مجله علوم وفنون دریایی، فصل نامه ی علمی پژوهشی
دوره ۲۰، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۰، صفحات ۱۶ تا ۲۵

مقاله پژوهشی

Available Online: *http://jmst.kmsu.ac.ir*

# تأثیر عصاره آبی گیاه گلرنگ بر تعیین جنسیت فیزیولوژیک در ماهی گوپی

مژگان تودویی [۱*]، شهلا روزبهانی [۲]، علی نوری [۲]، سمیه آزادبخت [۲]، حدیث کریمی فر [۲]

۱. باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاداسلامی، اصفهان، ایران.
۲. گروه آموزشی زیست شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاداسلامی، اصفهان، ایران.

نویسنده مسئول، پست الکترونیک: mozhgantoodooei@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۵/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۲/۳۰

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22113/jmst.2016.9573

## چکیده

گلرنگ (Safflower) با نام علمی *Carthamus tinctorius* متعلق به خانواده Compositae بوده و در صنایع غذایی و طب سنتی استفاده گسترده‌ای دارد. هدف از انجام این بررسی تأثیر عصاره آبی گیاه گلرنگ بر تعیین جنسیت فیزیولوژیک و تأثیر آن بر ایجاد جنس نر در ماهی گوپی (Guppy) با نام علمی (*Poecilia reticulata*) می‌باشد. ۸۸ ماهی گوپی درسن یک هفتگی، درچهار گروه ۲۲ تایی A، B، C و شاهد (بدون دریافت عصاره) تقسیم شده و غلظت‌های ppm ۱۵۰ و۱۰۰ و ۵۰ از عصاره آبی گلرنگ را به مدت یک ماه به همراه غذا دریافت کردند. پس از گذشت سه ماه از گنادهای ماهیان مقاطع بافتی تهیه شد و تغییرات بافتی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت و با گروه شاهد که هیچ عصاره‌ای دریافت نکرده بودند، مقایسه گردید. نتایج تیمار با عصاره گیاه گلرنگ اختلاف معنی‌داری را در تمامی گروه‌ها در تعداد اسپرماتوسیت های اولیه نشان داد؛ به طوری که بیشترین افزایش سلول‌ها درماهیان دریافت‌کننده غلظت‌های ppm۱۰۰و ۱۵۰ عصاره بود( $p <$ ۰/۰۵). نتایج همچنین نشان داد؛ با افزایش غلظت، تعداد فولیکول‌های ماده به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد( $p <$ ۰/۰۵). نتایج این مطالعه نشان داد؛ گلرنگ موجب افزایش اسپرماتوژنز شده و با ایجاد تغییرات بافتی می‌تواند جنسیت ماهی گوپی را در جهت نرسازی القاء کند.

**واژگان کلیدی:** تعیین جنسیت، فولیکول، *Carthamus tinctorius*، گوپی( *Poecilia reticulata*) ، نرسازی

**Copyrights:**

Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted Journal of Marine Science and Technology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons. org/licenses/ by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## ۱. مقدمه

در بسیاری از ماهی‌ها جنس نر و ماده از نظر رشد، شکل، رنگ، رفتار و زمان بلوغ با هم تفاوت دارند. در ماهی‌های زینتی از جمله گوپی (*Poecilia reticulata*) این حالت دیده می‌شود، به طوری‌که جنس نر رنگین‌تر و درخشنده‌تر و دارای باله‌های بلندتر نسبت به جنس ماده است. این در حالی است که هزینه‌های تولید آنها یکسان است و از طرف دیگر میزان تقاضا برای ماهی نر در بازار بیشتر از ماهی ماده است. مجموعه این عوامل باعث شده که تغییر جنسیت (نرسازی) در این ماهی‌ها مورد توجه بسیار زیادی قرار گیرد (Piferrer and Lim, 1997; Kavumpurath and Pandian, 1994; George and Pandian, 1995; George and Pandian, 1996).

ماهی گوپی نه تنها گونه اقتصادی مهمی است؛ بلکه به دلیل تنوع رنگ و همچنین سادگی تکثیر و پرورش از نظر مطالعات مختلف ژنتیکی وفیزیولوژیکی دارای ارزش زیادی است و به عنوان ماهی آزمایشگاهی کاربرد وسیعی دارد. این ماهی متعلق به ماهی های زنده‌زا است و مراحل رشد و نمو جنین در داخل بدن ماهی ماده سپری می‌شود؛ به همین دلیل محدودیت‌هایی در تغییر جنسیت آن وجود دارد و روش‌های تغییر جنسیت ژنتیکی و دستکارهای کروموزومی که نیاز به تیمار اسپرم یا تخمک دارد، در مورد این ماهی قابل اجرا نیست. زیرا لقاح به صورت داخلی انجام می‌شود و تخم داخل بدن ماهی ماده باقی می‌ماند(Azari Tkami et al., 2001). از این رو تنها روش قابل اجرا در این ماهی تغییر جنسیت هورمونی است که می‌تواند به صورت مستقیم یا غیر مستقیم انجام شود. در روش مستقیم جنین یا نوزاد تحت تیمار هورمونی قرار می‌گیرد ولی در روش غیرمستقیم ابتدا ابر-نرهایی با ژنوتیپ YY تولید شده و از آمیزش این ماهی‌ها با ماده‌های طبیعی (XX) ماهی‌های تمام نر تولید می‌شود. برخی از محققین اظهار نموده‌اند که با تجویز هورمون چه در دوره جنینی و چه بعد از آن (دوره نوزادی) می‌توان در این ماهی جنس تمام نر ایجاد نمود(Piferrer, 2001).

گیاه *Carthamus tinctorius* با نام فارسی گلرنگ (Safflower) متعلق به خانواده Compositae است( Bahmanpour, 2003). این گیاه یک‌ساله یا دوساله، علفی، بدون کرک به رنگ سبز روشن یا مات و متمایل به آبی، ایستاده به ارتفاع ۴۰ تا ۷۰ سانتی متر، تیغ‌دار و رنگده می‌باشد. گل‌های این گیاه زرد یا زرد نارنجی، برگ آن تخم-مرغی و سر نیزه ای است (Amin, 1992; Zargar, 1990). روغن گلرنگ غنی از اسیدهای چرب غیراشباع، لینولئیک ۶۰/۱-۴۱٪، اولئیک اسید ۷/۴۴-۵/۲۴ ٪، پالمیک اسید ۰/۱۶-۳/ ٪ است(Li and Mündel, 1996) گلرنگ در طی سالیان متمادی در طب چینی در درمان بیماری قلبی عروقی استفاده شده است و اثرات درمانی ضد ایسکمی میوکاردیال آن به اثبات رسیده است. اثرات فارماکولوژیک دیگر شامل ضد لخته‌شدگی، آنتی اکسیدانت و محافظ عصبی است (Mandade et al., 2011).

از خواص دیگر گلرنگ استفاده در درمان عقیمی مردان و بیماری زیادی اسپرم مرده بوده است( Qin, 1990; Qu, 1990). همچنین عصاره الکلی آن با اثر بر محور هورمونی هیپوفیز-گناد در موش سبب افزایش غلظت تستوسترون در سرم می‌گردد(Modaresi, 2005).

هدف از این تحقیق بررسی تأثیر عصاره آبی گیاه گلرنگ بر تعیین جنسیت فیزیولوژیک(میزان نرزایی) یا تأثیر آن بر ایجاد جنس نر(Masculinization) در ماهی گوپی است. با توجه به اهمیت اقتصادی تعداد جنس نر در صنایع تکثیر و پرورش این نوع ماهی، دستیابی به روشی علمی وکم هزینه درراستای تحقق این امر ضروری به نظر می‌رسد.

## ۲. مواد و روش ها

گیاه گلرنگ از مزارع بین کوهپایه و ورزنه واقع در شرق استان اصفهان در مهرماه ۱۳۹۱ جمع آوری شد. پس از تعیین و تأیید رده بندی آن توسط هرباریوم دانشگاه آزاداسلامی واحد فلاورجان، گل‌های آن‌ها را جداسازی شده و در سایه خشک گردید.

گل‌های خشک شده گیاه گلرنگ به منظور تهیه عصاره، آسیاب گردید. سپس، عصاره به صورت وزنی-حجمی به نسبت ۱به۱۰ تهیه شد. بدین منظور به ۱۵ گرم گیاه خشک شده cc ۱۵۰ آب مقطر اضافه شد، سپس مخلوط به مدت ۴۸ ساعت درون فور با دمای ۵۵ درجه قرارگرفت. پس از این مدت، مخلوط از صافی رد شد و عصاره بدست آمده درون پتری دیش تقسیم گردید. پتری‌دیش‌ها در مجاورت پنکه قرار داده شدند تا خشک شوند(Azimi et al., 2006). میزان غلظت عصاره مصرفی به صورت ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ppm در هر ۱ گرم غذا بود. به این شکل که به‌ترتیب

محلول‌ها در ۳ گروه A و B و C تقسیم شدند. سپس، به میزان یک گرم غذا به هر گروه اضافه و جلوی پنکه قرار داده شد تا ضمن خشک شدن؛ عصاره جذب غذا گردد. غذا به صورت هفتگی تهیه شد و وزن کل هر گروه از ماهیان در ابتدای هر هفته محاسبه و ۳ درصد وزن کل به عنوان وزن غذای موردنیاز در نظر گرفته شد( Cheleh Maal Dezful Nezhad, 2012). نوع غذای مورد استفاده برای ماهیان، بیومار فرانسه در سایز ۰/۴ میلی‌متر بود که حاوی میزان ۰/۶۳ پروتئین، ۰/۱۱ چربی خام، ۰/۰۳ فیبر خام (سلولز) و ۰/۱۲ رطوبت بود.

پس از تهیه ماهیان مولد پکینگ شده از شهرستان الیگودرز، پس از هم دما کردن با محیط، به درون آب اکواریوم‌هایی با شرایط مناسب رها شدند. ماهیان باردار حدوداً پس ازدو هفته شروع به بچه‌ریزی کردند. بچه ماهیان تازه متولد شده به ۴ گروه ۲۲ تایی(به‌صورت یک گروه شاهد و سه گروه تیمار) تقسیم و به درون اکواریوم‌هایی به ابعاد ۳۰×۲۰ cm و ارتفاع ۲۰ cm انتقال داده شدند. در هر آکواریوم دماسنج، سنگ هوا و بخاری آکواریوم(برای ثابت نگه داشتن دما در محدوده ۲۸-۲۶ درجه سانتیگراد) قرار گرفت. همچنین میزان روشنایی در طی شبانه‌روز ثابت نگه داشته شد. جهت حفظ کیفیت آب، هر دو روز یک‌مرتبه کف آکواریوم از مواد زائد تمیز شده و به میزان یک سوم حجم آب تعویض شد. پس از یک هفته که بچه ماهیان با محیط سازگار شدند، عصاره تهیه شده با غذا مخلوط شد و به مدت ۳۰ روز به گروه‌های مورد آزمایش ارائه شد. پس از ۳ ماهه شدن ماهیان، ماهیان نر و ماده براساس خصوصیات ظاهری‌شان تشخیص و شمارش شدند. سپس برش‌گیری انجام شد و پارامترهای مورد نظر مورد سنجش و بررسی قرار گرفت.

جهت تهیه مقاطع بافتی، هریک از بافت‌های بیضه و تخمدان از بدن ماهیان خارج شد و درون فرمالین ۴٪ قرار داده شد و پس از مراحل آماده‌سازی و انجام برش‌گیری، مقاطع بافتی با رنگ هماتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی شدند.

بافت‌ها (بیضه و تخمدان) پس از خارج کردن از بدن ماهی به مدت ۱۶ ساعت درون دستگاه Tissue processor قرار داده شدند. این دستگاه شامل ۱۲ ظرف است که به‌ترتیب شامل ۲ ظرف حاوی فرمالین، ۵ ظرف الکل با غلظت‌هایی به ترتیب ۷۵ و ۸۵ و ۹۰ و ۱۰۰ درصد، سپس ۳ ظرف گزیلول خالص و دو ظرف پارافین است. از فرمالین به منظور فیکس کردن بافت، الکل‌ها جهت آبگیری بافت، گزیلول به منظور شفاف کردن و حذف چربی اضافه بافت و از پارافین نیز برای نرم کردن بافت استفاده می‌شود. بافت‌ها پس از گذشت این مدت زمان از دستگاه خارج و در فور ۹۰ درجه قرار گرفت تا پارافین کاملاً ذوب شود. سپس، بلوک تهیه شده توسط میکروتوم با ضخامت ۴ تا ۷ میکرون برش داده شد و پس از ان رنگ آمیزی انجام شد.

شمارش فولیکول‌ها با استفاده از نرم‌افزار فتوشاپ و در سطح مشخص (مساحت میدان مورد شمارش توسط خط-کش این نرم‌افزار تعیین می‌شود) در چند نقطه از بافت که بطور تصادفی انتخاب شد، انجام و میانگین تعداد سلول‌ها در هر برش مشخص گردید.

## ۳. نتایج

درصد نر و ماده شدن ماهیان در جدول ۱ نشان داده شده است. طبق نتایج به‌دست آمده مشخص شد؛ گیاه گلرنگ جنسیت نر را در هر سه غلظت مورد استفاده، نسبت به گروه شاهد افزایش داده است. به گونه‌ای که در گروه‌هایی با غلظت ppm ۵۰ ، ۱۰۰، ۱۵۰، بیشترین ماهی‌ها نر و در گروه شاهد (غلظت صفر) بیشترین ماهی‌ها ماده هستند.

یافته‌های جدول ۲ با توجه به سطح معنی داری $p<۰/۰۵$ نشان می‌دهد؛ میزان غلظت محیط تاثیر معنی‌داری بر نر شدن ماهیان ندارد.

نتایج به دست آمده از شمارش تعداد سلول‌های جنسی نر (اسپرماتوسیت های اولیه) در مقاطع بافتی بیضه ماهیان (به صورت مقطع عرضی)، نشان می‌دهد که گروه B و C تحت تیمار با غلظت ppm ۱۰۰ و۱۵۰ در مقایسه با گروه شاهد دارای تفاوت معنی‌دار بوده و در این گروه تعداد سلول‌های جنسی نسبت به گروه شاهد افزایش یافته است (شکل ۱). همچنین نتایج آزمون دانکن نشان می‌دهد؛ بین گروه‌های شاهد و غلظت ppm ۵۰ (گروهA) با گروه-های B و C تفاوت معنی‌دار وجود دارد($p=۰/۰۲$).

نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد؛ بیشترین میانگین سلول‌های جنسی با ۳۱۱/۳۵ ±۲۲۳۰/۵۰ مربوط به غلظت ppm۱۰۰و کمترین میانگین با ۳۰۰/۸۸ ±۱۹۴۴/۷۰ مربوط به غلظت ppm۵۰ است. با توجه به سطح معنی-داری $p<۰/۰۵$، میزان غلظت محیط تاثیر معنی‌داری بر سلول های جنسی دارد.

جدول ۱. توزیع فراوانی گروه نمونه برحسب تعداد نر و ماده بودن

| شاخص های آماری غلظت | نر | | ماده | |
|---|---|---|---|---|
| | فراوانی | درصد فراوانی | فراوانی | درصد فراوانی |
| **۵۰ ppm** | ۱۲ | ۵۴/۵ | ۱۰ | ۴۵/۵ |
| **۱۰۰ ppm** | ۱۵ | ۶۸/۲ | ۷ | ۳۱/۸ |
| **۱۵۰ ppm** | ۱۳ | ۵۹/۱ | ۹ | ۴۰/۹ |
| **۰ppm (شاهد)** | ۱۰ | ۴۵/۵ | ۱۲ | ۵۴/۵ |

جدول ۲. مقایسه میانگین تاثیر غلظت بر نر شدن ماهیان

| شاخص آماری متغیرها | غلظت (ppm) | میانگین | انحراف معیار | F | p |
|---|---|---|---|---|---|
| **نر شدن ماهیان** | ۵۰ | ۱/۴۵ | ۰/۵۱ | ۰/۸۷۱ | ۰/۴۶۰ |
| | ۱۰۰ | ۱/۳۰ | ۰/۴۷ | | |
| | ۱۵۰ | ۱/۴۰ | ۰/۵۰ | | |
| | ۰ | ۱/۵۵ | ۰/۵۱ | | |

جدول۳. مقایسه میانگین تاثیر غلظت بر سلول های جنسی نر

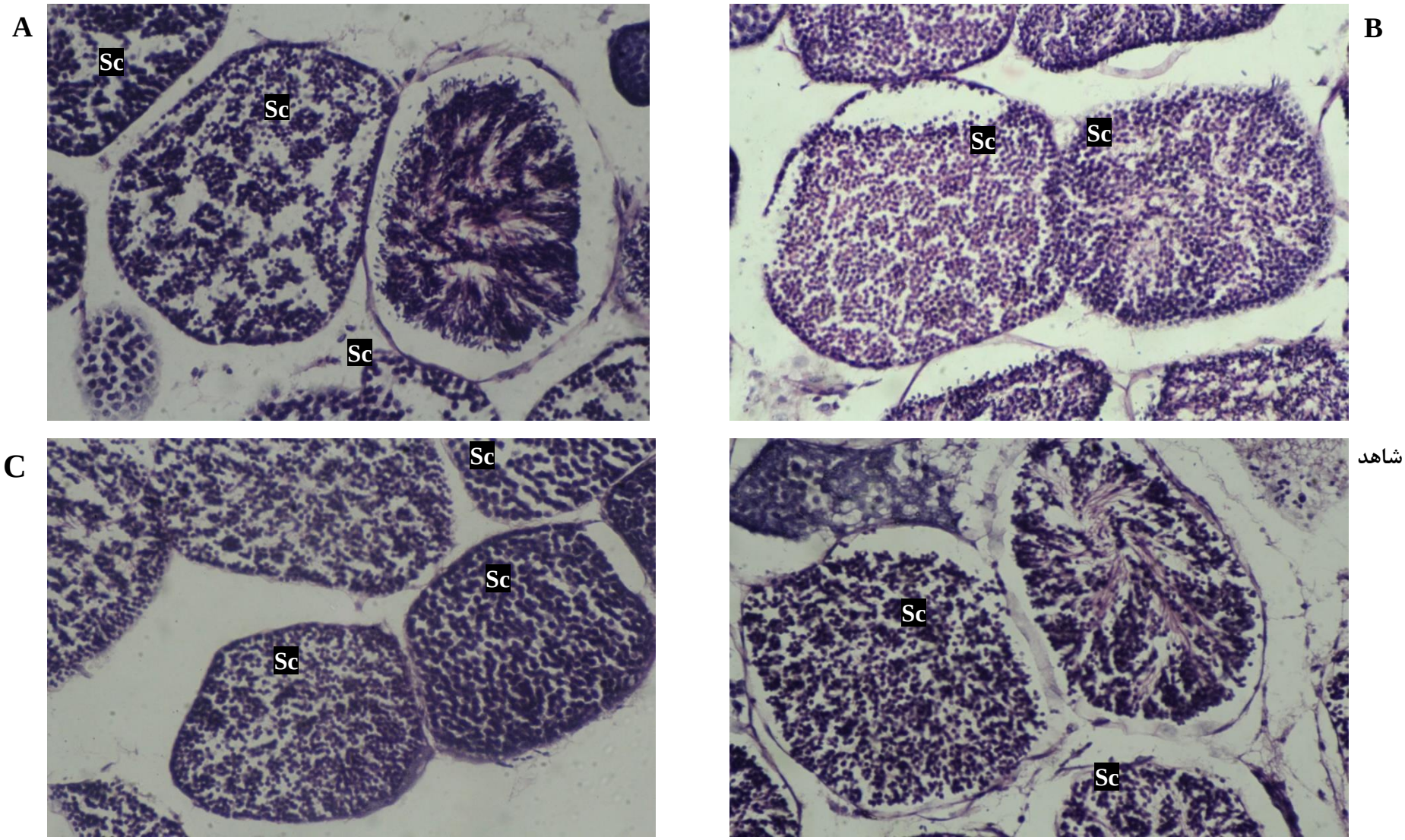
| شاخص آماری متغیرها | غلظت (ppm) | میانگین | انحراف معیار | F | p |
|---|---|---|---|---|---|
| **سلول‌های جنسی** | ۵۰ | ۱۹۴۴/۷۰ | ۳۰۰/۸۸ | ۳/۴۱۹ | ۰/۰۲۱ |
| | ۱۰۰ | ۲۲۳۰/۵۰ | ۳۱۱/۳۵ | | |
| | ۱۵۰ | ۲۱۹۴/۳۰ | ۳۲۲/۲۳ | | |
| | ۰ | ۲۰۲۱ | ۳۸۳/۹۸ | | |

نتایج حاصل از شمارش تعداد فولیکول‌های مقاطع بافتی تخمدان ماهیان( به صورت مقطع عرضی) نیز نشان می-دهد؛ بین هر چهار گروه با یکدیگر تفاوت معنی‌دار وجود دارد، یعنی با افزایش میزان غلظت تعداد فولیکول‌ها به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد( شکل ۲).

نتایج درجدول ۴ نشان می‌دهد؛ بیشترین میانگین تعداد فولیکول با ۸۲/۷۳ ± ۴۱۶/۵۰ مربوط به گروه شاهد( غلظت صفر) وکمترین میانگین با ۲۴/۴۱±۱۶۷/۵۰ مربوط به گروه با غلظت ۱۵۰ppm است. با توجه به سطح معنی‌داری ۰/۰۵> p، میزان غلظت محیط تاثیر معنی-داری بر تعداد فولیکول دارد.

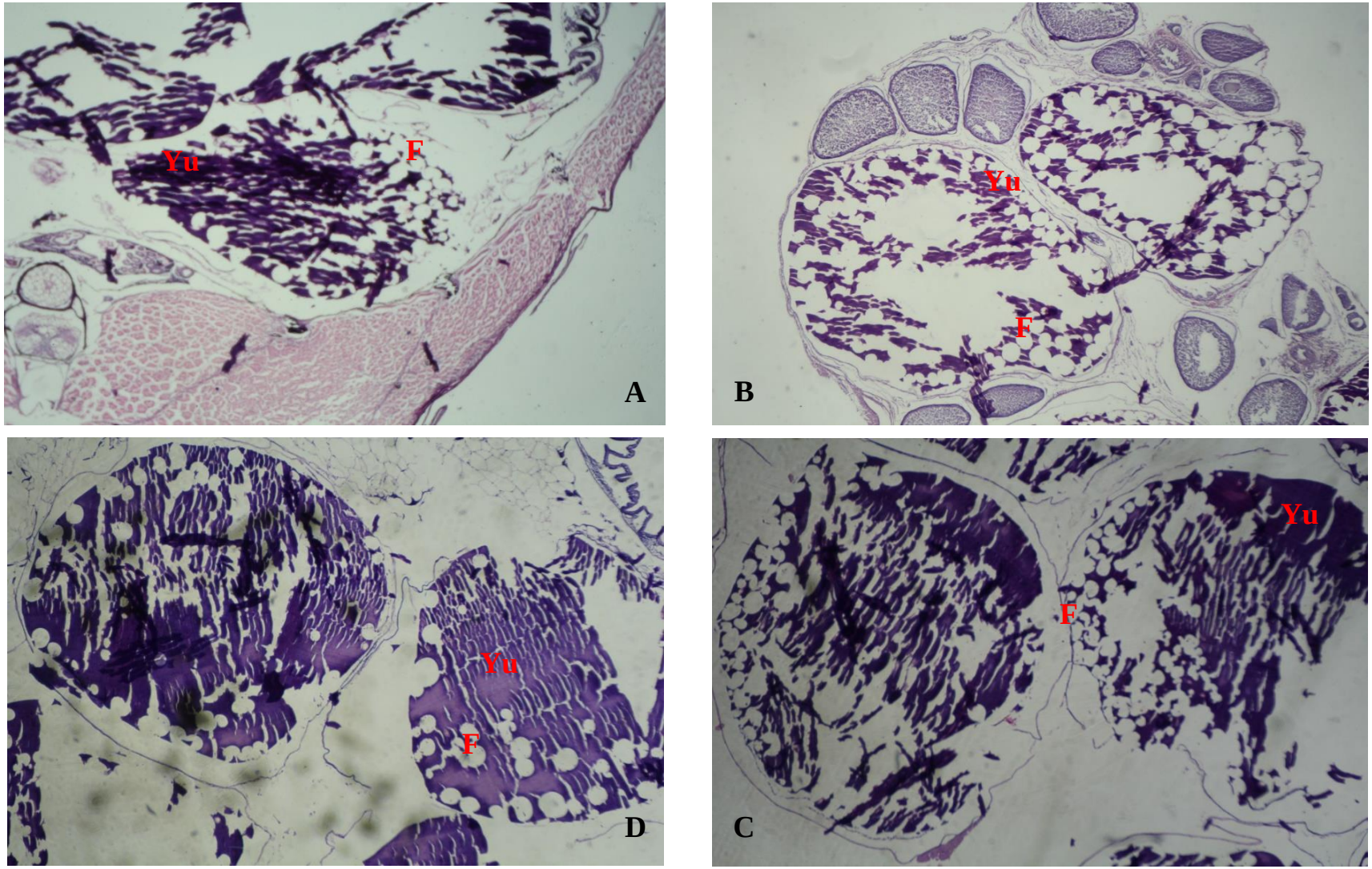
جدول۴. مقایسه میانگین تاثیر غلظت بر تعداد فولیکول

| شاخص آماری متغیرها | غلظت | میانگین | انحراف معیار | F | p |
|---|---|---|---|---|---|
| **تعداد فولیکول** | ۵۰ | ۲۰۶/۷۵ | ۴۷/۹۰ | ۹۵/۵۰۸ | ۰/۰۰۱ |
| | ۱۰۰ | ۲۶۷ | ۱۶/۵۷ | | |
| | ۱۵۰ | ۱۶۷/۵۰ | ۲۴/۴۱ | | |
| | ۰ | ۴۱۶/۵۰ | ۸۲/۷۳ | | |




شکل ۱. مقطع عرضی لوله اسپرم ساز با بزرگنمایی×۴۰۰، رنگ‌آمیزی H&E . Sc: اسپرماتوسیت.

میانگین اسپرماتوسیت‌ها در لوله های اسپرم‌ساز گروه‌های دریافت کننده عصاره نسبت به گروه شاهد زیادتر است. به‌طوری‌که نتایج به دست آمده از شمارش تعداد اسپرماتوسیت‌های اولیه در بیضه ماهیان نشان می‌دهد که تعداد سلول‌های جنسی گروه B و C تحت تیمار با غلظت ppm۱۰۰و۱۵۰، نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است.




شکل ۲. مقطع عرضی فولیکول‌های بافت تخمدان با بزرگنمایی×۱۰۰، رنگ آمیزی H&E.. Yu: زرده وF: فولیکول. در تعداد فولیکول‌های بافت تخمدان گروه‌های دریافت کننده عصاره( A,B,C) نسبت به گروه شاهد اختلاف وجود داشته و بیشترین میانگین تعداد فولیکول مربوط به گروه شاهد و کمترین میانگین مربوط به گروه A است.

## ۴. بحث و نتیجه‌گیری

ماهی گوپی از جمله گونه‌های گونوکوریست تمایز نیافته است. درنمونه‌های تمایز نیافته، تمام افراد درون گناد اولیه شبیه یک تخمدان تکوین می‌یابند که نیمی از جمعیت متعاقباً درون تستیس تمایز پیدا می‌کنند و نیمی دیگر به خود تخمدان متمایز می شوند( Maak and Segner, 2003).

به‌طور کلی ماهیانی که پس از تولد از لحاظ جنسی تمایز یافته نیستند، نسبت به دیگر ماهیان تمایز یافته‌ی جنسی حساسیت بیشتری به اثرات تیمار استروئیدی دارند. در حقیقت بسیاری از ماهیان تمایز یافته‌ی جنسی، حداقل نسبت به همان دوزهای مؤثر که زمان تمایزنیافتگی استفاده می‌شد، به تیمارهای استروئیدی پاسخ نمی‌دهند. بنابراین در طی تکامل، دوره‌ای وجود دارد که به عنوان دوره تغییر پذیری مطرح می‌شود و شامل محدوده‌ی زمانی است که گنادهای جنسی، تمایز نیافته‌اند و بیشتر به فعالیت استروئیدهای اگزوژنوس پاسخ می-دهند( Nakamura and Takahashi, 1973; Hackmann and Reinboth, 1974). بنابراین تیمار-های هورمونی اجرا شده در طی دوره تغییرپذیری به حداقل میزان استروئید و حداقل میزان تیمار برای دستیابی به گناد جنسی مورد نظر نیاز دارد( Donaldson et al., 1995).

دوره تغییرپذیری در ماهی گوپی هر دو دوره جنینی و پس از تولد را شامل می شود( Kavumpurath and Pandian, 1993; George and Pandian, 1995).

با توجه به اثرات گیاه گلرنگ در افزایش هورمون تستوسترون( Modaresi, 2005) و تغییرپذیری جنسیت ماهی گوپی تحت تیمار با گیاه گوکشورا، در این پژوهش اثر عصاره این گیاه بر تعیین جنسیت فیزیولوژیک و تأثیر آن بر ایجاد جنس نر در ماهی گوپی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج به دست آمده از میزان نر و ماده شدن ماهیان نشان می‌دهد که در تمامی گروه‌ها، میزان نرها نسبت به ماده‌ها در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافته است اما این اختلاف به اندازه‌ای نبوده که از لحاظ آماری معنادار گردد و احتمالاً در دوزهای بالاتر نتیجه بهتری را ایجاد خواهد کرد.

نتایج مطالعات Bahmanpour et al. (2012)، بر روی اثر گلرنگ بر کیفیت مایع منی و سطوح هورمونی گناد در موش‌های نر نشان داد که پارامترهای اسپرم و اندام‌های تولید مثلی پس از تیمار با عصاره گلرنگ بهبود یافته‌اند. بنابراین ترکیبات عصاره این گیاه می‌تواند اسپرماتوژنز را بهبود دهد و در نتیجه باروری را افزایش دهد.

به نظر می‌رسد؛ در این مطالعه ایزوفلاون، کارتامین و ترکیبات پلی فنول گلرنگ، اسپرماتوژنز و تعداد اسپرم را افزایش داده است. این اثرات ممکن است ناشی از افزایش جریان خون و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره گلرنگ باشد. ترکیبات آنتی اکسیدانت فلاونوئید می‌تواند با افزایش جریان خون در سیستم تولید مثلی، بارداری را بهبود ببخشد( Hiramatsu, 2009; Wang et al, 2011). مورفولوژی و تحرک اسپرم اغلب پس از تیمار با عصاره گلرنگ در دوز ۱۰mg/Kg بهبود یافته است (Bahmanpour, 2012). این نتایج نشان می‌دهد که عصاره نه تنها می‌تواند تحرک اسپرم را بالا ببرد اغلب می-تواند کیفیت اسپرم را بهبود دهد.

نتایج به دست آمده در این پژوهش درباره بررسی اثر عصاره گلرنگ بر تعداد سلول‌های جنسی نر نشان می‌دهد؛ در تعداد سلول‌های جنسی نر در مقاطع بافتی بیضه ماهیان، بین گروه‌های کنترل و غلظت ۵۰ppm( گروهA) با گروه‌های B وC تفاوت معنی‌دار وجود دارد و در این گروه‌ها تعداد سلول‌های جنسی نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است.

مطالعات انجام گرفته در زمینه برگشت جنسی در ماهی گوپی توسط گیاه گوکشورا( *Tribulus terrestris*)، تغییر جنسیت و اسپرم‌سازی موفقیت آمیز را در این ماهی نشان داد( Cek et al., 2007). این گیاه شامل مواد مختلفی است که به عنوان ساپونین‌های استروئیدی شناخته شده‌اند (Joshi et al., Ganzera et al., 2001 ;2005).

گیاه گلرنگ دارای آلکالوئیدها، گلیکوزیدهای قلبی، ساپونین ها، تانن‌ها، ترکیبات پلی فنلیک، استروئیدها، تری ترپنوئیدها می‌باشد( Kermanshahi et al., 2006). بر اساس مشترک بودن برخی ترکیبات بین گوکشورا و گلرنگ می‌توان نر شدن ماهی را با استفاده از این دو گیاه به وجود این ترکیبات نسبت داد و بر این اساس که

گوکشورا سبب اسپرم سازی موفق می‌گردد؛ افزایش سلول‌های جنسی نر در ماهی گوپی را نیز می‌توان به علت وجود ساپونین‌های موجود در این گیاه نسبت داد.

نتایج آماری در این تحقیق‌درباره بررسی اثر عصاره بر تعداد فولیکول‌های ماهیان ماده نشان می‌دهد؛ بین هر چهار گروه با یکدیگر تفاوت معنی‌داری وجود دارد و با افزایش میزان غلظت، تعداد فولیکول‌ها به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد.

مطالعات Louei Monfared et al. (2012)، بر روی بافت تخمدان موش نشان داد که عصاره گلرنگ تعداد فولیکول‌های تخمدان را کاهش می‌دهد. این یافته‌ها نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار در FSH سرم و اثرات توکسیک گلرنگ روی ساختار تخمدان موش است، همچنین سطوح استروژن سرم را کاهش می‌دهد. درمطالعات قبلی پیشنهاد شده است که سطح بهینه FSH خون برای آغاز و حفظ فولیکولوژنز تخمدان ضروری است( Roy and Albee, 2000). بنابراین می توان این چنین استنباط کرد که عصاره کلرنگ سبب کاهش در میزان FSH و متعاقباً اختلال در روند فولیکولوژنز گردیده و بر همین اساس در این تحقیق نیز تعداد فولیکول‌ها کاهش یافته است. علاوه بر این، مطالعات.Zhao et al (2005)، نشان داد که گیاه دارای یک جزء اصلی ضد استروژن که تراکلوزید نامیده می شود، است. بنابراین تغییرات ایجاد شده در بافت تخمدان را می‌توان به وجود این مواد نسبت داد.

## ۵. نتیجه‌گیری نهایی

نتایج آزمایشات بافت شناسی نشان می‌دهد که عصاره گیاه گلرنگ در میزان نر و ماده شدن تأثیر داشته و باعث افزایش سلول‌های اسپرماتوسیت‌ها در ماهیان گوپی شده است. غلظت‌هایی که بیشترین تأثیر را داشته اند، - ppm۱۵۰و۱۰۰ هستند. این گیاه همچنین در ماهیان ماده تعداد فولیکول‌ها را تغییر داده است، به طوری‌که با افزایش غلظت عصاره گلرنگ میزان فولیکول‌ها کاهش می یابد.

## ۶. تشکر و قدردانی

از زحمات اساتید محترم که باراهنمایی‌های ارزنده، ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند و از آقای دکتر علیرضا نظری به دلیل مشاوره‌های ارزشمندشان صمیمانه سپاسگزاریم. همچنین از همکاری دانشگاه آزاد واحد الیگودرز تشکر می‌شود.

**Refrences:**

Amin, Gh. R. 1992. Traditional medicinal plants. Publication Research Department, page 78.

Azari Takami, GH., Farahmnd H., Bahrami and Kamangar B. 2001. The female formation of rainbow trout by ultraviolet radiation. Iran's natural resources. 54: 369-382.

Azimi, A. A., Delnavaz H. B. and Mansour G. A. 2006. Antifungal effect of aqueous alcoholic and phenolic extracts of seed and leaves of Sorghum bicoloragainst Fusarium solani Fusarium poa in Persian. Journal of Medicinal Plants. 6:26-32.

Bahmanpour S., Vojdani Z., Panjehshahin M. R., Hoballah H., Kassas H. 2012. Effects of Carthamus tinctorius on Semen Quality and Gonadal Hormone Levels in Partially Sterile Male Rats. Korean Journal of Urology. 53:705-710.

Bahmanpour S., Javidnia k. and Arandi Pharm H. 2003. Weight and crown-rump length reduction,gross malformation and pregnancy outcome in Carthamus Tinctorius l-treated mice. Archives of Iranian Medicine. 6:117–120.

Cek S., Turan F. and Atik E., 2007. The effects of Gokshura, Tribulus terrestris on sex reversal of guppy. Poecilia reticulata. 10: 718-25.

Cheleh Mall Dezful Nezhad, J. M., Jahangiri Zadeh M., Mesbah M. and Javaheri Babohie M. 2012. Effects of feeding with Spirulina (Spirulina platensis) on hematological and immune system in fish Pangasius (*Pangasius hypophtalamus*). Journal of New Veterinary Research. 7: 9-1.

Donaldson, E. M., Solar, I. I., Piferrer, F. and Devlin, R. H., 1995. Sex control in Pacific Rim salmonid culture. *Aquaculture*, *135*(1-3): 128-128.

Ganzera, M., Bedir, E. and Khan, I. A., 2001. Determination of steroidal saponins in Tribulus terrestris by reversed-phase high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. Journal of Pharmaceutical Sciences, 90(11): 1752-1758.

George T. and Pandian T. J. 1995. Production of ZZ females in the female-heterogametic black

molly, Poecilia sphenops, by endocrine sex reversal and progeny testing. Aquaculture. 136(1-2):81–90.

George T. and Pandian T. J. 1996. Hormonal induction of sex reversal and progeny testing in the zebra cichlid, Cichlasoma nigrofasciatum. Journal of Experimental Zoology. 275:374-382.

Hackmann, E. and Reinboth, R. 1974. Delimitation of the critical stage of hormone-influenced sex differentiation in Hemihaplochromis multicolor (Hilgendorf)(Cichlidae). General and Comparative Endocrinology. 22(1):42-53.

Hiramatsu, M., Takahashi, T., Komatsu, M., Kido, T. and Kasahara, Y. 2009. Antioxidant and neuroprotective activities of Mogami-benibana (safflower, Carthamus tinctorius Linne). Neurochemical research. 34(4): 795-805.

Joshi, V. S., Parekh, B. B., Joshi, M. J. and Vaidya, A. B. 2005. Herbal extracts of Tribulus terrestris and Bergenia ligulata inhibit growth of calcium oxalate monohydrate crystals in vitro. Journal of Crystal Growth. 275(1-2): e1403-e1408.

Kavumpurath, S. and Pandian T. J. 1993. Masculinization of Poecilia reticulata by dietary administration of synthetic or natural androgen to gravid females. Aquaculture. 116: 83–89.

Kavumpurath S. and Pandian T. J. 1994. Masculinization of fighting fish, Betta splendens Regan, using synthetic or natural androgens. Aquaculture research. 25(4): 373-381.

Kermanshahi, R. K., Moatar, F. and Soleimani-manesh, A. R. 2006. Evaluation of antibacterial activity of aqueous and alcoholic extracts of safflower on a number of bacteria. Journal of Shahid Chamran University of Ahvaz, 15: 19.

Li D. and Mündel, H. H. 1996. Safflower (*Carthamus tinctorius L.*). Corporate Author: International Plant Genetic Resources Instit., (IPGRI), Rome (Italy). Journal or Series: Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 7: 83.

Louei Monfared, A., Aziziyan, H., Bahrami, A. M. and Ahmady Asbejin, S. 2012. Developmental toxicity evaluation of methanol extracts of Carthamus tinctorius L. in the Balb/C pregnant mice during organogenesis period. Journal of Medicinal Plants Research. 6: 1623-1626.

Maak G. and Segner, H. 2003. Morphological development of the gonads in zebrafish. Journal of Fish Biology. 62: 895–906.

Mandade R., Sreenivas S. A., Sakarkar D. M. and Wanare R. 2011. Pharmacological effects of extract of Carthamus tinctorius on volume and acidity of stimulated gastric secretion. Oriental Pharmacy and Experimental Medicine. 11:293–298.

Modaresi, M. 2005. The effect of alcoholic extract of safflower (*Carthamus Tinctorius*) on the pituitary-gonadal tissue in the testes of mice. Journal Medical Sciences University of Zanjan. 13:1-7.

Nakamura, M. and Takahashi, H. 1973. Gonadal sex differentiation in Tilapia mossambica, with special regard to the time of estrogen treatment effective in inducing complete feminization of genetic males. Research Report, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, 24(1): 1-13.

Piferrer, F. and Lim, L. C. 1997. Application of sex reversal technology in ornamental fish culture. Aquarium Sciences and Conservation. 1(2):113-118.

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

Qin, Y. 1990. The Clinical treatment of male Sterility. Jiangxi Traditional Chinese Medicine. 21:21-2.

Qu, C. 1990. Clinical Observation on dead Sperm exess disease of 182 cases. Shanghai Traditional Chinese. 5:28-9.

Roy S. K., Albee, L. 2000. Requirement for follicle-stimulating hormone action in the formation of primordial follicles during perinatal ovarian development in the hamster. Endocrinology. 141: 4449-4456.

Wang, C. C., Choy, C. S., Liu, Y. H., Cheah, K. P., Li, J. S., Wang, J. T. J., Yu, W. Y., Lin, C. W., Cheng, H. W. and Hu, C. M., 2011. Protective effect of dried safflower petal aqueous extract and its main constituent, carthamus yellow, against lipopolysaccharide induced inflammationin in RAW264. 7macrophages. Journal of the Science of Food and Agriculture. 91(2): 218-225.

Zargar A. 1990. Medicinal Plants. Tehran University Press. 3: 34-31.

Zhao, M., Ito, Y. and Tu, P. 2005. Isolation of a novel flavanone 6-glucoside from the flowers of Carthamus tinctorium (Honghua) by high-speed counter-current chromatography. Journal of Chromatography, A. 193:6–10.

*Journal of Marine Science and Technology*

***Winter 2021, Vol. 20, No. 4. P: 16-25.***

Khorramshahr University of Marine Science and Technology

**Available Online:** http://jmst.kmsu.ac.ir

**Original Article**

# The Effect of Aqueous Extract Safflower (*Carthamus tinctorius*) on Physiological Sex Determination in Guppy

**Mozhgan Toodooei *[1] ,Shahla Roozbehani [2], Ali Noori [2] , somaye Azadbakht [2], Hadis Karimifar [2]**

1. Club of young researchers and elites, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
2. Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

* Corresponding Author E-mail: mozhgantoodooei@yahoo.com

**Received:** 22 August 2013 **Accepted:** 20 May 2015

**Doi:** 10.22113/jmst. 2016.9573

**Abstract:**

The safflower (*Carthamus tinctorius)* belongs to the Compositae family. This plant is widely used in food industries and medicine. The aim of this paper is studying the effect of Safflower extract on physiological sex determination and Masculinization in Guppy fish(*Poecilia reticulata*). 88 one-week-old Guppy fishes were divided into four groups( 22 fishes in each group): A, B, C and control (without extract). The fishes were exposed to 50, 100 and 150 ppm concentrations of safflower extract for one month. After 3 months, gonads tissue sections of the fishes were prepared. Tissue changes were examined and compared with the control group that did not receive any extract. Results showed a significant difference in the number of primary spermatocytes in all groups; So the greatest increase of cells was in fishes that receiving concentrations of 100 and 150 ppm extract ($p<0.05$). The results also showed; with increasing concentration of safflower extract, the number of female follicles decreases significantly ($p<0.05$). Finally, the results of this study showed; safflower extract increases spermatogenesis and by creating tissue changes, it can induce the sex of guppy fish in the direction of masculinization.

**Keywords**: Sex determination, follicle, *Carthamus tinctorius*, guppy (*Poecilia reticulata*), masculinization

## List of Figures and Tables

**Table 1:** Distribution of the sample group in terms of the number of male and female.
**Table 2:** Comparison average of the effect of the concentrations on the male fish.
**Table 3:** Comparison average of the effect of the concentrations on the male sex cells.
**Table 4:** Comparison average of the effect of the concentrations on follicle count.
**Figure 1:** seminiferous tubular cross section magnification × 400, stained H & E. Sc: spermatocytes
**figure 2:** The cross-section of follicles in ovarian tissue magnification × 100, stained H & E. Yu: yolk, F: follicle.

**Copyrights:**

Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted Journal of Marine Science and Technology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons. org/licenses/ by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.