Journal of Aquaculture Development
Vol. 20, No. 4, 2027, Pages: 82-92
DOI: 10.71901/jad-2026-2-900

RESEARCH PAPER **OPEN ACCESS**

Effects of *Tribulus terrestris* Hydroalcoholic Extract and 17α-Methyltestosterone for Sex Reversal in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Using Immersion Treatment

Roghayah Mahmoudi[1], Mohammad Meysam Salahi Ardakani[1*], Sayed Abdolhamid Hosseini[1], Abolhassan Rastiannasab[1], Davod Zargham[1]

1- Shahid Motahary Cold Water Fishes Genetic and breeding Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Yasoj, Iran

Received: 28 October 2025 **Accepted: 24 February 2026**

Extended Abstract:

Introduction: The production of all-female populations is widely used in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) aquaculture to improve growth performance, size uniformity, and economic efficiency. This approach commonly depends on the production of functional XX neomales using *17α-methyltestosterone* (17α-MT). However, concerns regarding the environmental persistence and endocrine-disrupting effects of synthetic steroids have increased interest in sustainable alternatives. Plant-derived bioactive compounds have emerged as promising candidates due to their biodegradability and low environmental impact. Among these, *Tribulus terrestris* contains steroidal saponins and androgen-like compounds with reported effects on growth and reproductive performance. Although its beneficial effects have been documented in several fish species, information on its masculinizing potential during sex differentiation in salmonids remains limited. Therefore, this study evaluated the effectiveness of the hydroalcoholic extract of *T. terrestris*, administered by immersion during the sex differentiation period, as a natural alternative to 17α-MT for inducing masculinization in rainbow trout.

Material and Methods: The experiment was conducted at the Cold-Water Fish Genetics and Breeding Research Center, Yasuj, Iran, using rainbow trout larvae obtained from pooled gametes of multiple broodstock. A total of 22,500 fertilized eggs were incubated under standard hatchery conditions and randomly assigned to five experimental treatments, each with three replicates. Larvae were exposed by immersion once weekly for seven consecutive weeks during the sex differentiation period to the hydroalcoholic extract of Tribulus terrestris at concentrations of 20, 40, and 80 mL L^{-1}. A positive control group was treated with *17α-methyltestosterone* (400 µg L^{-1}), while an untreated group served as the negative control. Each immersion treatment lasted 2 h under continuous aeration at 11–12°C. At the end of the rearing period, the survival rate was recorded, and the sex ratio was determined through gonadal histological examination. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at a significance level of $P<0.05$.

Results and Discussion: The highest masculinization rate was observed in the 17α-methyltestosterone treatment (85.61 ± 1.52%), which was significantly higher than that of the control group (73.48 ± 0.49%)

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-07]

[DOI: 10.71901/jad-2026-2-900]

(p<0.05). Among the Tribulus terrestris treatments, only the 20 mL L^{-1} concentration maintained survival throughout the experimental period. In contrast, complete mortality occurred in the 40 and 80 mL L^{-1} groups within the first two weeks of exposure. The 20 mL L^{-1} treatment resulted in a masculinization rate of 68.47±1.18%, which differed significantly from the control group (p<0.05). No significant differences in survival rate were detected among the control, *17α-methyltestosterone*, and 20 mL L^{-1} Tribulus treatments (p<0.05). Histological examination revealed no intersex individuals in any treatment group. Furthermore, testes from fish treated with 20 mL L^{-1} Tribulus extract exhibited normal gonadal architecture with well-developed spermatogenic cells and no evidence of tissue abnormalities or structural damage.

Conclusion: The results demonstrated that the hydroalcoholic extract of *Tribulus terrestris* at 20 mL L^{-1} significantly increased the proportion of males in rainbow trout without adversely affecting survival or gonadal structure. Although the masculinization efficiency of *17α-methyltestosterone* remained higher, the observed effect of Tribulus extract suggests its potential as a natural sex-control agent in salmonid aquaculture. The complete mortality observed at higher concentrations (40 and 80 mL L^{-1}) highlights the importance of dose optimization when applying phytogenic compounds. Histological findings confirmed normal testicular development and the absence of tissue abnormalities or intersex individuals in fish treated with the effective dose. These results indicate that T. terrestris may influence sex differentiation pathways while maintaining gonadal integrity. Overall, the hydroalcoholic extract *of T. terrestris* can be considered a promising environmentally friendly alternative for increasing male proportion in rainbow trout; however, further molecular and long-term studies are required to clarify its mechanism of action and optimize its practical application in aquaculture.

Conflict of Interest: There is no conflict of interest between the authors of the article.

Acknowledgment: We hereby express our gratitude and appreciation for the assistance of all colleagues in conducting this research.

Key words: *Tribulus terrestris*, Masculinization, *17‑ alpha methyl testosterone*, Rainbow trout

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-07]

[DOI: 10.71901/jad-2026-2-900]

* *Corresponding Author: mmsalahi.a@gmail.com*

نشریه توسعه آبزی‌پروری، سال بیستم، شماره چهارم، زمستان ۱۴۰۵، صفحه های ۹۲-۸۲
DOI: 10.71901/jad-2026-2-900

"مقاله پژوهشی"

اثر عصاره هیدروالکلی گیاه خارخاسک (*Tribulus terrestris*) در مقایسه با هورمون ۱۷-آلفا متیل‌تستوسترون به روش غوطه‌وری در دوره تمایز جنسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

رقیه محمودی[۱]، محمدمیثم صلاحی اردکانی[۱]*، سیدعبدالحمید حسینی[۱]، ابوالحسن راستیان نسب[۱]، داود ضرغام[۱]

۱- مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردابی شهید مطهری، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۸/۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۲/۵

چکیده

پرورش جمعیت‌های تک‌جنس راهکاری کلیدی برای افزایش بازدهی و مدیریت بهتر در صنعت آبزی‌پروری محسوب می‌شود. این پژوهش با هدف بررسی کارایی عصاره هیدروالکلی گیاه خارخاسک (*Tribulus terrestris*) به‌عنوان منبع فیتوآندروژن، در مقایسه با هورمون سنتتیک ۱۷-آلفا متیل‌تستوسترون در نرسازی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام گرفته است. در این آزمایش، ۱۵۰۰۰ لارو تازه تفریخ‌شده (با میانگین وزن ۸ ± ۱۲۱ میلی‌گرم) به صورت کاملا تصادفی تیماربندی و درانکوباتورهای افقی توزیع شدند. لاروها طی دوره حساس تمایز جنسی، به مدت ۷ هفته (هفته‌ای یک‌بار) در حمام‌هایی حاوی غلظت‌های مختلف عصاره خارخاسک (۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌لیتر در لیتر) و هورمون متیل‌تستوسترون (۴۰۰ میکروگرم در لیتر) غوطه‌ور شدند. بررسی ها نشان داد بالاترین درصد نرسازی به‌ترتیب در تیمار هورمونی(۱/۵۲±۸۵/۶۱ درصد) و سپس تیمارحاوی عصاره خارخاسک با غلظت ۲۰ میلی‌لیتر در لیتر (۱/۱۸±۶۸/۴۷ درصد) مشاهده که نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد بود ($p<۰/۰۵$). غلظت‌های بالا (۴۰ و ۸۰ میلی‌لیتر) سبب ایجاد سمیت و تلفات کامل لاروها در دو هفته ابتدایی گردید. درصد بازماندگی در سایر تیمارها بدون اختلاف معنی‌داری بود. بررسی بافت‌شناسی لاروهای تیمار شده با عصاره هیدروالکلی در غلظت ۲۰ میلی‌لیتر در لیتر، هیچ‌گونه آسیب ساختاری به بافت بیضه را نشان نداد. در مجموع، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که استفاده از عصاره هیدروالکلی گیاه خارخاسک در دوز ۲۰ میلی‌لیتر در لیتر به روش غوطه‌وری می‌تواند به‌عنوان روشی بالقوه برای القای نرسازی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد توجه قرار گیرد. هرچند، بهینه‌سازی دوز و پروتکل کاربرد عصاره برای دستیابی به کارایی بالاتر و کاهش اثرات سمیت ضروری به‌نظر می‌رسد.

کلمات کلیدی: خارخاسک، نرسازی، ۱۷ آلفا متیل تستوسترون، قزل‌آلای رنگین کمان

* عهده‌دار مکاتبات: mmsalahi.a@gmail.com

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-07]

[DOI: 10.71901/jad-2026-2-900]

مقدمه

در دهه اخیر، تولید جمعیت‌های تک‌جنس، به‌ویژه جمعیت‌های تمام ماده، به‌عنوان یکی از راهبردهای کلیدی برای افزایش رشد، یکنواختی اندازه و بهبود بازده اقتصادی در پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مورد توجه ویژه قرارگرفته است. در حال حاضر، بیش از ۹۰ درصد مزارع پرورش قزل‌آلا در ایالات متحده از تخم‌های تمام ماده استفاده می‌کنند که نشان‌دهنده اهمیت بالای این رویکرد در آبزی‌پروری تجاری است (Weber *et al*., 2020). با توجه به بسته بودن مجرای اسپرم در ماهیان ماده تغییر جنسیت‌یافته به نر (نرهای XX)، تحقیقات اخیر عمدتاً بر توسعه روش‌هایی متمرکز شده که امکان تولید نرهای عملکردی برای دستیابی به جمعیت‌های تمام ماده را فراهم سازند. در این راستا، هورمون سنتتیک ۱۷-آلفا متیل‌تستوسترون (17α-MT) به‌طور گسترده برای القای نرسازی و تولید نرهای ژنتیکی XX به‌کارگرفته شده است. اگرچه این هورمون از کارایی بالایی در تغییر جنسیت برخوردار است، اما استفاده از آن با نگرانی‌های زیست‌محیطی و بهداشتی همراه می‌باشد. هورمون‌های استروئیدی مصنوعی می‌توانند از طریق غذای مصرف‌نشده و مدفوع ماهیان وارد محیط‌های آبی شوند و به‌دلیل پایداری بالا و تجمع در رسوبات، به‌عنوان آلاینده‌های بالقوه بلندمدت مطرح هستند. مطالعات نشان داده‌اند که این ترکیبات قادرند موجب اختلالات غدد درون‌ریز، تغییر نسبت جنسی در جمعیت‌های وحشی و بروز ناهنجاری‌های رشدی و تولیدمثلی در موجودات آبزی شوند (Dildar *et al*., 2026). به‌عنوان مثال، مواجهه با استروئیدهای آندروژنی در سخت‌پوستانی نظیر *Procambarus alleni* با کاهش موفقیت هم‌آوری، طولانی شدن دوره رشد جنینی، بروز ناهنجاری‌های مورفولوژیک و کاهش رشد همراه بوده است (Rodríguez *et al*., 2007). با توجه به این مخاطرات، توسعه و به‌کارگیری جایگزین‌هایی ایمن، کم‌هزینه و سازگار با محیط زیست به‌جای هورمون‌های مصنوعی، به یکی از اولویت‌های مهم در آبزی‌پروری پایدار تبدیل شده است.

در این زمینه، ترکیبات زیستی با منشأ گیاهی به‌دلیل تجزیه پذیر بودن، سمیت پایین، عدم انباشتگی مضر در بافت‌ها و سازگاری بیشتر با محیط زیست، به‌عنوان گزینه‌هایی امیدبخش مورد توجه قرار گرفته است (Citarasu, 2010; Reverter *et al*., 2021). در میان گیاهان دارویی، خارخاسک (*Tribulus terrestris*) به‌عنوان منبعی غنی از ساپونین‌ها و ترکیبات شبه‌آندروژنی شناخته می‌شود و در مطالعات مختلف اثرات آن بر افزایش سطح تستوسترون، بهبود عملکرد تولیدمثلی و رشد عضلانی در انسان و سایر مهره‌داران گزارش شده است (Duru and Şahin, 2016; Ghanbari *et al*., 2021). در حوزه آبزی‌پروری، مطالعات متعددی اثرات عصاره خارخاسک را بر رشد، شاخص‌های فیزیولوژیک، پارامترهای هماتولوژیک و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی در گونه‌های مختلف ماهیان از جمله تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*)، تیلاپیای موزامبیک (*O. mossambicus*)، گربه‌ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) و سیچلاید گورخری (*Cichlasoma nigrofasciatum*) گزارش کرده‌اند (Yeganeh e*t al*., 2017). با این حال، پژوهش‌های علمی در خصوص کارایی عصاره خارخاسک به‌عنوان عامل نرساز، به‌ویژه در گونه‌های سالمونیده و در دوره حساس تمایز جنسی، همچنان

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-07]

[DOI: 10.71901/jad-2026-2-900]

محدود و ناکافی است. بر این اساس، مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثر عصاره هیدروالکلی گیاه خارخاسک در مقایسه با هورمون ۱۷-آلفا متیل‌تستوسترون، به روش غوطه‌وری در دوره تمایز جنسی، بر القاء نرسازی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام گردید.

مواد و روش‌ها

محل اجرا

فعالیت های میدانی تحقیق شامل هورمون تراپی، غوطه‌وری، نگهداری لاروها و همچنین مراحل آزمایشگاهی شامل تشریح و بررسی‌های ریخت‌شناسی و بافت‌شناسی غدد جنسی در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی یاسوج صورت پذیرفت. منبع تأمین آب مرکز، چشمه طبیعی با میانگین دمای ۱۱ درجه سانتی‌گراد و غلظت اکسیژن محلول در حالت اشباع ۷ تا ۹ میلی‌گرم در لیتر بود.

طراحی آزمایش و تیمارهای آزمایشی

تعداد ۲۲۵۰۰ عدد تخم سبز قزل‌آلای رنگین‌کمان به سالن انکوباسیون مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی یاسوج منتقل و تا زمان تفریخ تحت شرایط استاندارد انکوباسیون نگهداری شدند. پس از تفریخ، لاروهای حاصله به‌صورت کاملاً تصادفی در سینی‌های انکوباسیون توزیع شدند، به‌طوری که در هر سینی ۱۰۰۰ لارو دارای کیسه زرده قرارگرفت.

جمع‌آوری تلفات و نظافت سینی‌ها به‌صورت روزانه تا پایان دوره آزمایش صورت می گرفت. این تحقیق شامل پنج تیمار آزمایشی و هر تیمار با سه تکرار اجرا شد. لاروها به مدت ۷ هفته، هفت بار (هفته‌ای یک‌بار) در غلظت‌های مشخص شده در جدول شماره ۱ در معرض دوز غوطه‌وری قرار گرفتند. دوزهای عصاره هیدروالکلی خارخاسک (۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌لیتر در لیتر) بر اساس مطالعات پیشین انتخاب شدند تا تأثیر وابسته به دوز بر نرسازی و ایمنی زیستی بررسی شود. دوز ۲۰ میلی‌لیتر در لیتر به‌عنوان کمترین دوز مؤثر انتخاب شد، زیرا در مطالعات مختلف باعث نرسازی بدون آسیب بافتی مشخص شده است (Yeganeh *et al*., 2017; El-Sayed *et al*., 2023). دوزهای بالاتر برای بررسی پاسخ وابسته به دوز و محدوده ایمن استفاده شدند. هورمون ۱۷-آلفا متیل‌تستوسترون ۴۰۰ میکروگرم در لیتر به‌عنوان تیمار شاهد مثبت انتخاب شد (Piferrer, 2001).

تهیه عصاره هیدروالکلی خارخاسک

عصاره هیدروالکلی گیاه خارخاسک توسط شرکت مروارید جوین تهیه شد. بدین منظور، ۴ کیلوگرم از بخش‌های هوایی گیاه (برگ و گل) پس از خرد شدن، در مخلوط آب مقطر و الکل ۷۰ درصد به حجم ۵۰۰ سی‌سی قرارداده شده و به‌مدت ۱۲ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد تحت استخراج قرار گرفت. سپس عصاره حاصل به‌وسیله دستگاه تبخیر تحت خلأ در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ گردید. در نهایت، از ۳ لیتر عصاره اولیه، یک لیتر عصاره غلیظ هیدروالکلی به‌دست آمد که برای تهیه محلول‌های غوطه‌وری مورد استفاده قرار گرفت.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-07]

[DOI: 10.71901/jad-2026-2-900]

جدول ۱: مشخصات تیمارهای غوطه‌وری مورد استفاده در دوره تمایز جنسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

Table 1: Specifications of the immersion treatments applied during the sexual differentiation period in rainbow trout

Treatment Code	Treatment Substance	Concentration	Administration Method	Initiation Time (post-hatch)	Number of Sessions (Frequency)	Session Duration
TT20	Hydroalcoholic extract of *Tribulus terrestris*	20 mL/L	Immersion	1 week	7 (weekly)	2 h
TT40	Hydroalcoholic extract of *Tribulus terrestris*	40 mL/L	Immersion	1 week	7 (weekly)	2 h
TT80	Hydroalcoholic extract of *Tribulus terrestris*	80 mL/L	Immersion	1 week	7 (weekly)	2 h
MT	17α-methyltestosterone	400 µg/L	Immersion	1 week	7 (weekly)	2 h
Control	Untreated (no additive)	–	–	–	–	–

عملیات لقاح

به منظور کاهش اثر فردی تخمک و اسپرم ها در فرایند لقاح، تخمک‌ها از ۶۰ مولد ماده معمولی ۴ ساله با میانگین وزن ۳ تا ۴ کیلوگرم استحصال (میانگین تخمک هر مولد ماده۴۰۰ گرم و تقریبا تعداد ۱۵ عدد تخمک در هر گرم) و پس از توزین در یک تشت پلاستیکی مخلوط و یکدست شدند. از ترکیب اسپرم ۲۰ مولد نر ۳ ساله همزمان برای لقاح تخمک ها استفاده شد. بعد از فرایند لقاح، شستشوی تخم ها و رها سازی تا جذب آب توسط آنها صورت گرفت. با درنظر گرفتن احتمال بروز تلفات در مرحله اولیه رشد (چشم زدگی و تفریخ) تعداد ۴’۵۰۰ عدد تخم به هر تیمار اختصاص داده شد تا بعد از مرحله تفریخ، دسترسی به تعداد مورد نیاز لارو هم اندازه برای شروع آزمایش وجود داشته باشد.

اعمال تیمارهای غوطه‌وری

محلول‌های استوک عصاره خارخاسک (TT) و هورمون ۱۷-آلفا متیل‌تستوسترون (MT) بر اساس دوزهای تعیین‌شده تهیه و به حمام‌های غوطه‌وری افزوده شدند. تمامی تیمارهای غوطه‌وری در حمام‌های ساکن و به‌مدت ۲ ساعت انجام گرفت. در طول مدت زمان غوطه‌وری، هوادهی مداوم با استفاده از پمپ هواده انجام شد و سطح اکسیژن محلول بالاتر از ۷ میلی‌گرم در لیتر حفظ گردید. دمای آب در تمامی تیمارها بین ۱۱ تا ۱۲ درجه سانتی‌گراد محفوظ نگه داشته شد. پس از پایان هر نوبت غوطه‌وری،آب حمام‌های حاوی هورمون متیل‌تستوسترون به‌منظور حذف باقی‌مانده استروئید، از بستر کربن فعال گرانولی عبور داده شد (Lu *et al*., 2021).

تعیین بازماندگی، نسبت جنسی و بررسی بافت شناسی غدد جنسی

برای ارزیابی اثر تیمارهای مختلف بر بازماندگی و نسبت جنسی ماهیان، تعداد ماهیان باقی مانده در پایان دوره آزمایش در هر تیمار شمارش، ثبت و نرخ بازماندگی به‌صورت درصد نسبت بازماندگی به تعداد اولیه لاروها محاسبه شد. تعیین جنسیت ماهیان بر اساس بررسی‌های بافت‌شناسی غدد جنسی انجام گرفت. بدین منظور، در پایان دوره آزمایش، تعدادی از ماهیان هر تیمار به‌صورت تصادفی نمونه‌برداری و پس از بیهوشی در محلول فرمالین بافر ۱۰ درصد تثبیت شدند. نمونه‌ها پس از طی مراحل متداول بافت‌شناسی شامل

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-07]

[DOI: 10.71901/jad-2026-2-900]

آب‌گیری، شفاف‌سازی و قالب‌گیری در پارافین، برش‌گیری شده و با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین – ائوزین مورد بررسی قرارگرفتند. لام‌های تهیه‌شده با میکروسکوپ نوری بررسی و جنسیت ماهیان بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی بیضه و تخمدان تعیین شد.

تجزیه و تحلیل آماری

ترسیم نمودارها و پردازش اولیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2016 انجام شد. تحلیل‌های آماری با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰۲۰ صورت گرفت. بررسی اختلافات معنی‌دار بین تیمارها، با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام گرفت.سطح معنی‌داری در تمامی آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد (Zar, 1999).

نتایج

نسبت جنسی و میزان نرسازی

نتایج حاصل از بررسی نسبت جنسی لاروهای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تیمارشده با عصاره هیدروالکلی گیاه خارخاسک و هورمون ۱۷-آلفا متیل‌تستوسترون در شکل ۱ ارائه شده است. بیشترین درصد نرسازی به‌طور معنی‌داری در تیمار هورمون ۱۷-آلفا متیل‌تستوسترون مشاهده شد (۱/۵۲±۸۵/۶۱ ٪) که اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشت (p<۰/۰۵). در مقابل، کمترین درصد نرسازی مربوط به گروه شاهد بود (۴۹/±۷۳/۴۸ درصد). در میان تیمارهای مربوط به عصاره هیدروالکلی خارخاسک، تنها تیمار با غلظت ۲۰ میلی‌لیتر در لیتر تا پایان دوره آزمایش دارای بقا بود، در حالی که تیمارهای ۴۰ و ۸۰ میلی‌لیتر در لیتر به‌دلیل بروز تلفات کامل طی دو هفته ابتدایی پس از شروع غوطه‌وری از ادامه بررسی حذف شدند. در تیمار ۲۰ میلی‌لیتر در لیتر خارخاسک، درصد نرسازی برابر با ۴۷/۱۸±۶۸/۱ درصد به‌دست آمد که این مقدار به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد (نسبت نرمال جنسیت در ماهیان معمولی) بود (p<۰/۰۵).

میزان بازماندگی

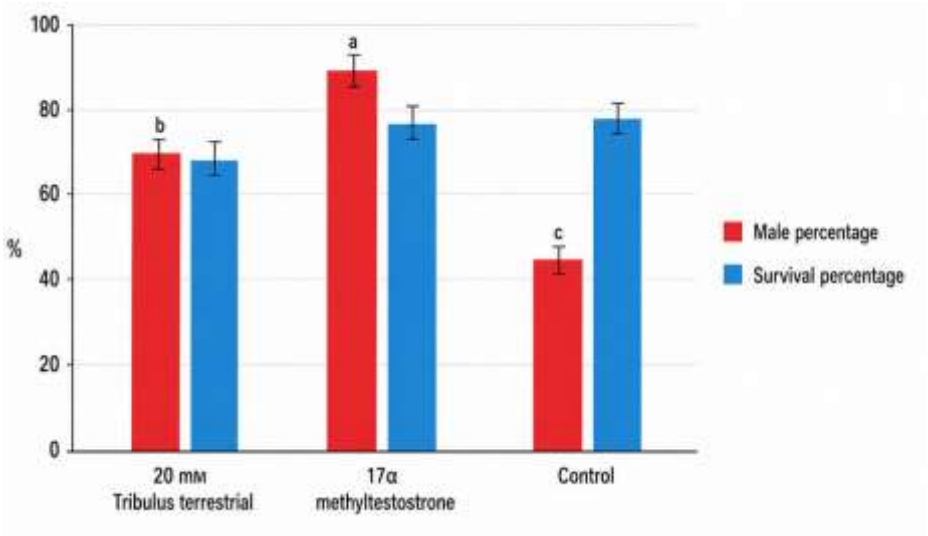
میانگین درصد بازماندگی در تیمارهای شاهد، هورمون ۱۷-آلفا متیل‌تستوسترون و تیمار عصاره خارخاسک با غلظت ۲۰ میلی‌لیتر در لیتر به‌ترتیب برابر با ۱/۹۴±۷۶/۹۱، ۲/۲۹±۷۳/۵۸ و ۲/۲۰±۶۷/۶۷ درصد بود. نتایج آنالیز آماری نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میزان بازماندگی بین تیمارهای مذکور وجود نداشت (p>۰/۰۵).

بررسی‌های ریخت‌شناسی و بافت‌شناسی

نتایج مطالعه ریخت‌شناسی و بافت‌شناسی غدد جنسی ماهیان تیمارشده نشان داد که در هیچ‌یک از تیمارهای مورد بررسی، نمونه‌های دوجنسیتی مشاهده نشد. مقاطع بافت‌شناسی بیضه ماهیان تیمارشده با عصاره هیدروالکلی خارخاسک در غلظت ۲۰ میلی‌لیتر در لیتر، ساختار طبیعی بافت بیضه را نشان داد. در این مقاطع، حضور سلول‌های زایای نر شامل اسپرماتوگونی‌ها، اسپرماتوسیت‌ها، اسپرماتیدها و اسپرماتوزوئیدها به‌وضوح قابل مشاهده بود (شکل ۲). رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین– ائوزین نیز هیچ‌گونه نشانه‌ای از ناهنجاری بافتی یا تخریب ساختاری در بافت گناد نشان نداد.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-07]

[DOI: 10.71901/jad-2026-2-900]

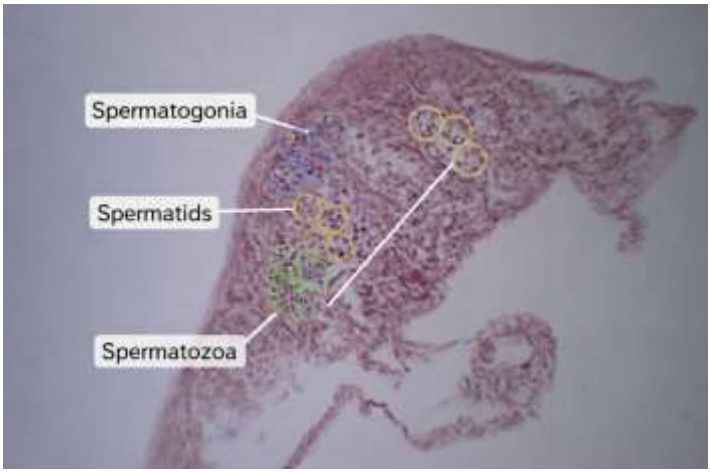


شکل ۱: تأثیر عصاره خارخاسک و ۱۷-αمتیل تستوسترون بر نسبت جنسی نر و بازماندگی قزل‌آلای رنگین‌کمان

*حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار می باشد (p<۰/۰۵)

Figure 1: Effect of Tribulus terrestris extract and 17α-methyltestosterone on the male sex ratio and survival rate of rainbow trout.

*Different letters above the bars indicate statistically significant differences among treatment groups (p<0.05).



شکل ۱: نمای میکروسکوپی بافت بیضه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تیمار شده با عصاره هیدروالکلی خارخاسک (غلظت ۲۰ میلی‌لیتر در لیتر). سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتید و اسپرماتوزوئید در بخش‌های مختلف مشاهده می‌شوند. (رنگ‌آمیزی: هماتوکسیلین–ائوزین . بزرگنمایی: ۴۰×).

Figure 1. Microscopic image of testicular tissue in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) treated with the hydroalcoholic extract of *Tribulus terrestris* (20 mL/L). Spermatogonia, spermatids, and spermatozoa are observed in various regions of the sections. (Staining: Hematoxylin and Eosin (H&E); Magnification: 40×)

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-07]

[DOI: 10.71901/jad-2026-2-900]

بحث

هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر عصاره هیدروالکلی گیاه خارخاسک در مقایسه با هورمون سنتتیک ۱۷-آلفا متیل‌تستوسترون بر نسبت جنسی و نرسازی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بود. نتایج نشان داد عصاره خارخاسک در دوز ۲۰ $ml\ L^{-1}$ نسبت جنسی را به‌طور معنی‌داری به سمت نرگرایی سوق می‌دهد، بدون آنکه باعث افزایش تلفات گردد. کارایی بالای ۱۷-آلفا متیل‌تستوسترون بعنوان یکی از مؤثرترین ابزارهای تک‌جنس‌سازی در ماهیان سالمونیده در این پژوهش با مطالعات پیشین همخوانی دارد (Piferrer, 2019). با این وجود، نگرانی‌های زیست‌محیطی مرتبط با رهاسازی استروئیدهای مصنوعی در اکوسیستم‌های آبی، از جمله اختلال در سیستم غدد درون‌ریز آبزیان غیرهدف و پایداری طولانی‌مدت این ترکیبات در رسوبات، ضرورت توسعه جایگزین‌های طبیعی وکم‌خطرتر را برجسته می‌سازد (Dildar *et al.*, 2026).

در این مطالعه، استفاده از غلظت‌های بالاتر عصاره خارخاسک (۴۰ و ۸۰ میلی‌لیتر بر لیتر) منجر به بروز سمیت شدید و تلفات کامل لاروها طی دو هفته ابتدایی شروع پروژه وغوطه وری گردید. این نتایج با گزارش‌های پیشین مبنی بر اینکه دوزهای بالای عصاره‌های گیاهی می‌توانند موجب بروز استرس اکسیداتیو، اختلال در تنظیم هورمونی و در نهایت مرگ‌ومیر شوند، همخوانی دارد (Gence *et al.*, 2025). در مقابل، تیمار با دوز پایین‌تر عصاره (۲۰ میلی‌لیتر بر لیتر) منجر به افزایش معنی‌دار درصد نر، در کنار حفظ سطح بازماندگی مشابه تیمار شاهد و تیمار هورمونی شد. این موضوع به‌روشنی نشان می‌دهد که اثرگذاری عصاره‌های گیاهی به‌شدت وابسته به دوز بوده و بهینه‌سازی دقیق مقدار مصرف، شرط اصلی موفقیت آن‌ها است.

هرچند مکانیسم دقیق تاثیر عصاره خارخاسک درپژوهش حاضر بررسی نشد، اما شواهد بیوشیمیایی موجود نشان می‌دهند که ترکیبات فعال این گیاه، به‌ویژه ساپونین‌ها و ترکیبات تری‌ترپنوئیدی، می‌توانند از طریق افزایش فعالیت آنزیم ۱۷بتا - هیدروکسی‌استروئید دهیدروژناز، موجب تقویت سنتز آندروژن‌ها شوند (Zhou *et al.*, 2021). همچنین مطالعات Fajkowsk و همکاران (۲۰۲۱) نشان داده است که عصاره‌های گیاهی از جمله خارخاسک، قادر به تأثیرگذاری بر بیان ژن‌های کلیدی دخیل در تمایز جنسی مانند Dmrt1، Sox9 و Cyp19a1 هستند (Fajkowska *et al.*, 2021). در همین راستا، Matter و همکاران (۲۰۲۴) گزارش کردند که عصاره خارخاسک با افزایش بیان ژن‌های Amh، Dmrt1 و Sox9 وکاهش بیان Foxl2، می‌تواند محور هیپوتالاموس–هیپوفیز–گناد را به سمت تولید جنس نر هدایت کند. اگرچه مطالعه حاضر به بررسی‌های مولکولی ورود نکرد، اما نتایج فنوتیپی به‌دست‌آمده می‌تواند مبنای مناسبی برای انجام پژوهش‌های ژنومی و ترنسکریپتومی در آینده باشد. در مقاله Neriswan و همکاران (۲۰۲۵) آمده است که عصاره‌های گیاهی مختلفی از جمله خارخاسک، توانایی افزایش نسبت جنسی نر در جمعیت وسیعی از گونه‌های ماهیان را دارند و می‌توانند به‌عنوان مدولاتور غدد درون‌ریز طبیعی در آبزی‌پروری مورد توجه قرار گیرند. همچنین مشخص شده است که افزودن عصاره خارخاسک به خوراک سبب افزایش نسبت جنسی نر به میزان قابل توجهی در کل جمعیت می گردد، اگرچه ساختار گناد

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-07]

[DOI: 10.71901/jad-2026-2-900]

در دوزهای بالای هورمون دچار آسیب جدی می شود (Amer *et al*., 2021).

یافته‌های بافت‌شناسی این تحقیق نیز نشان داد که در ماهیان تیمارشده با دوز ۲۰ میلی‌لیتر بر لیتر عصاره خارخاسک و هیچ آسیب ساختاری در گنادها مشاهده نشد و ساختار طبیعی بیضه، شامل حضور اسپرماتوگونی‌ها، اسپرماتیدها و اسپرماتوزوئیدها، حفظ گردید. این نتایج با مطالعات اخیر در گونه‌های مختلف آبزی همخوانی دارد که گزارش کردند استفاده از عصاره‌های گیاهی در مقادیر بهینه، عموماً با عوارض بافتی قابل‌توجه همراه نیست (Sarida *et al*., 2025).

نتیجه گیری

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره هیدروالکلی گیاه خارخاسک در دوز ۲۰ میلی‌لیتر بر لیتر می‌تواند به‌عنوان یک گزینه بالقوه به منظور افزایش نسبت جنسی نر در جمعیت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مطرح شود. اگرچه کارایی آن نسبت به هورمون سنتتیک کمتر بوده، اما مزایایی نظیر منشاء طبیعی، تجزیه‌پذیری بهتر و کاهش پیامدهای زیست‌محیطی، آن را به گزینه‌ای امیدوارکننده در مسیر توسعه آبزی‌پروری پایدار تبدیل می‌کند. انجام مطالعات تکمیلی در زمینه مکانیسم‌های مولکولی، اثرات بلندمدت و بهینه‌سازی پروتکل‌های کاربرد عصاره‌های گیاهی، می‌تواند سبب استفاده عملی و ایمن از این ترکیبات در صنعت آبزی پروری گردد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از بابت یاری کلیه همکاران در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع

1. Amer, M.A., Zaki, F.M., Tahoun, A. and Said, M.M.S., 2021. Effects of 17α-methyltestosterone and *Tribulus terrestris* extract on sex ratio and gonad histology of red tilapia hybrid. *Egyptian Journal of Nutrition and Feeds*, *24*(2), pp.189-198. DOI: 10.21608/ejnf.2021.210947
2. Citarasu, T., 2010. Herbal biomedicines: A new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International*, *18*(3), pp.403–414. DOI:10.1007/s10499-009-9253-7
3. Dildar, T., Xue, Y., Cui, W., Ikhwanuddin, M., Shafiq, M. and Ma, H. 2026. Endocrine-disrupting chemicals in aquatic ecosystems and their impacts on aquatic organisms and humans with advances in detection and remediation. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. *27*(6), pp.561-589. DOI: 10.1631/jzus.B2500252
4. Duru, M.E. and Şahin, A., 2016. Chemical composition and biological activities of Tribulus terrestris. *Journal of Food Biochemistry*, *40*, pp.1–10. DOI:10.1111/jfbc.12163
5. El-Sayed, I.A., Yones, A. M., Metwalli, A.A. and Saleh, H.H.E., 2023. Efficacy of Gokshura (*Tribulus terrestris*) on Sex Reversal and Growth Performance of the Nile Tilapia (*Orechromis niloticus*) Fries Reared in Prolonged Water Exchange. *Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries*, *27*(4), pp.1125–1140.
6. Fajkowska, M., Adamek-Urbańska, D., Ostaszewska, T., Szczepkowski, M. and Rzepkowska, M., 2021. Effect of genistein, daidzein and coumestrol on sex-related genes expression in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*). *Aquaculture, 530*, 735872. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.735872
7. Ghanbari, A., Akhshi, N., Nedaei, S.E., Mollica, A., Aneva, I.Y., Qi, Y., Liao, P., Darakhshan, S., Farzaei, M.H., Xiao, J. and Echeverría, J., 2021. *Tribulus terrestris* and female

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-07]

[DOI: 10.71901/jad-2026-2-900]

reproductive system health: A comprehensive review. *Phytomedicine*, *84*, 153462. DOI:10.1016/j.phymed.2021.153462

8. Gence, L., Fernezelian, D., Al Anaissy, T., Apalama, M. L., Hoarau, A., Ghaddar, B., Bringart, M., Veeren, B., Meilhac, O., Bascands, J.-L. and Diotel, N., 2025. Toxicity and therapeutic effects of aqueous extracts from reunionese medicinal plants: Insights from zebrafish models. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *189*, 118305. DOI: 10.1016/j.biopha.2025.118305
9. Lu, Jian & Zhang, Cui & Wu, Jun., 2021. Removal of steroid hormones from mariculture system using seaweed Caulerpa lentillifera. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*. *16*(2). DOI:10.1007/s11783-021-1449-8
10. Matter, A.F., Raslan, W.S., Soror, E.I., Khalil E.K., Kadah, A., Youssef, H.A., 2024. Comparable to 17α-methyltestosterone, dietary supplements of Tribulus terrestris and Mucuna pruriens promote mono-sex all-male tilapia fry, growth, survival rate and sex-related gene expression. *BMC Veterinary Research*, *20*(1), 326. DOI:10.1186/s12917-024-04162-0
11. Neriswan, A., Fadjar, M. and Kilawati, Y., 2025. Are plant-based endocrine modulators the future of sustainable sex control in aquaculture? *Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries*, 29, pp.1–15.
12. Piferrer, F., 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, *197*(1-4), pp.229–281. DOI:10.1016/S0044-8486(01)00583-0
13. Piferrer, F., 2019. Fifty years of research on fish sex determination: Gaps and perspectives on genetic and environmental influences. *Fish Physiology and Biochemistry*, *45*(3), pp.741–761. DOI:10.1007/s10695-018-0568-z
14. Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B. and Sasal, P., 2021. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture*, *433,* pp.50–61. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2014.05.048
15. Rodríguez, E.M., Medesani, D.A. and Fingerman, M., 2007. Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: A review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *146*(4), pp.661–671. DOI: 10.1016/j.cbpa.2006.04.030
16. Sarida, M., Lusiani, L., Putri, A.Y., Elisdiana, Y. and Adiputra, Y.T., 2025. Early gonadal differentiation, sex ratio, and growth performance of Nile tilapia *(Oreochromis niloticus)* supplemented with Tribulus terrestris extract. *Journal of Aquaculture and Fish Health*, *14*(1), pp.103–113. DOI:10.20473/jafh.v14i1.62860
17. Weber, G.M., Leeds, T.D. and Schneider, R.P., 2020. Sex reversal of female rainbow trout by immersion in 17α-methyltestosterone. *Aquaculture*, *528*, 735535. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.735535
18. Yeganeh, S., Sotoudeh, A. and Nosratimovafagh, A., 2017. Effects of tribulus terrestris extract on growth and reproductive performance of male convict cichlid (*Cichlasoma nigrofasciatum*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *17*(5), 1003-1007. DOI: 10.4194/1303-2712-v17_5_15
19. Zar, J.H., 1999. Biostatistical Analysis. 4th Edition, Prentice Hall, Upper Saddle River
20. Zhou, L., Li, M. and Wang, D., 2021. Role of sex steroids in fish sex determination and differentiation as revealed by gene editing. *General and Comparative Endocrinology*, *313*(3), 113893. DOI: 10.1016/j.ygcen.2021.113893

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-07]

[DOI: 10.71901/jad-2026-2-900]