Archive of SID

اثرهورمون ۱۷آلفا- متیل تستوسترون بر خصوصیات ثانویه‌ی جنسی، بافت‌شناسی تخمدان و تولید لارو در ماهی گوپی (*Poecilia reticulata*)

محمدحسین ابراهیمی*[۱]، فاطمه عباسی[۲]، سعید مهدوی[۱]، مروارید رحیمی[۳]

۱- گروه شیلات، دانشکده شیلات مرتع و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه الزهرا
۳- گروه زیست شناسی دریا، دانشکده‌ی منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

۱۷آلفا- متیل‌تستوسترون از جمله آندروژن‌هایی است که در سیکل جنسی نقش دارد و جهت افزایش رشد و تغییر جنسیت ماده‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این تحقیق اثر سه دوز مختلف از این هورمون (۳۰۰، ۴۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) به همراه تیمار شاهد (بدون هورمون) بر خصوصیات ثانویه جنسی ماهیان نر (شاخص گونوپودیوم و رنگ‌سنجی) و ماده (رنگ‌سنجی) و تکامل گنادی و تولید لارو ماهیان ماده در ماهی گوپی (*Poecilia reticulate*) مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر شاخص گونوپودیوم در نرها اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. نتایج نشان‌دهنده‌ی افزایش رنگدانه‌های قرمز در ماهیان نر و ماده است. با افزایش دوز هورمونی، کیسه‌های اسپرمی درگناد ماهیان ماده شکل گرفت و در نتیجه‌ی آن روند تولید لارو کاهش یافت به نحوی که در بیشترین دوز پس از حدود ۵ هفته، لاروی تولید نگردید. بطور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که ارتباط قوی بین شرایط فیزیولوژیک ماهی با رنگ پوست و خصوصیات ثانویه‌ی جنسی این ماهی وجود دارد.

واژگان کلیدی: ۱۷آلفا- متیل تستوسترون ، *Poecilia reticulata* ، خصوصیات ثانویه‌ی جنسی، رنگ سنجی

*. نویسنده مسوول، پست الکترونیک: eh.ebrahimi64@gmail .com

www.SID.ir

Archive of SID

۱. مقدمه

ماهی گوپی از خانواده پوسیلیده[1]، یکی از ماهیان محبوب در بین ماهیان زینتی در سطح جهان، گونه‌ای گرمسیری بوده و در طبیعت در آب‌هایی که دما در آن بین ۳۰-۲۴ درجه سانتی‌گراد باشد، زندگی می‌کند (Liley and Seghers, 1975). جنسیت فنوتیپی این ماهی معمولا در طول ده روز آخر بارداری تعیین گردیده، اما تمایز و تکامل بیشتر خصوصیات ثانویه جنسی در طول دوره جوانی، حدود ۱۶هفته پس از تولد صورت می‌گیرد (Goodrich *et al.*, 1943). این خصوصیات ثانویه جنسی شامل تغییر شکل باله مخرجی به گونوپودیوم که به عنوان اندام جفتگیری مورد استفاده قرار می‌گیرد، توسعه رنگ بدنی و ظهور رفتار معاشقه‌ای می‌باشد (Bayley *et al.*, 2002).

میزان جذابیت و رفتار ماهی نر در انتخاب او به عنوان جفت موثر است، برای مثال در ماهی گوپی گزارشاتی وجود دارد که نشان می‌دهد رنگ‌آمیزی نرها، انتخاب ماده‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Endler, 1983; Houde, 1987; Houde and Endler, 1990; Rodric- Brown, 1985). در طی انتخاب جفت، قبل از جفت‌گیری ماده‌ها نرهای نسبتا رنگارنگ با جذابیت بالا را ترجیح می‌دهند (Pilastro *et al.*, 2002)، به خصوص ناحیه‌ی با رنگ‌آمیزی کاروتنوئید (نارنجی، قرمز و زرد) در نرها انتخاب ماده را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Endler and Houde, 1995; Evans *et al.*, 2004). بسیاری از این ویژگی‌ها به عنوان ویژگی‌های ثانویه جنسی مطرح بوده و تحت تاثیر میزان هورمون‌های داخلی و سیستم درون‌ریز می‌باشند. مشخص گردیده است که رنگ آمیزی سطح بدن ماهی گوپی نر (Lopez, 1998; Pandey, 1969)، و توسعه گونوپودیوم در نرهای جوان (Hopper, 1965; Pandey, 1969)، به وسیله ی آندروژن‌های گنادی کنترل می گردد.

آندروژن‌ها با مکانیسم‌های مجزا خصوصیات اولیه و ثانویه جنسی را تحت تاثیر قرار می‌دهند. آندروژن‌ها به طور معمول جهت تحریک هورمونی رشد یا تغییر جنسیت در ماهیان کاربرد دارند (Reinboth, 1969; Sutherland, 1972). اثرات آنها به گونه‌ی ماهی، سن، دوز و زمان قرارگیری در معرض هورمون بستگی دارد. دوزهای بالا و زمان کوتاه معمولا برای تغییر جنسیت استفاده شده، حال آن‌که دوزهای پایین با زمان طولانی جهت تحریک رشد کاربرد دارند (Zakes *et al.*, 2000). در بین آندروژن‌ها هورمون ۱۷آلفا- متیل‌تستوسترون بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد زیرا به راحتی جذب شده، در بدن ماهی تجمع نیافته و راحت تر نیز استخراج می‌شود. این هورمون جهت نرسازی ماهی گوپی ماده نیز مورد استفاده قرار گرفته است (Turan *et al.*, 2006).

از نظر تجاری در ماهیان زینتی قیمت بالاتر فروش به ماهیانی تعلق می‌گیرد که دارای خصوصیات رنگی یا خصوصیات ریخت‌شناسی جذابی باشند. بنابراین دست‌کاری در سیستم هورمونی این ماهیان ضمن آن‌که به دلیل عدم استفاده‌ی خوراکی از آنها ضرری را متوجه انسان نمی‌کند، می‌تواند با افزایش جذابیت آنها بر قیمت فروش تاثیرگذار باشد. این مسئله چه در ماهیان نر و چه در ماهیان ماده حائز اهمیت است. اما در کنار این مسئله ماهیان بایستی با توجه به هدف مورد نظر، قابلیت بقا یا ایجاد نسل را حفظ کنند. با توجه به این مهم، هدف از انجام این تحقیق، آشنایی با سیستم درون‌ریز این

[1] Poecilidae

www.SID.ir

Archive of SID

ماهی و نقش متیل‌تستوسترون در سیکل جنسی آن و اثرات این هورمون در تغییرات ویژگی‌های ثانویه‌ی جنسی در هر دو جنس این ماهی، در سیکل تولید مثلی ماهیان ماده و میزان هماوری تعیین گردید.

۲. مواد و روش‌کار

به منظور انجام این آزمایش ۴ دوز مختلف هورمون ۱۷ آلفا- متیل‌تستوسترون (۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) با ۳ تکرار در نظر گرفته شد. در هر تکرار ۳ ماهی نر بالغ و ۶ ماهی ماده بالغ استفاده گردید. از قرص‌های متیل‌تستوسترون تجاری، شرکت داروسازی ابوریحان، حاوی ۲۵ میلی‌گرم ماده‌ی موثره استفاده شد که پس از محاسبه میزان ماده‌ی موثره، به صورت پودر درآمده و با غذای آنها مخلوط گردید. ماهیان به مدت ۴۵ روز با جیره‌ی حاوی هورمون تغذیه شدند. جهت تغذیه، غذای بیومار فرانسه با اندازه ۰/۸ میلی‌متر (پروتئین: ۵۶ درصد؛ چربی: ۱۸ درصد؛ فیبر: ۴/۰ درصد؛ خاکستر: ۵/۱۰ درصد؛ رطوبت و سایر مواد تشکیل‌دهنده: ۱/۱۵ درصد) و دو نوبت در روز در حد اشباع، مورد استفاده قرار گرفت. جهت حفظ کیفیت آب، نصف آب آکواریوم هر سه روز یک بار تعویض می‌گردید. آکواریوم در طول دوره‌ی آزمایش به خوبی هوادهی می‌گردید. سنجش پارامترهای کیفی آب به دفعات در طول آزمون انجام گرفت.

۲-۱. سنجش رنگ

در پایان آزمون، ۲ ماهی از ماهیان نر و ۲ ماهی نیز از ماهیان ماده‌ی هر تانک (در مجموع برای هر تیمار ۶ ماهی نر و ۶ ماهی ماده) جهت آنالیز رنگی انتخاب گردید. از هر ماهی گوپی در دو ناحیه (ناحیه جانبی تنه و ناحیه باله دمی) سنجش رنگ صورت گرفت. جهت سنجش میزان رنگ از دستگاه رنگ-سنج (Colour and Appearance Measurement System، ساخت انگلستان) با دوربین (Camera system CAM- System 500) استفاده شد که بر اساس سیستم پیشنهاد شده به وسیله‌ی (CIE) سه مولفه اصلی *L (۱۰۰+ -۰ یعنی از سیاه تا سفید خالص)، *a (۱۰۰+-۱۰۰- سبزی تا قرمزی که صفر هم نشانه خاکستری است) و *b (۱۰۰+ -۱۰۰- برای رنگ‌های آبی تا زردی و صفر نیز نشانه‌ی خاکستری)را به دست می‌داد. قبل از اندازه‌گیری، دستگاه به کمک کاشی ۲۴ خانه‌ای که جهت کالیبره شدن دستگاه طراحی شده است به صورت اتوماتیک کالیبره گردید.

جهت اندازه‌گیری کروما[1] از فرمول (۱) استفاده شده، همچنین میزان ته‌رنگ[2] و ECI نیز از رابطه ۲ و ۳ محاسبه گشت (Pavlidis *et al.*, 2006):

(1) $Chroma= (a^2+ b^2)^{0/5}$

(2) $H^{\circ} = \arctan (b^*/a^*)$

(3) $ECI_i= C_i^* \cos(H_i-H_{mean})$

که H_{mean} میانگین ته‌رنگ، C_i و H_i نیز کروما و ته‌رنگ مربوط به هر اندازه‌گیری می‌باشد.

با توجه به CIE (۱۹۷۸) رنگ یک ویژگی سه بعدی است که از یک جزء روشنایی و دو جزء رنگی با نام‌های کروما و ته‌رنگ تشکیل شده است، رنگ‌ها می‌توانند به وسیله‌ی اختصاصات این سه مولفه از یکدیگر تشخیص داده شوند. ته‌رنگ طول موج غالب می‌باشد و به صورت زاویه‌ی ته‌رنگ در صفحه‌ی a^* - b^* نمایش داده می‌شود که به صورت پادساعت گرد در حول محور خود افزایش می‌یابد که 0° قرمز، $^{\circ}$

[1] Chroma
[2] Hue

www.SID.ir

Archive of SID

۹۰ زرد، ° ۱۸۰ سبز و ° ۲۷۰ آبی می‌باشد. کروما به میزان اشباعیت یک رنگ اشاره داشته و بیان می‌دارد که چه میزان نور خاکستری و سفید با رنگ خالص مخلوط گشته است. کروما از خنثی تا براق تغییر کرده و به میزان فاصله روی محور عمود بر صفحه (a^*-b^*) از مبدا بر می‌گردد. به هر حال رنگ که شامل ته‌رنگ و کروما می‌شود از دو مولفه‌ی به هم پیوسته شود. به جای آن به صورت دو مولفه‌ی برداری بوده که در آن ته‌رنگ زاویه‌ی جهت و کروما طول بردار رنگی می‌باشد. ECI نیز تصویر هر بردار رنگی در جهت زاویه‌ای میانگین گروه بوده و سهم آن را در رنگ میانگین نشان می‌دهد. این فاکتور ترکیب دو فاکتور ته‌رنگ و کروما بوده و از آنجائی که یک کمیت عددی است، تجزیه و تحلیل‌های آماری کلاسیک می‌تواند در مورد آن مورد استفاده قرار گیرد. در صورتی که ته‌رنگ تشکیل شده که در صفحه‌ی (a^*-b^*) نمی‌تواند به صورت جداگانه در نظرگرفته فاقد اختلاف معنی‌دار باشد، این فاکتور محاسبه و مورد بحث قرار می‌گیرد (Pavlidis *et al.*, 2006).

۲-۲. بافت‌شناسی، تعیین شاخص گونوپودیوم و تعداد لارو

در انتهای آزمایش، ۲ عدد از ماهیان ماده از هر تانک انتخاب شده و گناد آنها جداسازی شد. نمونه ها پس از فیکس شدن در بوئن، جهت نگهداری و آبگیری در اتانول ۷۰ درصد قرار داده شد. مراحل آبگیری با استفاده از اتانول ۹۰، ۹۵ و ۱۰۰ درصد و در نهایت با الکل بوتیلیک انجام گردید. نمونه‌ها بعد از ۹ ساعت نگهداری داخل پارافین مایع (درون آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد) در پارافین قالب‌گیری شده و با استفاده از میکروتوم برش‌های ۵ میکرومتری از آنها تهیه شد. برش‌ها بر روی لام چسبانده شده و برای تثبیت عمل چسبندگی در آون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در مرحله بعد پس از پارافین‌زدایی و آبگیری با استفاده از هماتوکسیلین- ائوزین رنگ‌آمیزی شده و با میکروسکوپ نوری معمولی عکس‌برداری انجام گرفت. شاخص گونوپودیوم (طول گونوپودیوم به طول بدن) (Toft and Baatrup, 2003) پس از تهیه‌ی عکس از ماهیان نر محاسبه گردید. همچنین در طول دوره‌ی آزمایش تعداد لاروهای تولیدی در تانک‌های مختلف روزانه شمارش و ثبت گردید.

۲-۳. تجزیه و تحلیل آماری

در این مطالعه بر اساس منابع موجود، برای آنالیز داده‌های زاویه‌ای (ته‌رنگ) از توزیع دایره‌ای استفاده شد (Pavlidis *et al.*, 2006; Zar, 1996). به این صورت که تست ریلاق[1] برای بررسی نرمال بودن داده‌های دایره‌ای مورد استفاده قرار گرفت. تفاوت در مقادیر ته‌رنگ در بین نقاط اندازه‌گیری، و همچنین گروه‌های مورد سنجش، با استفاده از روش واتسون- ویلیامز[2] و در صورتی که حداقل یکی از گروه‌های مورد سنجش غیرنرمال بود، از تست ناپارامتری واتسون استفاده شد. تفاوت‌های آماری بین مقادیر روشنایی، ECI، کروما در دوزهای مختلف در ناحیه بدن یا دم و همچنین مقادیر شاخص گونوپودیوم در دوزهای مختلف، با استفاده از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه سنجیده شد و در صورت معنی‌دار بودن، با آزمون دانکن دسته‌بندی گردید، برای مقایسه تفاوت در دوزهای مختلف و

[1] Rayleigh
[2] Watson- Williams

www.SID.ir

Archive of SID

بین تنه و دم از آنالیز دوطرفه واریانس استفاده گردید. همچنین مقایسه‌ی لاروهای تولیدی در تیمارهای مختلف دو به دو، در هر هفته با استفاده از آزمون مربع کای صورت گرفت. آمار کلاسیک به وسیله‌ی نرم افزارهای Excel و SAS و مقایسه مقادیر زاویه‌ای به وسیله‌ی نرم‌افزار Oriana version 3.00، انجام گرفت.

۳. نتایج

نتایج حاصل از اندازه‌گیری پارامترهای کیفی آب در جدول ۱ ارائه شده است. همان‌طور که در جدول ۲ قابل مشاهده است، شاخص گونوپودیوم در تیمارهای مختلف هورمونی اختلاف معنی‌داری را در سطح ۰/۰۵ نشان نمی‌دهد ($P>۰/۰۵$).

جدول۱. نتایج حاصل از اندازه‌گیری پارامترهای کیفی آب

ردیف	پارامتر مورد سنجش	مقدار اندازه‌گیری شده
۱	دما (درجه سانتی‌گراد)	۸۲/۲۸±۲۵/۰
۲	pH	۶۹/۸±۰۵/۰
۳	اکسیژن (میلی‌گرم در لیتر)	۳۸/۶±۱۵/۰

جدول۲. میانگین ± انحراف معیار شاخص گونوپودیوم در نرهای در معرض هورمون

تیمار	شاخص گونوپودیوم
دوز ۰mg/kg.diet	۲۷/۰±۰۱۱/۰
دوز۳۰۰ mg/kg.diet	۲۸/۰±۰۱۴/۰
دوز ۴۰۰ mg/kg.diet	۲۹/۰±۰۲۷/۰
دوز ۱۰۰۰ mg/kg.diet	۲۶/۰±۰۱/۰
مقدار معنی داری	۲۸/۰

با افزایش دوز هورمونی، کاهش معنی‌داری در میزان روشنایی (L^*) ناحیه تنه و باله دمی ماهیان ماده مشاهده گردید (شکل ۱). همچنین میزان روشنایی ناحیه تنه ماهیان نر در دوز ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره بیشترین میزان را نسبت به سه دوز دیگر داشت و اختلاف معنی‌داری در روشنایی بین دوزهای مختلف در ناحیه دمی ماهیان وجود نداشت ($P>۰/۰۵$). در تمام دوزهای هورمونی میزان روشنایی ناحیه دمی ماهیان نر بطور معنی‌داری بیشتر از ناحیه تنه بود، اما در ماهیان ماده فقط در دوز صفر میلی‌گرم در کیلوگرم جیره میزان روشنایی ناحیه دمی بطور معنی‌داری بیشتر از ناحیه تنه بود ($P<۰/۰۵$).

بیشترین میزان ته‌رنگ ناحیه جانبی بدن ماهیان نر در دوز ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره به‌دست آمد که اختلاف معنی‌داری با دوزهای دیگر داشت ($P<۰/۰۵$). با افزایش دوز هورمونی، میزان ته‌رنگ ناحیه دمی کاهش معنی‌داری نشان داد. همان‌گونه که در جدول۳ قابل مشاهده است، در مورد ته‌رنگ، ناحیه‌ی جانبی بدن در ماهیان نر دوزهای ۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ اختلاف معنی‌داری نداشته در حالی که با دوز ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P<۰/۰۵$) و بیشترین میزان ته‌رنگ در ماهیان دوز ۱۰۰۰ قابل مشاهده است و این مسئله نشان از تمایل به افزایش ته‌رنگ به سمت ناحیه‌ی با ته‌رنگ قرمز دارد. ضمن آن‌که در تمامی دوزهای مورد بررسی اختلاف معنی‌داری در میزان ته‌رنگ بین باله‌ی دمی و تنه دیده می‌شود ($P<۰/۰۵$). از طرفی فاکتور ته‌رنگ در ناحیه‌ی باله‌ی دمی در ماهیان نر، نیز دارای اختلاف معنی‌دار بوده ($P<۰/۰۵$) و روند کاهشی را به سمت ته‌رنگ قرمز نشان می‌دهد. زیرا همان‌طور که گفته شد ناحیه‌ی ۰ (۳۶۰) درجه ناحیه‌ی با ته‌رنگ قرمز است.

www.SID.ir

Archive of SID

در ماهیان ماده، با توجه به عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در میزان ته‌رنگ، مقادیر ECI محاسبه گردید. به طور کلی مقادیر محاسبه شده برای ECI یک روند افزایش را نشان می‌داد. روند تغییرات در بخش جانبی بدن در دوزهای مختلف فاقد اختلاف معنی‌دار بوده ($P>۰/۰۵$) اما تمامی آنها با دوز ۱۰۰۰ دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P<۰/۰۵$). دوز ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره دارای بیشترین مقدار ECI است. داده‌های مربوط به ناحیه‌ی باله‌ی دمی نیز روندی تقریبا مشابه را نشان می‌داد یعنی دوز هزار بیشترین میزان و دوز صفر میلی‌گرم در کیلوگرم جیره کم‌ترین میزان را نشان داده و دوز هزار با ۴۰۰ و هر دو با شاهد دارای اختلاف معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$). در این قسمت بدن نیز روند کلی افزایش میزان ECI می‌باشد. ضمن آن‌که در ماهیان ماده در دوز ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره، اختلاف معنی‌داری در میزان ته‌رنگ بین ناحیه‌ی تنه و باله‌ی دمی قابل مشاهده بوده ($P<۰/۰۵$) و با توجه به ECI مربوطه، ناحیه‌ی باله‌ی دمی افزایش رنگدانه‌ها و افزایش ECI را نشان می‌دهد و این افزایش به سمت ته‌رنگ قرمز می‌باشد.

اولین زایمان مولد ماده ۵ روز بعد از شروع تیمار هورمونی ثبت گردید. مجموع تعداد لارو تولیدی در هفته‌های متوالی برای تیمارهای مختلف در جدول ۴ ارائه شده است.

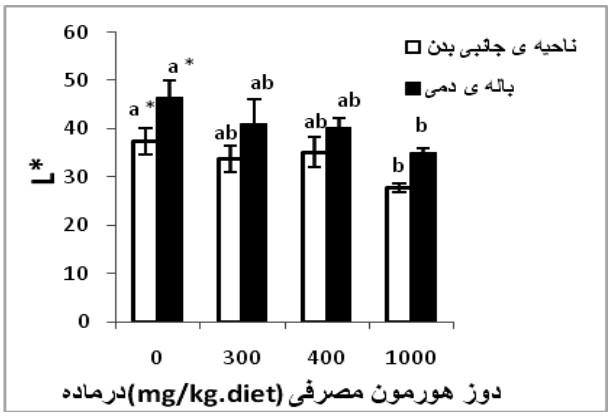
تعداد کل لارو تولیدی در هفته‌های مختلف در بین تیمارها بطور معنی‌داری اختلاف داشته و تنها تیمار شاهد با تیمار ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره فاقد اختلاف معنی‌دار بود. ماهیانی که هورمون دریافت نکردند لاروی در هفته اول تولید نکردند، اما تولید لارو از هفته دوم به بعد اتفاق افتاد. عکس این وضعیت در ماهیانی که دوز هورمونی ۱۰۰۰ را دریافت کردند مشاهده گردید که کل لارو تولیدی در هفته اول بود و در هفته‌های بعد عملا لاروی تولید نشد. ماهیانی که در معرض دوزهای ۳۰۰ و ۴۰۰ بودند در کل دوره تولید لارو داشتند. در کل دوره بیشترین لارو تولیدی در دوز ۳۰۰ مشاهده گردید که بطور معنی‌داری بیشتر از دوزهای دیگر بود و کمترین میزان آن در دوز ۱۰۰۰ مشاهده گردید. در ضمن اختلاف معنی‌داری بین دوز ۴۰۰ و ۰ وجود نداشت ($P>۰/۰۵$).

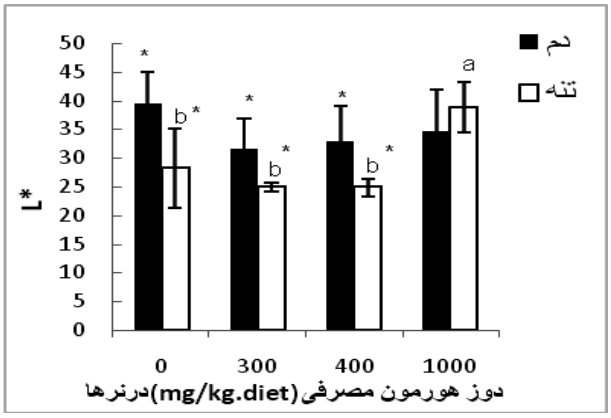
در شکل ۲، تیمارهای ۰ و ۳۰۰ روند صعودی تولید لارو را در هفته‌ی انتهایی نشان می‌دهند. در این دو تیمار با وجود پایین بودن تولید لارو در هفته‌ی ابتدایی که شاید به دلیل یکسان نبودن دقیق زمان سیکل تولید لارو در بین ماهیان تیمارهای مختلف باشد، اما در هفته‌های بعد تولید لارو ادامه یافته و ۲ پیک اصلی را نشان می‌داد که در هفته های ۲-۳ و ۶ است. در حالی که در تیمار ۱۰۰۰و تا حدود زیادی ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره، با وجود تولید زیاد لارو در ابتدای سیکل جنسی و قرارگیری در معرض هورمون، با گذشت زمان این روند دچار افت شده و تولید لارو کاهش می‌یابد.

تخمدان ماهیانی که در معرض هورمون نبودند در مراحل ابتدایی رسیدگی جنسی قرار داشت. در این مطالعه با افزایش دوز هورمونی در جیره، میزان فولیکول‌های سالم تخمدانی در انتهای دوره کاهش و میزان کیسه‌های اسپرمی ورودی به تخمدان افزایش یافت (شکل۳)، به طوری که در بالاترین دوز به سختی می‌توان فولیکول تخمدانی مشاهده کرد. وجود کیسه‌های اسپرمی در گناد ماده نشان‌دهنده‌ی روند تغییر جنسی در ماهیان ماده‌ی گوپی است.

www.SID.ir

Archive of SID





شکل۱. تاثیر دوزهای مختلف هورمون ۱۷ آلفا-متیل تستوسترون بر میزان روشنایی ناحیه تنه و دمی ماهیان نر و ماده.
علامت ستاره نشان دهنده اختلاف معنی دار بین بخش دم و تنه در هر دوز، و حروف انگلیسی نشان دهنده اختلاف معنی داری بین دوزهای مختلف در هر بخش دم یا تنه ($P<0.05$) است.

جدول ۳. میزان میانگین± انحراف معیار ته رنگ در ماهیان نر و ماده در دوزهای مختلف هورمونی و در دو ناحیه ی تنه و باله ی دمی و مقادیر میانگین± انحراف معیار ECI در ماهیان ماده در تیمارهای مختلف در دو ناحیه ی تنه و باله ی دمی.

دوزها (mg/Kg diet)	بخش بدن	ته رنگ نرها	ته رنگ ماده ها	ECI ماده ها
۰	تنه	^{b}۳۰۹/۷۵۹±۳/۲۰۶	۳۵۳/۱۹۶±۲۶/۸۱۵	^{b}۵/۱۹±۰/۸۳
	دم	^{a}۲۶/۰۸۱±۵/۴۳۳	۱۴/۰۴۹±۴۴/۶۳۳	^{c}۳/۷۴±۲/۸۸
۳۰۰	تنه	^{b}۳۱۴/۸۱۶±۲/۷۵۵	۳۲۸/۰۷۷±۱۶/۰۲۷	^{b}۶/۸۲±۲/۴۴
	دم	^{ab}۱۶/۳۵۸±۲/۶۲۳	۳۵۸/۵۳۴±۲۳/۱۳۵	^{cb}۱۰/۵۳±۷/۸۳
۴۰۰	تنه	^{b}۳۱۳/۹۴۷±۵/۵۱۱	۳۲۳/۱۴۶±۱۷/۰۹۷	^{b}۶/۷۹±۱/۸۰
	دم	^{b}۱۲/۷۴۳±۲/۱۷۵	۳۵۹/۸۳۱±۳۳/۴۷۶	^{b}۷/۷۱±۵/۷۴
۱۰۰۰	تنه	^{a}۳۲۷/۸۴۱±۵/۱۶۲	۳۱۱/۹۵±۵/۵۶۲	^{a}۹/۴۶±۱/۶۸
	دم	^{c}۳۵۵/۳۸۶±۶/۸۹۵	۱۲/۰۹±۷/۸۹۲	^{a}۱۹/۵۵±۲/۸۵

حروف مشابه نشان دهنده ی عدم وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهاست ($P<0.05$).

جدول۴. آزمون مربع کای مجموع تعداد لارو تولیدی در تیمارهای مختلف بصورت هفته ای و کل دوره.

تیمار / دوره	دوز ۰	دوز ۳۰۰	دوز ۴۰۰	دوز ۱۰۰۰
هفته ۱	^{b}۰	^{b}۳	^{a}۹۳	^{a}۱۰۸
هفته۲	^{a}۱۵۸	^{b}۱۲۲	^{c}۶۱	^{d}۰
هفته۳	^{b}۱	^{a}۱۲۸	^{b}۶	^{b}۰
هفته۴	^{b}۲۱	^{a}۲۵	^{a}۳۷	^{c}۲
هفته۵	^{a}۱۱	^{a}۱۳	^{a}۸	^{b}۰
هفته۶	^{a}۵۱	^{a}۵۶	^{b}۶	^{b}۰
کل دوره	^{b}۲۴۲	^{a}۳۴۳	^{b}۲۱۱	^{c}۱۱۰

حروف مشابه نشان دهنده ی عدم وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهاست ($P<0.05$).

www.SID.ir

Archive of SID

۴. بحث

عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر شاخص گونوپودیوم در تیمارهای مختلف، بی‌تاثیر بودن دوزهای مورد استفاده را بر این مولفه نشان می‌دهد. این مسئله می‌تواند به دلیل سن ماهیان قرار گرفته در معرض هورمون باشد، اما به هر حال نشان می‌دهد که شاخص گونوپودیوم نمی‌تواند شاخص جامعی برای نشان دادن اثرات آندروژن‌ها لااقل در دوزهای مورد بررسی در این گونه باشد. Toft و Baatrup (۲۰۰۳)، نتیجه گرفتند که ماهیان نر جوان در معرض E_2 و ۱۰۰ میکروگرم در لیتر ۴-ترت-اوکتیل‌فنول[1] (یک مختل کننده هورمون‌های درون‌ریز) به مدت ۹۰ روز از زمان تولد، افزایش در طول گونوپودیوم را نشان می‌دهند. با این حال، درمطالعه‌ای که اثر مختل کننده‌های هورمون‌های درون‌ریز بررسی گردید، درنرهای بالغ گوپی تعداد سلول‌های اسپرمی، نواحی دارای نقاط نارنجی، وزن گناد، رفتار جنسی و میزان تولید مثل تحت‌تاثیر قرار گرفت، حال آن‌که طول گونوپودیوم تفاوتی را نشان نمی‌داد که با یافته‌های ما در این مطالعه هم‌خوانی دارد(Toft and Baatrup, 2001; Bayley *et al.*, 1999).

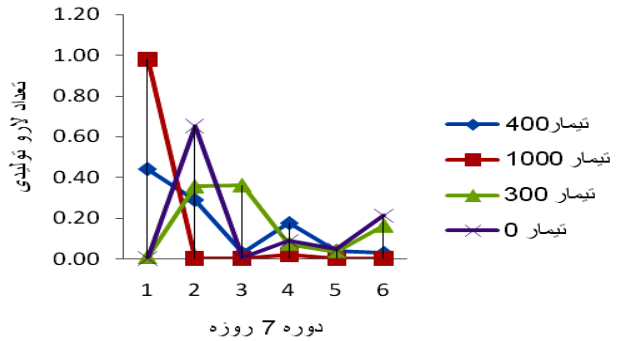
دروزوپترین و کاروتنوئید در ایجاد کرومای نقاط نارنجی نقش دارند. بنابراین می‌توان وجود این دو رنگدانه را در ماهیان مورد بررسی در نظر گرفت. فاکتور روشنایی نیز به میزان نوری اشاره دارد که رنگ مورد نظررا بازتاب داده یا از خود عبور می‌دهد که این مسئله باعث تمایز بین رنگ‌های روشن و تیره می‌شود. در ماهیان مورد بررسی حاضر تشابه بسیار جالبی را می‌توان در روند تغییرات ته‌رنگ و میزان روشنایی مشاهده کرد. در ناحیه‌ی باله‌ی دمی ماهیان شاهد، روشنایی مقدار بالایی را نشان می‌دهد که در این دوز ته‌رنگ قرمز کمتر بوده و ته‌رنگ بیشتر به سمت زرد است، اما در دوز ۳۰۰ روشنایی کاهش ناگهانی می‌یابد که به دلیل تمایل به سمت ته‌رنگ قرمز می‌باشد. در دوزهای بیشتر نیز افزایش تمایل به ته‌رنگ قرمز را نشان می‌دهد و در دوز ۱۰۰۰ کاملا ته‌رنگ قرمز غالب است که در این دوز روشنایی نیز در ناحیه‌ی باله‌ی دمی نسبت به دوزهای ۳۰۰ و ۴۰۰ افزایش را نشان می‌دهد، اما باز هم نسبت به تیمار شاهد کمتر است که می‌تواند ناشی از تغییر در رنگدانه‌های ملانین، دروزوپترین و کاروتنوئیدی باشد اما تعیین عامل قطعی آن نیاز به اندازه‌گیری روند تغییرات رنگدانه‌های پوستی دارد. در ناحیه‌ی جانبی بدن نیز با افزایش تمایل از ته‌رنگ ۲۷۰ (آبی) که می‌تواند به دلیل رنگدانه‌های ملانین و سایر رنگدانه‌ها باشد روشنایی کاهش یافته است، اما در دوز ۱۰۰۰ با افزایش تمایل ته‌رنگ به سمت ته‌رنگ قرمز روشنایی نیز افزایش را نشان می‌دهد. این مسئله با کاهش تمایل به ته‌رنگ آبی و رنگدانه‌های ایجاد کننده‌ی آن اتفاق افتاده است.

در ماهیان نر تغییرات رنگی در اثر هورمون در ناحیه‌ی جانبی بدن بسیار کمتر است به گونه‌ای که تنها در دوز ۱۰۰۰ باعث ایجاد اختلاف معنی‌دار گردیده است ($P<۰/۰۵$). Pavlidis و همکاران (۲۰۰۶) نیز کم بودن فاکتور روشنایی را نتیجه‌ی مقادیر بالاتر محتوای ملانین و بالاتر بودن درصد رنگدانه‌ی کاروتنوئید در پوست گزارش کردند. نتایج مطالعات دیگر نیز روند افزایش رنگ قرمز را با قرارگیری در معرض متیل‌تستوسترون یا مواد آندروژنی نشان می‌دهند.

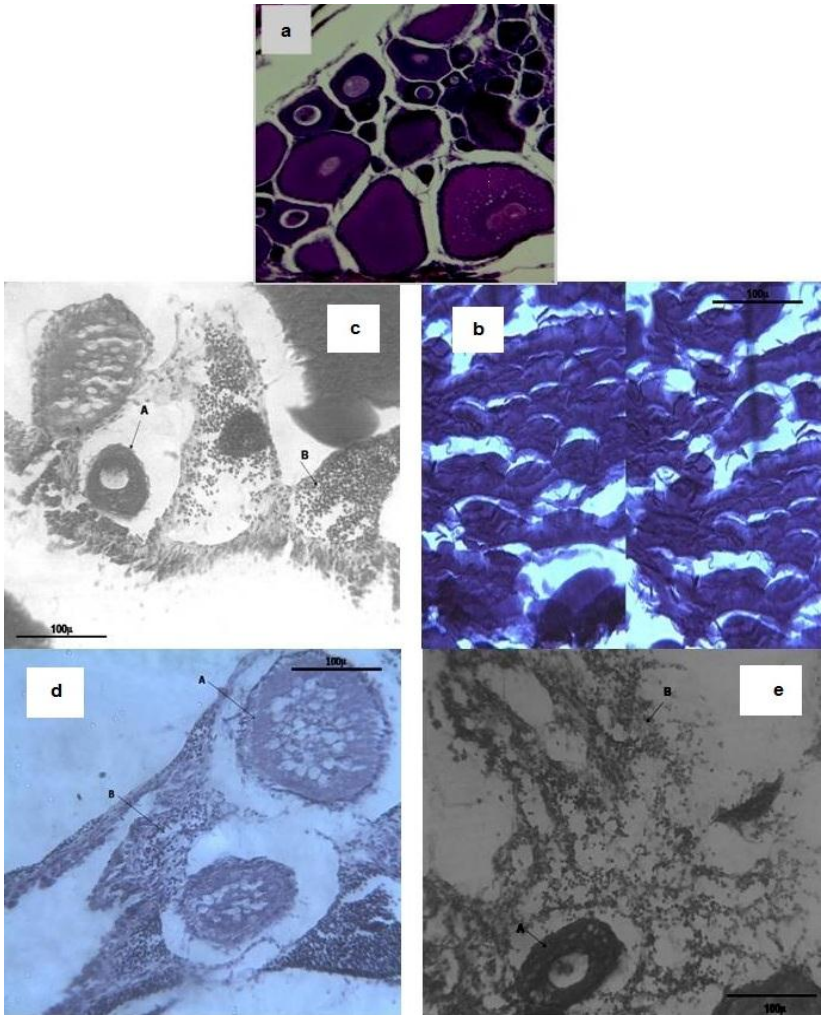
[1] 4-tert-octylphenol

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۲- روند تغییرات فراوانی نسبی لاروهای تولیدی در تیمارهای مختلف هورمونی



شکل۳- a) تخمدان طبیعی ماهی گوپی(× ۲۰۰) [۲۷] - b) قسمتی از تخمدان ماهی شاهد. تخمدان در مراحل اولیه رسیدگی قرار داشته و تخمک ها فشرده بافت تخمدان متراکم است. (× ۱۰۰۰)؛ c) تخمدان تحت تاثیر دوز۳۰۰ میلی گرم متیل تستوسترون. قسمت های کوچکی از بافت تخمدان دچار تغییر شده است (× ۱۰۰۰)؛ d) تخمدان گوپی تغذیه شده با ۴۰۰میلی گرم متیل تستوسترون (× ۱۰۰۰)؛ e) تخمدان ماهی تغذیه شده با غذای حاوی ۱۰۰۰میلی گرم. قسمت عمده تخمدان را کیسه های اسپرمی اشغال کرده اند. فولیکول ها به ندرت در تخمدان مشاهده می‌شوند(×۱۰۰۰). A: فولیکول های تخمدان- B: کیسه های اسپرمی.

www.SID.ir

Archive of SID

درنرهای بالغ گوپی نواحی دارای نقاط نارنجی پس از قرار گرفتن در معرض غلظت‌های بالای اکتیل‌فنول یا استرادیول تحت تاثیر قرار گرفت (Bayley *et al.*, 1999; Toft and Baatrup, 2001).

در مطالعه‌ی Pikulkaew و Wongsathein (۲۰۰۶) نیز شدت رنگ قرمز در ناحیه‌ی باله‌ی دمی تحت تاثیر غلظت‌های مشخص مواد مشابه دی‌کلرو دی‌فنیل- تری‌کلرواتان[1] (یک ماده‌ی استروژنیک)، کاهش را نشان می‌داد. Bayley و همکاران در سال ۲۰۰۲ در مورد ماهیان جوان نتیجه گرفتند که ماهیان در معرض آنتی‌آندروژن‌های وینکلوزولین و فلوتامید کاهش در میزان رنگ نارنجی را نشان می‌دهند. Devasurenda و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا از یک آنالوگ آندروژن در این ماهی، افزایش میزان رنگدانه‌های دروزوپترین را که به همراه رنگدانه‌های کاروتنوئید نقاط قرمز را در این ماهی ایجاد می‌کنند مشاهده نمودند و ایجاد نقاط نارنجی در این ماهی را بیشتر تحت تاثیر آندروژن‌ها دانستند.

در ماهیان ماده با افزایش میزان دوز هورمون روند کاهشی در میزان روشنایی بدن مشاهده گردید، ضمن آنکه در بررسی میزان ECI، در ناحیه‌ی باله‌ی دمی و ناحیه‌ی جانبی افزایش میزان ECI و افزایش رنگدانه‌ها وجود دارد. این افزایش می‌تواند به دلیل ایجاد خصوصیات جنسی ثانویه‌ی ماهیان نر در ماهیان ماده باشد که در هر دو ناحیه‌ی سنجش رنگی نیز خود را نشان داده و افزایش رنگدانه‌های مرتبط با آن، باعث کاهش میزان روشنایی در هر دو بخش بدن گردیده است. در ماهیان ماده انطباق روند تغییرات رنگدانه‌ای با تغییرات روشنایی کاملا قابل مشاهده است. ماهیان می‌توانند با پخش کردن و جمع کردن رنگدانه‌ها در کروماتوفور به سرعت (تغییر رنگ فیزیولوژیک) یا با تغییر میزان رنگدانه‌ها و/یا تعداد کروماتوفورها (تغییر رنگ مورفولوژیک)، رنگ خود را تغییر دهند (Stepien, 1986). افزایش گسترده و در عین حال آرام رنگدانه‌ها و به خصوص رنگ قرمز در این مطالعه در مدت زمانی اجرای آزمایش، نشان‌دهنده‌ی این است که تغییر رنگ در آنها از نوع مورفولوژیکی بوده و دلیل آن تغییر در میزان رنگدانه‌ها یا میزان کروماتوفورها می‌باشد. Joakim Larsson و همکاران (۲۰۰۲) نیز در مورد ماهیان گوپی قرار گرفته در معرض مواد آندروژنی نتیجه مشابهی را مشاهده کردند.

روند تغییرات میزان تولید لارو در تیمارهای تحت تاثیر دوزهای بالای هورمون به دلیل روند تغییرات گنادی می‌باشد. این مسئله باعث شد که در دوز ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره، حداکثر۴ هفته و ۵ روز تولید لارو ادامه داشته باشد و پس از این زمان ماهیان نازا گردیده و لاروی تولید نکنند که به دلیل کاهش تعداد فولیکول‌های تولیدی در دوزهای بالا می‌باشد. اما ماهیان تیمار صفر میلی‌گرم در کیلوگرم جیره احتمالا به دلیل زایمان قبل از شروع دوره‌ی آزمایش، در هفته‌های اول لارو چندانی تولید نکردند. ماهیان دوز ۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره دارای بیشترین لارو تولیدی بودند که می‌تواند به دلیل پایین بودن سطح هورمون باشد. این ماهیان از نظر ECI نیز در سطح پایین قرار گرفته بودند و میزان روشنایی نیز در آنها فاقد اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد بود. این یافته پیشنهاد می‌کند سطح هورمون مورد نیاز برای تغییر جنسیت در این

[1] Dichlorodiphenyl-trichloroethane (DDT)

www.SID.ir

Archive of SID

ماهیان پایین می‌باشد. تاکامی و همکاران (۱۳۸۵) نیز در ماهیان تحت تاثیر دوزهای هورمون متیل تستوسترون کاهش میزان هماوری را عنوان کردند که دلیل آن کاهش فولیکول‌های تخمدانی و افزایش حضور کیسه‌های اسپرمی در این دوز می‌باشد.

کاهش تعداد فولیکول‌های تخمدان و ورود میزان زیادتر کیسه‌های اسپرمی به درون تخمدان ماهیان تحت تیمار هورمونی به همراه افزایش رنگدانه‌های قرمز (افزایش ویژگی‌های ثانویه‌ی جنسی مربوط به نرها)، تمایل به سمت تغییر جنسیت به خصوص در دوز حداکثر هورمون را نشان می‌دهد. Pandian و sheela (۱۹۹۵) و تاکامی و همکاران (۱۳۸۵) نیز میزان دوز مناسب برای نر سازی ماهیان این خانواده را ۳۰۰ تا ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره گزارش کرده‌اند. در مطالعه حاضر نیز بیشترین میزان تغییر جنسیت و ورود کیسه‌های اسپرمی در تیمار با دوز ۴۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره مشاهده شد.

نکته‌ی بسیار جالب در این گزارش، تشابه روند ایجاد تغییرات گنادی و افزایش کیسه‌های اسپرمی با خصوصیات رنگ‌شناسی در ماهیان ماده و افزایش رنگ قرمز با افزایش دوز هورمون در ماهیان نر می‌باشد. به این ترتیب که با افزایش میزان کیسه‌های اسپرمی و کاهش فولیکول‌های تخمدانی و همراه با کاهش میزان تولید لارو، شاخص ECI افزایش و روشنایی کاهش نشان می‌دهد. در دوز ۱۰۰۰ که ماهیان بیشترین تغییر جنسیت را نشان می‌دهند و تولید لارو متوقف شده، بیشترین میزان ECI و کمترین میزان روشنایی در هر دو ناحیه‌ی بدن را نشان می‌دهد. این مسئله نشان‌دهنده‌ی قابلیت استفاده از روند تغییرات رنگ ماهیان در پیش‌بینی وضعیت فیزیولوژیک آنها می‌باشد. بر همین اساس فاکتور رنگ بدن می‌تواند به عنوان یک شاخص کلیدی در ارزیابی وضعیت فیزیولوژیک و در نهایت به پیش‌بینی وضعیت فیزیولوژی ماهیان مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

تاکامی، ق. آ.، امینی، م. و نقوی، م. ر. ۱۳۸۵. بررسی امکان ایجاد جنس تمام نر در ماهی گوپی *Poecilia reticulate* توسط هورمون ۱۷-آلفا متیل تستوسترون. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، سال دهم: ۲۷۹-۲۸۷.

Bayley, M., Nielsen, J. R. and Baatrup, E. 1999. Guppy sexual behavior as an effect biomarker of estrogen mimics. Ecotoxicol. Environ. Safe. 43: 68-73.

Bayley, M., Junge, M. and Baatrup, E. 2002. Exposure of juvenile guppies to three antiandrogens causes demasculinization and a reduced sperm count in adult males. Aquatic toxicol. 56: 227-239.

CIE (Commission Internationale de l' Ecalairage) 1978. Recommendations on uniform color spaces, color difference equations, psychometric color terms. Supplement No 2 to Publication No 15, Colorimetry, CIE 1971, Paris.

Devasurenda, R. S., Wanigasekera, A., Arulkanthan, A. and Jayasooriya, A. P. 2007. Identification of Androgen Induced Pigments in Guppies (*Poecilia reticulata*). Proceedings of the Peradeniya University Research Sessions, Sri Lanka 12: 164-165.

Endler, J. A. 1983. Natural and sexual selection on color patterns in Poeciliid fishes. Environ. Biol. Fish 9: 173-190.

Endler, J. A. and Houde, A. E. 1995. Geographic variation in female preferences for male traits in *Poecilia reticulate*. Evol. 49: 456-468.

Evans, J. P., Bisazza, A. and Pilastro, A. 2004. Female mating Preferences for colorful

www.SID.ir

Archive of SID

Pavlidis, M., Papandroulakis, N. and Divanach, P. 2006. A method for the comparison of chromaticity parameters in fish skin: preliminary results for coloration pattern of red skin Sparidae. Aquacult. 258: 211-219.

Pikulkaew, S. and Wongsathein, D. 2006. The effect of DDT congeners on reproductive function in male Guppy (*Poecilia reticulate*). CMUJ. 5: 219-228.

Pilastro, A., Evans, J. P., Sartorelli, S. and Bisazza, A. 2002. Male phenotype predicts insemination success in guppies. Proceedings of the Royal Society of London 269: 1325-1330.

Reinboth, R. 1969. Varying effects with different ways of hormone administration of gonadal differentiation in teleost fish. Gen. Comp. Endocrinol. 13: 527-528

Rodric- Brown, A. 1985. Female preference and sexual selection for male coloration in the guppy, *Poecilia reticulata*. Behav. Ecol. Sociobiol. 17: 199-206.

Sone, K., Hinago, M., Itamoto, M., Katsu, Y., Watanabe, H., Urushitani, H., Tooi, O., Guillette, L. J. and Iguchi, T. 2005. Effects of an androgenic growth promoter 17β-trenbolone on masculinization of Mosquito fish (*Gambusia affinis affinis*). Gen. Endocrinol 143: 151-160.

Stepien, C. A. 1986. Regulation of color morphic patterns in the giant kelp fish, *Heterostichus rostratus* Girard: Genetic versus environmental factors. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 100: 181–208.

Sutherland, E. W. 1972. Studies of the mechanism of hormone action. Sci. 177: 401-408.

Toft, G. and Baatrup, E. 2001. Sexual characteristics are altered by 4-tert-octylphenol and 17β-estradiol in the adult male guppy (*Poecilia reticulate*). Ecotoxicol. Environ. Safe. 48: 76-84.

Toft, G. and Baatrup, E. 2003. Altered sexual characteristics in guppies (*Poecilia reticulate*) exposed to 17α- estradiol and 4-tert- Octylphenol during sexual development. Ecotoxicol. Environ. Safe. 56: 228-237.

Turan, F., Cek, S. and Atik, E. 2006. Production of monosex male guppy *Poecilia* males in a population of guppies subject to high predation. J. Fish Biol. 65: 1154-1159.

Goodrich, H. B., Dee, J. E., Flynn, C. M. and Mercer, R. N. 1943. Germ cells and sex differentiation in *Lebistes Reticulatus*. Biol. Bull. 67: 83-96.

Hopper, A. F. 1965. Inhibition of regeneration of the gonopodium of the guppy by treatment with thiouracil. J. Exp. Zool. 159: 231-240.

Houde, A. E. 1987. Mate choice based on naturally occurring color pattern variation in a guppy population. Evol. 41: 1-10.

Houde, A. E. and Endler, J. A. 1990. Correlated evolution of female mating preferences and male color patterns in the guppy, *Poecillia reticulata*. Sci. 248: 1405-1408.

Joakim Larsson, D. G., Kinnberg, K., Sturve, J., Stephensen, E., Skon, M. and Forlin, L. 2002. Studies of masculinization, detoxification, and oxidative stress responses in Guppies (*Poecilia reticulata*) exposed to effluent from a Pulp Mill. Ecotoxicol. Environ. Safe. 52: 13-20.

Liley, N. R. and Seghers, B. H. 1975. Factors affecting the morphology and behavior of guppies in Trinidad. In: Baerends, G., Beer, P. and Manning, C. (eds.). Function and Evolution in Behavior. Oxford University Press, Oxford, England, pp: 92-118.

Lopez, S. 1998. Acquired resistance effects male sexual display and female choice in guppies. Proceedings of the Royal Society of London 265: 717-723.

Nielsen, L. and Baatrup, E. 2006. Quantitative studies on the effects of environmental estrogens on the testis of guppy, *Poecilia reticulate*. Aquatic toxicol. 80: 140-148.

Pandian, T. J. and Sheela, S. G. 1995. Hormonal induction of sex reversal in fish. Aquacult. 138: 1-22.

Pandey, S. 1969. The role of pituitary and gonadal hormones in the differentiation of testis and secondary sex characters of the juvenile Guppy *Poecilia reticulate* peters. Biol. Repod. 1: 272-281.

www.SID.ir

Archive of SID

reticulata by 17α- methyl testosterone. Aquacult. Res. 37: 200-203.

Zakes, K. D., Hliwa, P., Czepolanis, A. and Zakes, Z. 2000. The effect of administration of 11β-Hydroxyandrostenedione in feed on morphology of some internal organs of Wels, *Silurus glanis* (L.). Arch.Pol. Fish 8: 25-34.

Zar, J. H. 1996. Circular Distributions, Biostatistical Analysis, 3rd ed., Prentice-Hall International, INC, pp: 591-652.

www.SID.ir