University of Guilan with collaboration of Iranian Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 9, No. 4, 2024, pages: 47-63
DOI: 10.22124/janb.2024.25947.1225

RESEARCH PAPER **OPEN ACCESS**

Comparison of Lesser galangal, *Alpinia officinarum* extract and Letrozole in masculinization of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*

Seyed Mohammad Reza Taheri[1], Sakineh Yeganeh[1*], Homayon Hoseinzadeh Sahafi[2]
1- Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Mazandaran, Iran
2- Iranian Fisheries Science Research Institute , Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Received 19 October 2023 Revised 11 December 2023 Accepted 16 December 2023

KEYWORDS
Alpinia officinarum
Masculinization
Nile tilapia
Letrozole
Gonadosomatic index

ABSTRACT

Introduction: The ability to control sex is one of the most important commercial and efficient factors of the aquaculture industry. Sex reversal and sexual maturity control are among the most important goals of hormone induction in aquatic animals. Plants can be used as a potential alternative to chemical compounds in aquaculture. *Alpinia officinarum* is a plant from the ginger family, which is native to China. Since the use of plant extracts in aquaculture is a new approach, there is no definite standardization in almost all aspects of plant extract administration and use. So, the purpose of the present study was to investigate the effects of different doses of the rhizome extract of *A. officinarum* on the sex reversal of Nile tilapia fry and compare it with the chemical drug, letrozole.

Materials and Methods: The number of 2760 pieces of Nile tilapia larvae seven days after fertilization with an average weight of 0.026 ± 0.002 g distributed in 24 aquaria (200-L in volume) equipped with aeration and filtration systems in equal and completely random released. Larvae were tested for 30 days. Masculinization of larvae using the combination of letrozole aromatase inhibitor and ethanolic extract of the rhizome of *A. officinarum*, in eight treatments including two control treatments (control, without additives and solvent, impregnated with ethanol); three experimental dietary treatments including ethanol solution of 200, 300 and 400 mg/kg of letrozole followed by ethanolic extract of the *A. officinarum* rhizome in three experimental treatments including 200, 300 and 400 mg/kg, each with three repetitions. Whole-body and ELISA methods were used to measure the testosterone hormone. The

squash method was used to determine the sex of fish larvae. The growth parameters, survival, sex determination and gonadosomatic index were measured. One-way analysis of variance and Duncan's test were used to investigate the significance of supplementing by additives at the 0.05% level.
Results and Discussion: According to the results, the lowest level of testosterone was observed in the control treatment (0.116 ng/g) while the highest in the 400 mg treatment (0.475 ng/g; $p<0.05$). The highest and lowest male and female percentages were revealed in Letrozole (400 mg/kg) ($p<0.05$). According to the results, the lowest final weight and specific growth rate at the end of 30 days were observed in the control and solvent treatments, while it was the highest in the treatments containing *A. officinarum* ($p<0.05$). The lowest and highest FCR and gonadosomatic index at the end of the experiment were observed in treatments with 300 mg/kg and 400 mg/kg, respectively ($p<0.05$). No significant difference was observed in survival rate among all experimental groups ($p>0.05$). In the present study, the percentage of males increased by elevating dose of *A. officinarum* and letrozole. The obtained results clearly showed that the *A. officinarum* has significant effects on reducing FCR and final weight. Based on the results, treatment of 400 mg/kg can upraise the testosterone level and the rate of masculinization in tilapia fry.
Conclusions: Given the positive response of the ethanolic extract of *A. officinarum* rhizome with a dose of 400 mg/kg in creating male in tilapia fry around 92% and significant superiority in weight indices, SGR, FCR and gonadosomatic index compared to letrozole treatment, it can be used to produce single-sex male Nile tilapia. In addition, it is possible to achieve a higher percentage of the male population using a dose of over 400 mg/kg, which was not available in the present study and requires further studies.

*Corresponding author: s.yeganeh@sanru.ac.ir

دانشگاه گیلان با مشارکت انجمن آبزی‌پروری ایران

تغذیه آبزیان

سال نهم، شماره چهارم، دی ۱۴۰۲، صفحات ۶۳-۴۷

DOI: 10.22124/janb.2024.25947.1225

"مقاله پژوهشی"

مقایسه عصاره گیاه خولنجان (*Alpinia officinarum*) و داروی لتروزول در نرسازی ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*)

سید محمد رضا طاهری[۱]، سکینه یگانه[۱*]، همایون حسین زاده صحافی[۲]

۱- گروه شیلات، دانشکده علوم دامی‌و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، مازندران

۲- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، تهران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۲۵ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۲۵

چکیده

توانایی کنترل جنسی یکی از مهمترین عوامل تجاری و کارآمد در صنعت آبزی پروری است. تغییر جنسیت و کنترل بلوغ جنسی از مهمترین اهداف القای هورمون در آبزیان است. خولنجان *Alpinia officinarum* گیاهی از خانواده زنجبیل و بومی چین است. هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر عصاره ریزوم گیاه *A. officinarum* با دوزهای مختلف بر نرسازی بچه ماهی تیلاپیای نیل و مقایسه آن با داروی شیمیایی لتروزول بود. تعداد ۲۷۶۰ قطعه نوزاد تیلاپیای نیل هفت روز پس از لقاح با میانگین وزنی ۰/۰۰۲ ± ۰/۰۲۶ گرم در ۲۴ آکواریوم ۲۰۰ لیتری به طور مساوی و کاملاً تصادفی رها شدند. نوزادان به مدت ۳۰ روز آزمایش شدند. نرسازی نوزادان با استفاده از یک ترکیب بازدارنده آروماتاز (لتروزول) و عصاره اتانولی ریزوم *A. officinarum* در هشت تیمار شامل دو گروه شاهد (شاهد، خوراک بدون افزودنی و حلال، خوراک آغشته به اتانول) و ۳ تیمار آزمایشی لتروزول شامل ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم در کیلوگرم خوراک و عصاره اتانولی ریزوم *A. officinarum* در ۳ تیمار آزمایشی شامل غذای آغشته به ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم عصاره اتانولی *A. officinarum* در هر کیلوگرم خوراک و هر تیمار با ۳ تکرار انجام شد. برای اندازه‌گیری هورمون تستوسترون از طریق whole-body و روش ELISA استفاده شد. برای تعیین جنسیت نوزاد ماهی از روش اسکواش استفاده شد. اندازه‌گیری فراسنجه‌های رشد، بقا، تعیین جنسیت و شاخص گنادوسوماتیک انجام شد. برای بررسی معنی‌داری از آزمون واریانس یکطرفه و آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ استفاده شد. بر اساس نتایج، کمترین سطح تستوسترون در تیمار شاهد (۰/۱۱۶ نانوگرم در گرم) و بیشترین میزان در تیمار ۴۰۰ میلی گرم (۰/۴۷۵ نانوگرم در گرم) عصاره خولنجان مشاهده شد ($p<0/05$). بیشترین و کمترین درصد نر و ماده در لتروزول (۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به طور معنی‌داری مشاهده شد ($p<0/05$). بر اساس نتایج، کمترین وزن نهایی و نرخ رشد ویژه در پایان ۳۰ روز در

کلمات کلیدی

A. officinarum

نرسازی

تیلاپیا نیل

لتروزول

شاخص گنادوسوماتیک

تیمار شاهد و حلال و بیشترین در تیمارهای حاوی *A. officinarum* مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). کمترین و بیشترین میزان FCR و شاخص گنادوسوماتیک در پایان آزمایش در تیمارهای *A. officinarum* به ترتیب با ۳۰۰ و ۴۰۰mg/kg مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). تفاوت معنی‌داری در نرخ بقا در تمام گروه‌های آزمایشی مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$). با توجه به پاسخ مثبت عصاره اتانولی ریزوم خولنجان با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در ایجاد جنس نر در بچه ماهیان تیلاپیا در حدود ۹۲٪ و برتری معنی‌دار در شاخص‌های وزن، نرخ رشد ویژه و شاخص گنادوسوماتیک نسبت به تیمار لتروزول می‌توان از آن برای تولید ماهیان تک‌جنس نر تیلاپیای نیل در مراکز تکثیر و پرورش استفاده کرد.

نویسنده مسئول: s.yeganeh@sanru.ac.ir

مقدمه

آبزی‌پروری سریع‌ترین بخش در تولید مواد غذایی حیوانی است و از توان بزرگی به عنوان یک راه حل پایدار برای امنیت غذایی جهان برخورداراست (Budd et al. 2015). مهم‌ترین گونه‌های ماهی تیلاپیا که در صنعت پرورش ماهی استفاده می‌شوند، تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*)، تیلاپیای موزامبیک (*Oreochromis mosambicus*) و تیلاپیای آبی (*Oreochromis aureus*) هستند که با در نظر گرفتن ماهی تیلاپیای قرمز، ۹۹/۵٪ تولیدات جهانی تیلاپیا را شامل می‌شوند. مهم‌ترین مشکل پرورش ماهی تیلاپیا، بلوغ زودرس ماهیان بوده که موجب افزایش جمعیت و تراکم ماهیان در استخر، افزایش ضریب تبدیل خوراک، عدم بازار پسندی ماهیان و در نهایت عدم دستیابی به سود مناسب در طی دوره پرورش ماهی می‌شود. پرورش ماهی تیلاپیا تا قبل از دستیابی به فنون تولید بچه‌ماهی تیلاپیای تک جنس نر از روند توسعه خوبی برخوردار نبود (Fortes, 2005). در ایران نیز پرورش ماهی تیلاپیا از میزان ۵۴۹ تن در سال ۱۳۹۸ به ۷۳۶ تن در سال ۱۴۰۰ رسیده است (Statistical Yearbook of Iranian Fisheries Organization. 2021).

توانایی کنترل جنسی یکی ازمهم‌ترین عوامل تجاری وکارآمد بودن صنعت پرورش آبزیان است (Budd et al. 2015). از بین روش‌های تولید ماهی تیلاپیای تک‌جنس نر، روش استفاده از هورمون‌های استروئیدی، آنالوگ‌های استروئیدی و ترکیبات غیر استروئیدی به دلیل سهولت اجرا و عدم نیاز به ادوات و تجهیزات پیشرفته و اقتصادی بودن در انواع روش‌های تجویز خوراکی، غوطه‌وری و تزریق، در بیشتر کشورها مرسوم بوده و مورد اقبال تکثیرکنندگان ماهی تیلاپیا واقع شده است (El-Sayed, 2006). روش تغییر جنسیت ماهی تیلاپیا به‌دلیل سهولت اجرا و راندمان بالای آن در بیشتر کشورهای در حال توسعه استفاده می‌شود (Fuentes-silva et al. 2013).

تغییر جنسیت و کنترل رسیدگی جنسی از مهمترین اهداف القای هورمونی در آبزیان است (حسین‌زاده و همکاران، ۱۳۹۷). استفاده از هورمون‌ها در آبزیان باید با دقت کامل انجام شود، زیرا می‌تواند منجر به آلودگی محیط زیست، تغییرات در دستگاه غدد درون‌ریز و اثرات سوء بر مصرف‌کنندگان شود (Hoga et al. 2018)، اما استفاده از هورمون براساس این واقعیت که بسیاری معتقدند باقیمانده چنین هورمون‌هایی دارای اثر جانبی مضر است، از سوی مصرف‌کنندگان مورد انتقاد است (Guillen et al. 1999; El-Sayed et al. 2012).

از گیاهان می‌توان به عنوان یک گزینه بالقوه و جایگزین ترکیبات شیمیایی در آبزی‌پروری استفاده کرد. استفاده از گیاهان می‌تواند ابزاری مؤثر برای حرکت به سمت توسعه پایدار، اقتصادی سالم و دوستدار محیط زیست در تولید آبزیان باشد (Syahidah et al. 2015; Gabriel et al. 2015; 2019). ترکیبات زیست‌فعال گیاهی و عصاره‌های گیاهی، حاوی فیتواستروژن‌هایی مانند ایزوفلاونوئیدها، فلاونوئیدها و ساپونین‌ها، ترکیباتی طبیعی با فعالیت استروژنی و آندروژنی بوده و استفاده از آن‌ها را برای تولید تیلاپیای تک‌جنسی می‌توان به جای هورمون‌های استروئیدی استفاده کرد. روش‌های متعددی برای استخراج مواد مؤثره از گیاهان مانند ماسراسیون، پرکولاسیون، سوکسله، و روش‌های جدید سونیکاسیون، امواج ماکروویو، سیال فوق بحرانی و استخراج جریان همسو وجود دارد (Samam Shariat, 2007; Etemdi et al. 2017).

گیاه خولنجان *Alpinia officinarum* معروف به Lesser galangal گیاهی از خانواده زنجبیل و موطن اصلی آن در چین است. این گیاه با برگ‌های بلند و گل‌های مایل به قرمز و مایل به سبز ۱/۵ الی ۲ متر رشد می‌کند. ریزوم‌ها معروف به گالنگال به دلیل عطر و طعم تند شیرین و رایحه معطر آن ارزش دارد. عصاره ریزوم به طور عمده شامل ترکیبات فلاونوئید دی فنیل هپتان و روغن‌های فرار است. این عصاره دارای خواص ضد باکتریایی، مهار انعقاد خون، تسکین درد، رفع سوءهاضمه و سرماخوردگی، ضد التهاب، ضد سرطان و دارای خواص ضد اکسایشی است (Abubakar et al. 2018). معمولاً محلول‌های الکلی (متانول یا اتانول) نتایج مطلوبی را در فرایند استخراج موجب می‌شوند (Mohiuudin et al. 2011; Basri et al. 2017; Abubakar et al. 2018). تعداد دوازده فلاونوئید از جمله Chrysin، Kaempferol، Galangin و Quercetin از گیاه خولنجان استخراج شده است (Tan et al. 2015; Kolangi et al. 2019; Akbar et al. 2020). کریسین (Chrysin) فعالیت آنزیم آروماتاز سیتوکروم P450 را متوقف می‌کند (Balam et al. 2020). همچنین کریسین و گالانین (Galangin) از مهارکننده‌های طبیعی آروماتاز هستند (Balunas et al. 2008).

در آبزی‌پروری، عصاره‌های گیاهی را می‌توان از راه‌های مختلفی مانند خوراکی، تزریقی و غوطه‌وری استفاده کرد. مصرف خوراکی عصاره‌های گیاهی اثرات مؤثر کمتری می‌گذارند، زیرا این عصاره‌ها به آرامی توسط ماهیان خورده و جذب می‌شوند (Harikrishnan et al. 2009)، ولی این امکان را فراهم می‌کند که تعداد زیادی از ماهیان با هزینه کمتر، استرس پایین‌تر و نیروی کار کمتری تحت درمان قرار بگیرند (Sakai, 1999). بنابراین، این روش به یک گزینه بالقوه مناسب در آبزی‌پروری تبدیل شده است. عصاره‌های گیاهی موجود در جیره‌های غذایی ماهیان در دوزهای مختلف (Bulfon et al. 2013)، به اندازه حیوان، نوع و ماهیت عصاره‌ها، روش‌های پرورشی و هدف از تجویز بستگی دارد. از آنجا که استفاده از عصاره‌های گیاهی در آبزی‌پروری یک رویکرد جدید است، تقریباً در تمام جنبه‌های تجویز و استفاده از عصاره گیاهی، استانداردسازی معینی وجود ندارد. با توجه به مطالب بیان شده، هدف از تحقیق حاضر، بررسی تأثیر عصاره ریزوم گیاه خولنجان با دوزهای مختلف بر نرسازی بچه‌ماهیان تیلاپیای نیل و مقایسه آن با داروی شیمیایی لتروزل است.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی ماهی و تیمارهای آزمایشی

تعداد ۲۷۶۰ قطعه نوزاد ماهی تیلاپیای نیل هفت روز پس از لقاح (۴ روز پس از خروج از تخم) با میانگین وزن ۰/۰۰۲ ± ۰/۰۲۶گرم در ۲۴ آکواریوم ۲۰۰ لیتری به ابعاد ۴۰ × ۵۰ × ۱۰۰ سانتی‌متر مجهز به دستگاه هوادهی و فیلتراسیون به صورت مساوی و کاملاً تصادفی رهاسازی شد. ۱۸ ساعت روشنایی (از ۶ صبح تا ۱۲ شب) و ۶ ساعت تاریکی؛ دمای آب ۰/۸ ± ۲۷/۹ درجه سانتی‌گراد)؛ تغذیه ماهیان با غذای شرکت آکوا به صورت دستی و روزانه در ۸ نوبت در حد سیری (در ۱۵ روز اول تغذیه از غذای پیش آغازین پودری و کرامبل با اندازه ۰/۴-۰/۲ میلی‌متر و سپس با اندازه ۰/۸-۰/۴ میلی‌متر استفاده شد) انجام شد. آنتی آروماتاز لتروزول ساخت شرکت توفیق دارو به صورت پودر لتروزول خالص و گیاه خولنجان از شرکت گیاهینه تهیه شد. نوزادان برای مدت ۳۰ روز آزمایش شدند. در پایان روز سی‌ام تعداد ۲۰ قطعه ماهی از هر آکواریوم زیست‌سنجی شدند.

نرسازی نوزادان با استفاده از ترکیب مهارکننده آروماتاز لتروزول و عصاره اتانولی ریزوم گیاه خولنجان، در هشت تیمار شامل دو تیمار شاهد (شاهد، غذای بدون افزودنی و حلال، غذای آغشته به اتانول) و ۳ تیمار آزمایشی لتروزول شامل غذای آغشته به محلول اتانولی ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خوراک (Afonso et al. 2001) و عصاره اتانولی ریزوم گیاه خولنجان در ۳ تیمار آزمایشی شامل غذای آغشته به ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم عصاره اتانولی گیاه خولنجان در کیلوگرم خوراک، هر تیمار با ۳ تکرار انجام شد. برای افزودن لتروزول به خوراک در آزمایش اول، محلول الکلی لتروزول تهیه شد. بر اساس پیشینه مطالعات تأثیر دوزهای استفاده شده از داروهای مهارکننده آروماتاز مانند لتروزول (Bitaraf et al. 2011) و نیز دوزهای مصرفی عصاره‌های گیاهی در نرسازی ماهیان (علایی و همکاران ۱۳۹۷)، مقایسه تأثیر عصاره ریزوم گیاه خولنجان با داروی لتروزول در نرسازی ماهی تیلاپیا انجام شد. ابتدا دوزهای معین لتروزول (۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم) در ۱۲۰ میلی‌لیتر اتانول با درجه خلوص ۹۵٪ حل شده و محلول حاصل توسط یک افشانه روی توده یک کیلوگرم غذای خشک افشانه و همزمان به صورت یکنواخت با غذا مخلوط و برای خشک شدن در زیر هود در معرض جریان هوا قرار داده شد. پس از خشک شدن و بسته‌بندی، داخل یخچال گذاشته شد. در تیمارهای حلال تنها از ۱۲۰ میلی‌لیتر اتانول بدون افزودنی برای هر کیلوگرم غذا استفاده شد (Desprez et al. 2003). برای تهیه عصاره اتانولی ریزوم گیاه خولنجان ابتدا توسط آسیاب برقی پودر، سپس به ازای ۱۰۰ گرم پودر ریزوم خولنجان هزار میلی‌لیتر هیدروالکل اتانول ۷۰٪ اضافه کرده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای آزمایشگاه در دستگاه پرکولاتور نگهداری شد. بعد از گذشت ۷۲ ساعت، شیر دستگاه پرکولاتور باز شده و قطره قطره عصاره جمع‌آوری شده و همزمان از بالای پرکولاتور به وسیله قیف جداکننده قطره قطره محلول هیدروالکل اضافه شد تا زمانی که عصاره به دست آمده رنگی از گیاه نداشت. این عصاره توسط دستگاه بن‌ماری (water bath) تغلیظ شده و برای خشک کردن عصاره تغلیظ شده از روش انجماد سرد استفاده شد (قربانی رنجبری و همکاران، ۱۳۹۳). عصاره خشک تهیه شده خولنجان نیز در دوزهای ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در ۱۲۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰٪ حل شده و محلول حاصل روی توده یک کیلوگرم غذای خشک افشانه و به‌صورت یکنواخت با غذا مخلوط و پس از خشک‌شدن در زیر هود (دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد)، بسته‌بندی و داخل یخچال تا زمان مصرف نگهداری شد.

روزانه پس از آخرین وعده غذادهی، آکواریوم‌ها با روش سیفون‌کردن تمیز و ۳۰٪ تعویض آب شدند. غذادهی در حد سیری و ۸ بار در روز در ساعات ۷، ۹، ۱۱، ۱۳، ۱۵، ۱۷، ۱۹ و ۲۱ انجام شد. آنالیز جیره (جدول ۱) با استفاده از روش اندازه‌گیری استاندارد AOAC (۱۹۹۰) انجام شد.

Table 1 Proximate analysis of feed used in feeding Nile tilapia fry (*O. niloticus*) for 30 days

جدول ۱ آنالیز تقریبی خوراک مورد استفاده در تغذیه بچه ماهیان تیلاپیای نیل (*O. niloticus*) برای مدت ۳۰ روز

Compositions	Per diet (%)
Protein	36.40
Absorbable protein	30.63
Fat	14.20
Ash	13.34
Moisture	5.88

اندازه‌گیری تستوسترون

در روز سی‌ام آزمایش برای سنجش هورمون تستوسترون به دلیل کوچک بودن بچه‌ماهیان و محدودیت عملیات خونگیری و تهیه پلاسما، از طریق whole-body و روش ELISA استفاده شد. از هر تکرار دو قطعه بچه‌ماهی برداشته، پس از جداکردن سر و دم، محتویات شکم و باله‌ها، بافت بدن همگن شده، یک گرم بافت همگن داخل میکروتیوب ته‌گرد گذاشته و تا زمان انجام سنجش هورمون‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (Nouri et al. 2020; Roosta et al. 2020) و سپس با استفاده از کیت تجاری انسانی الایزا شرکت مونوبایند در آزمایشگاه مرجع آبزیان ویرومد رشت بر اساس دستورالعمل مربوطه کیت انجام شد. محلول بافر فسفات PBS (pH 7.4) به نسبت یک به یک به نمونه‌های بافت هموژنیزه اضافه و پس از سانتریفوژ با دور ۳۰۰۰ بمدت ۱۰ دقیقه، نمونه‌های پلاسما جدا شد. ۱۰ میکرولیتر از استانداردها و نمونه‌ها در چاهک‌های مورد نظر ریخته، به همراه ۲ چاهک کنترل بالا و پایین داخل پلیت قرار داده و شماره‌گذاری شدند. ۵۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه و پلیت به مدت ۳۰ ثانیه به آرامی تکان داده شد. ۵۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه بیوتینی به هر چاهک اضافه و پلیت به مدت ۳۰ ثانیه به آرامی تکان داده شد. چاهک‌ها توسط چسب مخصوص پلیت پوشانده و ۶۰ دقیقه در دمای اتاق گرمخانه‌گذاری شد. محتویات چاهک‌ها وارونه و خارج شد. سپس چاهک‌ها ۵ مرتبه و هر مرتبه با ۳۵۰ میکرولیتر محلول شسته شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا، درون تمام چاهک‌ها ریخته و پلیت به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی بدون تکان دادن، گرمخانه‌گذاری شد. ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده واکنش به کلیه چاهک‌ها اضافه کرده و پلیت به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان داده شد تا تمام رنگ آبی محلول چاهک‌ها زرد شود. مقدار جذب نوری برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر و تهیه منحنی مقادیر هورمون توسط دستگاه الایزا ریدر ELx800 محاسبه و انجام شد. حساسیت کیت ۰/۰۵۷۶ ng/ml بود.

تعیین جنسیت

ابتدا بچه‌ماهیان شوک آب سرد داده شدند تا آماده کالبد شکافی شوند (El-Sayed et al. 2012). سپس برای تعیین جنسیت بچه‌ماهیان از روش اسکواش (با رنگ استوکارمین) استفاده شد. برای مشاهده بافت گنادی و یاخته‌های آن در زیر میکروسکوپ از بزرگنمایی ۱۰۰x- ۲۵ استفاده شد (Guerrero and Shelton, 1974). پس از کالبد شکافی و خروج محتویات شکمی، دو قطره محلول بوئن به محل قرار گرفتن گنادها افزوده تا موجب سفت شدن و تثبیت گنادها شوند و توسط یک پنس ظریف، گنادها برداشت، و توسط ترازوی دیجیتال محفظه دار مارک AND مدل HR-200 ژاپن با دقت d=0.1 mg توزین شد.

بررسی عملکرد رشد

اندازه‌گیری فراسنجه‌های زیستی شامل وزن بدن، نرخ رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی، درصد بازماندگی، نسبت جنسیت (نر، ماده و جنس بینابینی) و شاخص گنادوسوماتیک انجام شد. روابط استفاده شده عبارت است از:

۱۰۰ × (وزن بدن/وزن گناد) = شاخص گنادوسوماتیک

۱۰۰ × [طول دوره پرورش/(لگاریتم وزن اولیه-لگاریتم وزن نهایی)] = نرخ رشد ویژه
افزایش وزن/ میزان غذای خورده شده = ضریب تبدیل غذایی
۱۰۰ × [تعداد کل ماهیان/(تعداد تلفات-تعداد کل ماهیان)] = بازماندگی
درصد نرسازی × درصد بازماندگی = درصدکارایی نرسازی

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده، ابتدا نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون کولموگروف-اسمیرنوف و همگن بودن واریانس‌ها توسط آزمون لِوِن بررسی و تأیید شد. برای بررسی معنی‌داری تأثیر افزودنی‌ها بر شاخص‌های رشد و میزان تستوسترون از آزمون واریانس یکطرفه و آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ استفاده شد. همچنین از روش کروسکال-والیس برای بررسی میزان بازماندگی و از آزمون کای دو برای بررسی نسبت جنسیت در ۸ تیمار استفاده شد.

نتایج

با توجه به نتایج به‌دست آمده (جدول ۲ و شکل ۱)، جمعیت نر در تیمار ۴۰۰ میلی‌گرم لتروزول در کیلوگرم (۹۸/۳٪) به طور معنی‌دار بیش از دیگر تیمارها بود ($p<0/05$). جمعیت نر در هر ۶ تیمار ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم لتروزول و خولنجان به طور معنی‌دار بیش از تیمارهای شاهد و حلال بود ($p<0/05$). تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم خولنجان در کیلوگرم و ۴۰۰ میلی‌گرم لتروزول در کیلوگرم به ترتیب کم‌ترین و بیش‌ترین درصد نرسازی را در بین ۶ تیمار افزودنی داشت که با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌دار نشان دادند ($p<0/05$).

نتایج نشان داد که پایین‌ترین میزان تستوسترون در تیمار شاهد و بیش‌ترین آن در تیمار ۴۰۰ میلی‌گرم خولنجان و لتروزول در کیلوگرم مشاهده شد ($p<0/05$). همچنین میزان تستوسترون در تیمارهای ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم لتروزول و خولنجان در جیره با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نشان ندادند ($p>0/05$).

Table 2 Comparison of gender percentage (percentage of male, female, interstitial and tissue testosterone) of tilapia fry (*O. niloticus*) (Mean ± SD) obtained at the end of the culturing period at different treatments

جدول ۲ مقایسه درصد جنسیت (درصد جنس نر، ماده، بینابینی و تستوسترون بافت) بچه ماهیان تیلاپیا (*O. niloticus*) (میانگین ± انحراف معیار) بدست آمده در انتهای دوره پرورش در تیمارهای مختلف

Treatments	Indices			
	Male (%)	Female (%)	Interstitial (%)	Tissue testosterone (ng/g)
Control	48.9 ± 1.45^{a}	51.1 ± 1.45^{e}	0	0.116 ± 0.02^{a}
Solvent	49.50 ± 3.02^{a}	50.5 ± 3.02^{e}	0	0.121 ± 0.03^{a}
Letrozole (200 mg/kg)	84 ± 3.74^{c}	15 ± 3.31^{bc}	0.3 ± 0.05	0.264 ± 0.05^{b}
Letrozole (300mg/kg)	91.3 ± 2.91^{d}	8.4 ± 2.37^{b}	0.3 ± 0.05	0.291 ± 0.07^{b}
Letrozole (400 mg/kg)	98.3 ± 2.08^{e}	1.7 ± 0.08^{a}	0	0.455 ± 0.04^{c}
Kholanjan (200 mg/kg)	69.6 ± 1.66^{b}	30.1 ± 1.10^{d}	0.3 ± 0.05	0.306 ± 0.11^{b}
Kholanjan (300 mg/kg)	82.8 ± 0.94^{c}	16.9 ± 1.29^{c}	0.3 ± 0.05	0.333 ± 0.07^{b}
Kholanjan (400 mg/kg)	91.9 ± 2.73^{d}	7.4 ± 2.15^{b}	0.7 ± 0.05	0.475 ± 0.05^{c}

Different letters in each column indicate significant differences ($p<0.05$).

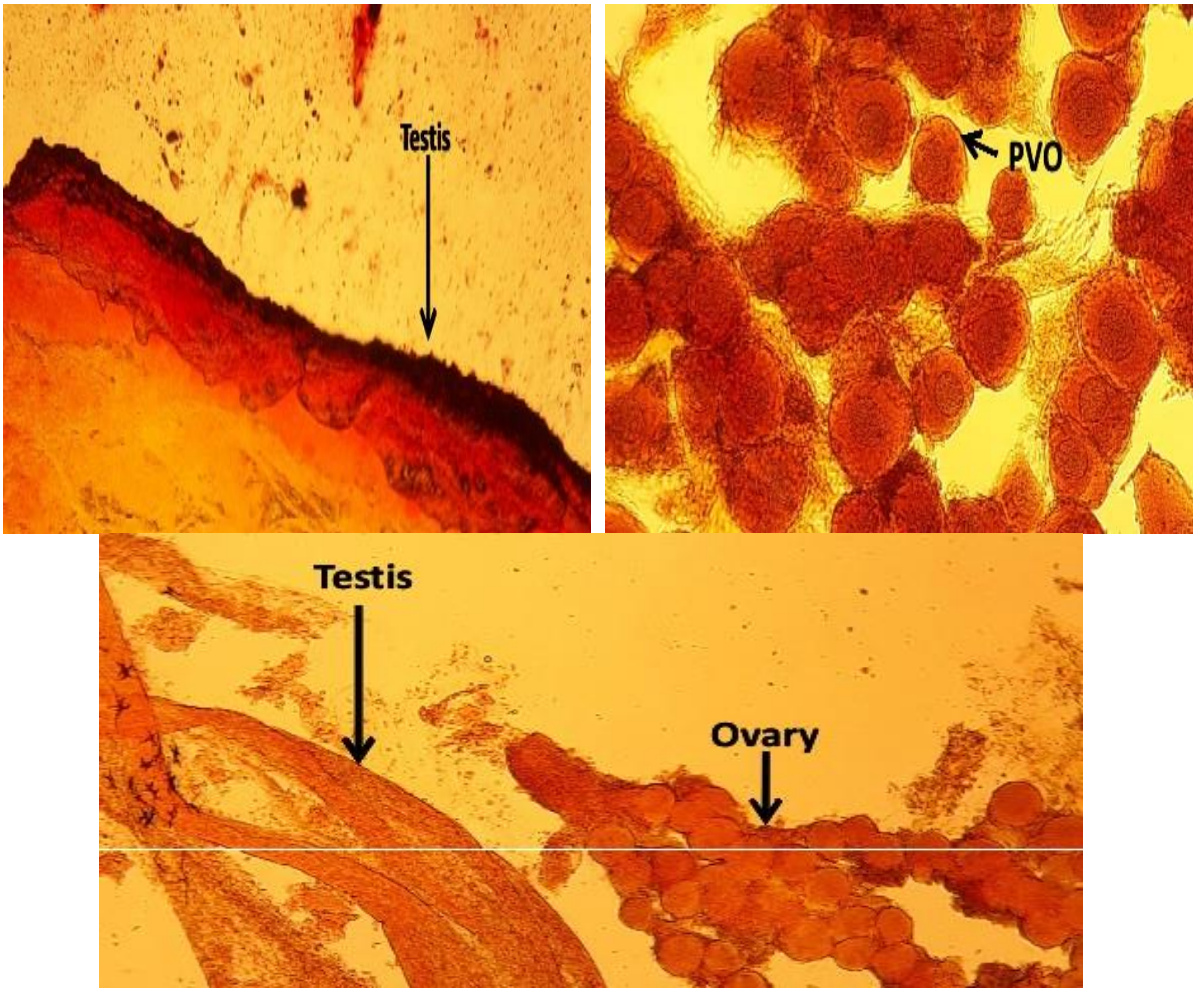

Figure 1 Gonadal tissue and sex cells of juvenile tilapia (*O. niloticus*) obtained at the end of the rearing period

شکل ۱ بافت گنادی و سلول‌های جنسی بچه ماهیان تیلاپیا (*O. niloticus*) بدست آمده در انتهای دوره پرورش

با توجه به نتایج به دست آمده در جدول ۳، کم‌ترین وزن به دست آمده و کمترین نرخ رشد ویژه در پایان ۳۰ روز در تیمار شاهد، حلال و بیش‌ترین آن در تیمارهای حاوی عصاره خولنجان مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). نرخ رشد ویژه در تیمار ۴۰۰ میلی‌گرم لتروزول در کیلوگرم و تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم خولنجان در کیلوگرم با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نداشتند ($p>۰/۰۵$). کم‌ترین ضریب تبدیل غذایی در تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم خولنجان در کیلوگرم به دست آمد که تفاوت معنی‌داری با تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم لتروزول در کیلوگرم از خود نشان داد ($p<۰/۰۵$).

برای شاخص گنادوسوماتیک کم‌ترین درصد به دست آمده در تیمار حلال و بیش‌ترین آن در تیمار ۴۰۰ میلی گرم خولنجان در کیلوگرم مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). درصد بازماندگی در تمامی تیمارها با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نشان ندادند ($p>۰/۰۵$).

Table 3 Growth indices (final weight, specific growth rate, food conversion ratio, survival and gonadosomatic index) of tilapia (*O. niloticus*) fry (Mean ± SD) obtained at the end of the culturing period at different treatments

جدول ۳ شاخص‌های رشد (وزن نهایی، نرخ رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی، بازماندگی و شاخص گنادوسوماتیک) بچه ماهیان تیلاپیا (*O. niloticus*) (میانگین ± انحراف معیار) بدست آمده در انتهای دوره پرورش در تیمارهای مختلف

Treatments	Indices					
	Final weight (g)	SGR (%/day)	FCR	Gonadosomatic index (%)	The percentage of male fertility	Survival (%)
Control	1.648 ± 0.16^{a}	13.867 ± 0.33^{a}	1.15 ± 0.01^{abc}	0.059 ± 0.01^{ab}	44.07 ± 1.34^{a}	90.14 ± 2.66
Solvent	1.696 ± 0.27^{a}	13.873 ± 0.53^{a}	1.12 ± 0.02^{ab}	0.055 ± 0.02^{a}	44.38 ± 2.30^{a}	89.57 ± 0.70
Letrozole (200 mg/kg)	1.802 ± 0.08^{ab}	14.101 ± 0.15^{ab}	1.14 ± 0.03^{ab}	0.067 ± 0.01^{ab}	73.94 ± 1.74^{c}	87.25 ± 1.81
Letrozole (300 mg/kg)	1.808 ± 0.03^{ab}	14.115 ± 0.06^{ab}	1.19 ± 0.04^{c}	0.077 ± 0.01^{bcd}	78.83 ± 1.34^{d}	86.38 ± 1.81
Letrozole (400 mg/kg)	2.003 ± 0.14^{b}	14.451 ± 0.23^{bc}	1.12 ± 0.01^{ab}	0.080 ± 0.01^{cd}	84.36 ± 1.50^{e}	85.80 ± 1.33
Kholanjan (200 mg/kg)	2.245 ± 0.13^{c}	14.832 ± 0.19^{cd}	1.16 ± 0.04^{bc}	0.094 ± 0.01^{de}	60.86 ± 0.89^{b}	87.54 ± 1.33
Kholanjan (300 mg/kg)	2.363 ± 0.09^{c}	15.005 ± 0.13^{d}	1.11 ± 0.02^{a}	0.093 ± 0.01^{de}	72.17 ± 2.31^{c}	87.25 ± 1.81
Kholanjan (400 mg/kg)	2.489 ± 0.01^{c}	15.180 ± 0.01^{d}	1.12 ± 0.02^{ab}	0.100 ± 0.01^{e}	40.79 ± 3.60^{d}	86.38 ± 1.81

Different letters in each column indicate significant differences ($p<0.05$).

بحث

فنون رایج برای تولید جمعیت تک‌جنس نر ماهی، استفاده از هورمون‌های استروئیدی مانند ۱۷-آلفا متیل تستوسترون است. افزایش استفاده از هورمون‌های استروئیدی صنعتی برای تولید جمعیت تک‌جنس نر ماهی تیلاپیا برای روش‌های پرورش متراکم می‌تواند باعث آلودگی محیط زیست و سلامتی جامعه شود. بنابراین، روش‌های جایگزین و مواد شیمیایی جدید و بی‌خطر برای تولید جمعیت تیلاپیای تک‌جنس نر باید مد نظر قرار داده شود (Syahidah et al. 2015).

در مطالعه حاضر درصد جمعیت نر در تیمارهای لتروزول ۷/۳-۹۸٪ ۸۴ و در تیمارهای حاوی عصاره خولنجان ۶/۹-۹۱٪ ۶۹ بود که در بین تیمارهای لتروزول و خولنجان، بیشترین درصد در تیمار حاوی ۴۰۰ میلی‌گرم لتروزول در کیلوگرم جیره و بازماندگی در محدوده ۹۸٪ بود. Bitaraf و همکاران (۲۰۱۱) در تولید تیلاپیای تک‌جنس نر، نسبت نرسازی توسط ترکیب مهارکننده آروماتاز لتروزول را در سطوح ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خوراک، به ترتیب ۹۹ و ۹۹/۶ و ۱۰۰٪ و میزان بازماندگی را در دامنه ۷۶/۵ الی ۹۱/۶ گزارش کردند. صیدی و همکاران (۱۳۹۶) در مطالعه اثر لتروزول با دوز ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلو گرم خوراک به مدت یک ماه در میزان تغییر جنسیت نوزاد یک روزه ماهیان گوپی (*Poecilia reticulate*) نتیجه گرفتند که تیمار لتروزول با دوز ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا دارای بیش‌ترین تأثیر در ایجاد نرسازی به میزان ۸۱/۸٪ بود. Shen و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه روی نرسازی ماهی کت فیش زرد (*Pelteobagrus fulvidraco*) دریافتند که افزودن لتروزول در جیره غذایی با دوز صفر، ۲۰، ۵۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی گرم در کیلوگرم غذا به مدت شصت روز پس از تخم‌گشایی، به ترتیب سبب نرسازی ۶۳/۸، ۸۰، ۸۸/۳ و ۹۶/۷٪ ماهیان شد. در مطالعه حاضر نیز با افزایش دوز خولنجان و لتروزول درصد نرسازی ماهیان تیلاپیا افزایش یافت. در مطالعه‌ای توسط Afonso و همکاران (۲۰۰۱) برای تغییر جنسیت نوزاد ماهی تیلاپیای نیل از یک مهارکننده آروماتاز بنام فادرزول به مدت ۱۵ و ۳۰ روز در چهار سطح صفر، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا استفاده شد. نتایج نشان داد که نسبت نرها در تمام تیمارهای آزمایشی به طور معنی‌دار بالاتر از دیگر تیمارها بود. دوزهای ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم فادرزول به مدت ۳۰ روز موجب نرسازی صد در صد شد.

با افزایش میزان عصاره ریزوم گیاه خولنجان در جیره نوزاد ماهیان تیلاپیا، میزان تستوسترون و شاخص گنادوسوماتیک در مطالعه حاضر افزایش معنی دار پیدا کرد. ناجی و همکاران (۱۳۹۴) نشان دادند که ماهیان نر مولی (*Poecilia latipinna*) تحت درمان با خولنجان به مقادیر ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت تزریق عضلانی به صورت یک روز در میان و به مدت ۲۰ روز، با افزایش دوز خولنجان میزان تستوسترون افزایش یافته و شاخص گنادوسوماتیک در مقادیر ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم از گیاه خولنجان افزایش یافت که یکی از دلایل آن اثر فلاونوئیدهای موجود در خولنجان با خاصیت مهارکننده آروماتاز گزارش شده است (Balunas et al. 2008; Balam et al. 2020). در بررسی Todoei و همکاران (۲۰۲۱)، تأثیر عصاره آبی گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius*) بر تغییر جنسیت فیزیولوژیک و ایجاد جنس نر در ماهی گوپی (*Poecilia reticulata*) بررسی شد که در این مطالعه، ماهیان غلظت‌های ppm ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ عصاره آبی گلرنگ را به مدت یک ماه همراه با غذا دریافت کردند. بیش‌ترین افزایش یاخته‌های جنسی نر در ماهیان دریافت‌کننده غلظت‌های ppm ۱۰۰ و ۱۵۰ عصاره آبی گیاه گلرنگ بود. نتایج تحقیق نشان داد که گیاه گلرنگ به دلیل داشتن ساپونین و افزایش تستوسترون به ترتیب موجب افزایش اسپرماتوژنز شده و می‌تواند جنسیت ماهی گوپی را در جهت نرسازی القاء کند. همچنین در مطالعه حاضر بر روی گیاه خولنجان، افزایش درصد نرشدگی با افزایش مقدار گیاه افزایش یافت که با مطالعه قبلی مطابقت دارد. افزایش سطح تستوسترون در گروه تحت درمان در این مطالعه با گیاه خولنجان با یافته‌های Adimoelja (۲۰۰۰)، El-Tantawy و همکاران (۲۰۰۷) و Gauthaman و Ganesan (۲۰۰۸) در استفاده از عصاره خارخاسک مطابقت دارد. اثر گیاه خارخاسک بر سطح تستوسترون ممکن است مستقیماً به حضور پروتودیوسین به عنوان جزء اصلی عصاره خارخاسک که از پیش سازهای تستوسترون در نظر گرفته می‌شود، نسبت داده شود. این امر می‌تواند تولید تستوسترون را از طریق تبدیل به دهیدرواپی آندروسترون افزایش دهد (Adimoelja, 2000). علاوه بر این، عقیده بر این است که گیاه خارخاسک به طور غیرمستقیم با تحریک آزادسازی

هورمـون رشد، بر سطوح تستـوسترون تـأثیر می‌گذارد (Adimoelja, 2000; Antonoi et al. 2000). همچنین تأثیر پودر دانه خرما بر سطح تستوسترون توسط Bahmanpour و همکاران (۲۰۰۶)، Iftikhar و همکاران (۲۰۱۱) و Marbeen و همکاران (۲۰۰۵) گزارش شده است. افزایش سطح تستوسترون را می‌توان به حضور گنادوتروپیک فعال، استرون، استرادیول و استریول از کسر هگزانی پودر دانه خرما نسبت داد (Abbas and Ateya, 2011). Ghosal و Chakraborty (۲۰۱۴) نشان دادند که غوطه‌وری نوزادان ۳ روزه تیلاپیای نیل با استفاده از عصاره آبی اسفناج رونده (*Basella alba*) با دوز ۰/۱ گرم در لیتر موجب نرسازی نوزادان به میزان ۷۰/۳٪ می‌شود که به علت فعالیت آندروژنیک عصاره به دلیل وجود مواد شیمیایی گیاهی مانند تانن‌ها، ساپونین‌ها، استروئیدها و آلکالوئیدها نسبت داده شد. همچنین، در مطالعه Mazaheri و همکاران (۲۰۱۴) مشخص شد که عصاره الکلی ۵٪ گیاه خولنجان به صورت خوراکی در دو تیمار ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در روز به مدت ۵۶ روز باعث افزایش میزان تستوسترون خون، افزایش حیات و حرکت اسپرم موش‌های آزمایشگاهی شد که به دلیل وجود ترکیبات شیمیایی خولنجان نسبت داده شد که باعث افزایش بیان ژن اسپرماتوژنز شده است. در مطالعه حاضر، افزایش میزان تستوسترون و درصد نرسازی در اثر تغذیه با جیره غنی شده با گیاه خولنجان، با نتایج پژوهش‌های قبلی درباره استفاده از عصاره‌های شیمیایی گیاهی مطابقت دارد.

Mukherjee و همکاران (۲۰۱۵) تأثیر باقلای مخملی (*Mucuna pruriens*) بر نرسازی ماهی تیلاپیا را گزارش کردند که یک ماه تغذیه با پودر باقلای مخملی به میزان ۵ گرم در کیلوگرم غذا موجب ۷۳/۳۳٪ نرسازی ماهیان شد. غوطه‌وری نوزادان با عصاره آبی دانه گیاه باقلای مخملی برای یک ماه با غلظت ۰/۰۵ گرم در لیتر باعث ۷۴/۶۷٪ نرسازی ماهیان شد. Ghosal و همکاران (۲۰۱۷) در بررسی تأثیر دانه خارخاسک (*Tribulus terrestris*) و برگ اسفناج رونده (*Basella alba*) در نرسازی ماهی تیلاپیا دریافتند که در تیمار ۱۵ گرم پودر برگ اسفناج در کیلوگرم غذا، ۷۶/۶٪ از ماهیان نر شدند و در تیمار غوطه‌وری نوزادان در عصاره آبی خارخاسک با دوز ۰/۱۵ گرم در لیتر، ۸۱/۴٪ ماهیان نر شدند. در مطالعه Gabriel و همکاران (۲۰۱۷) تأثیر افزودن گیاه آلوئه‌ورا (*Aloe vera*) در جیره غذایی نوزاد ماهی تیلاپیا بررسی شد و مشخص شـد که جیـره حاوی ۴٪ گیاه آلوئه‌ورا به مدت ۳۰ روز موجب افزایش نرسازی به میزان ۶۷/۶۲٪ شد که بیشتر از تیمار شاهد بدون افزودنی و دیگر تیمارها (۰/۵، ۱ و ۲٪) بود. Ghosal و Chakraborty (۲۰۱۷) در مطالعه بر روی تأثیر عصاره اتانولی دانه گیاه خارخاسک (*Tribulus terrestris*) با دوزهای صفر، ۲، ۲/۵ و ۳ گرم در کیلوگرم غذا در تغییر جنسیت نوزاد ماهی تیلاپیا نشان دادند که غذادهی با عصاره اتانولی دانه گیاه خارخاسک با دوز ۲ گرم در کیلوگرم غذا موجب نرسازی ۹۱/۵۳٪ بچه‌ماهیان شد. استفاده از ترکیبات شیمیایی گیاهی مختلف ذکر شده در نرسازی ماهیان می‌تواند به علت فعالیت آنـدروژنیک عصاره‌های گیاهی و به دلیل وجود موادی مانند تانن‌ها، ساپونین‌ها، استروئیدها و آلکالوئیدها نسبت داده شود، همچنان که در مطالعه حاضر استفاده از عصاره خولنجان به سبب ترکیبات فنولیکی و شیمیایی گیاهی سبب افزایش مقادیر تستوسترون و نرشدگی در نوزاد ماهیان تیلاپیا نیل شد.

Zaki و همکاران (۲۰۱۶) در مطالعه بررسی تأثیر افزودن پودر خولنجان به عنوان مکمل تغذیه در بچه ماهیان تیلاپیا به میزان صفر، ۰/۵، ۱ و ۲٪ به جیره غذایی رابطه مستقیمی بین میزان پودر خولنجان در غذا و افزایش وزن بدن و نرخ رشد ویژه بچه ماهیان مشاهده کردند. نتایج مطالعات Shalaby (۲۰۰۴)، El-Dakar و همکاران (۲۰۰۸) و Ahmad و همکاران (۲۰۰۹) بر روی ماهی تیلاپیای نیل درباره استفاده از عصاره‌های شیمیایی گیاهی نشان داد که با افزایش آن‌ها، میزان افزایش وزن و نرخ رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی افزایش داشته است. نتایج مطالعه حاضر با نتایج پیش‌اشاره همخوانی دارد و تسریع عملکرد رشد بچه ماهیان تیلاپیای نیل تیمار شده از طریق گیاه خولنجان در جیره غذایی در مطالعه حاضر ممکن است با افزایش سطح تستوسترون تفسیر شود (Asad et al. 2010). افزایش در سطح تستوسترون و وزن نهایی بدن بچه ماهیان تیلاپیای نیل مشاهده می‌شود و این مکانیسم ممکن است به دلیل وجود گیرنده تستوسترون در یاخته‌های سراسر بدن، به خصوص در اندام‌های حیاتی باشد (Seal, 2009). با وجود این، تستوسترون یکی از هورمون‌های اصلی است که دارای خواص حفظ نیتروژن، افزایش سنتز پروتئین، افزایش توده بدون چربی بدن و وزن بدن و افزایش قدرت عضلات اسکلتی است (Gauthaman et al. 2002; Mauras et al. 2003).

از نقطه نظر استفاده از مواد مغذی، نتایج به‌دست‌آمده به وضوح نشان داد که عصاره خولنجان اثرات قابل‌توجهی بر کاهش ضریب تبدیل غذایی و افزایش وزن دارد. همچنین Gültepe و همکاران (۲۰۱۴) دریافتند که تستوسترون به طور قابل توجهی مصرف خوراک ماهی تیلاپیای نیل را بهبود می‌بخشد. اثر تستوسترون ممکن است به دلیل کاهش آسیب‌های بافت پوششی روده باشد (Şahin and Duru, 2010). همچنین، Attia و همکاران (۲۰۱۱) دریافتند که مصرف خوراک و FCR به طور قابل توجهی با تجویز گرده زنبور عسل (حاوی مقادیر بالایی از تستوسترون) بهبود یافته است. علاوه بر این، Abbass و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که گرده زنبور عسل جیره به طور قابل توجهی ضریب تبدیل غذایی در ماهی تیلاپیای نیل را بهبود می‌بخشد.

Hayati و همکاران (۲۰۲۳) در مطالعه‌ای بر روی تأثیر افزودن خولنجان در سطوح صفر، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا در تغذیه بچه ماهی تیلاپیا در معرض آلودگی میکروپلاستیک دریافتند که رشد بچه ماهی تیلاپیا در تیمار خولنجان نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشت که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. مواد شیمیایی گیاهی نقش مهمی در مهار استقرار باکتری‌های بیماری‌زای دستگاه گوارش، افزایش جمعیت ریزموجودات مفید، افزایش فعالیت آنزیم‌های میکروبی و در نتیجه بهبود قابلیت هضم خوراک و جذب مواد مغذی ایفا می‌کنند (Hu et al. 2003). بنابراین، این مواد شیمیایی گیاهی ممکن است برای بهینه‌سازی مصرف پروتئین و انرژی برای رشد تیلاپیا و افزایش استفاده از رژیم غذایی و قابلیت هضم هم مفید باشد و به صورت افزایش مشاهده می‌شود (Rasmussen and Jokumsen, 2009) که در این مطالعه نیز مشاهده شد.

نتیجه‌گیری کلی

هر چند که مطالعاتی درباره تأثیر عصاره‌های گیاهی مختلف بر تمایز جنسی ماهیان انجام شده است، اما در این تحقیق برای اولین بار از عصاره اتانولی ریزوم گیاه خولنجان برای نرسازی بچه ماهیان تیلاپیا استفاده شده و تأثیر عصاره اتانولی ریزوم گیاه خولنجان و داروی لتروزول بر نرسازی بچه ماهیان تیلاپیا بررسی و مقایسه شد. لازم به ذکر است که با توجه به اهمیت تولید تیلاپیای تک‌جنس و مخاطرات مربوط به استفاده از هورمون‌ها و مواد صناعی در آبزی‌پروری، با توجه به پاسخ مثبت عصاره اتانولی ریزوم خولنجان با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در ایجاد جنسی نر در بچه ماهیان تیلاپیا در حدود ۹۲٪ و برتری معنی‌دار در شاخص‌های وزن، نرخ رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی و شاخص گنادوسوماتیک نسبت به تیمار لتروزول می‌توان از آن برای تولید ماهیان تک‌جنس نر تیلاپیای نیل در مراکز تکثیر و پرورش استفاده کرد. به علاوه، ممکن است با کاربرد دوز بیشتر از ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره خولنجان که در تحقیق حاضر موجود نبود، به درصد بیشتری از جمعیت نر دست یافت که نیاز به مطالعاتی در آینده دارد.

منابع

Abbas, F.A., Ateya, A.M. 2011. Estradiol, esteriol, estrone and novel flavonoids from date palm pollen. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 5: 606-614.

Abbass, A.A., El-Asely, A.M., Kandiel, M.M. 2012. Effects of dietary propolis and pollen on growth performance, fecundity and some hematological parameters of *Oreochromis niloticus*. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 12: 851-859. doi: 10.4194/1303-2712-v12_4_13.

Abubakar, I.B., Malami, I., Yahaya, Y., Sule, S.M. 2018. A review on the ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology of *Alpinia officinarum* Hance. Journal of Ethnopharmacology 224: 45-62. doi: 10.1016/j.jep.2018.05.027.

Afonso, L.O.B., Wassermann, G.J., Terezinha de Oliveira, R. 2001. Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using a nonsteroidal aromatase inhibitor. Journal of Experimental Zoology 290: 177-181. doi: 10.1002/jez.1047

Ahmad, M.H., El-Gamal, R.M., Hazaa, M.M., Hassan, S.M., El Araby, D.A. 2009. The use of *Origanium vulgare* extract in practical diets as a growth and immunity promoter for Nile tilapia,

Oreochromıs niloticus fingerling challenged with pathogenic. The Egyptian Journal of Experimental Biology (Zoology) 5: 457-463. doi: 10.13140/2.1.5162.3046.

Akbar, S. 2020. *Alpinia officinarum* Hance (Zingiberaceae). In: Handbook of 200 Medicinal Plants. Springer, Cham, 217-224.

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 15th ed, Washington, USA.

Asad, F., Ahmed, I., Saleem, M., Iqbal, T. 2010. Hormonal masculinization and growth performance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by androgen administration at different dietary protein levels. International Journal of Agriculture and Biology 12: 939-943.

Attia, Y.A., Al-Hanoun, A., Bovera, F. 2011. Effect of different levels of bee pollen on performance and blood profile of New Zealand White bucks and growth performance of their offspring during summer and winter months. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 95: 17-26. doi: 10.1111/j.1439-0396.2009.00967.x.

Balam, F.H., Ahmadi, Z.S., Ghorbani, A. 2020. Inhibitory effect of chrysin on estrogen biosynthesis by suppression of enzyme aromatase (CYP19): A systematic review. Heliyon 6: e03557. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03557.

Balunas, M.J., Su, B., Brueggemeier, R.W., Kinghorn, A.D. 2008. Natural products as aromatase inhibitors. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents) 8: 646-682.

Basri, A.M., Taha, H., Ahmad, N. 2017. A review on the pharmacological activities and phytochemicals of *Alpinia officinarum* (Galangal) extracts derived from bioassay-guided fractionation and isolation. Pharmacognosy reviews 11: 1-43. doi: 10.4103/phrev.phrev_55_16.

Bitaraf, A., Sarsangi Aliabadi, H., Mohammadi, M., Hoseinzadeh, H., Alizadeh, M. 2011. The final report of the study of the production methods of single male Nile tilapia in the conditions of Bafaq's brackish water. Iranian Fisheries Science Research Institute.

Budd, A., Banh, Q., Domingos, J., Jerry, D. 2015. Sex control in fish: approaches, challenges and opportunities for aquaculture. Journal of Marine Science and Engineering 3: 329-355. doi: 0.3390/jmse3020329

Bulfon, C., Volpatti, D., Galeotti, M. 2013. Current research on the use of plant derived products in farmed fish. Aquaculture Research. 46: 513-551. doi: 10.1111/are. 12238.

Desprez, D., Géraz, E., Hoareau, M.C., Mélard, C., Bosc, P., Baroiller, J.F. 2003. Production of a high percentage of male offspring with a natural androgen, 11β-hydroxyandrostenedione (11βOHA4), in Florida red tilapia. Aquaculture 216: 55-65. doi: 10.1016/S0044-8486(02)00276-4

El-Dakar, A., Hassanien, G., Gad, S., Sakr, S. 2008. Use of dried basil leaves as a feeding attractant for hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*, fingerlings. Mediterranean Aquaculture Journal 1: 35-44. doi: 0.21608/maj.2008.2662.

El-Sayed, A.F.M., Abdel-Aziz, E.S.H., Abdel-Ghani, H.M. 2012. Effects of phytoestrogens on sex reversal of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) larvae fed diets treated with 17α-Methyltestosterone. Aquaculture 360: 58-63. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.07.010.

El-Sayed, A.M., 2006. Tilapia culture. CABI Pub, 277 p.

Etemdi, M., Sadeghi, A., Hoseini S.M. 2017. An overview of the most important methods of extracting medicinal plants. 4th Separation Science and Engineering Conference, Iran.

Fortes, R.D. 2005. Review of techniques and practices in controlling tilapia populations and identification of methods that may have practical applications in Nauru including a national tilapia plan. Aquaculture

Technical Paper/Secretariat of the Pacific Community, 55.

Fuentes-Silva, C., Soto-Zarazúa, G.M., Torres-Pacheco, I., Flores-Rangel, A. 2013. Male tilapia production techniques: a mini-review. African Journal of Biotechnology 12: 5496-5502.

Gabriel, N.N. 2019. Review on the progress in the role of herbal extracts in tilapia culture. Cogent Food and Agriculture 5: e1619651. doi: 10.1080/23311932.2019.1619651.

Gabriel, N.N., Qiang, J., Kpundeh, M.D., Xu, P. 2015. Use of herbal extracts for controlling reproduction in tilapia culture: Trends and Prospects-a Review. The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh 67: 1-29. doi: 10.46989/001c.20705

Gabriel, N.N., Qiang, J., Ma, X.Y., He, J., Xu, P., Omoregie, E. 2017. Sex-reversal effect of dietary *Aloe vera* (Liliaceae) on genetically improved farmed Nile tilapia fry. North American journal of aquaculture 79: 100-105. doi: 10.1080/15222055.2016.1236046.

Gauthaman, K., Adaikan, P.G., Prasad, R.N.V. 2002. Aphrodisiac properties of *Tribulus terrestris* extract (Protodioscin) in normal and castrated rats. Life Sciences 71: 1385-1396. doi: 10.1016/s0024-3205(02)01858-1.

Ghorbani Ranjbari, A., Ghorbani Ranjbari, N., Ghorbani Ranjbari, Z., Joybar, F. 2014. The effect of intraperitoneal injection of hydroalcoholic extract of mountain thyme (*Origanum vulgare*) on sex hormones in male Wistar rats. Scientific Journal of Babol University of Medical Sciences. 16: 57-63.

Ghosal, I., Chakraborty, S.B. 2014. Effects of the aqueous leaf extract of *Basella alba* on sex reversal of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences 9: 162-164.

Ghosal, I., Chakraborty, S.B. 2017. Production of monosex all-male Nile tilapia using ethanol extract of *Tribulus terrestris* seeds. In: Proceedings of the Zoological Society, 1-4. doi: 10.1007/s12595-017-0254-7.

Ghosal, I., Mukherjee, D., Hancz, C., Bhusan, S. 2016. Production of monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* by dietary and immersion treatment with *Basella alba* leaves and *Tribulus terrestris* seeds. International Journal of Fisheries and Aquatic Studies 4: 358-363.

Guerrero III, R.D., Shelton, W.L. 1974. An aceto-carmine squash method for sexing juvenile fishes. The Progressive Fish-Culturist 36: 56-56. doi: 10.1577/1548-8659(1974)36[56:AASMFS]2.0.CO;2

Gültepe, N., Acar, Ü., Kesbiç, O.S., Yılmaz, S., Yıldırım, Ö., Türker, A. 2014. Effects of dietary *Tribulus terrestris* extract supplementation on growth, feed utilization, hematological, immunological and bio-chemical variables of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. The Israeli Journal of Aquaculture- Bamidgeh 66: 124-1036.

Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Kim, M.C., Kim, J.S., Han, Y.J., Heo, M.S. 2009. Innate immune response and disease resistance in *Carassius auratus* by triherbal solvent extracts. Fish and Shellfish Immunology 27: 508-515. doi: 10.1016/j.fsi.2009.07.004.

Hayati, A., Pramudya, M., Soepriandono, H., Maullani, A., Puspitasari, Y., Maulidah, S., Dewi, F.R.P. 2023. Effects of medicinal plants rhizome on growth performance of tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to micro plastics. In: AIP Conference Proceedings, Vol. 2554, AIP Publishing. doi: 10.1063/5.0105225.

Hoga, C.A., Almeida, F.L., Reyes, F.G. 2018. A review on the use of hormones in fish farming: Analytical methods to determine their residues. CyTA-Journal of Food 16: 679-691. doi: 10.1080/19476337.2018.1475423.

Hu, S., Concha, C., Lin, F., Waller, K.P. 2003. Adjuvant effect of ginseng extract on the immune responses to immunization against *Staphylococcus aureus* in dairy cattle. Veterinary Immunology and Immunopathology 91:

29-37. doi: 10.1016/s0165-2427(02)00264-7

Kolangi, F., Shafi, H., Memariani, Z., Kamalinejad, M., Bioos, S., Jorsaraei, S.G.A., Mozaffarpur, S.A. 2019. Effect of *Alpinia officinarum* Hance rhizome extract on spermatogram factors in men with idiopathic infertility: A prospective double-blinded randomized clinical trial. Andrologia 51: e13172. doi: 10.1111/and.13172.

Mauras, N., Rini, A., Welch, S., Sager, B., Murphy, S.P. 2003. Synergistic effects of testosterone and growth hormone on protein metabolism and body composition in prepubertal boys. Metabolism 52: 964-969. doi: 10.1016/s0026-0495(03)00163-x.

Mazaheri, M., Shahdadi, V., Boron, A.N. 2014. Molecular and biochemical effect of alcoholic extract of *Alpinia galanga* on rat spermatogenesis process. Iranian Journal of Reproductive Medicine 12: 76-81.

Mohiuudin, E., Akram, M., Akhtar, N., Asif, H.M., Shah, P.A., Saeed, T., Malik, N.S. 2011. Medicinal potentials of *Alpinia galanga*. Journal of Medicinal Plants Research 5: 6578-6580. doi: 10.5897/JMPR11.525.

Mukherjee, D., Ghosal, I., Chakraborty, S.B. 2015. Production of monosex Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* using seed of *Mucuna pruriens*. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences 10: 55-59.

Mukherjee, D., Ghosal, I., Hancz, C., Chakraborty, S.B. 2018. Dietary administration of plant extracts for production of monosex tilapia: Searching a suitable alternative to synthetic steroids in tilapia culture. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 18: 267-275.

Nouri, M.Z., Kroll, K.J., Webb, M., Denslow, N.D. 2020. Quantification of steroid hormones in low volume plasma and tissue homogenates of fish using LC-MS/MS. General and Comparative Endocrinology 296: 113543. doi: 10.1016/j.ygcen.2020.113543.

Rasmussen, R.S., Jokumsen, A. 2009. Digestibility in selected rainbow trout families and relation to growth and feed utilization. Aquaculture International 17: 187-197. doi: 10.1007/s10499-008-9191-9.

Roosta, Z., Falahatkar, B., Sajjadi, M.M., Paknejad, H., Kesthmont, P. 2020. Comparison of some biochemical parameters in blood plasma and skin mucus of female redfish (*Carassius auratus*) in different stages of sexual maturity. Animal Research Journal (Iranian Biology). 33: 160-171.

Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulant. Aquaculture 172: 63-92. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00436-0.

Samam Shariat, H. 2007. Extraction and extraction of effective substances of medicinal plants and their identification and evaluation methods. Mani Publications, 258 p.

Seal, L.J. 2009. Testosterone replacement therapy. Medicine 37: 445-449.

Seydi, J. 2017. Comparison of the effect of letrozole and raloxifene on the sex change rate of guppy fish (*Poecilia reticuata*). Master's thesis. Faculty of Natural Resources, University of Kurdistan.

Shalaby, S.M. 2004. Response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerling to diets supplemented with different levels of fenugreek seeds (Hulba). Journal of Animal and Poultry Production 29: 2231-2242. doi: 10.21608/jappmu.2004.239150.

Shen, Z.G., Fan, Q.X., Yang, W., Zhang, Y.L., Hu, P.P., Xie, C.X. 2013. Effects of nonsteroidal aromatase inhibitor letrozole on sex inversion and spermatogenesis in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. The Biological Bulletin 225: 18-23. doi: 10.1086/bblv225n1p18.

Statistical Yearbook of Iranian Fisheries Organization. 2021. Deputy Planning and Resource Management of Iran Fisheries Organization, Iran Fisheries Publications, 29 p.

Syahidah, A., Saad, C.R., Daud, H.M., Abdelhadi, Y.M. 2015. Status and potential of herbal applications in aquaculture: A review. Iranian Journal of Fisheries Sciences 14: 27-44.

Şahin, A., Duru, M. 2010. Effects of *Tribulus terrestris* (Puncture Vine) supplementation on performance and digestive system of broiler chicks. Journal of Agricultural Science 16: 271-277. doi: 10.1501/Tarimbil_0000001147.

Tan, Y.F., Li, H.L., Li, Y.B., Li, Y.H., Lai, W.Y., Wang, Y. 2015. Identification of chemical constituents occurring in leaves of *Alpinia officinarum*. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae 3: 37-40. doi: 10.1155%2F2021%2F5592518.

Todoei, M., Rozbahani, Sh., Noori, A., Azadbakht, S., Karimifar, H. 2021. Effect of safflower plant aqueous extract on physiological sex determination in guppy fish, Journal of Marine Science and Technology 20: 16-25.

Zaki, M.A., Ibrahim, M.A., Khalafalla, M.M., Mocuta, D., Rahoveanu, A.T., Rahoveanu, M.M.T., Hassan, A.A. 2016. Physiological and nutritional studies on improving growth of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings using Alpinia meal (*Alpinia Galanga*) as a feed additive. Agriculture and Agricultural Science Procedia 10: 604-614. doi: 10.1016/j.aaspro.2016.09.043.