

نرسازی ماهی مولی (*Poecilia Sphenops*) با استفاده از جیره حاوی گیاه خارخاسک (*Tribulus terrestris*)

سالار درافشان^{۱*}، مظاهر زمانی فرادنبه^۱، احسان رنجبر^۱، رشید شفیعی^۱، رضا نهاوندی^۲

*sdorafshan@cc.iut.ac.ir

- ۱- دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، اصفهان، ایران
- ۲- موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

چکیده

تولید جمعیت‌های تک‌جنس از نظر بازارپسندی در صنعت شیلات حائز اهمیت است. هدف از مطالعه حاضر، استفاده از گیاه خارخاسک (*Tribulus terrestris*) به عنوان ترکیب شبه آندروژن گیاهی جهت نرسازی ماهی مولی (*Poecilia Sphenops*) به عنوان یکی از ماهیان مهم زینتی بود. برای این منظور مولدین دارای جنین ماهی مولی با جیره‌های حاوی عصاره هیدروالکلی خارخاسک (۲ و ۴ درصد وزن جیره) تغذیه شدند. دو گروه کنترل (جیره پایه) و تغذیه شده با هورمون متیل تستوسترون (۳ mg/kg food) نیز در نظر گرفته شد. نوزادان متولد شده از ماهیان در تیمارهای مختلف در طی روزهای نهم تا یازدهم جمع‌آوری شده و تا سن حدود دو ماهگی و امکان تشخیص ظاهری جنسیت نگهداری شدند. نسبت‌های جنسی مشاهده شده با آزمون کای مربع (χ^2) مورد تحلیل آماری قرار گرفتند. نتایج نشان داد که دو تیمار متیل تستوسترون و خارخاسک ۴ درصد قادر به تغییر جنسیت ماهی مولی به سمت جنس نر بود. این تحقیق برای نخستین بار کارایی استفاده از خارخاسک را به صورت خوراکی بر روی ماهیان زنده‌زا نشان داد.

کلمات کلیدی: تغییر جنسیت، ماهی زینتی، گیاه دارویی.

مقدمه

جنسیت ماهیان در آبی پروری بسیار مهم است چراکه دو جنس نر و ماده دارای تفاوت‌هایی در نرخ رشد، اندازه، الگوی رفتاری و زمان تکثیر هستند (Turan and Cek, 2007). بسیاری از ماهیان زینتی از قبیل ماهیان تخم‌گذار و زنده‌زا، دو شکلی جنسی مشخصی نمایش می‌دهند که به صورت بدن رنگ‌آمیزی شده و اندازه باله‌های بزرگ‌تر در نرها دیده می‌شوند که این تفاوت‌ها به وسیله جنس مخالف (ماده) و دوست‌داران ماهیان زینتی ترجیح داده می‌شوند (Piferrer and Lim, 1997; Mousavi-Sabet et al., 2012). برخی از گونه‌های ماهیان زینتی از قبیل گویی (*Poecilia reticulata*)، مولی بالون (*P. latipinna*)، مولی باله بادبانی (*P. velifera*) و پلاتی سانست (*Xiphophorus variatus*) قیمت و ارزش ماهیان نر بیش از ۴ برابر ماهیان ماده است (Mousavi-Sabet et al., 2012). بنابراین به خاطر جذابیت و محبوبیت بالاتر این قبیل ماهیان، تولید جمعیت نر ارزش تجاری بالایی را به همراه دارد (Janalizadeh et al., 2015). تغییر جنسیت، نرسازی و تولید جمعیت تمام نر ماهیان زینتی خانواده *Poeciliidae* به خصوص جنس (*Poecilia*) با استفاده از مواد هورمونی و هورمون‌های گیاهی (عصاره‌های گیاهی) در مقیاس آزمایشگاهی و تجاری انجام شده است (Kavumpurath and Pandian, 1993; Cek et al., 2007a; Mousavi-Sabet et al., 2012; Faghani-Langroudi et al., 2014; Turan, 2017).

تغییر جنسیت به وسیله مصرف دهانی از طریق تغذیه با غذاهای آغشته به ترکیبات تستوسترون از قبیل آلفا متیل تستوسترون (MT) روش بسیار مؤثر و عملی برای تولید جمعیت‌های تمام نر هست. غلظت یا دز مصرفی آلفا متیل تستوسترون استفاده شده در ماهیان زینتی دامنه وسیعی دارد که به گونه، سن و روش مصرف هورمون بستگی دارند (Mousavi-Sabet et al., 2012; Faghani-Langroudi et al., 2014).

هورمون‌های گیاهی ترکیبات استروژنی هستند که در بیش از ۳۰۰ گونه گیاهی یافت می‌شوند که دارای عمل شبه استروژنی هستند (Turan, 2017). گیاه خارخاسک (*T. terrestris*) گیاهی یک‌ساله است که رویشگاه‌های طبیعی در بسیاری از مناطق چین، ژاپن، نواحی غربی آسیا و جنوب اروپا

و آفریقا دارد. عصاره این گیاه تحریک‌کننده جنسی و بهبوددهنده صفات جنس نر از قبیل میزان عضلات در انسان، کاهنده گلوکز خون، کاهنده کلسترول سرم خون و کاهنده کلسترول تخم‌مرغ در برخی طیور پرورشی (Duru and Şahin, 2016)، افزایش سطوح تستوسترون و رفتار جنسی در موش‌ها (Rats) است (Bashir et al., 2009) و ترکیبات این گیاه به عنوان اثر پیش‌ساز هورمونی در خرگوش‌ها نیز معرفی شده است (Gauthaman and Adaikan, 2008).

Cek و همکاران (۲۰۰۷b) دریافتند که عصاره این گیاه دارای اثرات تغییر جنسیت در سیچلاید زندانی (*Cichlasoma nigrofasciatum*) و بهبوددهنده رشد ماهی است و مشابه این گزارش در مورد گویی (*P. reticulata*) تیمار شده با این گیاه نیز ارائه شده است (Cek et al., 2007a). Şahin and Duru (۲۰۱۰) به امکان استفاده از پودر این گیاه به عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها نیز اشاره کرده است. Janalizadeh و همکاران (۲۰۱۵) دوز مناسب عصاره این گیاه در تغییر جنسیت ماهی جنگجوی (*Betta splendens*) را مورد بررسی قرار دادند و عنوان کردند که عصاره این گیاه در تغییر جنسیت و بهبود نرخ رشد ماهی جنگجوی مؤثر هست اما اثر مثبتی بر نرخ بقای این ماهی ندارد.

در مطالعه حاضر اثرات تیمارهای تستوسترون و عصاره خارخاسک (*T. terrestris*) به عنوان جایگزین عامل تغییر جنسیت بر تغییر جنسیت ماهی مولی (*P. sphenop*) بررسی شد. هدف از این تحقیق بررسی امکان تغییر جنسیت و تعیین غلظت مناسب عصاره خارخاسک برای تغییر جنسیت ماهی مولی به دلیل زیبایی‌شناختی و ارزش تجاری بالاتر جنس نر بوده است.

مواد و روش‌ها

عصاره‌گیری

به منظور عصاره‌گیری، ابتدا ۱۵۰ گرم (۳۰۰ سی‌سی) پودر میوه گیاه خارخاسک را به وسیله پودر کردن میوه آن با استفاده از دستگاه مولینکس را تهیه کرده و در ۶۰۰ سی‌سی الکل اتانول ۷۰ درصد حل نموده و بعد از گذاشتن درپوش ظرف، به مدت ۴۸ ساعت در محیط تاریک قرار داده و فواصل ۱۲ ساعته هم زده می‌شدند. بعد از طی این مدت زمان،

شدند و در این مدت، بچه ماهیان از غذاهایی مثل جلبک و آرتیمیا تغذیه شدند.

نتایج

در این آزمایش تعداد بچه ماهیان از روز اول شروع تیمار ثبت و تعداد بچه ماهیان در روزهای نهم، دهم و یازدهم جمع‌آوری شده و در ظروفی جداگانه تا سن ظهور علائم فنوتیپی جنس نر و ماده نگهداری شدند. تعداد بچه ماهیان جمع‌آوری شده در هر تیمار در هر روز جداگانه در **Error! Reference source not found.** ارائه شده است.

جدول ۱: روند تولید نوزاد در هر تیمار.

روز	تیمار			
	شاهد	متیل تستوسترون	خارخاسک خوراکی (۲٪)	خارخاسک خوراکی (۴٪)
۶	۱۰	۶	۳	۷
۱۰	۶	۹	۵	۳
۱۱	۱۲	۱	۵	۵
تعداد کل	۲۸	۱۶	۱۳	۱۵
میانگین	۹/۳۳	۵/۳۳	۴/۳۳	۵

با توجه به **Error! Reference source not found.** بیشترین تعداد بچه ماهی متولد شده در روز نهم در تیمار شاهد، در روز دهم در تیمار متیل تستوسترون و در روز یازدهم در تیمار شاهد و کمترین بچه ماهی متولد شده در روز نهم در تیمار خارخاسک خوراکی (۲٪)، در روز دهم در تیمار خارخاسک خوراکی (۴٪) و در روز یازدهم در تیمار متیل تستوسترون ثبت شد. بیشترین و کمترین درصد ماهیان نر به ترتیب در تیمارهای متیل تستوسترون و شاهد به دست آمد (شکل ۱). تیمار خارخاسک ۲٪ قادر به تغییر نسبت جنسی از نسبت مورد انتظار ۱:۱ نشد (شکل ۱)، با این وجود افزایش میزان خارخاسک به ۴٪ افزایش نسبت بچه ماهیان نر را به همراه داشت.

علاوه بر ارزیابی نسبت جنسی مشاهده شده و مورد انتظار (۱:۱)، نسبت‌های جنسی بچه ماهیان حاصل از ماهیان تحت تیمار با نسبت جنسی ماهیان گروه شاهد (به عنوان نسبت مورد انتظار در این آزمایش) مورد مقایسه قرار گرفت. با توجه نتایج ارائه شده در **Error! Reference source not**

عملیات صاف کردن محلول به صورت عبور از توری و جداسازی تفاله و عبور از کاغذ صافی انجام شد و در پایان ۲۵۵ سی‌سی عصاره هیدروالکلی تهیه گردید که این مقدار برای هر گرم پودر گیاه خارخاسک معادل ۱/۷ سی‌سی عصاره گیاه بوده است. این عصاره تا زمان مصرف در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

تهیه تیمارهای مطالعه

این مطالعه دارای چهار سطح تیمار شامل گروه شاهد (فاقد ماده افزودنی)، تیمارهای غذایی با دوز سه میلی‌گرم متیل تستوسترون در یک کیلوگرم غذا و تیمارهای غذایی ۲ و ۴ درصد عصاره^۱ خارخاسک است.

غذای مصرفی برای این مطالعه، غذای آغازین قزل‌آلای تولیدی شرکت رشد دانه (شهرکرد- ایران) در نظر گرفته شد که بر اساس اطلاعات تولیدکننده دارای ۵۴ درصد پروتئین، ۱۰-۱۱ درصد چربی، ۱/۵ درصد فیبر، ۱ درصد فسفر و ۱۰ درصد رطوبت بود.

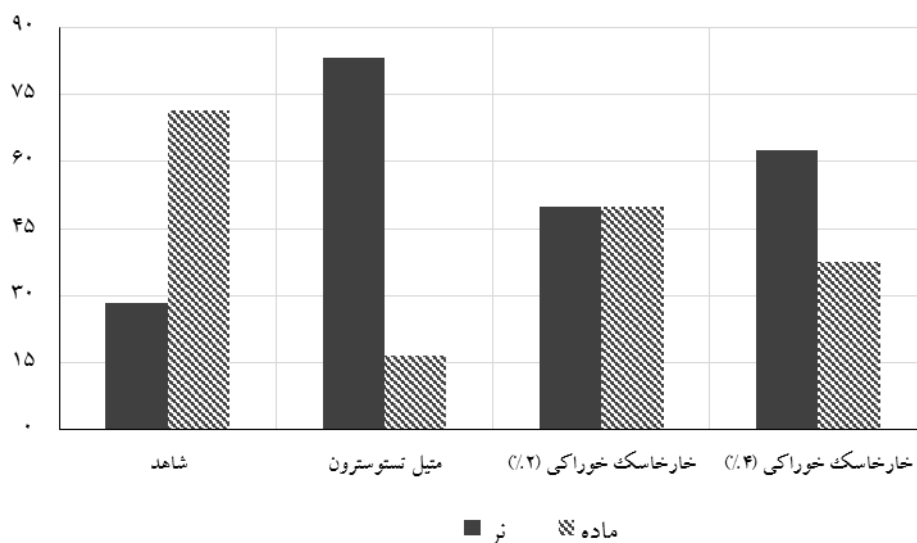
تهیه مولدین حامل بچه ماهی

مولدین موردنیاز برای این مطالعه، از قنات حسن آباد جرقویه واقع در شرق استان اصفهان و ۱۲۰ کیلومتری مرکز استان صید شده و پس از بررسی‌های انجام شده ماهیان ماده و سالم آن‌ها جدا شده و برای انتقال به آکواریوم‌ها آماده شدند. مولدین بعد از طی مراحل سازگاری به شرایط آزمایش در پنج آکواریوم ۴۰ لیتری با تراکم ۳۵ مولد قرار داده شدند. دمای آب در محدوده ۲۸-۲۶ درجه سانتی‌گراد، هوادهی دائمی و تعویض روزانه ۲۰ درصد آب انجام شد.

تیماربندی

نرخ غذایی مولدین، حدود ۲٪ وزن بدنی به صورت روزانه در دو وعده بود. طول دوره تیمار ۲۰ روز بود اما بچه ماهی‌های متولد شده در هر آکواریوم را در روزهای ۹، ۱۰ و ۱۱ از تیمار جدا شده و به‌طور جداگانه در آکواریوم‌های مجزا تا ظهور علائم فنوتیپی جنس نر و ماده تا سن حدود دو ماهگی نگهداری

^۱ - معادل عصاره استخراج شده از ۲۰ و ۴۰ گرم پودر میوه خارخاسک به ازای هر کیلوگرم غذای ماهی.



found. تغییر جنسیت مثبت نسبت به میزان مورد انتظار (۱:۱) در تیمار متیل تستوسترون به دست آمده است و در سایر تیمارها تغییر جنسیت منفی نسبت به میزان مورد انتظار (۱:۱) به دست آمده است. شکل ۱: جنسیت بچه ماهیان متولد شده در تیمارهای مختلف آزمایش

جدول ۲: مقایسه نتایج با توجه به نسبت ۱:۱.

تیمار	شاهد	متیل تستوسترون	خارخاسک خوراکی (۰.۲٪)	خارخاسک خوراکی (۰.۴٪)
درصد بچه ماهیان نر	۲۸/۵	۸۳/۳	۵۰	۶۲/۵
درصد بچه ماهیان ماده	۷۱/۵	۱۶/۷	۵۰	۳۷/۵
χ^2 محاسبه شده	۲/۴	۷/۱۳	۰	۰/۵
χ^2 جدول	۳/۸۴	۳/۸۴	۳/۸۴	۳/۸۴
(درجه آزادی ۱، سطح معنی دار ۰/۰۵)	-	+	-	-
معنی دار بودن آزمون	-	+	-	-

شد و تیمار خارخاسک خوراکی (۰.۲٪) نسبت به تیمار شاهد تأثیری در تغییر جنسیت نداشته و تفاوت معنی داری نشان ندادند ($p > 0.05$).

با توجه نتایج ارائه شده در **Error! Not a valid bookmark self-reference.** تغییر جنسیت و تبدیل شدن بچه ماهیان به جنسیت نر نسبت به تیمار شاهد در تیمارهای متیل تستوسترون و خارخاسک خوراکی (۰.۴٪) حاصل

جدول ۳: مقایسه نتایج با توجه به گروه شاهد.

تیمار	شاهد	متیل تستوسترون ۳ mg/kg	خارخاسک خوراکی (۰.۲٪)	خارخاسک خوراکی (۰.۴٪)
درصد بچه ماهیان نر	۲۸/۵	۸۳/۳	۵۰	۶۲/۵
درصد بچه ماهیان ماده	۷۱/۵	۱۶/۷	۵۰	۳۷/۵
χ^2 محاسبه شده	-	۱۸/۲۲	۱/۴۳	۴/۷۲

۳/۸۴	۳/۸۴	۳/۸۴	۳/۸۴	χ ^۲ جدول
+	-	+		معنی دار بودن آزمون

بحث

خارخاسک باعث تغییر جنسیت، اسپرماتوزنیز موفق و نرخ رشد بهتر نسبت به بچه ماهیان غیر تیمار می شود.

جانعلی زاده و همکاران (۲۰۱۵) بهترین میزان نرسازی ماهی جنگجو (*B. splendens*) را در زمان استفاده از آرتیمای غنی شده با عصاره الکلی گیاه خارخاسک در میزان ۰/۵ گرم بر لیتر گزارش دادند. همچنین در این مطالعه، بهبود نرخ رشد نیز مشاهده و گزارش شده است ولی افزایش میزان عصاره این گیاه اثر مثبتی بر نرخ بقا نداشته است؛ آن‌ها همچنین وجود تفاوت در تیمارهای مختلف در زمینه رفتارهای تولیدمثلی از قبیل لانه سازی و معاشقه مشاهده نکردند.

با توجه به نتایج این مطالعه، بیشترین و کمترین درصد ماهیان نر به ترتیب در تیمارهای متیل تستوسترون و شاهد به دست آمده است و بیشترین و کمترین درصد ماهیان ماده به ترتیب در تیمارهای شاهد و تیمار متیل تستوسترون متولد شده‌اند. در بین سه تیمار خارخاسک، تیمار خارخاسک خوراکی ۰/۴٪ بیشترین درصد ماهیان نر و کمترین درصد ماهیان نر در تیمار خارخاسک خوراکی ۰/۲٪ به دست آمد.

مقایسه نسبت جنسی با استفاده از آزمون مربع کای (χ^2)، تغییر جنسیت و تبدیل شدن بچه ماهیان به جنسیت نر نسبت به تیمار شاهد در تیمارهای متیل تستوسترون و خارخاسک خوراکی (۰/۴٪) مورد تأیید قرار داد و تیمار خارخاسک خوراکی (۰/۲٪) نسبت به تیمار شاهد اثر مثبتی در تغییر جنسیت نداشته دادند.

مطالعه Turan and Cek (۲۰۰۷) نشان می دهد که بهترین میزان استفاده از گیاه خارخاسک در تغییر جنسیت و نرسازی گربه ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) در میان ۰/۳ گرم بر لیتر به صورت حمام است. آن‌ها گزارش دادند که علی رغم تفاوت‌های مشاهده شده در نسبت جنسی، نرخ رشد، تخمدان‌ها و بیضه‌های ماهیان تیمار شده با این گیاه نسبت به گروه شاهد، اما از نظر بافت‌شناسی تفاوتی با تیمار شاهد نشان ندادند.

با توجه به نتایج این تحقیق، می توان از عصاره هیدروالکلی گیاه خارخاسک جهت تغییر جنسیت ماهی مولی استفاده کرد.

هدف از این مطالعه یافتن روشی ارزان، غیرمضر برای محیط زیست، در دسترس و مؤثر برای نرسازی در ماهیان پرورشی است و ماهی مولی (*P. sphenops*) به عنوان گونه آزمایشگاهی و گیاه خارخاسک (*T. terrestris*) به عنوان ماده ارزان و غیرمضر برای محیط زیست در مقایسه با مشتقات تستوسترون از جمله هورمون متیل تستوسترون در نظر گرفته شدند.

در زمینه تغییر جنسیت با عصاره گیاه خارخاسک (*T. terrestris*)، مطالعات زیادی صورت گرفته است که این گیاه به دلیل داشتن ترکیبات شبه استروئیدی باعث تأثیر بر جنسیت و همچنین شاخص‌هایی نظیر درصد تلفات و میانگین وزنی ماهیان می شود. از ترکیبات مفید و فعال موجود در این گیاه می توان به ساپونین‌ها، لیگنینامیدها، فلاونوئیدها، آلکانوئیدها و گلیکوزیدها اشاره داشت (Şahin and Duru, 2010).

مطالعات در مورد اثرات مصرف این گیاه در موجودات مختلف نشان می دهد که این گیاه باعث افزایش ترشح هورمون تستوسترون و همچنین افزایش قدرت و حجم عضلات منجر می شود. مصرف این گیاه در انسان تولید سلول‌های جنسی زنانه و مردانه را افزایش می دهد (Duru and Şahin, 2016). آزمایش‌های زیادی در خصوص جایگزینی عصاره‌های این گیاه به جای هورمون‌های نرسازی از جمله آلفا متیل تستوسترون بر روی ماهیان مختلف انجام داده‌اند که این آزمایش‌های حاکی از تأثیر مثبت عصاره این گیاه در نرسازی جمعیت‌های ماهیان است (Kavumpurath and Pandian, 1993; Cek et al., 2007a; Mousavi-Sabet et al., 2012; Faghani-Langroudi et al., 2014; Turan, 2017).

مطالعه Cek و همکاران (۲۰۰۷a) در زمینه استفاده از گیاه خارخاسک بر روی ماهی گویی (*P. reticulata*) نشان می دهد که بیشترین درصد نرسازی (۸۰٪) در دوز ۰/۱۵ گرم بر لیتر به دست آمده است. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که تیمار بچه ماهیان تازه متولد شده *P. reticulata* با گیاه

testicular development of immature albino rats. *Biomedica*, 25(1), 63-68.

Cek, S., Turan, F. and Atik, E., 2007a. The effects of gokshura, *Tribulus terrestris*, on sex reversal of guppy, *Poecilia reticulata*. *Pakistan Journal of Biological Science*, 10(5), 718-72.

Cek, S., Turan, F. and Atik, E., 2007b. Masculinization of convict cichlid (*Cichlosoma nigrofasciatum*) by immersion in *Tribulus terrestris* extract. *Aquaculture International*, 15, 109-119.

Duru, M. and Şahin, A., 2016. Effects of dietary yohimbe (*Pausinystalia yohimbe*) and puncture vine (*Tribulus terrestris*) extracts for growth performance, body composition and digestive parts of broiler chicks. *European International Journal of Science and Technology*, 5(6), 8-15.

Faghani-Langroudi, H., Esmailpour-Chokami, H., Rohani-Rad, M. and Mousavi-Sabet, H., 2014. Sex reversal, mortality rate and growth performance of platy *Xiphophorus variatus* (Poeciliidae) treated by methyltestosterone. *Poeciliid Research*, 4(1), 6-12.

Gauthaman, K. and Adaikan, P.G., 2008. The hormonal effects of *Tribulus terrestris* and its role in the management of male erectile dysfunction— an evaluation using primates, rabbit and rat. *Phytomedicine*, 15(1), 44–54.

Janalizadeh, E., Manoucheri, H., Changizi, R. and Hosseinifard, S.M., 2015. Sex reversing of fighter fish (*Betta splendens*) by artemia enriched with *Tribulus terrestris* (Caltrops) herbal extract. *Journal of Animal Science Advances*, 5(10), 1467-1472.

Kavumpurath, S. and Pandian, T.J., 1993. Production of an YY female guppy, *Poecilia reticulata*, by endocrine sex reversal and

پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی، استفاده از سایر روش‌های تیمار هورمونی نظیر حمام دادن نیز مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

Bashir, A., Tahir, M., Samee, W. and Munir, B., 2009. Effects of *Tribulus terrestris* on progeny testing. *Aquaculture*, 118(3-4), 183-189.

Mousavi-Sabet, H., Langroudi, H.F. and RohaniRad, M., 2012. Sex reversal, mortality rate and growth of guppy (*Poecilia reticulata*) affected by 17-alpha methyltestosterone. *Poeciliid Research*, 2(1), 1-8.

Piferrer, F. and Lim, L.C., 1997. Application of sex reversal technology in ornamental fish culture. *Aquarium Sciences and Conservation*, 1, 113-118.

Şahin, A. and Duru, M., 2010. Effects of *Tribulus terrestris* (Puncture Vine) supplementation on performance and digestive system of broiler chicks. *The Journal of Agricultural Science*, 16, 271-277.

Turan, F., 2017. The Influence of Licorice root (*Glycyrrhiza glabra*) on sex reversal in guppy *Poecilia reticulata*. *International Journal of Secondary Metabolite*, 4(3), 205-210.

Turan, F. and Cek, S., 2007. Masculinization of African Catfish (*Clarias gariepinus*) treated with gokshura (*Tribulus terrestris*). *Israeli Journal of Aquaculture–Bamidgheh*, 59(4), 224-229.

**Masculinization of molly fish (*Poecilia Sphenops*) treated with gokshura
(*Tribulus terrestris*)**

Dorafshan S.^{1*}; Zamani Faradonbe M.¹; Ranjbar E.¹; Shafie R.¹

* sdorafshan@cc.iut.ac.ir

1-Department of Natural Resources (Fisheries Division), Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

Abstract

Production of single-sex populations of fish is important in the fisheries industry. The aim of the present study was to use gokshura (*Tribulus terrestris*) as herbal androgen-like for masculinization molly fish (*Poecilia sphenops*) as one of the most important ornamental fish. For this purpose, female brood stocks of molly fish with embryos were fed with foods that contain 2 and 4% of diet weight of hydroalcoholic extracts of gokshura. The two groups of food include control (basic diet) and fed with methyl testosterone were also considered as controls. New born larval were collected in different treatments during the ninth to eleventh days. They were kept until about two months of age that were able to sex differentiate. The observed sex ratios were analyzed by chi-square test. The results showed that only two treatments including methyl testosterone and gokshura at 4% were able to sex reversal of molly fish to male sex. This research for the first time showed the effectiveness of the orally administration of gokshura for single-sex population production of livebearers fish.

Keywords: Sex reversal, Ornamental fish, Medicinal plant.