

بررسی مورفولوژی غدد جنسی در ماهی قزل آلاي رنگين کمان *Oncorhynchus mykiss* پس از تجویز هورمون ۱۷آلفا- متیل تستوسترون به دوروش خوراکی و/یا غوطه وری

مهندس مریم طلا^{۱*} دکتر فرهاد امینی^۲ دکتر سید محمد رضا فاطمی^۳

دریافت مقاله: ۲۴ تیرماه ۱۳۸۳
پذیرش نهایی: ۱۰ اردیبهشت ماه ۱۳۸۴

Morphological Study of Gonads of Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) after Administration of 17- α -Methyl Testosterone Via Feed and/or Immersion

Tala, M.¹, Amini, F.², Fatemi, M. R.³

¹Aquaculture Department, Iranian Fisheries Company, Tehran-Iran.

²Department of aquatic animal health and diseases, University of Tehran, P.O. Box 14155-6453, Tehran- Iran. ³Department of Marine Biology, Science and Research Branch of Islamic Azad University, Tehran-Iran.

Objective: To study the morphology of gonads and sperm ducts of sex reversed male rainbow trout after administration of 17- α -methyl testosterone.

Animals: Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*.

Procedure: 17- α -methyl testosterone (17- α -MT) was administered to rainbow trout in 5 treatments as follows: I) two times immersion of eyed eggs and yolk sac alevins in 250 μ g/l bath with 2 hours duration and 8 days interval. II) three times immersion of eyed eggs and yolk-sac alevins in 250 μ g/l bath with 2 hours duration and 4 days intervals. III) two times immersion of eyed eggs and yolk sac alevins in 250 μ g/l bath with 2 hours duration and 8 days interval plus oral administration of 3ppm 17- α -MT starting from active feeding of larvae for 90 days. IV) oral administration of 3ppm 17- α -MT starting from active feeding of larvae for 70 days. V) oral administration of 30ppm 17- α -MT starting from active feeding of larvae for 120 days. In addition, a control group was maintained with no hormonal treatment. 20 fishes from each treatment as well as control groups were examined morphologically for their reproductive organs at the age of 24 months.

Results: A range of normal to totally atrophic reproductive organs was observed in different treatment groups. Four types of sperm ducts were detected ranging from normal open-ended sperm ducts containing fluid semen, close-ended sperm duct containing fluid semen, close-ended sperm duct lacking fluid semen, to close-ended atrophic sperm duct with no semen. The highest number of functional males with the ability of production of fluid sperm was found in treatment II.

Conclusion: 17- α -MT administration in an optimal dosage and route to female rainbow trout can produce functional males with the ability of normal sperm production although the gonads and sperm ducts may be affected morphologically.

J.Fac.Vet.Med. Univ. Tehran. 61,1:91-99,2006.

Keyword: rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, sex reversal, masculinization, sterilization, 17- α -methyl testosterone.

Corresponding author's email: famini@ut.ac.ir

هدف: بررسی مورفولوژی غدد جنسی و مجاری اسپرم بر ماهیان قزل آلاي رنگين کمانی که به منظور تغییر جنسیت به نر و یا عقیمی تحت تجویز هورمون ۱۷آلفا- متیل تستوسترون قرار گرفته بودند.

طرح: مطالعه توصیفی.

حیوانات: ماهی قزل آلاي رنگين کمان.

روش: تجویز هورمون ۱۷آلفا- متیل تستوسترون در ۵ تیمار به شرح زیر: ۱) دونوبت غوطه وری تخمهای چشم زده و لاروهای دارای کیسه زرده در حمام هورمون ۱۷آلفا- متیل تستوسترون به مقدار ۲۵۰ میکروگرم در لیتر به مدت دوساعت با فاصله ۸ روز، ۲) سه نوبت غوطه وری تخمهای چشم زده و لاروهای دارای کیسه زرده در حمام هورمون ۱۷آلفا- متیل تستوسترون به مقدار ۲۵۰ میکروگرم در لیتر به مدت دوساعت با فواصل ۴ روز، ۳) دونوبت غوطه وری تخمهای چشم زده و لاروهای دارای کیسه زرده در حمام هورمون به مقدار ۲۵۰ میکروگرم در لیتر به مدت دوساعت با فاصله ۸ روز + تجویز خوراکی هورمون به لاروها به مقدار ۳ppm از زمان شروع تغذیه فعال به مدت ۹۰ روز، ۴) تجویز خوراکی هورمون به لاروها به مقدار ۳ppm از زمان شروع تغذیه فعال به مدت ۷۰ روز، ۵) تجویز خوراکی هورمون به لاروها به مقدار 30ppm از زمان شروع تغذیه فعال به مدت ۱۲۰ روز (برای ایجاد عقیمی)، یکگروه شاهد که هیچ هورمونی دریافت نکردند نیز نگهداری شدند. سپس بررسی شکل غدد جنسی و مجاری اسپرم بر ۲۰ عدد ماهی از هر گروه تیمار و شاهد در سن ۲۴ ماهگی و تعیین تعداد ماهی نر کاری در هر تیمار.

نتایج: غدد جنسی ماهیان تحت بررسی در گروههای تیمار مختلف دامنه ای از طبیعی تا کاملاً اتروفیک را نشان دادند. چهار نوع مجاری اسپرم بر مشاهده گردید: مجاری اسپرم بر با انتهای باز و حاوی اسپرم سیال، مجاری اسپرم بر با انتهای بسته و حاوی اسپرم سیال، مجاری اسپرم بر با انتهای بسته و فاقد اسپرم سیال، مجاری اسپرم بر اتروفیک با انتهای بسته و فاقد اسپرم. بیشترین تعداد ماهیان نر کاری با توانایی تولید اسپرم سیال در تیمار ۲ یافت گردید.

نتیجه گیری: در صورت تجویز مقدار بهینه هورمون ۱۷آلفا- متیل تستوسترون از راه مناسب به ماهیان ماده قزل آلاي رنگين کمان می توان به ماهیان نر تغییر جنسیت یافته ای دست یافت که به طور طبیعی قادر به تولید اسپرم می باشند هر چند که ممکن است از نظر مورفولوژی غدد جنسی و مجاری اسپرم بر آنها تغییراتی یابند. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۵، دوره ۶۱، شماره ۱، ۹۹-۹۱.

واژه های کلیدی: قزل آلاي رنگين کمان، تغییر جنسیت، نرسازی، عقیم سازی، ۱۷ آلفا- متیل تستوسترون.

(۱) معاونت تکثیر و پرورش آبزیان شرکت سهامی شیلات ایران.

(۲) گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.

(۳) گروه شیلات و بیولوژی دریا و واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی.

(* نویسنده مسؤول: famini@ut.ac.ir)



جدول ۱- تیمارهای مورد آزمایش برای بررسی مورفولوژی غدد جنسی و مجاری اسپرم بر پس از تجویز هورمون ۱۷آلفا- متیل تستوسترون در ماهی قزل آلا رنگین کمان.

ردیف	شماره تیمار	نوع تیمار	مقدار تجویز هورمون
۱	A1	دو نوبت غوطه وری دو ساعته تخمهای چشم زده و لاروهای دارای کیسه زرده در حمام هورمون با فاصله ۸ روز	۲۵۰ میکرو گرم در لیتر
۲	A2	سه نوبت غوطه وری دو ساعته تخمهای چشم زده و لاروهای دارای کیسه زرده در حمام هورمون با فاصله ۴ روز	۲۵۰ میکرو گرم در لیتر
۳	A3	دو نوبت غوطه وری تخمهای چشم زده و لاروهای دارای کیسه زرده در حمام هورمون با فاصله ۸ روز و هر نوبت به مدت ۲ ساعت + تجویز خوراکی هورمون به لاروها از زمان شروع تغذیه فعال به مدت ۹۰ روز	۲۵۰ میکرو گرم در لیتر + ۳ ppm
۴	A4	تجویز خوراکی هورمون به لاروها از زمان شروع تغذیه فعال به مدت ۷۰ روز	۳ ppm
۵	A5	تجویز خوراکی هورمون به لاروها از زمان شروع تغذیه فعال به مدت ۱۲۰ روز	۳۰ ppm
۶	شاهد	--	--

حاصل بر روی غذا اسپری می شد. جدول ۱ تیمارهای مورد استفاده را نشان می دهد. یک گروه شاهد نیز بدون دریافت هورمون نگهداری گردید. بعد از پایان دوره تجویز هورمون، ماهیان برای رسیدن به اندازه مناسب و رشد کامل غدد جنسی تا سن ۲۴ ماهگی با غذای فاقد هورمون تغذیه شدند. سپس برای بررسی تاثیر هورمون بر مورفولوژی غدد جنسی و مجاری اسپرم بر، تعداد ۲۰ ماهی از هر تیمار و نیز گروه شاهد به طور تصادفی صید گردید. طول و وزن هر یک از ماهیان به ترتیب با استفاده از تخته بیومتری (دقت: میلیمتر) و ترازوی دیجیتال (دقت: دهم گرم) اندازه گیری شد. به منظور تشخیص ماهیان نری که به طور طبیعی قادر به خارج ساختن اسپرم از طریق مجاری اسپرم بر بودند، تمام ماهیان صید شده مربوط به هر تیمار، تحت معاینه شکمی قرار گرفتند. سپس جهت بررسی تاثیر هورمون در مورفولوژی غدد جنسی و مجاری اسپرم بر، شکم هر یک از آنها برش داده شد و مورد بررسی واقع گردید.

نتایج

در این بررسی تنوع جالبی در شکل غدد جنسی ماهیان نمونه مشاهده شد که به چهار گروه تقسیم گردید:

گروه ۱- ماهیان نر کاری که غدد جنسی با ساختار مشخص بیضه داشتند که همگی حاوی اسپرم سیال بودند. بیضه هایی که در این گروه یافت گردیدند، خود به دو دسته اصلی تقسیم شدند:

۱-۱- بیضه هایی که شکل طبیعی داشتند (تصویر ۱).

۲-۱- بیضه هایی که شکلهای غیر طبیعی داشتند. این بیضه ها که غالباً

بروز تغییرات فصلی در ترکیب لاشه و اختلاف اندازه ماهیان پرورشی که با فرا رسیدن بلوغ جنسی ایجاد می شود موجب می گردند که پرورش دهندگان نتوانند به کیفیت و ویژگیهای مورد نظر محصول در بازارهای خرده فروشی دست یابند. از آنجا که این مشکلات در قزل آلا رنگین کمان غالباً مربوط به جنس نر است، لذا تولید جمعیت های تک جنسی ماده در مورد این ماهی، مورد توجه می باشد (۱۴، ۱۲، ۷). اولین مرحله برای تولید یک جمعیت تک جنسی ماده، انجام تغییر جنسیت در یک جمعیت مخلوط از ماهیان نر و ماده است زیرا هیچ راه عملی برای تشخیص جنسیت نوزادان در مرحله تغذیه فعال و جود ندارد (۱۴). به این منظور نوزادان ماده در هنگام تمایز جنسی فیزیولوژیک توسط تجویز متیل تستوسترون نرسازی می شوند (۴). در این ماهیها، بیضه ها رشد کرده و خصوصیات ثانویه جنس نر بروز می نماید، در حالی که ساختار ژنتیکی آنها هنوز ماده (XX) می باشد. این ماهیان هوموگامتیک، نر کاری (واجد اسپرم سیال) بوده و می توانند به هنگام بلوغ اسپرم تولید نمایند. اگر چه این ماهیان نر تغییر جنسیت یافته در زمان بلوغ، دارای مشخصات ثانویه پیشرفته خوبی هستند، اما اکثر آنها دارای مجاری اسپرم بر مسدود یا ناقص بوده و برخی فاقد آن می باشند. در نتیجه، عموماً این ماهیان قادر به اسپرم ریزی طبیعی نبوده و برای اسپرم گیری ناگزیر باید شکم آنها شکافته شده و بیضه های آنها برداشته شود. لقاح تخمکهای طبیعی با اسپرم حاصل از ماهیان نر تغییر جنسیت یافته، موجب تولید زاده های تماماً ماده (XX) در نسل دوم می شود، زیرا اسپرماتوزویدهای مورد استفاده، حاوی هیچ کروموزوم Y نمی باشند (۹، ۱۲، ۱۴، ۱۵). تاکنون مطالعات زیادی در خصوص تغییر جنسیت در ماهیان انجام شده است. این مطالعات در ایران از اوایل دهه ۱۳۷۰ آغاز و تغییر جنسیت در ماهی کپور معمولی و قزل آلا رنگین کمان انجام گردید (۴، ۵، ۶، ۱). اما تغییرات ایجاد شده در مورفولوژی غدد جنسی ماهیان پس از تجویز استروئیدهای جنسی و بعد از بلوغ مورد توجه چندانی واقع نشده است. این پژوهش با هدف بررسی تغییرات غدد جنسی پس از تجویز هورمون ۱۷آلفا- متیل تستوسترون در ماهی قزل آلا رنگین کمان انجام گردید.

مواد و روش کار

پژوهش حاضر در مرکز تکثیر شهید باهنر کلاردشت انجام پذیرفت. برای انجام این بررسی، تخمهای چشم زده و لاروهای دارای کیسه زرده از مرکز تکثیر شهید باهنر، هورمون به صورت پودر خالص از شرکت داروسازی ابوریحان و غذای مورد نیاز در اندازه های SFT و FFT از کارخانه چینه تهیه گردید. برای تجویز هورمون ۱۷آلفا- متیل تستوسترون از دوز ۱۰۰ غوطه وری و تجویز خوراکی هورمون استفاده شد. در روش غوطه وری، مقادیر مورد نیاز هورمون پس از حل شدن در الکل اتیلیک به آب اضافه شده و سبدهای حاوی تخمهای چشم زده یا لاروهای دارای کیسه زرده درون محلول حاصل غوطه ور می گردید. در روش تجویز خوراکی هورمون نیز مقادیر مورد نیاز هورمون پس از توزین، در الکل اتیلیک حل شده و محلول





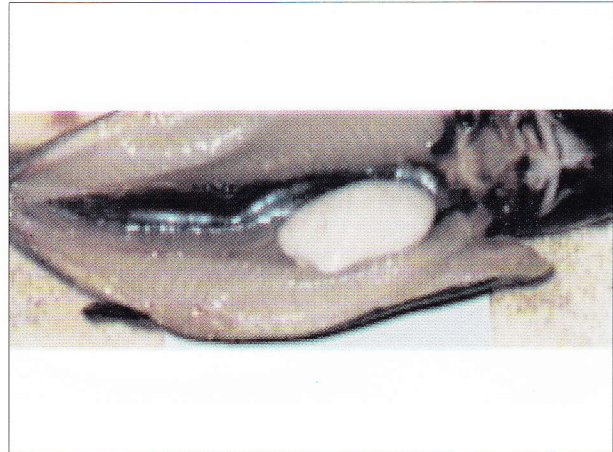
تصویر ۲- بیضه‌های غده‌ای شکل و فاقد مجاری اسپرم بر (تیمار A1، طول کل: ۳۵ سانتیمتر، وزن: ۶۸۳ گرم).



تصویر ۱- غدد جنسی و مجاری اسپرم بر طبیعی (تیمار A3، طول کل: ۲۷ سانتیمتر، وزن: ۳۴۷ گرم).



تصویر ۴- تخمدان توسعه یافته در ماهی ماده (تیمار A3، طول کل: ۲۶ سانتیمتر، وزن: ۳۱۴ گرم).



تصویر ۳- یک بیضه متورم و غده‌ای شکل فاقد مجاری اسپرم بر که فقط در یک پهلوی ماهی تشکیل شده است. (تیمار A2، طول کل: ۲۸ سانتیمتر، وزن: ۳۸۷ گرم).



تصویر ۶- غدد جنسی نخی شکل در ماهی عقیم (تیمار A2، طول کل: ۳۰ سانتیمتر، وزن: ۴۲۸ گرم).



تصویر ۵- تخمدان توسعه نیافته در ماهی ماده (تیمار A3، طول کل: ۲۸ سانتیمتر، وزن: ۳۱۰ گرم).

نامساوی بودند. این بیضه‌های ندولی در موارد معدودی، فقط در یک پهلوی ماهی تشکیل شده و در پهلوی دیگر، فقط یک رشته طویل مشاهده گردید (تصویر ۳).

گروه ۲- ماهیانی که غدد جنسی با ساختار مشخص تخمدان داشتند.

حالت ندولی داشته و متورم بودند، در نمونه تمام تیمارها یافت شدند (تصویر ۲). اندازه بیضه‌های غیرطبیعی در بعضی از ماهیانی که هر دو بیضه در آنها تشکیل شده بود، برابر و در تعدادی نیز نابرابر بود و در بعضی موارد نیز، یکی از دو بیضه و یا هر دو بیضه، متشکل از دو تاسه لوب در اندازه‌های



تصویر ۸- نمای شماتیک از مجاری اسپرم بر طبیعی و غیرطبیعی. الف- مجرای اسپرم بر طبیعی که در آن، انتهای مجرا، باز و داخل مجرا حاوی اسپرم است. ب- انتهای مجرای اسپرم بر، مسدود و داخل مجرا فاقد اسپرم است. ج- انتهای مجرای اسپرم بر، مسدود و داخل مجرا حاوی اسپرم است. د- مجرای اسپرم بر قبل از رسیدن به منفذ تناسلی مسدود شده است.



تصویر ۹- مجرای اسپرم بر طبیعی، انتهای این مجرای باز و داخل آنجا حاوی اسپرم است.

تصویر ۱۰- مجرای اسپرم بر غیرطبیعی. انتهای مجرای اسپرم بر، مسدود و داخل مجرای فاقد اسپرم است (تیمار A3، طول کل: ۳۳ سانتیمتر، وزن: ۵۵۴ گرم).

به طور کلی در این پژوهش، سه نوع مجرای اسپرم بر غیرطبیعی در ماهیان نر کاری مشاهده گردید که توضیحات مربوطه در زیر نویس تصویرهای ۸ تا ۱۲ آمده است. تصویر ۸، نمای شماتیک از مجرای اسپرم بر طبیعی و غیرطبیعی را نشان می‌دهد.

در جدول ۲ تعداد ماهی نر کاری شامل ماهیان نر با مجرای اسپرم بر باز و تعداد ماهی نر با مجرای اسپرم بر مسدود از کل ماهیان نر موجود در نمونه‌های تیمار نشان داده شده است. همان طور که در جدول فوق مشاهده می‌شود، تمام تیمارها واجد ماهی نر کاری بودند. همچنین در تمام تیمارها، ماهی نر کاری با مجرای اسپرم بر مسدود مشاهده شد. در حالی که ماهی نر کاری با مجرای اسپرم بر باز، فقط در دو تیمار A1 و A3 یافت گردید.

بحث

نتایج حاصل از این بررسی که با هدف مطالعه اثر تیمارهای هورمونی ۱۷ آلفا- متیل تستوسترون بر روی شکل غدد جنسی و مجرای اسپرم بر در ماهی



تصویر ۷- غدد جنسی با جنسیت بینابینی. بافت نر (۱) در بخش خلفی غده جنسی پایینی مشاهده می‌گردد (تیمار A3، طول کل: ۳۰ سانتیمتر، وزن: ۴۹۳ گرم).



تصویر ۱۰- مجرای اسپرم بر غیرطبیعی، انتهای این مجرای باز و داخل آنجا حاوی اسپرم است.

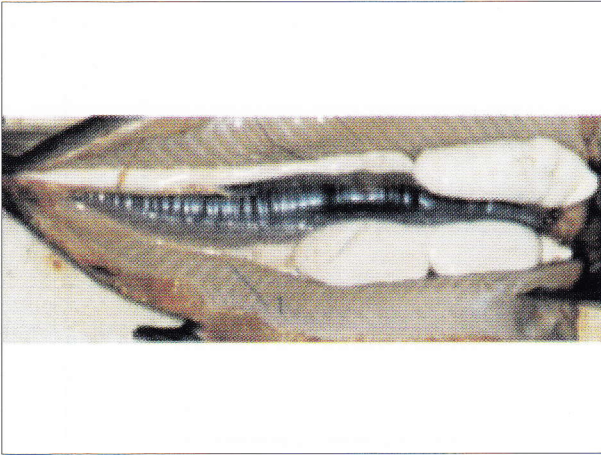
این تخمدانها نیز به دو دسته تقسیم شدند:

۱-۲- تخمدانهای توسعه یافته که اندازه آنها نسبت به اندازه و سن ماهی، طبیعی بود (تصویر ۴). این تخمدانها فقط در دو ماهی که هر دو متعلق به تیمار A3 مشاهده شدند.

۲-۲- تخمدانهای توسعه نیافته که اندازه آنها نسبت به اندازه و سن ماهی، کوچک بود. این تخمدانها نیز در ۳ ماهی از تیمار A3 و نیز تمام ماهیان ماده تیمار A5 که جمعاً شامل ۷ ماهی ماده بود، یافت گردیدند (تصویر ۵). گروه ۳- ماهیانی که دارای غدد جنسی تحلیل رفته و نخی شکل (عقیم) بودند (تصویر ۶). غدد جنسی نخی شکل، در تمام تیمارها به استثنای تیمار A3 مشاهده شدند.

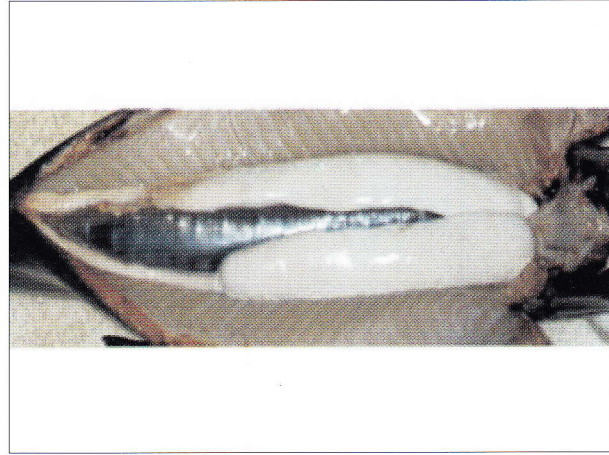
گروه ۴- ماهیان با جنسیت بینابینی که تشخیص جنسیت بینابینی در آنها بدون نیاز به تشخیص میکروسکوپی و به طور ماکروسکوپی میسر بود (تصویر ۷). در این ماهیان، تخمدان و بیضه به صورت توأم در مجاورت یکدیگر مشاهده می‌شدند. این حالت فقط در یک ماهی از نمونه‌های هر یک از دو تیمار A1 و A3 مشاهده گردید.





تصویر ۱۲- مجاری اسپرم بر غیر طبیعی. بیضه بالای، دارای مجاری اسپرم بر با انتهای مسدود می باشد که داخل آن، حاوی اسپرم است و مجرای اسپرم بر مربوط به بیضه پایینی قبل از رسیدن به منفذ تناسلی مسدود شده است (تیمار A1، طول کل: ۲۷ سانتیمتر، وزن: ۹۱۱ گرم).

قدامی به سمت بخش خلفی غده جنسی پیش می رود. Yamamoto در سال ۱۹۶۲ پیشنهاد کرد که این نحوه پیشرفت تمایز جنسی می تواند پدید آمدن غدد با جنسیت بینابینی در ماهیانی که تحت تجویز مقادیر ناکافی استروژن و یا دوره های ناکافی تجویز هورمون قرار گرفته اند را توجیه کند. بر اساس این فرضیه، احتمالاً بخش قدامی غده جنسی، تمایز بیضه ای را تحت تاثیر القاکننده های طبیعی جنسیت طی می کند. اما بخش خلفی آن، تحت تاثیر استروژن های با منشأ خارجی قرار گرفته و تمایز تخمدانی می یابد (۱۲). در صورتی که فرضیه فوق صحیح باشد، شاید بتوان دلیل تشکیل بافت بیضه در قسمت خلفی غده جنسی در نمونه فوق الذکر را این طور توضیح داد که بخش قدامی غده جنسی تحت تاثیر محرک های طبیعی جنسیت، تمایز تخمدانی یافته، در حالی که در بخش خلفی، تحت تاثیر هورمون ۱۷ آلفا- متیل تستوسترون تمایز بیضه ای ایجاد شده است. Witschi در سال ۱۹۶۷ به طور مشابه پیشرفت تمایز جنسی از بخش قدامی به خلفی را در دوزیستان (*Xenopus laevis*) شرح داده است. اما آزمایشی که توسط Ogori و Yoshikawa در سالهای ۱۹۷۹ و ۱۹۸۱ بر روی *Oryzias latipes* انجام شد، فرضیه Yamamoto را حمایت نکرد. آنها یک توزیع تصادفی از پیشرفت عناصر زایگر و بینابینی را در *Oryzias latipes* گزارش کردند. Johnstone و همکاران در سال ۱۹۷۸ نیز، در پی تجویز استرادیول یا متیل تستوسترون به ماهی قزل آلا رنگین کمان، هیچ الگوی مشخصی را در غدد جنسی با جنسیت بینابینی مشاهده نکردند (۱۲). به علاوه در بررسی حاضر، وجود یک مورد جنسیت بینابینی که در آن بافت بیضه در نزدیکی بخش قدامی غده جنسی تشکیل شده بود، می تواند مثالی برای نقض فرضیه فوق باشد. ضمن این که در پژوهش انجام شده توسط Feist و همکاران نیز که ماهیان تماماً ماده قزل آلا رنگین کمان را از طریق غوطه وری تحت تجویز هورمون قرار دادند، در یک ماهی دو ساله، تخمدانی تقریباً طبیعی یافت شد که مقدار کمی از بافت بیضه در بخش قدامی آن ایجاد شده بود (۱۰). بنابراین



تصویر ۱۱- مجاری اسپرم بر غیر طبیعی. انتهای مجاری اسپرم بر، مسدود و داخل مجاری حاوی اسپرم است (تیمار A3، طول کل: ۳۴ سانتیمتر، وزن: ۷۱۴ گرم).

قزل آلا رنگین کمان انجام گردید، نشان داد که تمام تیمارها در مورفولوژی غدد جنسی و مجاری اسپرم بر تاثیر گذاشتند و تعداد زیادی ماهی دارای غدد جنسی با شکلهای غیر طبیعی در مقابل تعداد اندکی ماهی دارای غدد جنسی طبیعی (بیضه یا تخمدان) مشاهده گردید. مشاهده شکلهای غیر طبیعی بیضه در ماهیان قزل آلا رنگین کمان تغییر جنسیت یافته، توسط Bye و Lincoln در سال ۱۹۸۱ نیز تایید شده است. آنها گزارش کردند که تجویز خوراکی متیل تستوسترون به مقدار ۳ ppm به مدت ۹۰ روز، باعث تولید ۹۴ درصد ماهی نر گردید که ۵۵ درصد از این ماهیها دارای بیضه های غیر طبیعی بودند (۱۲). Tsumura و همکاران در سال ۱۹۹۱ نیز در آزمایشی که به منظور نرسازی بر روی ماهیان ماده زاد قزل آلا رنگین کمان انجام دادند، وجود بیضه های غیر طبیعی و کروی شکل را گزارش نمودند (۱۵). در بررسی حاضر، مشاهده تخمدان در تعدادی از ماهیان تیمارهای A3 (دو نوبت غوطه وری با فاصله ۸ روز به اضافه تجویز خوراکی هورمون به مقدار ۳ ppm از زمان شروع تغذیه فعال به مدت ۹۰ روز) و A5 (تجویز خوراکی هورمون به مقدار ۳۰ ppm از زمان شروع تغذیه فعال به مدت ۱۲۰ روز)، می تواند دلیل بر تاثیر معکوس ماده سازی ناشی از تجویز مقدار زیاد هورمون و دوره تجویز طولانی آن باشد (۳، ۴). وجود تعداد بیشتر ماهیانی که دارای تخمدان با اندازه کوچک بودند در تیمار A5 را ممکن است بتوان ناشی از دریافت مقادیر بسیار زیاد هورمون دانست. در بررسی حاضر، دو ماهی با جنسیت بینابینی مشاهده گردید که در غدد جنسی آنها بافت بیضه و تخمدان به طور مشخص در مجاورت یکدیگر قرار داشتند. در یکی از این دو ماهی که دارای تخمدانی تقریباً طبیعی بود، مقدار کمی از بافت بیضه در بخش خلفی غده جنسی ایجاد شده بود (تصویر ۷) و در دیگری که بافت بیضه در نزدیکی بخش قدامی غده جنسی مشاهده گردید، غده جنسی تقریباً نخی شکل بود، به طوری که برای تایید جنسیت بینابینی غده مذکور، مقاطع بافت شناسی تهیه گردید. بر مبنای فرضیه ای که Yamamoto و Matsuda (1962, 1959a) در سال ۱۹۶۳ مطرح کردند، فرایند تمایز جنسی در ماهی مداکا از بخش



ردیف	شماره تیمار	نوع تیمار	تعداد ماهیان	نر	ماهی نرکاری		ماده	جنسیت بینابینی	عقیم
					ماهی نرکاری با مجرای اسپرم پر مسدود	ماهی نرکاری با مجرای اسپرم پر باز			
۱	شاهد	---	۲۰	۹	۰	۰	۱۱	۰	۰
۲	A1	دونوبت غوطه‌وری دوساعتۀ تخمهای چشم‌زده ولاروهای دارای کیسه زرده در حمام هورمون MT به مقدار ۲۵۰ میکروگرم در لیتر با فاصلۀ ۸ روز	۲۰	۱۰	۹	۱	۰	۲	۸
۳	A2	سه نوبت غوطه‌وری دوساعتۀ تخمهای چشم‌زده ولاروهای دارای کیسه زرده در حمام هورمون MT به مقدار ۲۵۰ میکروگرم در لیتر با فاصلۀ ۴ روز	۲۰	۱۲	۱۲	۰	۰	۱	۷
۴	A3	دونوبت غوطه‌وری دوساعتۀ تخمهای چشم‌زده ولاروهای دارای کیسه زرده در حمام هورمون MT به مقدار ۲۵۰ میکروگرم در لیتر با فاصلۀ ۸ روز به اضافه تجویز خوراکی هورمون به مقدار ۳ppm از زمان شروع تغذیه فعال به مدت ۹۰ روز	۲۰	۱۴	۵	۹	۵	۱	۰
۵	A4	تجویز خوراکی هورمون به مقدار ۳ppm از زمان شروع تغذیه فعال به مدت ۷۰ روز	۲۰	۳	۲	۰	۰	۰	۱۸
۶	A5	تجویز خوراکی هورمون به مقدار ۳۰ppm از زمان شروع تغذیه فعال به مدت ۱۲۰ روز	۲۰	۲	۲	۰	۷	۱	۱۰

این پرسش که آیا تمایز جنسی در ماهیان استخوانی از بخش قدامی به سمت بخش خلفی گرایش دارد یا خیر، همچنان باقی می ماند.

نتایج بدست آمده از مشاهدات انجام شده در این بررسی نشان داد که تعداد قابل توجهی از ماهیان در تمام تیمارها به استثنای نمونه تیمار A3 دارای غدد جنسی نخی شکل عقیم بودند. احتمالاً تغییر ساختار این غدد جنسی، به دلیل دریافت مقادیر زیاد هورمون بوده است. Chevassus و Krieg در سال ۱۹۹۲ نیز در آزمایشی که از طریق تجویز هورمون ۱۷آلفا-متیل تستوسترون به مقدار ۳ ppm به مدت ۶۰ روز تا ۹۰ روز در ماهی قزل آلاي خال قرمز انجام دادند، تولید تعداد زیادی از ماهیان که دارای غدد جنسی عقیم نخی شکل بودند را گزارش نمودند. مشاهدۀ این حالت در ماهی آزاد اقیانوس اطلس *Salmo salar* (Jhonstone et al., 1978)، قزل آلاي رنگین کمان (Jhonstone et al., 1979) و قزل آلاي خال قرمز *Salmo trutta* (Quillet et al., 1991) نیز گزارش گردیده است (۸).

در بررسی حاضر، سه نوع مجرای اسپرم بر غیر طبیعی شامل مجرای اسپرم بر با انتهای مسدود و فاقد اسپرم، مجرای اسپرم بر با انتهای مسدود و حاوی اسپرم، مجرای اسپرم بر حاوی اسپرم که قبل از رسیدن به منفذ تناسلی مسدود شده بودند، مشاهده گردید. تنوع مشاهده شده در شکل مجرای اسپرم بر مربوط به هر یک از تیمارهای مورد آزمایش در این بررسی را شاید بتوان به تجویز مقادیر مختلف هورمون و دوره های متفاوت تجویز هورمون در تیمارهای مختلف و نیز دریافت مقادیر متفاوت هورمونی که همراه با غذا توسط هر یک از افراد در هر تیمار اخذ شده است، نسبت داد. احتمالاً به دلیل تفاوت اندازه ماهیان و تاثیر آن در رقابت غذایی و نیز عدم توزیع کاملاً یکنواخت هورمون در تمام دانه های غذا، همچنین تفاوت های موجود در بین



شده (۱۴ ماهی)، ۹ ماهی توانایی ترشح اسپرم تحت فشار شکمی را داشتند. در حالی که در مقایسه، فقط یک ماهی از ماهیان نری (۱۰ ماهی) که تحت تیمار دو نوبت غوطه‌وری (A1) قرار داشتند، قادر به انجام این عمل بودند. در این مطالعه، بیشترین تعداد ماهی نر با مجرای اسپرم بر باز (۹ ماهی)، در نمونه تیمار A3 (دو نوبت غوطه‌وری به اضافه تجویز خوراکی هورمون) مشاهده گردید و این تیمار از نظر تولید ماهی نر، از دو تیمار A1 و A2 مؤثرتر بود. در حالی که Yeoh و Feist در سال ۱۹۹۵ مشاهده نمودند ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمانی که در مرحله جنینی تحت تیمار غوطه‌وری در حمام هورمون ۱۷ آلفا-متیل تستوسترون به مقدار ۴۰۰ میکروگرم در لیتر و به مدت ۲ ساعت قرار داشتند، دارای درصد بالایی از ماهیان نر با مجرای اسپرم بر باز بودند. اما ماهیانی که تحت تیمار غوطه‌وری به اضافه تجویز خوراکی هورمون به مقدار ۳ ppm و به مدت ۶۰ روز قرار گرفته بودند، مجرای اسپرم بر طبیعی نداشتند. اما در مطالعات آزمایشگاهی و نیز در مزارع تجاری که فقط نوزادان ماده برای نرسازی مورد استفاده قرار گرفته‌اند، مشاهده شده که بعضی از ماهیان تغییر جنسیت یافته بالغ، قادر به اسپرم‌ریزی بودند. وقتی این موضوع بررسی شد، ملاحظه گردید که این ماهیان نر که واجد مجرای اسپرم بر طبیعی بودند، میزان لقاح عالی داشته و فقط نتاج ماده تولید کردند. این آزمایشات، امکان دستیابی به دوره مناسب تجویز هورمون، برای دسترسی به درصد بالایی از ماهیان نر تغییر جنسیت یافته دارای مجرای اسپرم بر طبیعی را بیان می‌کند. ممکن است کاهش دوره تجویز اندروژن، درصد ماهیان نر با مجرای اسپرم بر طبیعی را افزایش دهد (۱۲). Cousin-gerber در سال ۱۹۸۹ مقدار هورمون را عامل اصلی در تعیین فراوانی ماهیان نر با مجرای اسپرم بر طبیعی می‌داند. در آزمایشی که وی انجام داد، از ماهیان نر تغییر جنسیت یافته ۲ ساله قزل‌آلای رنگین‌کمان که از طریق تجویز مقدار ۳ ppm به مدت ۶۰ روز قرار داشتند، ۳۶ درصد ماهی نر با مجرای اسپرم بر طبیعی تولید گردید. وی نشان داد که افزایش طول دوره تجویز هورمون، منجر به کاهش تعداد ماهی نر با مجرای اسپرم بر طبیعی می‌گردد. وی پیشنهاد کرد که برای افزایش میزان تولید ماهیان نر با مجرای اسپرم بر طبیعی، باید مقدار کم هورمون (۵ ppm/۰) به مدت فقط ۶۰ روز مورد استفاده قرار گیرد. Bye و Lincoln در سال ۱۹۸۶ نیز معتقدند که کاهش دوره تجویز اندروژن، نسبت ماهی نر با مجرای اسپرم بر طبیعی را افزایش می‌دهد (۷).

مطابق جدول ۲، نمونه‌های مربوط به تمام تیمارها، شامل ماهی نر با مجرای اسپرم بر مسدود بودند. نمونه تیمار A2 با ۱۲ ماهی، دارای بیشترین تعداد ماهی نر با مجرای اسپرم بر مسدود و نمونه دو تیمار A4 و A5 هر کدام با ۲ ماهی، دارای کمترین تعداد ماهی نر با مجرای اسپرم بر مسدود بودند. در نمونه‌های تیمارهای A1 و A3 نیز به ترتیب ۹ و ۵ ماهی نر با مجرای اسپرم بر مسدود مشاهده گردید. تمام ماهیان نر کاری که در نمونه‌های تیمارهای A2، A4 و A5 تولید شده بودند، ماهی نر با مجرای اسپرم بر مسدود بودند. در مورد ماهیان نر کاری تولید شده در این آزمایش که فاقد مجرای اسپرم بر طبیعی بوده و در نتیجه قادر به اسپرم‌ریزی نبودند، لازم بود که اسپرم آنها از

نبودند. پس از باز نمودن شکم ماهیان نر بالغی که قادر به اسپرم‌ریزی نبودند، مشخص گردید دلیل این امر، فقدان مجرای اسپرم برو یا وجود مجرای اسپرم بر مسدود، همچنین وجود غدد جنسی نخی شکل در بعضی از ماهیان (ماهیان عقیم یا ماهیان با جنسیت بینابینی) بوده است. احتمالاً بخشی از ماهیان نر با مجرای اسپرم بر باز، ماهیان نر ژنتیکی هستند که مقادیر مؤثر هورمون را دریافت نموده‌اند و بخشی دیگر، ماهیان نر فنوتیپی هستند که به دلیل دریافت مقادیر بهینه هورمون، به ماهی نر با مجرای اسپرم بر باز تغییر جنسیت یافته‌اند. ماهیان نر با مجرای اسپرم بر مسدود نیز ماهیان ماده‌ای بوده‌اند که به دلیل دریافت مقادیر مؤثر هورمون به ماهیان نر تغییر جنسیت یافته‌اند، اما مقدار هورمون دریافتی هنوز با مقدار بهینه آن که باعث ایجاد مجرای اسپرم بر باز می‌شود، فاصله داشته است. ماهیان با غدد جنسی نخی شکل، احتمالاً ماهیانی هستند که خیلی بیشتر از مقدار بهینه، هورمون دریافت نموده‌اند، به طوری که در ساختار غدد جنسی آنها تغییرات نامطلوب ایجاد گردیده است.

به طور کلی نتایج بدست آمده از این بررسی نشان داد که مقدار هورمون و طول دوره تجویز آن، در تولید ماهی نر و ویژگی باز یا مسدود بودن مجرای اسپرم بر، اثر قابل توجهی داشته است. دلیل این اثر، کاهش تعداد ماهی نر، همچنین کاهش تعداد ماهی نر با مجرای اسپرم بر باز و افزایش تعداد ماهی با غدد جنسی نخی شکل و نیز ماهی نر با مجرای اسپرم بر مسدود در تیمارهای مورد آزمایش می‌باشد. بر اساس مشاهدات انجام شده در این بررسی، تعداد ماهیان نر با مجرای اسپرم بر مسدود، در تمام تیمارها به استثنای تیمار A3، بیش از تعداد ماهیان نر با مجرای اسپرم بر باز بود (جدول ۲). مقایسه نمونه دو تیمار غوطه‌وری (A1 و A2) نشان داد که تعداد ماهی نر با مجرای اسپرم بر مسدود در نمونه تیمار A2 (۱۲ ماهی)، بیش از نمونه تیمار A1 (۹ ماهی) و در نمونه تیمار A3 (۵ ماهی)، بیش از نمونه تیمار A4 (۲ ماهی) بوده است. همان طور که در جدول ۲ ملاحظه می‌شود، بیشترین تعداد ماهی نر با مجرای اسپرم بر باز (۹ ماهی)، متعلق به نمونه تیمار A3 و بیشترین تعداد ماهی نر با مجرای اسپرم بر مسدود (۱۲ ماهی) مربوط به نمونه تیمار A2 بوده است. در نمونه تیمار A5 نیز ۲ ماهی نر با مجرای اسپرم بر مسدود مشاهده گردید.

در این بررسی، مقایسه تیمار غوطه‌وری مضاعف تخمهای چشم زده و لاروهای دارای کیسه زرده در حمام هورمون (A1)، با تیمار سه نوبت غوطه‌وری نشان داد که سه نوبت غوطه‌وری، تولید ماهی نر با مجرای اسپرم بر مسدود را افزایش داده و در عین حال موجب کاهش تولید ماهی با مجرای اسپرم بر باز گردیده است. بنابراین افزایش دفعات غوطه‌وری، موجب افزایش تولید ماهیان نر با مجرای اسپرم بر مسدود از ۹ ماهی در تیمار A1، به ۱۲ ماهی در تیمار A2 و نیز کاهش نسبت ماهیان نر با مجرای اسپرم بر باز از ۱ ماهی در تیمار A1، به صفر در تیمار A2 گردیده است. مقایسه ماهیان نر در نمونه مربوط به تیمارهای A1 و A3، یعنی دو تیماری که ماهی نر با مجرای اسپرم بر باز تولید نموده بودند، نشان داد که در نمونه تیمار A3، از میان ماهیان نر تولید



نسبت زیادی از ماهیان نر کاری با مجرای اسپرم بر مسدودار جح باشد (۹).

تشکر و قدردانی

این پژوهش با استفاده از امکانات معاونت تکثیر و پرورش آبزیان شیلات ایران و با همکاری مؤسسه تحقیقات شیلات ایران انجام پذیرفته است. از جناب آقای مهندس حسین عبدالحی (مدیر کل تکثیر ماهی و بازسازی ذخایر معاونت تکثیر و پرورش شیلات ایران)، جناب مهندس امیرسعید ویلکی (رئیس اداره تکثیر ماهیان آبهای داخلی معاونت تکثیر و پرورش شیلات ایران)، سرکار خانم دکتر مریم رضاییان (دانشیار بخش بافت شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران) که در اجرای این پروژه همکاری نمودند سپاسگزاری می شود.

References

- آذری تاکامی، ق.، امینی، ف.، فرحمن، ح. (۱۳۷۵): بررسی ایجاد تغییر جنسیت و عقیمی در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio Linne*) به وسیله هورمون ۱۷ آلفا- متیل تستوسترون، مجله منابع طبیعی ایران، انتشارات دانشگاه تهران، شماره ۴۹، صفحه: ۱۵-۳.
- امینی، ف. (۱۳۷۰): جایگاه ژنیک و اصلاح نژاد در پرورش ماهی، مجموعه مقالات دهمین کنگره دامپزشکی ایران، انتشارات جامعه دامپزشکان ایران، صفحه: ۴۳۰-۴۲۳.
- شهبازی، پ.، ملک نیا، ن. (۱۳۷۸): بیوشیمی عمومی، جلد ۲. انتشارات دانشگاه تهران، صفحه: ۵۹۸.
- طلا، م. (۱۳۸۰): بهینه سازی تیمار هورمونی ۱۷ آلفا- متیل تستوسترون برای ایجاد تغییر جنسیت و عقیمی در ماهی قزل آلائی رنگین کمان، پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی، صفحه: ۲۴۰.
- علیشاهی، م. (۱۳۷۷): القای تغییر جنسیت در ماهی کپور معمولی به وسیله هورمون ۱۷ آلفا- متیل تستوسترون خوراکی در سطح صنعتی، پایان نامه دکتری عمومی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، صفحه: ۹۸.
- فرحمن، ح. (۱۳۷۲): ایجاد تغییر جنسیت در ماهی کپور معمولی، پایان نامه کارشناسی ارشد دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تربیت مدرس- نور، صفحه: ۱۰۱.
- Bye, V.J. and Lincoln, R. F. (1986): Commercial methods for the control of sexual maturation in Rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture*, Vol., 56, PP: 299-309.
- Chevassus, B. and Krieg, F. (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.
- Cousin-Gerber, M., Burger, G., Boisseau, C. and Chevassus, B. (1989): Effect of 17 methyltestosterone

طریق بیرون آوردن بیضه از بدن ماهی، خارج شود. Johnstoneb و همکاران در سال ۱۹۷۹ نیز اعلام کردند که ماهیان قزل آلائی رنگین کمان ماده ژنتیکی که توسط اندروژنها تغییر جنسیت یافته بودند، دارای مجرای اسپرم بر توسعه یافته نبودند و آنها اسپرم را از طریق جراحی خارج نمودند (۱۲).

در این بررسی، بیشتر ماهیان نر کاری تغییر جنسیت یافته، از نظر عملکرد، همانند ماهیان نر ژنتیکی نبوده و عملکرد نسبتاً ضعیف تری داشتند. پس از باز نمودن شکم تعدادی از این ماهیان نر کاری با مجرای اسپرم بر مسدود، حتی با خصوصیات ثانویه جنسی پیشرفته، مشاهده گردید که دارای بیضه های سفت محتوی کمی منی سیال بودند. به علاوه این ماهیان بلوغ تاخیری داشتند و مقدار اسپرم در آنها حتی ۲ سال بعد از خاتمه تجویز هورمون کم بود. اما تعدادی نیز بیضه های رسیده فاقد مجرا داشتند که غالباً دارای مقدار زیادی منی بودند که به راحتی ترشح می گردید. Bye و Lincoln در سال ۱۹۸۶ نیز توانستند از طریق نرسازی نوزادان ماهی قزل آلائی رنگین کمان، ماهیان نر هوموگامتیک کاری دارای منی تولید کنند، اما آنها نیز با این مشکل مواجه بودند که بعضی از ماهیان بالغ با ویژگیهای ثانویه جنسی پیشرفته، بیضه های سفت حاوی مختصری منی مایع داشتند. بعضی دیگر از محققین نیز مشاهدات مشابهی در مورد سایر گونه هایی که تحت تجویز هورمون قرار داشتند را گزارش نموده اند (۱۲). Tsumara و همکاران در سال ۱۹۹۱ هنگامی که ماهیان قزل آلائی رنگین هورمونوترایی شده که واجد بیضه های غیر طبیعی بودند را برای آمیزش با ماهیان ماده طبیعی مورد استفاده قرار دادند، زاده های تماماً ماده تولید نمودند (۱۵). Pandian و Sheela در سال ۱۹۹۸، همچنین Tsumara و همکاران در سال ۱۹۹۱ که در بررسی خود از یک جمعیت تماماً ماده قزل آلائی رنگین کمان استفاده کرده و فقط نوزادان ماده را نرسازی نمودند، در زمان بلوغ ماهیهام مشاهده کردند که بعضی از ماهیان تغییر جنسیت یافته بالغ، قادر به اسپرم ریزی بودند. وقتی این موضوع بررسی شد، مشاهده گردید که این ماهیان نر با مجرای اسپرم بر طبیعی، میزان لقاح عالی داشتند و فقط نتاج ماده تولید کردند (۱۵، ۱۳). بنابراین احتمالاً تعدادی از ماهیان مورد آزمایش در بررسی حاضر که به طور طبیعی قادر به اسپرم ریزی بودند، ماهیان نر تغییر جنسیت یافته می باشند که البته قطعیت این موضوع، توسط آزمون نتاج مشخص خواهد شد. چند گزارش نیز وجود دارد که میزان لقاح اسپرم حاصل از ماهیان نر هوموگامتیک با تخمک ماهیان ماده طبیعی را بیشتر از میزان لقاح ماهیان نر هتروگامتیک طبیعی با ماهیان ماده طبیعی بیان می کند (۱۲).

به هر حال تولید ماهیان نر کاری با مجرای اسپرم بر باز یا مسدود و امکان دست بردن در نسبت این ماهیان نر کاری، بسته به نیاز، دو کاربرد متفاوت خواهد داشت:

- ۱- چندین سال استفاده مکرر از ماهیان نر کاری با مجرای اسپرم بر باز برای تولید زاده های تماماً ماده، به دلیل صرفه جویی در منابع و امکانات بسیار مفید است.
- ۲- به منظور ایجاد تنوع ژنتیکی و دودمانهای جدید، ممکن است تولید



- on sex differentiation and gonad morphogenesis in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, Vol. 2, No. 4, PP: 225-230.
10. Feist, G., Yeoh, C-G., Fitzpatrick, M. S. and Schreck, C.B. (1995): The production of functional sex-reversal male rainbow trout with 17 methyltestosterone and 11 - hydroxyandrostenedione. *Aquaculture*, Vol. 131, PP: 145-152.
 11. Garcia-Abidado, M.A. and Dabrowski, K. (1998): Research review : The fish genetic resources bank. ?, PP: ?.
 12. Hunter, G. A. and Donaldson, E. M. (1983): Hormonal sex control and its application to fish culture. In : *Fish physiology*. Vol. 9, Part B. Hoar, W. S., D. J. Randel and E. M. Donaldson (Editors), Academic Press INC., 477 PP:
 13. Pandian, T. J. and Sheela, S. G. (1995): Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture*, Vol. 138, PP: 1-22.
 14. Shepherd, C. and Bromage, N. (1992): *Intensive fish farming*. Blackwell scientific publications, PP: 404 .
 15. Tsumura, K., Blann V.E. and Lamont, C.A. (1991): Progeny test of masculinized female rainbow trout having functional gonoducts. *The Progressive fish culturist*. Vol. 53, PP: 45-47.
 16. Yamazaki, F. (1983): Sex control and manipulation in fish. *Aquaculture*, Vol. 33, PP: 329-354.

