13 (3) 181-188, Autumn 2021

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

Original Research Paper

Study on the effect of phytoestrogen genistein on sex hormones of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae in sex differentiation stage

***Tayebeh Bashti* [*1], *Mohammadreza Imanpour* [1], *Homayoun Hosseinzadeh Sahhafi* [2], *Davood Zargham* [2]**

[1] *Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran*

[2] *Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran*

Key Words

Genistein
Rainbow trout
Phytoestrogen
Hormone

Abstract

Introduction: Phytoestrogens are plant-based and anti-nutrient substances that usually have estrogenic activities. These substances affect gonadal evolution and sexual differentiation in some aquatic species. Phytoestrogens may have a similar effect to estrogen or, conversely, have the ability to block the effect of estrogens. One of the plants used in the diet of fish, especially Rainbow trout, is soy and its derivatives. One of the most important phytoestrogenic compounds in soy is Genistein.

Materials & Methods: In the present study, genistein was administered in three doses of 40, 400 and 800 mg/kg of feed to larvae during the sex differentiation period. 17 beta-Estradiol treatment and Methyl Testosterone treatment were also considered for comparison. The larvae of one treatment did not receive any hormones as a control treatment. The duration of hormonal feeding to larvae was 60 days from the beginning of active feeding and at the end of the hormonal feeding period, the levels of 17 beta-Estradiol, Testosterone and 17 OH-Progesterone, Vitellogenin level and free phosphate level in different treatments were evaluated and compared.

Result: The results showed that the highest level of 17 beta-Eestradiol was measured in treatment E and the treatments containing Genistein had lower levels of this hormone ($P \leq 0.05$). Also, the level of Vitellogenin was somewhat lower in the treatment of Genistein but the change in the amount Feed Genistein did not show a significant difference in this regard ($P > 0.05$).

Conclusion: The results showed that at the end of the hormonal feeding period, phytoestrogen Genistein did not have an acute and significant effect on the levels of sex steroids and Rainbow Trout larvae Vitellogenin and partially reduced sex steroids, especially 17 beta-Estradiol and 17 OH-progesterone.

* Corresponding Author's email: tbashty@gmail.com

Received: 26 July 2020; Reviewed: 18 September 2020; Revised: 3 November 2020; Accepted: 3 December 2020
(DOI): 10.22034/AEJ.2020.241249.2310

مقاله پژوهشی

بررسی اثر فیتواستروژن جنستئین بر هورمون‌های جنسی لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در مرحله تمایز جنسی

طیبه باشتی[1*]، محمدرضا ایمانپور[1]، همایون حسین‌زاده‌صحافی[2]، داود ضرغام[1]

[1] گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
[2] موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

کلمات کلیدی

جنستئین
قزل‌آلای رنگین‌کمان
هورمون
فیتواستروژن

چکیده

مقدمه: فیتواستروژن‌ها مواد گیاه پایه و ضدمغذی‌هایی هستند که معمولاً دارای فعالیت‌های استروژنیک می‌باشند. این مواد بر روی تحول گنادی و تمایز جنسی در برخی از گونه‌های آبزیان تاثیرگذارند. فیتواستروژن‌ها ممکن است اثر مشابهی با استروژن داشته و یا بالعکس توان بلاک کردن اثر استروژن‌ها را داشته باشند. یکی از گیاهانی که در جیره غذایی ماهیان و مخصوصاً ماهی قزل‌آلا مورد استفاده قرار می‌گیرد، سویا و مشتقات آن است. یکی مهم‌ترین ترکیبات فیتواستروژنی موجود در سویا جنستئین می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر، جنستئین در ۳ دوز ۴۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم خوراک برای لاروها در دوره تمایز جنسی تجویز شد. هم‌چنین تیمار ۱۷ بتا- استرادیول و تیمار متیل تستوسترون نیز برای مقایسه درنظر گرفته شد. لاروهای یک تیمار نیز به‌عنوان تیمار شاهد هیچ‌گونه هورمونی دریافت نکردند. مدت تجویز خوراک هورمونی به لاروها ۶۰ روز از زمان شروع تغذیه فعال بود و در پایان دوره غذادهی هورمونی، مقادیر هورمون‌های ۱۷ بتا- استرادیول، تستوسترون و ۱۷ OH- پروژسترون، سطح ویتلوژنین و هم‌چنین سطح فسفات آزاد در تیمارهای مختلف بررسی و مقایسه شد.

نتایج: نتایج نشان داد که فیتواستروژن جنستئین تا حدی کاهش استروئیدهای جنسی علی‌الخصوص ۱۷ بتا-استرادیول و ۱۷OH- پروژسترون را ایجاد نمود به‌طوری‌که بیش‌ترین سطح هورمون ۱۷ بتا-استرادیول در تیمار E اندازه‌گیری شد و تیمارهای حاوی جنستئین دارای مقادیر پایین‌تری از این هورمون بودند ($P\leq ۰/۰۵$). هم‌چنین سطح ویتلوژنین نیز در تیمارهای جنستئینی تا حدی پایین‌تر بود ولی تغییر در میزان جنستئین خوراک اختلاف معنی‌داری در این خصوص از خود نشان نداد ($P>۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری و بحث: نتایج نشان داد که در پایان دوره غذادهی هورمونی، فیتواستروژن جنستئین تأثیر حاد و قابل توجهی بر روی سطح استروئیدهای جنسی و نیز ویتلوژنین لارو ماهی قزل‌آلا نداشت.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: tbashty@gmail.com

تاریخ دریافت: ۵ مرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ داوری: ۲۸ شهریور ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۱۳ آبان ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳ آذر ۱۳۹۹
(DOI): 10.22034/AEJ.2020.241249.2310

مقدمه

فیتواستروژن‌ها مواد گیاه پایه و ضدمغذی‌هایی هستند که دارای فعالیت‌های استروژنیک می‌باشند. این مواد بر روی تحول گنادی و تمایز جنسی ماهی‌ها تاثیر گذارند. بسته به نسبت فیتواستروژن به استروژن‌های درون‌زاد، فعالیت آروماتازی، گونه ماهی، مرحله تولیدمثلی (گنادی)، طول دوره expose، روش به‌کارگیری آن، فیتواستروژن‌ها ممکن است اثر مشابهی با استروژن داشته و یا بالعکس توان بلاک کردن اثر استروژن‌ها را داشته باشند. یکی از گیاهانی که در جیره غذایی ماهیان و مخصوصاً ماهی قزل‌آلا مورد استفاده قرار می‌گیرد، سویا و مشتقات آن است. مهم‌ترین ترکیبات فیتواستروژنی موجود در سویا جنستئین و دیادزین می‌باشند. جنستئین نوعی ایزوفلاوون می‌باشد و در غلظت‌های بالا در سویا وجود دارد. این ماده در مطالعات مختلفی اثرات متفاوت استروژنی و یا آنتی‌استروژنی از خود نشان داده است (Green و Kelly، ۲۰۰۸؛ Yuliana و همکاران، ۲۰۰۶). در سال‌های اخیر از دو هورمون ۱۷ بتا استرادیول و متیل تستوسترون برای کنترل و تغییر جنسیت ماهی‌ها استفاده می‌شود. کنترل جنسیت در تولید برخی از ماهیان پرورشی مهم است، به‌ویژه اگر هدف، تولید جنس خاصی برای پرورش باشد. علت این کنترل جنسیت ممکن است تولید یک جنس با هدف جلوگیری از بلوغ زودرس و یا دستیابی به تولید بیش‌تر باشد. کنترل جنسیت با استفاده از هورمون‌ها بدون هیچ‌گونه تاثیری بر تعیین جنسیت (کروموزوم) فقط بر روی مراحل تمایز جنسی تاثیرگذار است. بنابراین در گونه‌هایی مانند قزل‌آلا که سیستم تعیین جنسیت به صورت کروموزومی است این روش بی آن‌که نوع کروموزوم‌های جنسی پس از درمان دچار تغییر گردد به‌ترتیب باعث ماده‌سازی (feminization) و نرسازی (masculinization) می‌شود (Hendry و همکاران، ۲۰۰۶). در چندین گونه پرورشی ازجمله نیل تیلاپیا، خرچنگ آب شیرین، آزاد ماهی اطلس و قزل‌آلای رنگین‌کمان بلوغ جنسی و تولیدمثل قبل رسیدن به سایز مناسب برای برداشت رخ می‌دهد که این بلوغ زودرس منجر به کاهش سرعت رشد و افت درکیفیت گوشت از طریق انحراف انرژی به سمت بلوغ جنسی و فرآیندهای تولیدمثل و درنتیجه تفاوت در ارزش اقتصادی بین جنس نر و ماده می‌گردد. میل به ایجاد جمعیت تک جنس در مزرعه باعث غالبیت یک جنس خاص می‌شود. برای مثال، تیلاپیای نیل نر (*Oreochromis niloticus*)، رشد سریع‌تر و نرخ تبدیل خوراک کم‌تر از جنس ماده دارد، درحالی‌که میگو ماده *Kuruma* به‌طورکلی بزرگ‌تر از جنس نر در زمان برداشت محصول است. در مورد قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز جنس ماده رشد بیش‌تری از جنس نر خصوصاً در دوران نزدیک به بلوغ دارد (Budd و همکاران، ۲۰۱۵). مکانیسم ظهور جنس در ماهیان به دو فرایند تعیین جنسیت و تمایز جنسی بستگی دارد. تعیین جنسیت در نتیجه صفات ژنتیکی جنس (ژنوتیپ) می‌باشد و تمایز جنسی مشخص‌کننده نوع تکامل گنادها، جنسیت گنادی (بیضه یا تخمدان) یا به‌عبارتی فنوتیپ خواهد بود (Leet و همکاران، ۲۰۱۱؛ Billard، ۱۹۸۹). تمایز جنسی شامل مهاجرت سلول‌های بنیادی جنینی (PGCs)، استقرار غدد تولیدمثلی و نهایتاً تمایز گنادها به‌صورت بیضه ویا تخمدان می‌باشد و در گونه‌های تمایز یافته یا gonochorist در گنادها مستقیماً به یک تخمدان یا بیضه تبدیل می‌شود. به‌طورکلی موجوداتی که از لحاظ جنسی تمایز نیافته‌اند در مقایسه با هم‌نوعان تمایز یافته خود، نسبت به اثرات درمانی استروئیدها حسّاس‌ترند. وقوع دوره حسّاس تمایز جنسی بیانگر حوادث پیچیده درگنادها است که نمی‌توان آن را از لحاظ هیستولوژیک مشاهده نمود (Nagahama، ۲۰۰۰)، زیرا این حوادث جزء اولین علائم هیستولوژیک تمایز جنسی محسوب می‌گردد (Nakamura و همکاران، ۱۹۷۳). این دوره مرحله‌ای است که از آن به نام تمایز جنسی فیزیولوژیک یاد می‌شود (Piferrer، ۲۰۰۱). حساس‌ترین نقطه زمانی برای مواجهه با هورمون در ماهی در طی تمایز جنسی است (Liao و همکاران، ۲۰۰۹). دوره حساس تمایز جنسی یا labile period در موفقیت تغییر جنسیت بسیار با اهمیت می‌باشد. زمان وقوع دوره حسّاس تمایز جنسی در گونه‌های مختلف متفاوت است. دوره labile در قزل‌آلای رنگین کمان هم‌زمان با شروع جذب کیسه زرده و شروع شنای فعال همراه خواهد بود. مصرف خوراکی هورمون هم‌زمان با شروع تغذیه فعال یعنی هم‌زمان با دوره حساس تمایز جنسی در قزل‌آلا باعث بیش‌ترین اثرات تمایز جنسی می‌گردد (Piferrer، ۲۰۰۱). بیش‌تر تحقیقات برای مطالعه اثرات اندروژن و استروژن در ماهی‌های بالغ انجام شده‌اند. منابع کمی درخصوص اثرات این هورمون‌ها بر روی ماهی‌ها در مراحل اولیه زندگی وجود دارد به‌خصوص در دوره‌های با حساسیت بالا نظیر تمایز جنسی (Leet و همکاران، ۲۰۱۱). یکی از نکات مهم در این دوره دریافت منظم و کامل هورمون از طریق غذا است. عدم دریافت منظم غذا توسط لاروهای نورس در روزهای ابتدایی تغذیه تا حدودی در آزمایش خطا ایجاد می‌کند (حسین‌زاده و همکاران، ۱۳۹۰؛ رزمی و همکاران، ۱۳۸۶). فیتواستروژن‌ها همانند استروژن توانایی بلاک کردن بیوسنتز را دارند. این کار توسط عملی شبیه به محدودکننده‌ها و آنتاگونیست‌های آروماتاز برای رسپتور استروژنی هسته‌ای در سلول‌های نطفه‌ای گنادی (gonad germ cells) صورت می‌گیرد و بنابراین می‌تواند به‌عنوان یک حد واسط بالقوه باعث تغییر جنسیت در ماهی‌ها گردد (Rample و Schlenk، ۲۰۰۸). اطلاعات محدود و با نتایج متفاوت در مورد اثر فیتواستروژن‌ها در ماهی‌ها وجود دارد. اثر و عملکرد فیتواستروژن‌ها بر روی ماهی‌ها احتمالاً در گونه‌های مختلف ماهیان اختصاصی و متفاوت از سایر گونه‌هاست. این مواد می‌توانند به‌عنوان

آگونیست یا آنتاگونیست استروژنی در مقابل استروژن درون‌زاد عمل کند. بنابراین ممکن است رفتاری مشابه با انواع استروئیدهای جنسی از خود نشان دهند. اثرات مختلف مواجهه استروئیدها بر روی ماهی‌ها شامل افزایش رشد غده جنسی، تغییر در اسپرماتوژنز، تغییرات پاتولوژیک در غدد جنسی، کاهش خصوصیات ثانویه جنس نر، و نسبت جنسی می‌باشد (Fibly و همکاران، ۲۰۰۷). از طرفی برخی از اندروژن‌ها در زمانی که در مراحل اولیه اعمال شود تولید ماهی‌های دوجنسه می‌کنند. دوجنسگی در جمعیت‌های ماهی مواجه با غلظت‌های محیطی استروئیدها در زمان تفکیک جنسی دارای شیوع بالایی در مقایسه با جمعیت‌های مرجع است (Hirai و همکاران، ۲۰۰۶). این تحقیق با هدف مقایسه تاثیر احتمالی دوزهای مختلف ماده جنستئین بر سطوح هورمونی لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و مقایسه آن با هورمون‌های معمول برای نرسازی و ماده‌سازی طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

مراحل عملیاتی این پایان‌نامه در مرکز تحقیقات ماهیان سردابی تنکابن (مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور) انجام شد.

هورمون‌ها و فیتواستروژن مورد استفاده و تیمارهای آزمایشی: جنستئین مورد استفاده در این پژوهش (4′,5,7-trihydroxyisoflavone) به‌صورت پودر تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. هم‌چنین در این آزمایش هورمون ۱۷- بتا استرادیول E2 و هورمون ۱۷- آلفا متیل تستوسترون (MT) برای مقایسه عملکرد جنستئین مورد استفاده قرار گرفت. به‌منظور تعیین نوع و میزان اثرگذاری فیتواستروژن جنستئین، این ماده در سه تیمار و با سه دوز مختلف به خوراک ماهی اضافه شد. تیمارهای جنستئین دوزهای ۴۰ میلی‌گرم، ۴۰۰ میلی‌گرم و ۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا را دارا بودند (Yousefi joordehi و همکاران، ۲۰۱۴؛ Malisson و همکاران، ۲۰۰۵؛ Benetto-Pellisero و همکاران، ۲۰۰۱). هم‌چنین در این آزمایش یک تیمار با دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم هورمون ۱۷- بتا استرادیول (E2) را دریافت نمود (حسین زاده‌صحافی، ۱۳۹۰). یکی دیگر از تیمارهای طراحی شده، تیمار متیل تستوسترون (MT) است که لاروهای قزل‌آلای این تیمار، ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم غذا از این هورمون دریافت نمودند (باشتی، ۱۳۹۵). لاروهای قرار گرفته در تیمار شاهد این آزمایش نیز در تمام مدت آزمایش خوراک مشابه و بدون هورمون را دریافت نمودند. بدین‌ترتیب این آزمایش دارای ۶ تیمار بود که متشکل از ۳ تیمار جنستئین، یک تیمار E2، یک تیمار MT و یک تیمار شاهد می‌باشد. برای سهولت در کار، تیمارهای جنستئین به‌ترتیب G1، G2، و G3 نام‌گذاری شدند و تیمار استرادیول به‌عنوان E، تیمار تستوسترون با نام MT و تیمار شاهد با نام تیمار C نام‌گذاری گردیدند. هریک از تیمارها در سه تکرار انجام شد. در هر تکرار آزمایش ۵۰۰ لارو قزل‌آلا که در شروع شنای آزاد و تغذیه فعال بودند قرار خواهد داشتند. غذادهی به لاروها از زمانی شروع شد که ۵۰ درصد لاروها شروع به شنا نمودند. خوراک مورد استفاده در این آزمایش در سه سایز غذای استارتر در دوره‌های ۲۰ روزه تهیه و به‌مدت ۶۰ روز به لاروها داده شد. غذادهی در ابتدا ۱۰ بار در روز و در انتهای دوره نیز ۶ بار در روز صورت گرفت (Kuzminski و Dabosz، ۲۰۱۰). ماهی‌های متعلق به هر تکرار از آزمایش در یک تراف جداگانه نگه‌داری شدند. برای چیدمان تراف‌ها از طرح بلوک‌های کامل تصادفی استفاده شد. از این طرح زمانی استفاده می‌شود که ماده آزمایشی یکنواخت نباشد (Anderson و Whitcomb، ۲۰۰۱).

نحوه تجویز هورمون و اضافه نمودن هورمون به غذا: در این تحقیق از روش تجویز خوراکی هورمون برای تغییر جنسیت استفاده شد، زیرا این روش به‌عنوان یک روش بهینه معرفی گردیده است (Pandian و Sheela، ۱۹۹۵). غذای کنستانتره شرکت بیومار فرانسه در این تحقیق مورد استفاده قرار می گیرد. برای تهیه غذای هورمونی مقدار مشخص هورمون‌ها را برای هر تیمار در اتانول ۹۶ درجه حل نموده و به‌ازای هر کیلو غذا ۲۰۰ سی‌سی اتانول همراه با هورمون به غذا اسپری گردید. این کار در چندین مرحله انجام شد تا هورمون کاملاً با تمام غذا مخلوط گردد. پس از اتمام این مرحله غذا کاملاً خشک گردیده و به‌منظور حفظ کیفیت هورمون، داخل ظروف دربسته در یخچال نگه‌داری شد (حسین‌زاده‌صحافی، ۱۳۹۰).

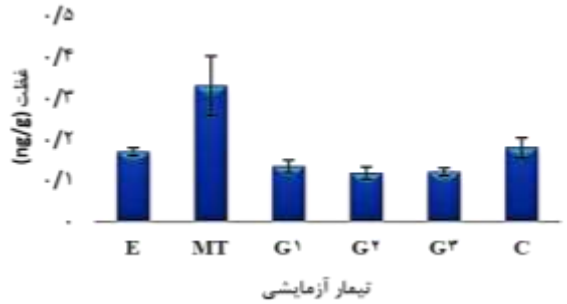
بررسی‌های هورمونی: به‌منظور سنجش سطوح هورمونی در لاروها، بلافاصله پس از پایان آزمایش و در روز پایانی غذادهی (۶۰ روز)، از هریک از تکرارها ۱۰ لارو برداشته و به‌وسیله محلول پودر گل میخک بی‌هوش و سپس به‌آرامی کشته شدند. دوره غذادهی هورمونی و زمان نمونه‌گیری بدون هیچ فاصله زمانی انجام شد چرا که طبق آزمایشات انجام‌شده، خروج بقایای هورمونی از خون ماهی قزل‌آلا تنها چند ساعت تا چند روز پس از قطع تجویز هورمون کامل می‌گردد و بنابراین تغییرات هورمونی و سطح ویتلوژنین ناشی از آن نیز دچار خلل خواهد شد (حسین‌زاده‌صحافی ۱۳۹۴). بنابراین برای سنجش تاثیر تجویز هورمون بر روی ترشح هورمون‌های مختلف، بهترین زمان، روز آخر غذادهی هورمونی می‌باشد. لاروهای کشته شده به‌منظور حذف بقایای گل میخک با آب شستشو داده شدند. لاروهای هر تکرار (۱۰ لارو) بلافاصله در فریزر منجمد شدند. سپس لاروها به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشگاه همه لاروهای یک تکرار توسط هموژنایزر هموژن شده و هورمون‌های موجود شامل ۱۷- بتا استرادیول، ۱۷- آلفا متیل تستوسترون، و پروژسترون در این هموژن به‌روش RIA (Radio

Immuno Assay) سنجش شد (Huga و همکاران، ۲۰۱۸). این روش برای اندازه‌گیری غلظت‌های هورمون‌ها درسطح نانو و پیکوگرم کاربرد دارد. هم‌چنین سطح ویتلوژنین تیمارهای مختلف نیز با استفاده از کیت تجاری Eastbiopharm-VTG-fish مورد سنجش قرار گرفت (Diotel و همکاران، ۲۰۱۰).

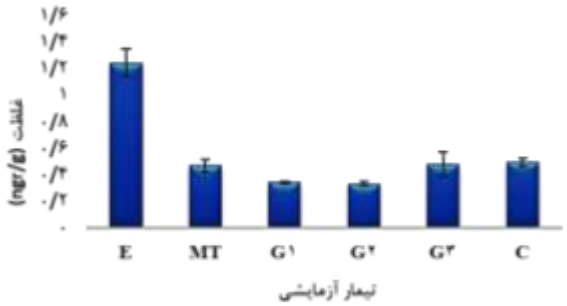
آنالیز آماری: جهت بررسی اختلافات آماری مربوط به داده‌های مربوطه از واریانس یک‌طرفه (one way Anova) برای مقایسه اختلاف بین گروه‌های آزمایشی ($P\leq ۰/۰۵$) استفاده شد. هم‌چنین برای مقایسه، جهت تشخیص تفریقی اختلافات بین تیمارها از آزمون دانکن (Duncan) استفاده گردید (Zarr، ۱۹۹۹).

نتایج

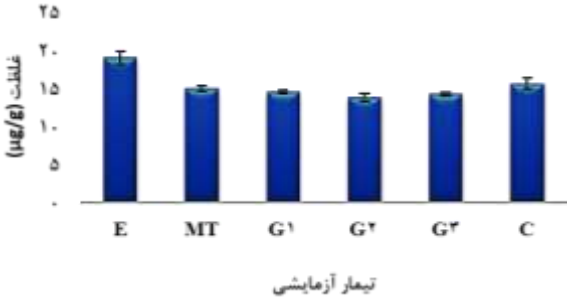
نتایج سنجش هورمونی نشان داد که غلظت هورمون تستوسترون در تیمار متیل تستوسترون (MT) بالاتر از سایر تیمارها بوده و اختلاف معنی‌داری با آن‌ها داشت ($P\leq ۰/۰۵$). هم‌چنین مشاهده گردید که تیمارهای جنستئین دارای پایین‌ترین میزان تستوسترون در میان تیمارهای آزمایشی بودند. شکل ۱ غلظت این هورمون را در تیمارهای مختلف نمایش می‌دهد. باسنجش میزان غلظت هورمون ۱۷ بتااسترادیول در تیمارهای مختلف آزمایشی مشخص گردید که تیمار استرادیول (E) دارای بالاترین میزان این هورمون بوده و اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها دارد. سایر تیمارها از این نظر اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ($P>۰/۰۵$). شکل ۲ غلظت هورمون ۱۷ بتا استرادیول را در تیمارهای مختلف نمایش می‌دهد. همان‌طورکه در شکل ۳ نشان داده شده است، غلظت ویتلوژنین نیز در تیمار E دارای اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها بوده و بالاتر از آن‌ها قرار داشت. تیمارهای جنستئین از این نظر اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نشان ندادند. غلظت هورمون ۱۷ OH پروژسترون در تیمارهای جنستئینی پایین‌تر از سایر تیمارها و حتی تیمار شاهد بود و چنان‌که در شکل ۴ نشان داده شده است بالاترین سطح این هورمون در تیمار E مشاهده و سنجش گردید ($P\leq ۰/۰۵$). سنجش فسفات آزاد در تیمارهای آزمایش به‌منظور تأیید میزان ویتلوژنین انجام گرفت و نتایج حاصله، نتایج سنجش ویتلوژنین را تأیید نمود. بالاترین میزان فسفات در تیمار E و کم‌ترین آن در تیمارهای جنستئینی مشاهده شد ($P\leq ۰/۰۵$). شکل ۵ غلظت فسفات را در تیمارهای مختلف نمایش می‌دهد.



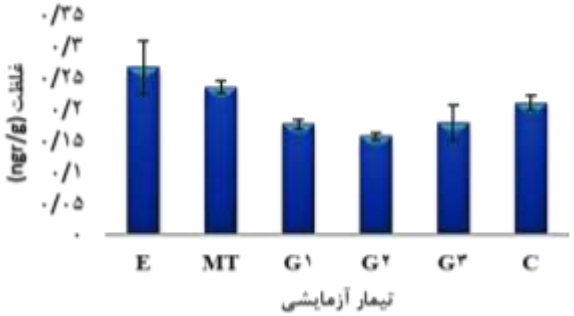
شکل ۱: نمودار غلظت هورمون تستوسترون در تیمارها پس از ۶۰ روز غذادهی هورمونی



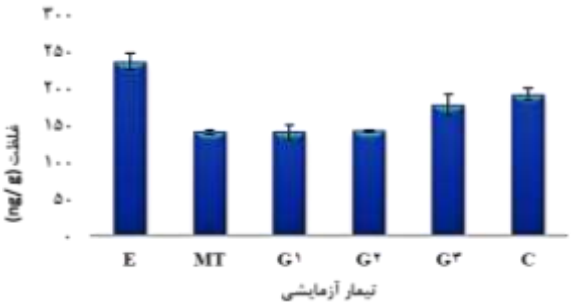
شکل ۲: نمودار غلظت ۱۷ بتا- استرادیول در تیمارها پس از ۶۰ روز غذادهی هورمونی



شکل ۳: نمودار غلظت ویتلوژنین در تیمارها پس از ۶۰ روز غذادهی هورمونی



شکل ۴: نمودار غلظت ۱۷ OH- پروژسترون در تیمارها پس از ۶۰ روز غذادهی هورمونی



شکل ۵: نمودار غلظت Alkali- labile phosphate در تیمارها پس از ۶۰ روز غذادهی هورمونی

بحث

Genistein و daidzein دو فیتواستروژن هستند با گیرنده‌های استروژن موجود در انسان‌ها، ماهی و سایر جانوران ارتباط برقرار می‌کنند. بررسی‌ها نشان داده شده است که جنستئین اثرات تولیدمثلی، رفتاری و سرکوب‌کننده سیستم ایمنی در ماهی دارد (Kelly و همکاران، ۲۰۱۳). بررسی اثر جنستئین بر روی تغییرات هورمونی و یا تغییر جنسیت گونه‌های مختلف آبزیان توسط محققین مختلفی صورت گرفته است و نتایج مختلفی در این خصوص به‌دست آمده است. جنستئین در برخی از گونه‌های آبزیان نقشی شبیه استروژن‌های درون‌زاد ایفا کرده و باعث حرکت روند فیزیولوژیک و بافتی آبزی به سمت جنس ماده شده است و در برخی از گونه‌ها نقش آنتی‌استروژنی داشته است. در این صورت، هورمون‌های استروئیدی جنس ماده بلاک شده و درصد نرسازی در افراد جمعیت بالاتر رفته است. حتی در برخی از گونه‌ها با توجه به مرحله زیستی آبزی، جنستئین تاثیرات متفاوت و گاهاً متضادی را باعث شده است. Tzchori و همکاران (۲۰۰۴) متوجه شدند که غذای حاوی جنیستئین نسبت جنس ماده را در مارماهی‌های جوان بالا می‌برد. به‌طور مشابه، Benetto-Pellisero و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند که غذای حاوی جنیستئین باعث کاهش سطح ۱۱-کتوتستوسترون و تستوسترون، قبل و در طول دوره تولیدمثل قزل‌آلا شده است که این نتایج با نتایج حاصله در تحقیق حاضر (شکل ۱) مشابهت دارد، به‌طوری که تیمارهای جنستئین، پایین‌ترین سطح هورمون تستوسترون را از خود نشان دادند. El-sayyed و همکاران (۲۰۱۲) تاثیر جیوه حاوی سویا را بر نسبت جنسی ماهی تیلاپیا مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد که محتویات فیتواستروژن SBM، دارای اثرات استروژنی بر روی لارو تیلاپیا نیل است. آن‌ها چنین نتیجه گرفتند که باید از غذای حاوی سویا و دیگر منابع پروتئین گیاهی حاوی مقادیر زیادی فیتواستروژن‌ها به‌عنوان منابع پروتئین لارو تیلاپیا نیل در طی تیمارهای تغییر جنسیت خودداری شود. هم‌چنین در تحقیق دیگری استفاده از آن به‌عنوان یک افزودنی به جیره‌ها برای القای رشد تخمدان در *Huso huso* پیشنهاد شده است (Yousefi Jourdehi و همکاران، ۲۰۱۴). از سویی دیگر، Kaushik و همکاران (۱۹۹۵) دریافتند که جایگزین کردن آرد ماهی توسط کنسانتره پروتئین سویا در غذای قزل‌آلای جوان هیچ گونه اثر استروژنی ندارد. هم‌چنین NG و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که جنیستئین و سایر ایزوفلاوون‌هایی که در سویا یافت می‌شوند متابولیسم استروژن کبدی و کلیوی را در ماهی آزاد آتلانتیک (*Salmo salar*) و قزل‌آلای دریاچه‌ای (*Salvelinus namaycush*) محدود می‌کند. Davis و همکاران (۲۰۱۰) هم‌چنین دریافتند که سطوح ویتلوژنین پلاسما به‌طور معنی‌داری در تیلاپیای موزامبیک (*O. mossambicus*) که با غذای حاوی آرد سویا تغذیه شده بودند، به‌طور معنی‌دار کاهش پیدا کرد. این مطالعات پیشنهاد می‌کند که اثر استروژنی فیتواستروژن‌ها بر روی ماهی‌ها احتمالاً در گونه‌های مختلف ماهی مخصوص و متفاوت از سایر گونه‌هاست و نیز این مواد می‌توانند به‌عنوان آگونیست یا آنتاگونیست استروژنی در مقابل استروژن درون‌زاد عمل کند. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، در تحقیق حاضر جنستئین تأثیر معنی‌داری بر روی غلظت ویتلوژنین در لارو ماهی قزل‌آلا ایجاد نکرده است. هم‌چنین همان‌طورکه در شکل ۵ مشاهده می‌شود، غلظت Alkali- labile phosphate نیز نتایج به‌دست آمده از سطح ویتلوژنین تیمارها را تایید می‌نماید و در تیمارهای جنستئینی پایین‌تر از تیمار شاهد و E می‌باشد. Yuliana و همکاران (۲۰۰۶) اثر بازدارندگی جنستئین و سایر ایزوفلاوون‌ها را بر روی متابولیسم استروژن در کبد و کلیه سه گونه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، ماهی آزاد آتلانتیک و ماهی قزل‌آلای دریاچه‌ای بررسی کردند. آن‌ها نتیجه گرفتند که دوزهای ۱ و ۱۰ میکرومول جنستئین مانع از سنتز استرادیول در کبد و کلیه ماهی قزل‌آلا و ماهی آزاد آتلانتیک و در کبد ماهی قزل‌آلای دریاچه‌ای شدند. جنستئین، دایدزئین و گلایسیتوین با دوزهای موجود در سویای معمولی، متابولیسم استروژن را در کبد متوقف نمود. در حالت سوم، در برخی از مطالعات فیتواستروژن‌ها مخصوصاً جنستئین عملکرد نامشخص و دوگانه‌ای از خود نشان داده‌اند. Brown و همکاران (۲۰۱۴) طی تحقیقی بیان نمودند که فیتواستروژن‌های β-Sitosterol و Genistein بر مراحل پایانی تولیدمثلی در ماهی ماده فایتر (*Betta splendens*) اثرات محدودی دارند و اثرات معنی‌داری از β-sitosterol و جنستئین بر روی استروئیدها یا گنادها مشاهده نگردید و اثرات حاد کم‌تری نسبت به ماهی‌های دیگر مشاهده شد. Benetto-Pelissero و همکاران (۲۰۰۱) تأثیر رژیم‌های غنی شده با جنستئین را بر فرایندهای اندوکرینی گامتوژنز و کارآیی تولیدمثلی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار دادند. در نرها، القای اندک اما مداوم سنتز ویتلوژنین و کاهش در سطوح تستوسترون مشاهده شد که این کاهش تستوسترون در تحقیق

حاضر هم ملاحظه گردید (شکل ۱). هم‌چنین کاهش اندکی در سطح βFSH و βLH پلاسما در پایان اسپرماتوژنز در ماهی‌های نر با رژیم غذایی ۵۰۰ ppm جنستئین مشاهده شد. در این آزمایش، رشد بیضه در ماهی تغذیه شده با جنستئین تسریع شد و تحرک و غلظت اسپرم به شکل وابسته به دوز در زمان تخم‌ریزی کاهش یافت. در ماده‌ها، افزایش معنی‌داری در ویتلوژنین پلاسما فقط در آغاز و پایان مرحله اووژنز رخ داد. سطوح تستوسترون نیز در آغاز oogenesis کاهش یافت. کیفیت گامت نیز فقط در این گروه مختل شد و درصد کم‌تری از ماده‌های تخمک‌گذار در این تیمار مشاهده شد، با میزان لقاح پایین‌تر و زنده‌مانی کم‌تر تخم.

این نتایج می‌تواند با اثر آگونیستی / آنتاگونیستی جنستئین بر عملکرد استروژن قابل توجیه باشد که این عملکرد نیز مربوط به نسبت بین استروژن‌های درون‌زاد/جنستئین درون‌بافتی می‌باشد. Klaut-feler و Rodriguez (۲۰۰۶) تغییرات رفتاری را در جنس نر گونه *Betta splendens* (fighting fish) در معرض فیتواستروژن‌های آزاد بررسی کردند. نتایج این تحقیق نشان داد که آلودگی فیتواستروژن این پتانسیل را دارد که به‌طور معنی‌داری بر رفتار این ماهیان تأثیر بگذارد. Malisson و همکاران (۲۰۰۵) تأثیر جنستئین بر رشد، نمو و تولیدمثل ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها بیان نمودند که جنستئین می‌تواند هم اثرات استروژنی و هم ضداستروژنی داشته‌باشد که هر یک به‌نوبه خود می‌توانند تاثیرات تحریک‌کننده یا سرکوب کننده‌ای بر رشد و تولیدمثل ماهی داشته باشند. در تمام دوزهای آن آزمایش، جنستئین هیچ تاثیری بر رشد یا ضریب تبدیل غذایی نداشت. سطوح سرمی ویتلوژنین، چهار بار در طول دوره درمان اندازه‌گیری شد که در ماهی‌های تحت درمان با جنستئین (تمام دوزها) از گروه شاهد بالاتر بود. هیچ تاثیری از جنستئین بر سطوح سرمی هورمون‌های تولیدمثلی، مورفولوژی و بافت‌شناسی گنادها (هر دو جنس)، تولید تخم، میزان باروری، سایز لارو و هم‌چنین زنده‌مانی یافت‌نشد. بر این اساس، آن‌ها پیشنهاد کردند که جنستئین محصولات سویا نباید جهت ترکیب آن‌ها در رژیم‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد توجه قرار گیرد. در تحقیق حاضر نیز جنستئین تأثیر مشخص و معنی‌داری بر روی سطح ۱۷بتا- استرادیول نداشت (شکل ۲). درخصوص سطح هورمون ۱۷ OH پروژسترون مشاهده شد که در تیمارهای جنستئین، سطح هورمون پایین‌تر از سایر تیمارها و حتی تیمار MT بود (شکل ۴). Flicker و همکاران (۲۰۱۹) اثر جنستئین و سایر ایزوفلاوون‌های موجود در سویا را بر روی بیوسنتز DHA در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی نمودند. در پایان، عملکرد رشد و ترکیب مواد مغذی هموژنات کل بدن تحت تأثیر رژیم‌های غذایی قرار نگرفت که این نتیجه، با فرضیه ارائه شده توسط Malisson و همکاران (۲۰۰۵) متفاوت می‌باشد. علاوه بر این، مشخص گردید هنگامی که اکوئول و جنستئین با روغن‌های گیاهی رژیمی ترکیب می‌شوند، به‌نظر می‌رسد که باعث تحریک بیوسنتز DHA شده و از این طریق سطوح DHA بافت را در قزل‌آلای رنگین‌کمان، هرچند، تنها به‌میزان متوسط افزایش می‌دهد. درنهایت با توجه به نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر، فیتواستروژن جنستئین تأثیر حاد و قابل توجهی بر روی سطح استروئیدهای جنسی و نیز ویتلوژنین لارو ماهی قزل‌آلا نداشت و به‌میزان کمی کاهش استروئیدهای جنسی علی‌الخصوص ۱۷ بتا استرادیول و ۱۷ OH پروژسترون را ایجاد نموده و هم‌چنین به میزان کمی باعث کاهش ویتلوژنین گردید. لذا بررسی مطالعات بافتی بر روی بچه‌ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جنستئین به‌منظور مشخص شدن میزان تأثیر این فیتواستروژن بر روی نمو گنادی و تمایز جنسیت پیشنهاد می‌گردد.

منابع

۱. **باشتی، ط.، ۱۳۹۴.** تولید جمعیت تمام ماده قزل‌آلا رنگین‌کمان به روش ماده‌سازی غیرمستقیم. گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور. ۶۸ صفحه.

۲. **رزمی، ک.، ۱۳۸۶.** بررسی تغییر جنسیت قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌وسیله هورمون ۱۷ آلفا اتینیل استرادیول. پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد، دانشکده علوم و فنون دریایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاداسلامی. ۱۴۳ صفحه.

۳. **حسین‌زاده‌صحافی، ه.، ۱۳۹۰.** ایجاد تک جنس قزل‌آلا به‌روش مستقیم با استفاده از هورمون ۱۷-بتا استرادیول. گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور. ۴۰ صفحه.

4. **Anderson, M. and Whitcomb, P., 2001.** Design of Experiments Statistical Principles of Research Design and Analysis. Technometrics. Vol. 43, No. 2, pp: 236-237. doi:10.1198/tech.2001.s589.

5. **Budd, M.A.; Banh, Q.; Domingos, K. and Jerry, D.R., 2015.** Sex Control in Fish: Approaches, Challenges and Opportunities for Aquaculture. Journal of Marine Science Engineering. Vol. 3, pp: 329-355. doi:10.3390/jmse3020329.

6. **Bennetau-Pelissero, C.; Breton, B. and Bennetau, B., 2001.** Effect of Genistein-Enriched Diets on the Endocrine Process of Gametogenesis and on Reproduction Efficiency of the Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. General and Comparative Endocrinology. Vol. 121, No. 2, pp: 173-187.

7. **Billard, R., 1989.** Endocrinology and fish culture. Fish Physiol. Biochem. Vol. 7, pp: 49-58.

8. **Davis, L.K.; Fox, B.K.; Lim, C.; Lerner, D.T.; Hirano, T. and Grau, E.G., 2010.** Effects of 11– ketotestosterone and fishmeal in the feed on growth of juvenile tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Aquaculture. Vol. 305, pp: 143-149.

9. **Diotel, N.; LePagea, Y.; Mouriec, K.; Tong, S. and Pellegrin, E., 2010**. Aromatase in the brain of teleost fish: Expression, regulation and putative functions. Frontiers in Neuroendocrinology. Vol. 31, No. 2, pp: 172-192.

10. **El-Sayed, A.; Abdel-Aziz, A. and Abdel-Ghani, H., 2012.** Effects of phytoestrogens on sex reversal of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) larvae fed diets treated with 17α-Methyltestosterone. Aquaculture. Vol. 360-361, pp: 58-63.

11. **Filby, A.; Thorpe, K.L.; MaackCharles, G. and Tyler, R., 2007.** Gene expression profiles revealing the mechanisms of anti-androgen- and estrogen-induced feminization in fish. Aquatic Toxicology. Vol. 81, No. 2, pp: 219-231.

12. **Fickler, A.; Rimbach, G.; Schulz, C. and Staats, S., 2019.** Screening dietary biochanin A, daidzein, equol and genistein for their potential to increase DHA biosynthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Plos one. pp: 51-67.

13. **Green, C.C. and Kelly, A.M., 2008.** Effects of the estrogen mimic genistein as a dietary component on sex differentiation and ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 35, No. 3, pp: 377-384. doi:10.1007/s10695-008-9260-z

14. **Hirai, N.; Nanba, A.; Koshio, M.; Kondo, T.; Morita, M. and Tatarazako, N., 2006.** Feminization of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17β-estradiol: effect of exposure period on spawning performance in sex transformed females. Aquat. Toxicol. Vol. 79, No. 3, pp: 288-295. doi: 10.1016/j.aquatox.2006.06.018.

15. **Hendry, C.I.; Martin-Ribochaud, D.J. and Benfey. T.J., 2006.** Hormonal sex reversal of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Aquaculture. Vol. 219, pp: 769-781.

16. **Hoga, C.A.; Fernanda, L. and Reyes. F.G., 2018.** A review on the use of hormones in fish farming: Analytical methods to determine their residues. CyTA Journal of food. Vol 16, No. 1.

17. **Kaushik, S.J.; Cravedi, J.P.; Lalles, J.P.; Sumpter, J.; Fauconneau, B. and Laroche, M., 1995.** Partial or total replacement of fish meal by soya protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout. Aquaculture. Vol. 133, pp: 257-274.

18. **Kelly, M., 2013.** The Environmental Fate of the Phytoestrogens Genistein and Daidzein, University of Minnesota. 156 p.

19. **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, pp: 45-49. doi: 10.2478/v10086-010-0005-0

20. **Liao, T.; Guo, Q.; Jin, S.; Cheng, W. and Xu, Y., 2009.** Comparative responses in rare minnow exposed to 17 β-estradiol during different life stages. Fish Physiol. Biochem. Vol. 35, No. 3, pp: 341-349.

21. **Leet, J.K.; Heather, E. and Sepúlvedaa, M.S., 2011.** A review of studies on androgen and estrogen exposure in fish early life stages: effects on gene and hormonal control of sexual differentiation. Journal of Applied Toxicology. Vol. 31, pp: 379-398.

22. **Nagahama, Y., 2000.** Gonadal steroid hormones: major regulators of gonadal sex differentiation and gametogenesis in fish. In: Norberg, B.; Kjesbu, O.S.; Taranger, G.L.; Andersson, E. and Stefansson, S.O., Proc. Sixth Int. Symp. Reprod. Physiol. Fish. Univ. Bergen. pp: 211-222.

23. **Nakamura, M. and 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. Vol. 24, pp: 1-23.

24. **Ng, Y.; Hanson, S.; Malison, J.A.; Wentworth, B. and Barry, T.P., 2006.** Genistein and other isoflavones found in soybeans inhibit estrogen metabolism in salmonid fish. Aquaculture. Vol. 254, pp: 665-658.

25. **Pandian, T.J. and Sheela, S.G., 1995.** Hormonal induction of sex reversal in fish. Aquaculture. Vol. 138, pp: 1-22.

26. **Piferrer, F., 2001.** Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. Aquaculture. Vol. 197, pp: 229-281.

27. **Tzchori, I.; Degani, G.; Elisha, R.; Eliyahu, R.; Hurvitz, A.; Vaya, J. and Moav, B., 2004.** The influence of phytoestrogens and oestradiol-17beta on growth and sex determination in the European eel (*Anguilla anguilla*). Aquaculture Research. Vol. 35, No. 13, pp: 1213-1219. doi: 10.1111/j.1365-2109.2004.01129.

28. **Yuliana, N.; Hanson, S.; Malison, J.A.; Wentworth, B. and Barry, T.P., 2006.** Genistein and other isoflavones found in soybeans inhibit estrogen metabolism in salmonid fish. Aquaculture. Vol. 254, pp: 658-665.

29. **Zar, J.H., 1999.** Blostatistical Analysis. Prentic Hall. (4th Edition) New Jersey. 663 p.