13 (2) 295-302, Summer 2021

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Effect of 17-α-methyl testosterone on the sex reversal of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

*Mehrnaz Mobini Kashe [1], Ammar Salehi Farsani [2], Mehdi Shamsaie Mehrgan [1], Seyed Pezhman Hosseini Shekarabi [*1]*

[1] Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Abzi Exir Kowsar Company, Kowsar Economic Organization, Tehran, Iran

Key Words

17-α-methyl testosterone
All-female population
XX neomale
PCR

Abstract

Introduction: This study was conducted to reverse female trout to male (XX male) by oral administration of 17-alpha-methyl testosterone.

Materials & Methods: For this purpose, 12,000 larvae of rainbow trout were fed from the beginning of active feeding with diets containing 0 (control), 0.5, 1, 1.5 and 2 mg 17-alpha-methyl testosterone per kg of feed for 60 days. The growth performance and survival were evaluated during this period. In addition, the treated fish were fed with hormone-free commercial diet for 18 months until their sex glands had grown. The sex reversal of fish was performed by sampling from 120 numbers of fry (2g mean weight) fin tails, designing specific primers and PCR assay.

Result: The results of growth showed that there was no significant difference in growth parameters among treatments ($P>0.05$). Fish treated with the hormone had lower survival rate (82.1±1.1%) compared to the control group ($P<0.05$). By necropsy and direct observation of the sexual organs of the breeders, the ratio of female to male sex reversal was increased by increasing the concentration of the hormone from 0.5 to 2 mg/kg in the diets and the best efficiency was obtained in 2 mg/kg of 17-alpha-methyl testosterone ($P<0.05$).

Conclusion: The results of this study showed that the highest ratio of male XX breeders (96.0±1.0%) was observed in the fish fed with alpha methyl testosterone at 2 mg/kg of feed. Also, the PCR test had the specificity to identify the sex reversal of rainbow trout fry as a non-invasive method.

* Corresponding Author's email: hosseini@srbiau.ac.ir
Received: 17 April 2020; Reviewed: 30 May 2020; Revised: 25 July 2020; Accepted: 28 August 2020
(DOI): 10.22034/aej.2021.137489

مقاله پژوهشی

تأثیر هورمون ۱۷-آلفا متیل تستوسترون بر تغییر جنسیت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

مهرناز مبینی کشه[۱]، عمار صالحی‌فارسانی[۲]، مهدی شمسایی‌مهرجان[۱]، سیدپژمان حسینی‌شکرابی[۱]*

[۱] گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲] شرکت آبزی اکسیر کوثر، سازمان اقتصادی کوثر، تهران، ایران

کلمات کلیدی

هورمون ۱۷-آلفامتیل تستوسترون
تمام ماده
نر XX
واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

چکیده

مقدمه: این مطالعه به‌منظور تغییر جنسیت ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان ماده به نر با تجویز خوراکی هورمون ۱۷-آلفا متیل تستوسترون انجام شد.

مواد و روش‌ها: برای این منظور تعداد ۱۲۰۰۰ قطعه لارو ماهی قزل‌آلا از شروع تغذیه فعال به‌مدت ۶۰ روز با خوراک حاوی ۰ (شاهد)، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم هورمون در کیلوگرم خوراک تغذیه شدند. شاخص‌های رشد و بازماندگی در تیمارهای مختلف طی این بازه زمانی ارزیابی شد. علاوه‌براین تیمارها تا زمانی که غدد جنسی آن‌ها رشد یافته و به مرحله تکثیر برسند، با غذای تجاری فاقد هورمون به‌مدت ۱۸ ماه تغذیه شدند. تغییر جنسیت ماهیان با نمونه‌برداری ازباله دمی ۱۲۰ قطعه بچه ماهی (میانگین وزن ۲ گرم) توسط پرایمرهای اختصاصی طراحی شده و انجام آزمایش PCR صورت گرفت.

نتایج: نتایج مربوط به فاکتورهای رشد بچه‌ماهیان نشان داد که اختلاف معنی‌داری در این شاخص‌ها در بین تیمارها وجود ندارد ($P>0/05$). ماهیان هورمون‌تراپی‌شده نسبت به تیمار شاهد (۱/۱±۸۲/۲) درصد بازماندگی کم‌تری داشتند ($P<0/05$). با کالبدگشایی مولدین و مشاهده مستقیم اندام‌های جنسی با افزایش غلظت هورمون از غلظت ۰/۵ به ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم نسبت تغییر جنسیت مولدین ماده به نر افزایش یافت ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری و بحث: نتایج این مطالعه نشان داد که بالاترین نسبت مولدین نر XX (۱/۰±۹۶/۰ درصد) در ماهیان تغذیه شده با غلظت ۲ میلی‌گرم هورمون ۱۷-آلفا متیل تستسترون در کیلوگرم خوراک حاصل شد. هم‌چنین آزمون PCR از اختصاصیت لازم جهت شناسایی تغییر جنسیت بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌عنوان یک روش غیرتهاجمی برخوردار بود.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: hosseini@srbiau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۲۹ فروردین ۱۳۹۹؛ تاریخ داوری: ۱۰ خرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ٤ مرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۷ شهریور ۱۳۹۹
(DOI): 10.22034/aej.2021.137489

مقدمه

یکی از اساسی‌ترین مشکلات پیش روی صنعت قزل‌آلای رنگین کمان رشد پایین، اندازه کوچک و مرگ و میر بالا ماهیان نر به‌علت بلوغ زودرس است (Dunham، ۲۰۰۴). این مشکل در بسیاری از کشورها به‌خصوص کشورهای اروپایی با ایجاد لاین‌های تمام ماده (تک جنس) مرتفع شده است. از طرف دیگر جمعیت تمام ماده در آزاد ماهیان، به سبب رشد سریع‌تر، کیفیت لاشه مناسب و بلوغ زودرس (حدود یک‌سال)نسبت به‌جمعیت نر ارجحیت دارد(Dunham، ۲۰۰۴). بنابراین، ایجاد جمعیت‌های تمام ماده برای صنعت آبزی‌پروری این گونهٔ اقتصادی ضروری به‌نظر می‌رسد. علاوه براین در صنعت ماهیان زینتی نیز همواره یک جنس از نظر زیبایی، رنگ، رشد و زمان بلوغ نسبت به جنس مخالف ارجحیت دارد (ایمانپور و همکاران، ۱۳۹۵). یکی از روش‌های تولید جمعیت‌های تک جنس ماده با استفاده از استروئیدهای جنسی، روش ماده‌سازی مستقیم می‌باشد.این روش در تمامی گونه‌های ماهیان صرف نظر از نوع سیستم تعیین جنسیت و این که چه جنسی (نر یا ماده) به‌صورت هوموگامتیک و یا هتروگامتیک است، کاربرد دارد و این روش بر پایه استفاده از هورمون‌های استروژن در طول مراحل اولیه رشد در ماهیان می‌باشد (Hoseinzadeh Sahafi و همکاران، ۲۰۱۰). در این روش با استفاده از یک استروژن طبیعی و یا مصنوعی، جنس مورد نظر در همان نسلی که استروژن را دریافت کرده به‌دست می‌آید (Folmar و همکاران، ۲۰۰۰). این عمل از طریق غوطه‌ور کردن تخم‌ها یا لاروهای دارای کیسه زرده در حمام حاوی هورمون‌های استروژن و یا با تجویز خوراکی آن‌ها امکان‌پذیر می‌باشد. میزان هورمون مورد مصرف و طول دوره درمان در این روش به عواملی مانند گونه مورد نظر، شرایط محیطی، درجه حرارت و طول دوره نوری بستگی دارد (Piferrer، ۲۰۰۱). در حقیقت استفاده از ماهیان ماده نر سازی شده جهت تولید زاده‌های تمام ماده در صنعت تجاری پرورش قزل‌آلا در دنیا رواج بسیار یافته است که این اشتیاق به تولید ماهیان تمام ماده به‌دلیل سود بالای این ماهیان نسبت به جنس نر می‌باشد (Pavlov و همکاران، ۲۰۱۶). هورمون‌های اندروژنی مختلفی برای تولید جمعیت‌های تمام نر استفاده شده است. اما بیش‌تر هورمون‌های اندروژنی که در فرآیند نر زایی اثرات بالاتری دارند از مشتقات مصنوعی تستسترون بوده که یکی از مؤثرترین، دردسترس‌ترین و پرکاربردترین آن‌ها ۱۷-آلفا متیل تستسترون است. برای مثال، Weiss و همکاران (۲۰۱۸)با تجویز خوراکی غلظت‌های مختلف ۱۷-آلفا متیل تستسترون به لارو گربه ماهی آمریکایی (*Rhamdia quelen*) را نشان دادند ماهیان هورمون‌تراپی شده با ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خوراک پس از ۱۵۰ روز تشریح شده و بیش‌ترین بازده تغییر جنسیت به نر را در مقایسه با دوزهای بالاتر (۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خوراک) دارند. در تحقیق دیگری غوطه‌وری تخم ماهی قزل‌آلای جویبار (*Salvelinus fontinalis*) با ۱۷-آلفا متیل تستسترون (۴۰۰ میکروگرم در لیتر) به مدت ۶ روز قبل از تخم‌گشایی سبب نرسازی گله می‌شود. هم‌چنین، Fotedar (۲۰۱۷) بیان کرد مکمل‌سازی خوراک ماهی سوف نقره‌ای (*Bidyanus bidyanus*) با ۱۸-۹ میلی‌گرم ۱۷-آلفا متیل تستسترون در کیلوگرم خوراک به‌مدت ۳۱ تا ۶۰ از زمان تغذیه فعال ماهیان به‌طور معنی‌داری سبب تغییر جنسیت می‌گردد. در تحقیق دیگری مشخص شد که ۸۵ درصد از ماهیان بارب (*Pethia conchonius*) محاصل از هورمون‌تراپی ۶۰ روزه لاروها با ۱۷-آلفا متیل تستسترون به جنس نر تغییر جنسیت پیدا کردند (Ramee و همکاران، ۲۰۲۰). Chávez-García و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند تغییر جنسیت ماهی تیلاپیانیل(*Oreochromis niloticus*)با۱۷-آلفامتیل تستسترون باعث افزایش منحنی رشد ماهیان تغییر جنسیت یافته و یکنواختی اندازه نهایی می‌شود. ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مهم‌ترین گونه پرورشی سردابی در کشور بوده و در حال حاضر با تولید سالانه ۱۴۰ هزار تن، ایران رتبه اول تولید این گونه مهم پرورشی را در جهان دارا است (سالنامه آماری سازمان شیلات ایران، ۱۳۹۶). علی‌رغم تحقیقات زیادی که جهت تولید تخم چشم‌زده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در کشور صورت گرفته اما تحقیقات محدودی در زمینه تولید جمعیت تمام ماده ماهی قزل‌آلا حاصل از تلاقی ماهی ماده معمولی با ماهی ماده تغییر جنسیت یافته با فنوتیپ جنس نر یا واجد بیضه (نر XX) در شرایط ایران انجام شده است. بنابراین در این مطالعه، تغییر جنسیت ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان ماده به نر با تجویز خوراکی هورمون ۱۷-آلفا متیل تستوسترون انجام شد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در آذر ماه سال ۱۳۹۶ در مزرعه تکثیر و پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان احرار متعلق به شرکت آبزی اکسیر کوثر (الیگودرز، استان لرستان) انجام گرفت.منبع آبی این مزرعه، آب چشمه با دبی ۱۵۰۰ لیتر بر ثانیه بود و میانگین دما و اکسیژن به‌صورت روزانه ثبت‌شدو میزان pH، نیتریت، نیترات و آمونیاک‌در آب هر هفته یک‌بار اندازه‌گیری و ثبت گردید (جدول ۱). این شاخص‌ها با استفاده از روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شد (APHA، ۲۰۰۵). اکسیژن محلول به‌روش وینکلر اندازه گیری شد. مقدار اسیدیته آب، به‌کمک pH متر پرتابل با الکترود حساس (مدل 320-WTW، ساخت کشور آمریکا) تعیین گردید. نیتریت، نیترات و آمونیاک آب نیز به‌وسیله دستگاه دیجیتال HACH (ساخت کشور آمریکا) به‌صورت هفتگی اندازه‌گیری شد.

جدول ۱: میانگین فاکتورهای کیفی آب در طی دوره پرورش (میانگین±انحراف معیار)

pH	اکسیژن محلول (میلی‌گرم در لیتر)	درجه حرارت (درجه سانتی‌گراد)	نیتریت (میلی‌گرم در لیتر)	آمونیاک (میلی‌گرم در لیتر)
۷/۸±۰/۱	۸/۲±۰/۴	۱۰/۰±۰/۴	۰/۰۲±۰/۰۰۰	۰/۰۱±۰/۰۰۳

تهیه جیره‌های آزمایش: به‌منظور تهیه جیره‌های آزمایشی سطوح ۰ (شاهد)، ۰/۵، ۱ و ۲ گرم در کیلوگرم غذا از هورمون ۱۷ آلفا متیل تستوسترون روی خوراک پایه (شرکت بیومار، فرانسه) با الکل ۷۰ درصد اسپری شد (جدول ۲). سپس اجازه داده شد تا غذا در دمای اتاق و در محل تمیز خشک گردد. در غذای ماهیان گروه شاهد فقط الکل ۷۰ درصد اسپری گردید. غذای تهیه شده، در ظروف پلاستیکی درب‌دار استریل، ریخته شده و تا زمان استفاده در فریزر ۱۸- درجه سانتی‌گراد، نگه‌داری شد. غذاهایی مصرفی هفتگی تهیه شد. هورمون ۱۷ آلفا متیل تستوسترون از شرکت سیگما (آلمان) با خلوص ۹۷٪ تهیه شد (Lee و همکاران، ۲۰۱۷).

جدول ۲: ترکیبات تقریبی خوراک پایه تجاری مورد استفاده در این مطالعه

ترکیبات	درصد (وزن خشک)
پروتئین خام	۴۸/۱±۰/۳
چربی خام	۱۵/۳±۰/۲
خاکستر	۷/۳±۰/۱
فیبر	۱/۵±۰/۱
رطوبت	۸/۴±۰/۴

هورمون‌تراپی: ۱۲۰۰۰ قطعه لارو ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با نژاد فرانسوی تمام ماده از زمان شروع تغذیه فعال به‌مدت ۲ ماه با جیره‌های منتخب (سطوح ۰ (شاهد)، ۰/۵، ۱ و ۲ گرم/کیلوگرم غذا از هورمون ۱۷ آلفا متیل تستوسترون) در مخازن فایبرگلاس ۳ هزار لیتری (هر تیمار با سه تکرار) در دمای آب ۱۰ درجه سانتی‌گراد غذادهی شد. مقدار غذای روزانه و نیز تعداد دفعات غذادهی ماهیان مورد آزمایش براساس دمای آب، بیومس ماهی و طبق جداول خوراک دهی تا حد سیری محاسبه شد (به‌میزان ۴-۵ درصد وزن بدن).

ارزیابی شاخص‌های رشد وبازماندگی: رشد و بازماندگی بچه ماهیان در تیمارهای مختلف هورمون‌تراپی شده طی بازه‌زمانی ۲ ماهه، مورد بررسی قرار گرفت. بدین‌منظور درفاصله‌های زمانی ۱۵روز یک‌بار وزن لاروهای هر تیمار با ترازوی دیجیتال با دقت ۰۱/ گرم و طول کل با خط‌کش با دقت ۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد (به این منظور ۲۴ ساعت قبل از زیست‌سنجی، تغذیه ماهیان قطع شد). در این بررسی، نمونه‌برداری‌ها به‌طور کاملاً تصادفی و از ۵۰ درصد جمعیت هر تکرار انجام شد. درنهایت، شاخص‌های رشد لاروها و درصد بازماندگی طبق روابط زیر محاسبه گردید (Hevroy و همکاران، ۲۰۰۵):

- درصد افزایش وزن:

{(وزن ابتدایی بر حسب گرم /وزن ابتدایی بر حسب گرم - وزن نهایی بر حسب گرم)} ×۱۰۰

- ضریب تبدیل غذایی:

افزایش وزن بدن بر حسب گرم/ مقدار غذای خورده شده بر حسب گرم

- نرخ رشد ویژه:

{(تعداد روزهای پرورش)/(میانگین وزن اولیه - میانگین وزن ثانویه)} ×۱۰۰

- درصد بازماندگی:

(تعداد اولیه ماهیان / تعداد ماهیان باقی‌مانده) ×۱۰۰

تعیین جنسیت بچه‌ماهیان به‌روش مولکولی PCR: به‌منظور تأیید صحت ماده‌سازی و تولید بچه‌ماهیان تمام ماده، تعیین جنسیت تعداد کل ۱۲۰ قطعه بچه‌ماهیان در دامنه‌وزنی ۲ گرم به‌روش مولکولی (PCR) توسط پرایمرهای طراحی شده براساس توالی بانک ژنی و نرم‌افزار برخط Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/) صورت پذیرفت (جدول ۳). بدین‌منظور نمونه‌برداری از باله پشتی بچه‌ماهیان (هر تیمار ۳۰ نمونه) به‌صورت تصادفی صورت گرفته و استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (MBST، کره جنوبی) انجام پذیرفت.

جدول ۳: مشخصات زوج پرایمرهای به‌کار رفته جهت تعیین جنسیت بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

توالی پرایمرها (F: رفت و R: برگشت)	اندازه باند (جفت باز)	ژن هدف	Gene ID
R- 5'CCCAGCACTGTTTTCTTGTCTCA3' F- 5'CTGTTGAAGAGCATCACAGGGTC3'	۳۷۰	SDY	101268975

* SDY (sexually dimorphic on the Y-chromosome gene): ژن تمایز جنسی روی کروموزوم-Y

برای تشخیص حضور کروموزم Y در نمونه‌ها از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) و تکثیر جایگاه ژنی مورد نظر استفاده شد. برای این منظور، یک میکرولیتر DNA استخراج شده از بافت باله پشتی، ۰/۱۵ میکرولیتر آنزیم تک پلی‌مراز (شرکت سینا ژن، تهران)، ۰/۴ میکرولیتر از دزوکسید نوکلئوتید تری فسفات (۱۰ میلی‌مولار)، ۰/۷ میلی‌لیتر کلرید منیزیوم ۵۰ میلی‌مولار، ۲ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، یک میکرولیتر از هر پرایمر استفاده شدکه‌درنهایت حجم آن با آب مقطر به ۲۰ میکرولیتر رسید. شرایط چرخه دمایی دستگاه ترموسایکلر برای هر جایگاه ژنی ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه‌سانتی‌گراد، درادامه ۳۵چرخه‌شامل ۹۴درجه‌سانتی‌گرادبرای ۳۰ثانیه،درجه‌حرارت

اتصال ۵۵-۶۲ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه با یک بسط نهایی ۷۲ درجه‌سانتی‌گراد برای ۱۰-۳ دقیقه بود. در این بررسی جهت آشکارسازی نتایج، محصول PCR به‌روش الکتروفورز روی‌ژل آگارز ۱/۵ درصد برده و تصویر ژل الکتروفورز تهیه شده توسط دستگاه ژل داکت مشاهده و عکس‌برداری شد (Gross و همکاران، ۲۰۰۷).

پرورش تیمارها به‌مدت ۱۸ ماه جهت کالبدشکافی و تعیین نسبت جنسیت: پس از پایان دوره تجویز هورمون‌تراپی، تیمارها به‌مدت ۱۸ ماه و تا زمانی که غدد جنسی (بیضه) آن‌ها رشد یافته و به مرحله تکثیر برسد با غذای فاقد هورمون تغذیه شدند (خوراک کیمیاگران تغذیه، شهرکرد). تعیین جنسیت مولدین با کالبدگشایی و مشاهده مستقیم اندام‌های جنسی انجام پذیرفت. در این مطالعه مقدار غذای روزانه و نیز تعداد دفعات غذادهی ماهیان مورد آزمایش براساس دمای آب، بیومس ماهی و طبق جداول خوراک دهی محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری: در ابتدا کار نرمال‌سازی داده‌ها پس از آزمون شاپیرو ویلک صورت گرفت. در این مطالعه از طرح آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار برای هر تیمار و شاهد استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ و با استفاده از تجزیه واریانس یک‌طرفه صورت گرفت. مقایسه میانگین بین تیمارهای مختلف براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تعیین شد ($P<0/05$).

نتایج

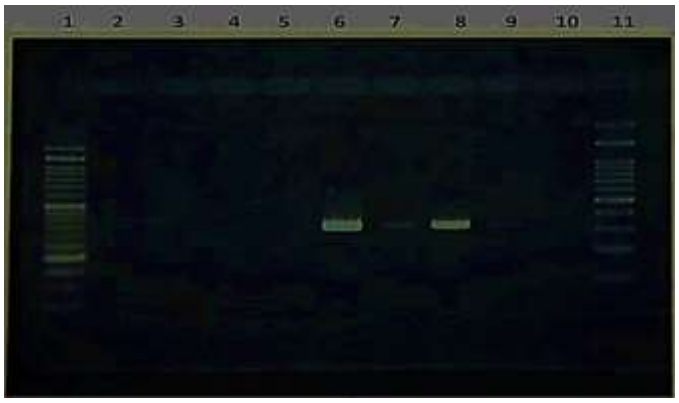
عملکرد رشد و بازماندگی لاروهای هورمون‌تراپی شده: نتایج مربوط به فاکتورهای رشد و بازماندگی تیمارهای مختلف تحت تأثیر هورمون ۱۷-آلفا متیل تستسترون در انتهای دوره ۶۰ روزه در جدول ۴ خلاصه شده است. براساس این نتایج میزان وزن نهایی، وزن کسب شده، درصد افزایش وزن و نرخ رشد ویژه در تیمار ۲ میلی‌گرم هورمون/کیلوگرم خوراک بچه‌ماهیان نسبت به گروه شاهد و تیمارهای دیگر بیش‌تر میزان بوده هر چند اختلاف مشاهده شده در بین تیمارهای مورد بررسی معنی‌دار نبوده است ($P>0/05$). نتایج این بررسی نشان داد که اختلاف معنی‌داری در درصد بازماندگی در ماهیان هورمون تراپی شده از مقادیر ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم به بالا با شاهد وجود داشته به‌طوری‌که بالاترین مقدار بازماندگی در تیمار شاهد مشاهده شد ($P<0/05$) و هم‌چنین تیمار ۰/۵ میلی‌گرم هورمون/کیلوگرم خوراک با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($P>0/05$).

جدول ۴: میانگین شاخص‌های رشد و بازماندگی لاروهای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف پس از گذشت ۶۰ روز هورمون‌تراپی

شاخص	میلی‌گرم هورمون ۱۷-آلفا متیل تستسترون در کیلوگرم خوراک				
	۰ (شاهد)	۰/۵	۱	۱/۵	۲
وزن اولیه (میلی‌گرم)	۱۰/۲±۱/۴^{a}	۱۰/۰±۱/۱^{a}	۱۰/۲±۱/۰^{a}	۱۰/۱±۱/۳^{a}	۱۰/۱±۱/۰^{a}
وزن نهایی (گرم)	۴/۲±۰/۱^{a}	۴/۴±۰/۲^{a}	۴/۴±۰/۱۱^{a}	۴/۷±۰/۱^{a}	۴/۸±۰/۳^{a}
وزن اکتسابی (گرم)	۴/۱±۰/۰۵^{a}	۴/۳±۰/۰۴^{a}	۴/۳±۰/۰۶^{a}	۴/۶±۰/۰۷^{a}	۴/۹±۰/۰۵^{a}
افزایش وزن بدن (٪)	۴۱۰/۵±۲۱/۹^{a}	۴۴۰/۰±۲۰/۸^{a}	۴۴۰/۰±۲۰/۸^{a}	۴۷۱/۵±۱۵/۹^{a}	۴۹۰/۰±۱۰/۸^{a}
نرخ رشد ویژه (درصد/روز)	۱/۲۱±۰/۰۱^{a}	۱/۲۳±۰/۰۳^{a}	۱/۲۵±۰/۰۳^{a}	۱/۲۷ ±۰/۰۲^{a}	۱/۲۹±۰/۰۳^{a}
ضریب تبدیل غذایی	۰/۴۱±۰/۰۲^{a}	۰/۴۰±۰/۰۱^{a}	۰/۳۸±۰/۰۱^{a}	۰/۳۷±۰/۰۱^{a}	۰/۳۷±۰/۰۱^{a}
بازماندگی (٪)	۸۲/۲±۱/۱^{a}	۸۱/۰±۲/۰^{ab}	۷۹/۱±۱/۴^{b}	۷۸/۱±۱/۱^{b}	۷۷/۸±۱/۴^{b}

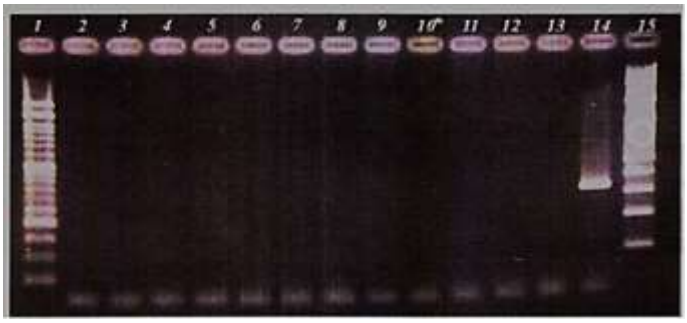
حروف غیرهمسان در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد می‌باشد ($P<0/05$).

آزمایشات مولکولی جهت تعیین جنسیت لاروهای هورمون تراپی شده: نتایج آزمایش مولکولی PCR در باله پشتی بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان هورمون‌تراپی‌شده با غلظت‌های مختلف هورمون ۱۷-آلفا متیل تستسترون جهت تعیین جنسیت ماهیان در شکل‌های ۱ تا ۳ نشان داده شده است. طبق نتایج حاصل شده با افزایش غلظت هورمون ۱۷-آلفا متیل تستسترون از غلظت ۰/۵ (شکل‌های ۱ تا ۳) به ۲ میلی‌گرم/کیلوگرم خوراک نسبت ماهیان ماده به نر افزایش یافته است و بهترین تأثیر در غلظت ۲ میلی‌گرم هورمون ۱۷-آلفا متیل تستسترون در کیلوگرم خوراک حاصل شده است که کلیه نمونه‌های مورد آزمایش نر بوده و باندی با اندازه ۳۷۰ bp بر روی ژل الکتروفورز مشاهده شده است ($P<0/05$).



شکل ۱: تشخیص مولکولی (PCR) جنسیت بچه‌ماهیان معمولی و تمام ماده تحت تأثیر غلظت ۰/۵ میلی‌گرم هورمون آلفا متیل تستسترون در کیلوگرم خوراک. ۱: مارکر (bp۵۰)، ۲: کنترل منفی مستر، ۸: کنترل مثبت، ۳-۷ و ۹-۱۰: نمونه‌ها ، ۱۱: مارکر (۵۰ bp). (حدود قابل قبول bp۳۷۰).

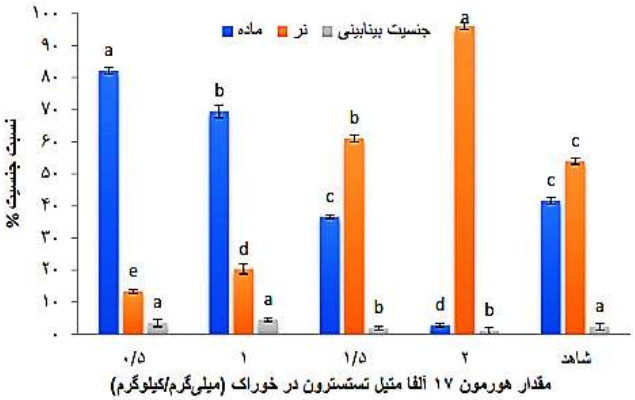
شکل ۲: تشخیص مولکولی (PCR) جنسیت بچه‌ماهیان معمولی و تمام ماده تحت تأثیر غلظت ۱/۵ میلی‌گرم هورمون آلفا متیل تستسترون در کیلوگرم خوراک (حدود قابل قبول bp۳۷۰). ۱: مارکر (bp۵۰)، ۲: کنترل منفی مستر، ۳: کنترل منفی استخراج، ۴-۱۷: نمونه‌ها، ۱۸: کنترل مثبت نر و ۱۵: مارکر (۱۰۰ bp).



شکل ۳: تشخیص مولکولی (PCR) جنسیت بچه‌ماهیان معمولی و تمام ماده تحت تأثیر غلظت ۲ میلی‌گرم هورمون آلفا متیل تستسترون در کیلوگرم خوراک (حدود قابل قبول bp۳۷۰). ۱: مارکر (bp۵۰)، ۲: کنترل منفی مستر، ۳: کنترل منفی استخراج، ۴-۱۳: نمونه‌ها، ۱۴: کنترل مثبت نر و ۱۵: مارکر (۱۰۰ bp).

تأثیر هورمون‌تراپی در تغییر جنسیت ماهیان پس از ۱۸ ماه

پرورش: در شکل ۴ نسبت جنسیت ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان بالغ تحت تأثیر هورمون‌تراپی پس از ۱۸ ماه پرورش و پس از کالبدشکافی نشان‌داده شده است. طبق نتایج حاصل شده با افزایش غلظت هورمون ۱۷-آلفا متیل تستسترون از غلظت ۰/۵ به ۲ میلی‌گرم/کیلوگرم خوراک نسبت مولدین ماده به نر افزایش یافته است و بهترین تأثیر در غلظت ۲ میلی‌گرم هورمون ۱۷-آلفا متیل تستسترون در کیلوگرم خوراک حاصل شده است (P<۰/۰۵). در این مطالعه درصد ماهی نر از ۵۴ درصد در تیمار شاهد به ۹۶ درصد نر در تیمار ۲ میلی‌گرم هورمون ۱۷-آلفا متیل تستسترون در کیلوگرم خوراک رسیده است. هم‌چنین بیش‌ترین و کم‌ترین درصد جمعیت با جنسیت بینابینی به ترتیب در تیمار ۱ میلی‌گرم هورمون ۱۷-آلفا متیل تستسترون در کیلوگرم خوراک (۴/۲۶±۰/۳ درصد) و تیمار شاهد (۱/۰±۰/۱ درصد) مشاهده گردید (P<۰/۰۵).



شکل ۴: نسبت جنسیت ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان بالغ تحت تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون ۱۷-آلفا متیل تستسترون

بحث

مزایای بالقوه استفاده از ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تک جنس ماده حاصل از تلاقی ماهیان مولد ماده معمولی و ماده تغییر جنسیت یافته (نر XX) در صنعت آبزی‌پروری شامل افزایش شاخص‌های رشد، حذف تولیدمثل ناخواسته، کاهش رفتارهای تولیدمثلی، کاهش مخاطرات ناشی از ورود تخم‌های وارداتی است (Koldras و همکاران، ۱۹۹۶). ازجمله روش‌های ایجاد جمعیت تمام ماده، تغییر جنسیت ماهیان ماده به نر به‌منظور تولید ماهیان نر XX در فرآیند لقاح می‌باشد (Hendryو همکاران، ۲۰۰۳). نتایج این مطالعه درخصوص شاخص‌های رشد و بهره‌وری غذا در لارو ماهیان هورمون‌تراپی شده نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار میان این شاخص‌ها با تیمار شاهد بود. درحالی‌که میزان بازماندگی در تیمار شاهد حداکثر بوده و در تیمارهای هورمون‌تراپی حداقل و با افزایش دوز خوراکی هورمون یک روند کاهشی

مشاهده شد. به‌طورمشابه Feist و همکاران (۱۹۹۵) بیان کردند که هورمون‌تراپی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با غلظت ۳ میلی‌گرم در کیلوگرم ۱۱بتا-هیدروکسی آندروستندیون اگرچه سبب درصد بالایی تغییر جنسیت به نر را فراهم می‌کند اما درصد بازماندگی لاروها نسبت به گروه شاهد کم‌تر است. نرخ مرگ و میر بالاتر ماهیان هورمون‌تراپی شده با استروئیدها جهت تغییر جنسیت به نر نسبت به گروه شاهد در برخی از گونه‌های ماهیان گزارش شده که تمام این تحقیقات علت اصلی مرگ و میر را ناشی از افزایش سوخت و ساز کبد نسبت داده و برخی با کالبدشکافی بزرگ شدن کبد را ثبت کرده‌اند (Karayucel و همکاران، ۲۰۰۶؛ Khiabani و همکاران، ۲۰۱۴؛ Khiabani و همکاران، ۲۰۱۶؛ Robert و همکاران، ۲۰۱۹). دلیل این امر می‌تواند به‌خاطر فرآیند آروماتیزه شدن هورمون‌های استروئیدی در بدن باشد چراکه هورمون‌های استروئیدی در غلظت‌های بالا سبب تحریک تولید ویتلوژنین شده و که در نهایت این امر سبب بروز صدمات کبدی می‌شود (Karayucel و همکاران، ۲۰۰۶). نتایج حاصل از این مطالعه موید آن است که امکان تغییر نسبت جنسیت در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با تجویز خوراکی هورمون ۱۷-آلفا متیل تستسترون به‌ویژه در غلظت ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وجود دارد. در این مطالعه درصد ماهی نر از ۵۴ درصد در تیمار شاهد به ۹۶ درصد در تیمار ۲ میلی‌گرم هورمون ۱۷-آلفا متیل تستسترون در کیلوگرم خوراک رسید. هم‌چنین بیش‌ترین و کم‌ترین میزان جمعیت با جنسیت بینابینی به‌ترتیب در تیمار ۱ میلی‌گرم هورمون/کیلوگرم خوراک(۰/۳±۴/۲۶ درصد)و تیمار شاهد(۰/۱±۱/۰ درصد)مشاهده گردید.در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و سایر ماهی‌ها از سوف نقره‌ای (*Bidyanus bidyanus*) (Fotedar و همکاران، ۲۰۱۷)، گربه‌ماهی آمریکایی (*Rhamdia quelen*) (Weiss و همکاران، ۲۰۱۸) و تیلاپیا (*Oreochromis sp*)(Campos-Ramos و همکاران، ۲۰۰۹) نیز تولید ماهی نر XX با استفاده از هورمون ۱۷ آلفامتیل تستسترون با موفقیت همراه بوده است (Campos-Ramos و همکاران، ۲۰۰۹). در یک مطالعه هم‌سو Atar و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که در بین هورمون‌های ۱۷-آلفا متیل تستوسترن، ۱۷ آلفا اتینیل تستوسترن و ۱۱ بتا-هیدروکسی اندروسترن ادیون جهت تولید ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تمام ماده، بیش‌ترین تأثیر توسط هورمون ۱۷-آلفا متیل تستوسترن و در غلظت ۳ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم خوراک پس از ۶۰ روز هورمون‌تراپی لاروهای قزل‌آلای حاوی کیسه زرده به‌میزان ۸۶/۶٪ ماهی ماده مشاهده شد. هم‌چنین، باشتی (۱۳۹۶) لاروهای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را به‌مدت ۶۰ روز پس از شروع تغذیه فعال با غذای حاوی هورمون ۱۷-آلفا متیل تستوسترن با غلظت‌های ۰/۵، ۱/۵، ۳، ۶ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم خوراک تغذیه نمودند. در این بررسی در ماهیان دریافت‌کننده جیره حاوی ۰/۵، ۱/۵ و ۳ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا ۱۰۰ درصد تغییر جنسیت به نر حاصل شد. Kuzminski و Dobosz (۲۰۱۰) لارو ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان که شروع به تغذیه فعال نموده بودند را در دو تیمار شامل ۱۷ آلفامتیل تستسترون(۶میلی‌گرم‌درکیلوگرم‌غذا) و ۱۱- بتا هیدروکسی آندرواستادیون (۲۰ میلی‌گرم در میلی‌گرم غذا) به‌مدت ۶۰ روز جهت تغییر جنسیت هورمون‌تراپی کردند. نتایج نشان داد از ماهیان تغذیه شده با ۱۷-آلفا متیل تستسترون مقدار ۵۹/۷٪ از جمعیت تبدیل به جنس نر XX و ۱/۶٪ به‌صورت دو جنسی بودند که کارایی کم‌تری نسبت به مطالعه حاضر داشته‌اند که ممکن است مرتبط با شرایط دمایی و پرورش، نحوه و مدت زمان هورمون‌دهی باشد که باعث بروز این تغییرات و تنوع در نتایج شده است. در مطالعه Tsumura و همکاران (۱۹۹۱) غذادهی ماهیان قزل‌آلا با هورمون ۱۷-آلفامتیل تستوسترن با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم/کیلوگرم غذا طی دوره ۶۰ روزه به‌ترتیب منجر به ایجاد ۸۲ و ۶۶ درصد ماهی نر در جمعیت ماهیان بالغ شد، هر چند کارایی و درصد ماهیان نر تولیدی در تحقیق حاضر بهتر از تحقیق مذکور است. Cousin-Gerber و همکاران (۱۹۸۹) با استفاده از هورمون متیل تستسترون با غلظت‌های ۰/۵ تا ۳ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا و طی دوره ۶۰ و ۹۰ روزه بعد از شروع تغذیه فعال جمعیت تمام ماده به ۸۹ تا ۹۷ درصد دست یافتند هر چند که هورمون ۱۷-آلفا متیل تستوسترن مورد استفاده در تحقیق حاضر در محدوده زمانی کوتاه‌تری نسبت بیش‌تری ماده نر تولید کرده است. در مطالعه حاضر مقدار بهینه هورمون برای ایجاد تغیر جنسیت به ماهی نر به‌روش خوراکی ۲ میلی‌گرم/کیلوگرم غذا و زمان شروع تجویز آن از زمان شروع تغذیه فعال و پس از دوره تجویز ۲ ماهه حاصل شد که هم‌سو با مطالعه Atar و همکاران (۲۰۰۹) بود. در مطالعه باشتی (۱۳۹۶) مقدار بهینه هورمون برای ایجاد تغیر جنسیت ماهی قزل‌آلا به جنس نر به‌روش خوراکی ۰/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم غذا و زمان شروع تجویز آن از زمان شروع تغذیه فعال و دوره تجویز ۶۰ روزه است در حالی‌که غلظت بهینه در تحقیق حاضر ۲ میلی‌گرم هورمون/کیلوگرم خوراک به‌مدت ۲ ماه تجویز بوده است. Yamazaki (۱۹۸۳) بیان داشت که تجویز خوراکی هورمون در قزل‌آلای رنگین‌کمان زمانی‌که درست پس از شروع تغذیه فعال آغاز گردد مؤثرتر خواهد بود. در مطالعه هم‌سو، باشتی (۱۳۹۶) نیز نشان داد که تجویز هورمون ۱۷ آلفامتیل تستسترون در جیره غذایی ماهی قزل‌آلا بر روی فاکتور رشد تاثیری نداشته است. بررسی‌ها نشان‌دهنده آن بوده که تجویز هورمون ۱۷-آلفا متیل تستسترون در جیره غذایی در جیره غذایی ماهیان کپور علف‌خوار (*Ctenopharyngdon idellus*)، کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) و ماهی آزاد کوهو (*Oncorhynchus kistuch*) منجر به بهود شاخص‌های رشد شده است (Nagy و همکاران، ۱۹۸۱؛ Degani و

Dosoretz، ۱۹۸۶). در نقطه مقابل با تحقیق حاضر، Kocmarek و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که عملکرد رشد ماهیان تمام ماده قزل آلای رنگین‌کمان حاصل از تلاقی برگشت نسبت به ماهیان با جنسیت مختلف بالاتر بوده است، با این‌حال مشخص نیست که آیا این هورمون به‌صورت مستقیم باعث افزایش‌وزن شده است یا این‌که از طریق تغییر جنسیت این افزایش وزن حاصل شده است. Yamazaki (۱۹۷۶) بیان کرد که افزایش رشد ماهی در نتیجه مصرف هورمون به‌میزان مصرف هورمون بستگی دارد. به‌طوری‌که حمام‌دهی ماهی‌طلایی غلظت بالای ۱۰ میلی‌گرم در لیتر منجر به جلوگیری از رشد شده است. بنابراین این نتایج متناقض رشد در گونه‌های مختلف می‌تواند ناشی از شرایط متفاوت پرورشی، طول دوره هورمون‌تراپی و گونه مورد بررسی داشته باشد. در تکثیر مصنوعی ماهیان جنسیت و هم‌چنین مرحله رسیدگی جنسی دارای اهمیت زیادی می‌باشد (باشتی، ۱۳۹۶). در حال حاضر به‌دلیل عدم وجود تفاوت‌های مورفولوژیکی واضح میان ماهیان قزل آلا نر و ماده در مراحل مختلف رسیدگی جنسی، تشخیص جنسیت با مشکلاتی همراه است. به‌طوری‌که، ماهیان تا رسیدگی جنسی و فصل تکثیر به درستی جنسیت آن‌ها تشخیص داده نمی‌شود (Rud و همکاران، ۲۰۱۵). اگرچه قابلیت تعیین جنسبت ملکولی برای ماهیان در سنین پایین وجود داشته و تعیین جنسیت ژنتیکی در ماهی می‌تواند شامل سیستم‌های تک ژنی و چند ژنی باشد که روی اتوزوم‌ها یا کروموزوم‌های جنسی واقع است و اساساً سه الگو شامل کروموزومی، چند ژنی و بر هم کنش ژنوتیپ و محیط برای تعیین جنسیت زنتیکی شناخته شده است. یکی از راه‌های تشخیص سریع و آسان جنسیت درمراحل اولیه‌زندگی، استفاده از تکنیک‌های PCR به‌عنوان یک روش غیرتهاجمی با صحت و کارایی بالا جهت تأیید کاریی فنی مزارع تکثیر در طی چرخه هورمون‌تراپی می‌باشد (Felip و همکاران، ۲۰۰۵). نتایج آزمایش PCR بر روی بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان هورمون تراپی شده با غلظت‌های مختلف هورمون ۱۷-آلفا متیل تستسترون نشان داده که با افزایش غلظت هورمون ۱۷-آلفا متیل تستسترون از غلظت ۰/۵ به ۲ میلی‌گرم/کیلوگرم خوراک نسبت ماهیان بچه‌ماهیان ماده به نر افزایش یافته و بهترین تأثیر در غلظت ۲ میلی‌گرم هورمون ۱۷-آلفا متیل تستسترون در کیلوگرم خوراک حاصل شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده از این تحقیق امکان تغییر نسبت جنسیت در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با تجویز خوراکی هورمون ۱۷ آلفامتیل تستسترون به‌ویژه در غلظت ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم خوراک وجود دارد. استفاده از هورمون ۱۷ آلفامتیل تستسترون پس از دوره ۶۰ روزه تغذیه از زمان تغذیه فعال لاروها بود. هم‌چنین روش PCR به‌کار رفته در این مطالعه از سرعت، حساسیت و اختصاصیت لازم جهت شناسایی تغییر جنسیت بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان برخوردار بوده به‌عنوان یک روش غیرتهاجمی سودمند مطرح می‌باشد. به‌طورکلی، نتایج این مطالعه نشان‌داد که با افزایش غلظت هورمون ۱۷-آلفامتیل تستسترون از غلظت ۰/۵ به ۲ میلی‌گرم/کیلوگرم نسبت تغییر جنسیت ماهیان مولد ماده به نر افزایش یافته است و بالاترین تغییر جنسیت به نر تغییر جنسیت یافته با فنوتیپ جنس ماده (نر XX) با ۱/۰±۹۶/۰ درصد در ماهیان تغذیه‌شده با غلظت ۲ میلی‌گرم هورمون ۱۷-آلفا متیل تستسترون در کیلوگرم خوراک حاصل شد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بدین‌وسیله از پرسنل محترم شرکت آبزی اکسیر کوثر به‌واسطه تأمین مالی، حمایت‌های عملیاتی و علمی این پروژه کمال تشکر را دارد. هم‌چنین از همکاری مجتمع آزمایشگاهی کوثر (آزمایشگاه دامپزشکی کوثر) نیز قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. **ایمانپور، ج.؛ عرب‌صباحی، ا.م.؛ بحرکاظمی، م. و مختاری، م.، ۱۳۹۵.** اثرات رژیم غذایی حاوی ۱۷- بتا استرادیول روی رشد، تغییر جنسیت و برخی فراسنجه‌های خون‌شناسی در ماهی گورامی سه‌خال (*Trichogaster trichopterus*). محیط‌زیست جانوری. دوره ۸، شماره ۳، صفحات ۲۳۷ تا ۲۴۴.

۲. **باشتی، ط.، ۱۳۹۶.** تولید جمعیت تمام ماده ماهی قزل‌آلای رنگین کمان به‌روش ماده‌سازی غیرمستقیم. طرح موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، یاسوج. ۳۸ صفحه.

۳. **سالنامه آماری سازمان شیلات ایران. ۱۳۹۶.** ناشر سازمان شیلات ایران/معاونت برنامه‌ریزی و توسعه مدیریت/دفتر برنامه و بودجه. ۶۴ صفحه.

4. **APHA. 2005.** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st Edition, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC.

5. **Atar, H.H.; Bekcan S. and Dogankaya L., 2009.** Effects of different hormones on sex reversal of rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) and production of all-female populations. Biotech Equip. Vol. 23, No. 4, pp: 1509-1514.

6. **Billard, R.; Petit, J.; Jalabert, B. and Szoilosi, D., 1974.** Artificial insemination in trout using a sperm diluent. pp: 715-723. In: Blaxter, J.H.S., 4nd edition. Early Life History of Fish. Springer Verlag Pbu., Berlin. 325 p.

7. **Campos-Ramos, R.; Harvey, S.C. and Penman, D.J., 2009.** Sex-specific differences in the synaptonemal complex in the genus *Oreochromis* (Cichlidae). Genetica. Vol. 135, No. 3, pp: 325-332.

8. **Chávez-García, R.; Contreras-Ramos, A.; Ortega Camarillo, C.; Figueroa-Lucero, G.; Prado-Flores, G.; Mendoza-Martínez, G. and Vergara-Onofre, M., 2020.** Morphometric comparison of the growth curve in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) sexually reverted to masculinized & feminized. Lat. Am. J. Aquat. Res. Vol. 48, No. 1, pp: 1-6.

9. **Cousin-Gerber, M.; Burger; G.: Boisseau, C. and Chevassus, B., 1989.** Effect of methyltestosterone on sex differentiation and gonad morphogenesis in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Aquat. Living Resour. Vol. 2, No. 1, pp: 255-230.

10. **Degani, G. and Dosoretz, C., 1986.** The effect of 3,3', 5-triiodo-L-thryronine and 17a-methyltestosterone on growth and body composition of the glass stage of the eel (*Anguilla Anguilla*). Fish Physiol. Biochem. Vol. 1, No. 3, pp: 145-l55.

11. **Dunham, R.A., 2014.** Aquaculture and fisheries biotechnology: genetic approaches. Cabi. 504 p.

12. **Fatima, S.; Adams, M. and Wilkinson, R., 2016.** Sex reversal of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) by 17 α-methyltestosterone exposure: A serial experimental approach to determine optimal timing and delivery regimes. Anim. Reprod. Sci. Vol. 175, pp: 39-47.

13. **Feist, G.; Yeoh, C.G.; Fitzpatrick, M.S. and Schreck, C.B., 1995.** The production of functional sex-reversed male rainbow trout with 17α-methyltestosterone and 11 β-hydroxyandrostenedione. Aquaculture. Vol. 131, No. 1-2, pp: 145-152.

14. **Felip, A.; Young, W.P.; Wheeler, P.A. and Thorgaard, G.H., 2005.** An AFLP based approach for the identification of sexlinked markers in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). Aquaculture. Vol. 274, No. 1, pp: 35-43.

15. **Folmar, L.C.; Hemmer, M.; Hemmer, R.; Bowman, C.; Kroll, K. and Denslow, N.D., 2000.** Comparative estrogenicity of estradiol, ethynyl estradiol and diethylstilbestrol in an in vivo, male sheepshead minnow (*Cyprinodon Õariegatus*), vitellogenin bioassay. Aquat Toxicol. Vol. 49, No. 1, pp: 77-88.

16. **Fotedar, R., 2017.** Masculinization of silver perch (*Bidyanus bidyanus* Mitchell 1838) by dietary supplementation of 17 α-methyltestosterone. Egypt. J. Aquat. Res. Vol. 43, No. 1, pp: 109-116.

17. **Gross, R.; Lulla, P. and Paaver, T., 2007.** Genetic variability and differentiation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) strains in northern and Eastern Europe. Aquacult Res. Vol. 272, No. 1, pp: 139-146.

18. **Hendry, C.I.; Martin-Ribochaud, D.J. and Benfey. T.J., 2003.** Hormonal sex reversal of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Aquaculture. Vol. 219, No. 1, pp: 769-781.

19. **Hevroy, E.M.; Espe, M.; Waagbo, R.; Sandness, K.; Rund, M. and Hemre, G.I., 2005.** Nutrition utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) fed increased level of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. Aquac Nutri. Vol. 11, No. 1, pp: 301-313.

20. **Hoseinzadeh Sahafi, H.; Bashti, T. and Zargham, D., 2010.** Dietary Effects of 01-β Estradiol on Sex Reversal of Rainbow Trout in Early Larval Stage. J Adv Environ Biol. Vol. 5, No. 9, pp: 2011-2018.

21. **Karayucel, I.; Orhan, A.K. and Karayucel, S., 2006.** Effect of different level of 17α methyltestosterone on growth and survival of angelfish (*Pterophyllum scalare*) fry. J. Anim. Veter. Advan. Vol. 5, No. 3, pp: 244-248.

22. **Khiabani, A.; Anvarifar, H. and Mousavi-Sabet, H., 2016.** Effect of dietary administration of methyltestosterone and vitamin C on the sex reversal and survival of *Xiphophorus maculatus* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). Poeciliid Res. Vol. 6, No. 1, pp: 16-24.

23. **Khiabani, A.; Anvarifar, H.; Safaeian, S. and Tahergorabi, R., 2014.** Masculinization of swordtail *Xiphophorus hellerii* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) treated with 17α-methyltestosterone and vitamin E. Glob. Res. J. Fish. Sci. Aquacult. Vol. 1, No. 5, pp: 21-25.

24. **Koldras, M.; Loir, M.; Maisse, G. and Le Gae, F., 1996.** Study of the composition of the seminal fluid and of sperm motility along genital tract, during a spawning season, in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat Living Resour. Vol. 9, No. 4, pp: 337-345.

25. **Kuzminski, H. and Dobosz, S., 2010.** Effect of sex reversal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) using 17-methyltestosterone and 11-hydroxyandrostenedione. Arch Pol Fish. Vol. 18, No. 1, pp: 45-49.

26. **Lee, S.L.J.; Horsfield, J.A.; Black, M.A.; Rutherford, K.; Fisher, A. and Gemmell, N.J., 2017.** Histological and transcriptomic effects of 17α-methyltestosterone on zebrafish gonad development. BMC Genom. Vol. 18, No. 1, pp: 557-573.

27. **Nagy, A.; Bercsenyi, M. and Csanyi, V., 1981.** Sex reversal in carp (*Cyprinus carpio*) by oral administration of methyltestosterone. Can J Fish Aquatic Sci. Vol. 38, No. 1, pp: 725-728.

28. **Pavlov, E.; Ganzha, E.V.; Ponomareva, V.Y.; Kostin, V.V.; Pavlov, D. and Thu Ha, V.T., 2016.** Effect of methyltestosterone on physiological state and rheoreaction of rainbow trout Parasalmo mykiss (*Oncorhynchus mykiss*) under unfavorable keeping conditions. J Ichthyol. Vol. 56, No. 6, pp: 904-915.

29. **Piferrer, F., 2001.** Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. Aquaculture. Vol. 197, No. 1, pp: 229-281.

30. **Ramee, S.W.; Lipscomb, T.N. and DiMaggio, M.A., 2020.** Effects of 17α-methyltestosterone feeding and immersion on masculinization of rosy barbs *Pethia conchonius* and dwarf gouramis *Trichogaster lalius*. J World Aquacult. Soc.

31. **Robert, E.A.; Onyeche, V.O.; Ovie, S.O.; Biyontubo, O.; Ekundayo, T. and Offor, C.C., 2019.** Growth, survival and reproductive success of *Clarias gariepinus* broodstocks fed feed mixed with 17-α-methyl testosterone (mt) in stagnant concrete systems. Sci. Res. J. Vol. 7, No. 3, pp: 17-32.

32. **Rud, Y.P.; Maistrenko, M.I. and Buchatskii, L.P., 2015.** Sex identification of the rainbow trout Oncorhynchus mykiss by polymerase chain reaction. Ontogenez. Vol. 46, No. 2, pp: 87-93.

33. **Thorgaard, G.H., 1992.** Application of genetic technologies to rainbow trout. Aquaculture. Vol. 100, No. 1, pp: 85-97.

34. **Tsumura, K.; Blann, V.E. and Lamont, C.A., 1991.** Progeny test of masculinized female rainbow trout having functional gonoducts. Progressive Fish Culturist. Vol. 53, No. 1, pp: 45-47.

35. **Weber, G. and Leeds, T., 2017.** Immersion of fry in 17-Alpha Methyltestosterone can be highly effective for sex reversal in rainbow trout. Am. Fish. Soc. Symp. Vol. 1, pp: 11-14.

36. **Weiss, L.A.; Bernardes-Júnior, J.J.; Machado, C. and de-Oliveira-Nuñer, A.P., 2018.** Masculinization of South American catfish (*Rhamdia quelen*) through dietary administration of 17α-methyltestosterone. Rev. Colomb. Cienc. Pec. Vol. 31, No. 4, pp: 304-314.

37. **Yamazaki, F., 1983.** Sex control and manipulation in fish. Aquaculture. Vol. 33, pp: 329-354.