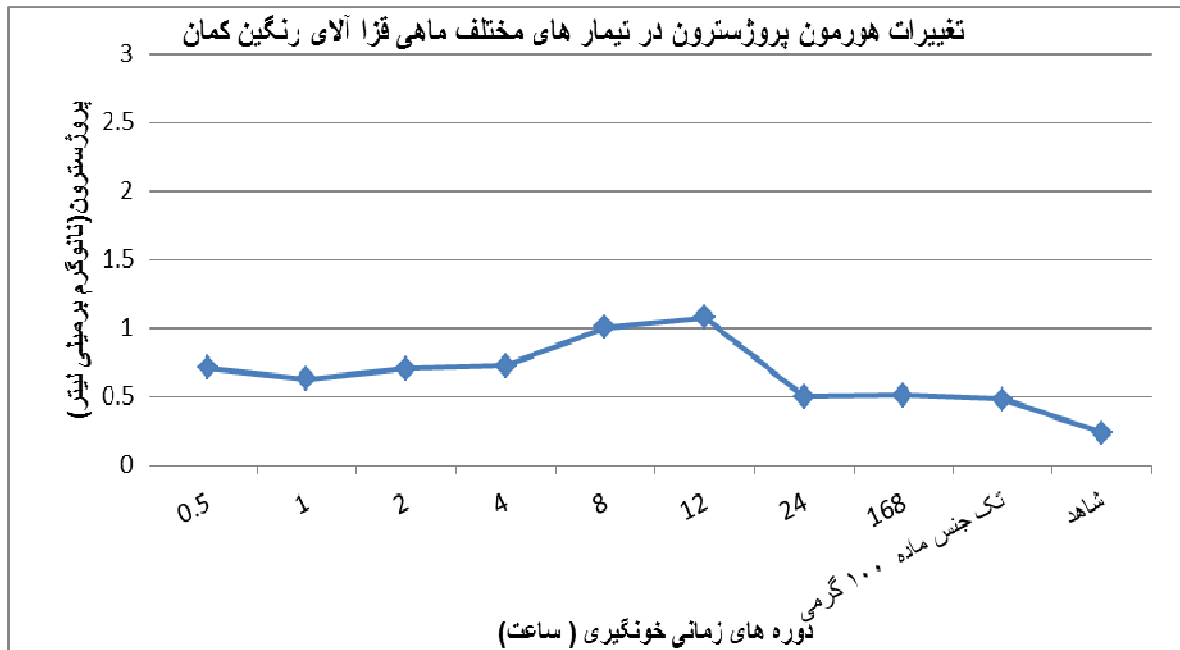
نتایج حاصل از سنجش هورمون تستوسترون در دوره ۳۰ روز آزمایش در نمودار ۲ آمده است. نتایج نشان داد، که مقدار هورمون تستوسترون در دوره های زمانی ۵/۰ و ۱۰ اختلاف آماری معنی داری در مقایسه با گروه شاهد دارد ($P<0.001$).



نمودار ۳- 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 ۱۰۰ گرمی 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 ۴- 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 هورمون مذکور بین ماهی های تک جنس شده قبلی و ماهی های قزل آلا در تیمار ۱۶۸ 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 ($P < 0.001$).

۴- بحث

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

در مصرف استروئید های جنسی در آبرزی پروری این نگرانی وجود دارد که بقایای هورمونی در ماهیانی 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 غیر قابل 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 (*Oreochromis mossambicus*) و قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در مدت کمتر از ۲۴ ساعت در آب آزاد گردید. در این آزمایش ماهیان جوان تیلاپیا و قزل آلائی رنگین کمان را با هورمون ۱۷-آلفا - متیل تستوسترون که توسط ترتیوم نشان دار شده بود تغذیه نموده و مقادیر کاهش رادیواکتیویته از بافت های بدن آنها را اندازه گیری نمودند. میزان رادیواکتیویته باقی مانده ۸، تا ۱۲ ساعت بعد از خاتمه تجویز هورمون زیاد بوده و تا اندازه زیادی (بیش از ۹۵ درصد) منحصر به امعا و احشا بود. پس از آن مقدار آن هم از بافت و هم از گوشت به سرعت کاهش یافته و بعد از ۱۰۰ ساعت فقط کمتر از ۱ درصد مقدار اولیه در تمام بدن باقی ماند.

از طرفی مقایسه مقادیر ۱۷-آلفا - تستوسترون موجود در داروهای انسانی به میزان ۱۰ تا ۵۰ میلی گرم در روز با مقادیر مصرفی جهت تغییر جنسیت ماهیان، نشان می دهد که بیان خطرناک بودن مصرف ماهیان بالغی که در دوره جوانی و در شرایط طبیعی تحت تجویز این استروئید قرار داشته اند منطقی نباشد، مگر اینکه مقادیری از هورمون که از طریق غذای خورده نشده و ترشحات ادرار و مدفوع به مقداری هم پس مانده هورمون که از مراحل غوطه وری در تانک ها به سیستم آبی رها می شوند. هم اکنون در بسیاری از کشورها 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).

جدول ۴: سطوح رادیواکتیویته Bq/100 mg در بافت احشایی و لاشه در قزل آلای رنگین کمان پس از تجویز خوراکی 17-M (اقتباس از (Johnston et al., 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: مقادیر غیر قابل اندازه گیری

در اواخر دهه ۱۹۳۰ و اوایل دهه ۱۹۴۰ میلادی مشخص گردید که غدد تناسلی ماهیان می تواند تحت تاثیر هورمون ها قرار گیرد. بدین صورت افزایش ظهور یک جنس با ویژگیهای خاص فیزیولوژیک، مورفولوژیک و اتیولوژیک در پرورش ماهیان مزایای فراوانی به دنبال داشته باشد (Schreck, 1974). برخی از نتایج حاصل از کنترل جنسیت (ماده سازی) در ماهیان را می توان افزایش تعداد تخم و بچه ماهی در صورت ایجاد و پرورش ماده های 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 استروژن ها 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 گونه های تفکیک جنسیت شده (Gonochorist) مطالعه صورت گرفته است گرچه نمونه هایی از تاثیر استروژن، بر ماهی دهان گرد رودخانه ای 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 بر گزارش یامازاکی ثبات جنسیت در ماهیان تغییر جنسیت یافته قزل آلای رنگین کمان را تا سن ۲ سالگی گزارش نموده اند. بنا بر گزارش ناگی ثبات جنسی در ماهیان کپور معمولی که به وسیله هورمون تغییر جنسیت 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 صادر می 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 تغییر جنسیت ماهی تنها در یک محدوده زمانی، قابل اجراست و در خارج از این محدوده ی زمانی تغییر جنسیت فنوتیپی امکان پذیر نخواهد بود. تجویز هورمونی در ماهیان به روش های مختلفی انجام می گیرد (ابراهیم زاده ۱۳۸۶). این روش ها به دو گروه سریع و مدت دار یا کند تقسیم بندی می شوند. روش سریع معمولاً برای گونه هایی مورد استفاده قرار می گیرد که فرآیند تمایز جنسی کمی بعد از تخم گذاری به وقوع می پیوندد، مانند اکثر آزاد ماهیان (Crim, 1985).

مطالعات نشان می دهد ماهی آزاد چینوک در زمان تخم گذاری به هورمون های با منشأ خارجی حساس نیست (Baker et al., 1987). این موضوع نشان می دهد حتی در گونه هایی که خویشاوندی نزدیکی با یکدیگر دارند دوره "labile" می تواند متفاوت باشد. Piferrer (2001) معتقد است دوره "labile" در قزل آلا ی رنگین کمان همزمان با شروع جذب کیسه زرده و شروع شنای فعال همراه خواهد بود. بدین ترتیب، مصرف خوراکی هورمون همزمان با شروع تغذیه فعال به مدت یک ماه، همزمان با دوره حساس تمایز جنسی در قزل آلا می باشد.

هورمون ۱۷ بتا استرادیول (E_2) به عنوان یک استروئید طبیعی یکی از متداول ترین استروژن ها برای القای جنسیت ماده از ماهیان می باشد و نسبت به استرون (E_1) و ۱۷ آلفا اتینیل استرادیول (EE_2) دارای اثرات ماده سازی موثرتر بوده و به اندازه این دوهورمون تاثیرات منفی بر میزان بازماندگی ندارد. نتایج تحقیقات قبل نشان داد، دوز بهینه (۴۰ میلی گرم بر کیلو گرم غذا) از هورمون 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 در مورد از بین رفتن و رفع استروئیدهای خارجی که در مراحل تمایز جنسی استفاده می شود انجام گرفته است. استروئیدهای جنسی پس از متابولیسم در کبد، دفع می شوند (Piferrer, 2000). در آزمایش دیگری که ماهیان تیلاپپای بالغ تحت تزریق وریدی H-17-MT قرار گرفته بودند، بیشترین مقدار هورمون در کیسه شنا و کبد وجود داشت (Johnston, 1983). همچنین در مطالعات مربوط به استفاده از ۱۷-آلفا-متیل-تستوسترون به عنوان یک عامل آنابولیک در پرورش ماهی آزاد کوهو *Oncorhynchus* Kisutch که توسط Fugerlund و Dye در سال ۱۹۷۹ انجام گرفت، مشاهده گردید که مقدار رادیو اکتیویته 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., 1979). درحقیقت مقادیرهورمون ۱۷-بتا-استرادیول و ۱۷-آلفا-متیل تستوسترون که رایج ترین هورمون های مورد استفاده برای تغییر جنسیت در ماهیان می باشند، فقط ۵ روز پس از قطع هورمون از غذا، به حدی کاهش می یابد که مقدار آن قابل اندازه گیری نمی باشد (Bromag and cumarantungo, 1988). به علاوه استروئید ها را نوعا در ماهیان جوان و سال ها قبل از مصرف تجویزی می کردند و همچنین مقادیر استروئید استفاده شده کم و نیمه عمرشان نیز کوتاه است. نیمه عمر استرادیول در ماهی قزل آلا ی رنگین کمان یک ساله، کمتر ۱۲ ساعت (Hunter & Donaldson, 1983) و نیمه عمر تستوسترون، ۲/۵ تا ۳/۵ ساعت گزارش شده است (فرهمند، ۱۳۷۲).

با وجود اینکه تعداد هورمون مصرفی توسط هر ماهی کم بوده و سریعاً از بدن ماهی دفع می گردد و از این لحاظ مصرف این گونه ماهیها توسط انسان مشکل خاصی را بوجود نمی آورد (Thomas و همکاران، 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.

Correlation LOD

No. Compound Regression equation coefficient (mg/kg)

1 Estriol $Y = 8.096 \times -0.824$ 0.9998 0.5

2 Prednisolone $Y = 17.418 \times -2.088$ 0.9999 0.2

3 Hydrocortisone $Y = 15.746 \times -1.518$ 0.9999 0.3

4 Prednisone $Y = 20.192 \times -2.152$ 0.9998 0.2

5 Methylprednisolone $Y = 16.986 \times -1.894$ 0.9999 0.4

6 Betamethasone $Y = 20.439 \times -1.106$ 0.9997 0.2

7 Dexamethasone $Y = 20.176 \times -2.176$ 0.9999 0.2

8 Triamcinolone acetate $Y = 16.374 \times -1.558$ 0.9997 0.4

9 Gestrinone $Y = 6.370 \times -0.668$ 0.9998 1.0

10 Prednisolone acetate $Y = 15.589 \times -1.627$ 0.9999 0.4

11 Hydrocortisone acetate $Y = 15.051 \times -1.584$ 0.9999 0.4

12 Prednisone acetate $Y = 24.106 \times -2.401$ 0.9997 0.2

13 Estradiol $Y = 8.709 \times -0.635$ 0.9999 0.8

14 Cortisone acetate $Y = 19.826 \times -2.336$ 0.9996 0.4

15 Methyltestosterone $Y = 19.980 \times -2.209$ 0.9996 0.3

Estrone $Y = 10.701 \times -0.847$ 0.9999 0.4 ۱۶

منابع

- سالنامه آماری شیلات، ۱۳۹۲.
- ستاری و معتمد، ۱۳۷۶. بیوتکنولوژی در آبرزی پروری، تغییر جنسیت ماهی. مرکز نشر دانشگاهی.
- علیرزاده 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، ۱۰۱ ص.
- حسینی، ا. ۱۳۷۳. بررسی کاربرد هورمونها در تغییر جنسیت قزل آلا ی رنگین کمان. پایان نام کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی. ۱۰۴ ص.
- حسین زاده صحافی، ه.، ۱۳۸۰. بیولوژی تولید مثل ماهی با تأکید بر ماهیهای ایران. مؤسسه نشر جهاد وابسته به جهاد دانشگاهی واحد تهران، ۲۷۲ ص.
- حسین زاده صحافی، ه. و همکاران، ۱۳۹۰. ایجاد تک جنس ماده قزل آلا ی رنگین کمان به روش مستقیم با استفاده از هورمون ۱۷ بتا استرادیول، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور.
- رعنا ی اخوان، س. و همکاران، ۱۳۹۰. تاثیر کاشت سطوح مختلف هورمون ۱۷ بتا استرادیول، بر روند رشد و توسعه گنادی و متابولیت های سرم در فیل ماهیان پرورشی، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه گیلان، ۸۲ ص.
- 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 DFO/Syndel 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. (Eds.), 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 tshawytscha*) by immersion of alevins in a solution of estradiol -17- β . *Aquaculture*, vol. 53, Issues 3-4, pp: 243-302.
- Johnstone, R., Macintosh, D.J., Wright, R.S., 1983. Elimination of orally administered 17 α -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. 2006. Estradiol Acts as a Germ Cell Survival Factor in the Human Testis in vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* ,57-67.
- Piferrer, F., Donaldson, E.M., 1989. Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. *Aquaculture* 77, 251–262.
- 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 17 α -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 publishing 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. (Eds.), *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. *Biostatistical Analysis*. Prentice 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 and 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**