

تاثیر عصاره اتانولی رازیانه (*Foeniculum vulgare*) بر رشد و باروری ماهی گوپی (*Poecilia reticulata*)

شهلا روزبهرانی^۱، علیرضا نظری^{۱*}

۱- گروه زیست شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، فلاورجان، ایران، صندوق پستی: ۸۴۵۱۵-۱۵۵

تاریخ دریافت: ۲ اردیبهشت ۱۳۹۴

تاریخ پذیرش: ۱۱ شهریور ۱۳۹۴

چکیده

ارائه راهکارهای نوین و طراحی و ساخت مکمل‌های غذایی جدید در راستای افزایش تولید و بهره‌وری می‌تواند نقش به‌سزایی در توسعه پایدار صنعت تکثیر و پرورش ماهیان زینتی به عنوان یکی از زیربخش‌های مهم صنعت آبرزی پروری داشته باشد. در این تحقیق تاثیر عصاره اتانولی میوه رازیانه حاوی ترکیبات فیتواستروژنیک بر رشد و باروری ماهی گوپی بررسی گردید. تعداد ۳۶۰ قطعه بچه ماهی گوپی در ۱۲ آکواریوم، هر آکواریوم ۳۰ قطعه ماهی در سه تیمار و یک شاهد هر کدام با سه تکرار به مدت ۱۳۳ روز با سه جیره غذایی با مقادیر ۷۵، ۱۰۰ و ۱۲۵ میکرو لیتر عصاره رازیانه بر گرم غذا و روزانه دومرتبه تغذیه گردیدند. نتایج نشان داد گروه آزمایشی ۱۰۰ $\mu\text{L/g}$ بیشترین مقدار رشد و زادآوری را نسبت به سایر تیمارها و گروه شاهد نشان داد. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و مقایسه آنها با نتایج قبلی، می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که عصاره رازیانه حاوی فیتواستروژن‌هایی است که تاثیراتی مشابه با ۱۷-بتا استرادیول‌های مصنوعی داشته و می‌توان از آن در تغذیه ماهیان زینتی در راستای افزایش باروری و رشد استفاده نمود.

کلمات کلیدی: ماهی گوپی، رازیانه، زنده زائی، فیتواستروژن، ماهیان تزئینی.

* عهده‌دار مکاتبات (✉) alireza_15869@yahoo.com

مقدمه

صنعت تکثیر و پرورش ماهیان زینتی یکی از زیر بخش‌های مهم صنعت آبرزی پروری است که در سالیان اخیر باعث اشتغال‌زائی و افزایش درآمد در کشور شده است. میزان تولید ماهیان زینتی با حدود ۶۰۰ گونه پرورشی، در سال ۱۳۹۱ به حدود ۱۳۰ میلیون قطعه در کل کشور رسیده است. ارائه راهکارهای نوین و طراحی و ساخت مکمل‌های غذائی جدید در راستای افزایش تولید و بهره‌وری می‌تواند نقش به‌سزائی در توسعه پایدار و هرچه بیشتر این صنعت نو پا داشته باشد. به‌کارگیری گیاهان داروئی در صنعت آبرزی پروری از جمله راه‌کارهایی است که توسعه این صنعت را بدون آسیب رساندن به دیگر بخش‌ها میسر خواهد ساخت. از سوی دیگر، به‌کارگیری فرآورده‌های نوین داروئی تهیه شده از منابع گیاهی به‌عنوان راهکاری در راستای کاهش معضلات این صنعت، مدتی است که مورد توجه محققین قرار گرفته است. افزایش میزان بازماندگی، کاهش تلفات ناشی از عوامل بیماری‌زا و افزودنی‌های خوراکی در جهت افزایش سرعت رشد گونه‌های مختلف ماهیان زینتی بخشی از موارد متعدد کاربرد گیاهان داروئی در صنعت تکثیر و پرورش ماهیان زینتی می‌باشد. گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgar*) دارای خواص فیتواستروژنیک می‌باشد (حاجی شریفی اصفهانی، ۱۳۸۶). تاثیر عصاره این گیاه بر روی جانوران مختلفی مطالعه شده است. تاثیر عصاره رازیانه بر دسیمنوره (قاعدگی دردناک) اولیه در انسان مطالعه گردیده است که باعث کاهش معنادار درد قاعدگی شده است (ترک زهرائی و همکاران، ۱۳۸۶). تاثیر مثبت عصاره رازیانه به عنوان یک داروی پیشگیری‌کننده از پوکی استخوان و استرادیول والرات

(استروژن مصنوعی) بر روی ساختار بافتی دهانه رحم و واژن بعد از برداشت تخمدان موش صحرایی مورد مطالعه قرار گرفته است (نورمند و همکاران، ۱۳۸۷). هم‌چنین در تحقیقی، تاثیرات مثبت عصاره رازیانه بر کاهش سندروم PCO گزارش شده است (Sadrefozalayi and Farokhi, 2012). تاثیرات بیولوژیک فیتواستروژن‌های موجود در گیاهان بر روی دستگاه تولید مثلی پستانداران توسط محققین متعددی بررسی گردیده است. Zhao و همکاران (۲۰۱۰) تاثیر استروژنیک و آنتی استروژنیک فیتواستروژن‌ها را بر روی محور مغز-هیپوفیز-گناد و اندام‌های تناسلی بررسی کردند. نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر تاثیر ممانعت‌کننده فیتواستروژن‌ها بر روی سرطان سینه و تخمدان است. تاثیر فیتواستروژن‌ها در کاهش اضطراب بر روی موش‌های صحرایی نیز توسط پورعباس و همکاران (۱۳۹۰) گزارش گردیده است. هم‌چنین تاثیر مثبت فیتواستروژن‌ها در کاهش احتمال ابتلاء به سرطان سینه، سرطان پروستات، بیماری‌های قلبی عروقی پوکی استخوان و علائم یائسگی نیز بررسی گردیده است (Tham et al., 1998). تاثیر فیتواستروژن‌های موجود در گیاهان مختلف بر توسعه دستگاه‌های جنسی جانوران توسط Kim و Park (۲۰۱۲) گزارش شده است. هم‌چنین تاثیر فیتواستروژن گیاهی Genesis بر رشد، تمایز جنسی و ترکیبات بدن گربه ماهی *Clarias gariepinus* نیز مورد بررسی قرار گرفته است (Yilmaz et al., 2008). نتایج این تحقیق بیانگر تاثیر افزایشی عصاره رازیانه بر رشد و تمایز جنسی این گونه می‌باشد. ماهی گویی (*Poecilia reticulata*) از ماهیان زینتی زنده‌زا بوده و دارای تفاوت ظاهری آشکار بین جنس نر و ماده و شرایط آسان تکثیر می‌باشد. وجود

ملایم و به کمک خلأ برداشته شد (زهرائی و همکاران، ۱۳۸۶).

جیره غذایی

عصاره آماده شده با نسبت ۱ g/ml / با آب مقطر رقیق و به عنوان محلول عصاره پایه در نظر گرفته شد. سپس با استفاده از غذای پولکی مخصوص ماهی گوپی با نام Tetra (ساخت کشور فرانسه)، سه جیره غذایی حاوی مقادیر مختلف عصاره (۷۵، ۱۰۰ و ۱۲۵ میکرولیتر به ازاء هر گرم غذا) تهیه گردید. با توجه به نوع غذای پولکی و اینکه جیره های غذای بصورت هفتگی تهیه می گردید و حجم عصاره مورد استفاده بسیار کم بود امکان اسپری عصاره بر روی غذا وجود نداشت. بهمین دلیل غذای مورد نیاز هر گروه با عصاره تعیین شده جهت هر جیره مخلوط گردید. سپس اجازه داده شد تا جیره در هوای آزمایشگاه خشک گردد. جیره های تهیه شده مجدداً به وسیله هاون کوچک به سائز مورد استفاده بچه ماهی ها تبدیل گردید.

ماهی

۳۶۰ قطعه بچه ماهی گوپی سنگاپوری با میانگین وزنی (0.035 ± 0.017 gr) پس از ظاهر شدن صفات جنسی نر و ماده جهت انجام آزمایش در نظر گرفته شدند. بچه ماهی ها به نسبت ۱:۵ نر و ماده در سه گروه آزمایش و یک گروه شاهد هر کدام با سه تکرار، و هر تکرار حاوی ۳۰ عدد بچه ماهی در آکواریوم های مجزا تقسیم شدند. در طول آزمایش آکواریوم ها با پمپ هوا هوادهی گردیدند. دمای آب با استفاده از بخاری های برقی 28°C تنظیم شدند. بچه ماهی ها در هر گروه با سه تکرار، با یک جیره غذایی به نسبت ۳٪ وزن بدن در دو

این خصوصیات ماهی گوپی را به مدلی با ارزش جهت مطالعه و بررسی تاثیر مواد و ترکیبات مختلف داروئی بر روی سیستم تناسلی مهره داران توسط محققین این بخش نموده است (شیخان، ۱۳۸۱). هم چنین تاثیر ترکیبات متعدد استروژنیک بر دستگاه تناسلی ماهی گوپی بررسی شده است (Kinnberg and Toft, 2003). در تحقیق حاضر برای اولین بار تاثیر عصاره اتانولی رازیانه بر رشد و افزایش میزان باروری ماهی گوپی در یک دوره کامل بررسی گردیده است.

مواد و روش ها

کیفیت آب مورد استفاده در تکثیر و پرورش آبزیان نقش بسیار مهمی در میزان رشد و حتی باروری آنها دارد. به همین لحاظ قبل از شروع آزمایش، آب مورد استفاده که آب شرب لوله کشی بود جهت تعیین مقادیر مواد محلول در آن و میزان سختی آنالیز گردید. سختی آب در حدود ۲۲۰ میلی گرم و میزان سختی کل ۲۹۴ اندازه گیری شد. کلر آب $14/2$ میلی گرم بر لیتر بود که با استفاده از پمپ هوا، آب آکواریوم ها به مدت ۴۸ ساعت قبل از شروع آزمایش هوادهی گردیدند.

تهیه عصاره رازیانه

برای تامین عصاره مورد نیاز، ابتدا میوه رازیانه از فروشگاه های عطاری شهر اصفهان تهیه و پس از تأیید گونه، با آسیاب برقی، پودر شدند. با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک و مقایسه با مرجع، از مرغوب بودن نمونه گیاه اطمینان حاصل شد. رازیانه پودر شده به نسبت حجمی ۱:۱ با استفاده از اتانول 96° به روش خیساندن، سه بار هر مرتبه به مدت یک شب، بدون استفاده از حرارت، عصاره گیری و حلال در حرارت

نوبت در روز غذادهی گردیدند. در تمامی تیمارها بیومتری هر ۱۵ روز جهت اندازه گیری رشد بر اساس فاکتور وزن تکرار شده و تغذیه ماهی ها تا ۱۳۳ روز ادامه یافت. با افزایش سن ماهی ها و حجیم شدن بدن جنس های ماده، زایشگاه های تهیه شده برای هر گروه درون آکواریوم ها نصب گردید تا پس از تولد نوزادان از خورده شدن آنها توسط والدین ممانعت گردد. با شروع تولد نوزادان، تعداد نوزادان متولد شده در هر آکواریوم به مدت یکماه ثبت گردید.

آنالیز آماری

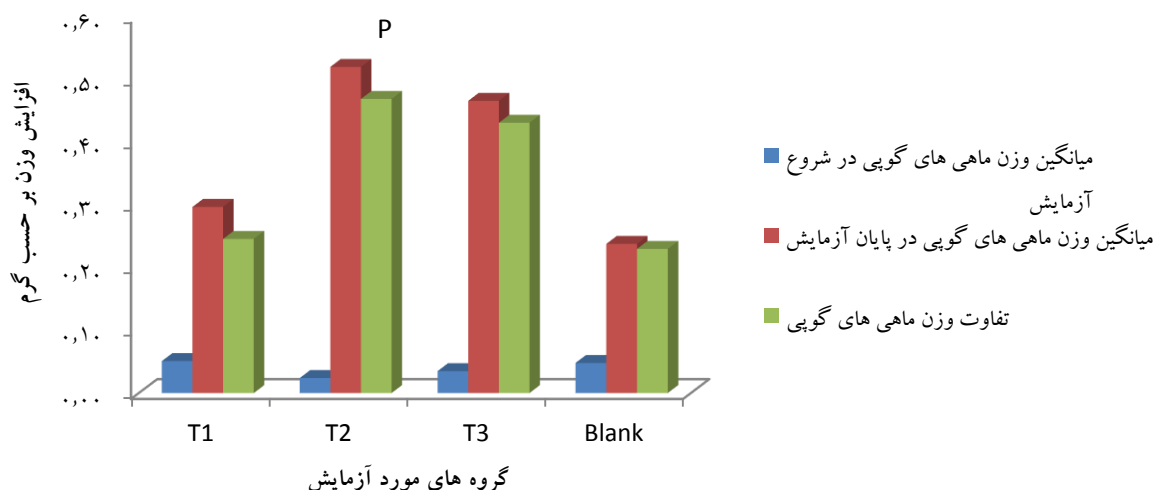
اطلاعات حاصل از بیومتری های گروه های ۱۲ گانه و هم چنین تعداد نوزادان متولد شده در هر گروه با

استفاده از آزمون Repeat Measure (آزمون تحلیل واریانس با اندازه گیری های مکرر) در سطح انحراف معیار ۰/۰۵. آنالیز گردیدند.

نتایج

نتایج حاصل از تاثیر عصاره رازیانه بر روی رشد ماهی گویی در سه گروه تیمار و یک گروه شاهد هر کدام با سه تکرار در طول ۱۳۳ روز دوره آزمایش در شکل ۱ نشان داده شده است.

تیمار اول شامل ۹۰ عدد ماهی در سه گروه با میانگین وزنی 0.051 ± 0.002 غذای شماره یک با $\mu\text{l/g}$ ۷۵ عصاره رازیانه را دریافت کرد. این گروه پس از اتمام دوره رشد به میانگین وزنی 0.297 ± 0.144 رسید.



شکل ۱: نمودار مقایسه افزایش وزن گروه های مختلف ماهی گویی در طول آزمایش

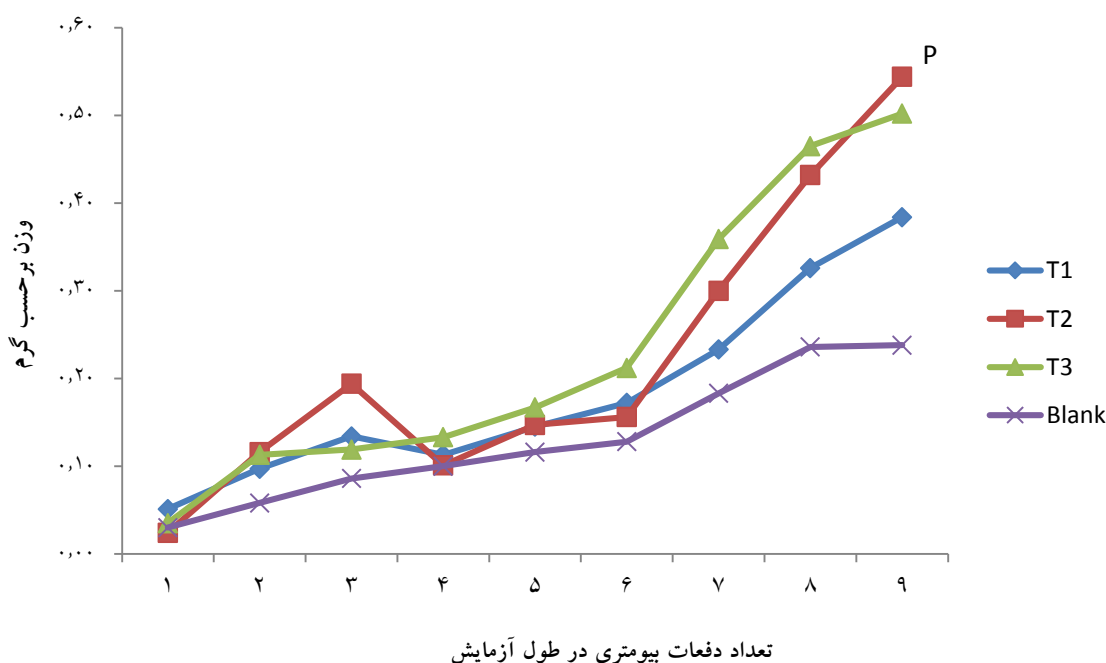
تیمار سوم نیز همانند دو تیمار قبلی با ۹۰ عدد ماهی در سه تکرار با میانگین وزنی 0.001 ± 0.035 ، پس از ۱۳۳ روز تغذیه با غذای شماره ۳ حاوی

تیمار دوم شامل سه تکرار هر کدام ۳۰ عدد ماهی با میانگین وزنی 0.002 ± 0.024 غذای شماره دو با $100 \mu\text{l/g}$ عصاره رازیانه را دریافت نمود. میانگین افزایش وزن در این تیمار به 0.520 ± 0.172 رسید. در

۱۲۵ µl/g عصاره رازیانه، به میانگین وزنی ۰/۴۶۶±۰/۱۱۷ رسیدند.

گروه شاهد در ۳ تکرار و ۹۰ قطعه ماهی با میانگین وزنی ۰/۰۲±۰/۰۲۹ و استفاده از غذای بدون عصاره رازیانه به وزن ۰/۲۳۸±۰/۰۱۰ رسیدند.

شکل ۲ نمودار میانگین رشد در طول ۱۳۳ روز در گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد. بر اساس این نمودار



شکل ۲: مقایسه تغییرات وزن ماهی گوپی در گروه‌های مختلف در طول دوره آزمایش

۱۰۹ روز رخ داد و در نهایت ۵۰ نوزاد در این تیمار به- دنیا آمدند که به‌طور میانگین ۱۶/۶۷ قطعه بچه ماهی به ازای هر گروه می‌باشد. در تیمار سوم اولین بچه ماهی پس از گذشت ۱۰۴ روز متولد و نهایتاً ۱۳ عدد بچه ماهی و به‌طور میانگین ۴/۳۳ به‌دنیا آمد (شکل ۳).

در گروه شاهد که با غذای بدون عصاره رازیانه تغذیه گردید اولین تولد پس از ۱۱۴ روز اتفاق افتاد و نهایتاً ۱۱ نوزاد به‌طور متوسط در این گروه متولد شدند. با استفاده از آزمون Repeat Measure تفاوت بین

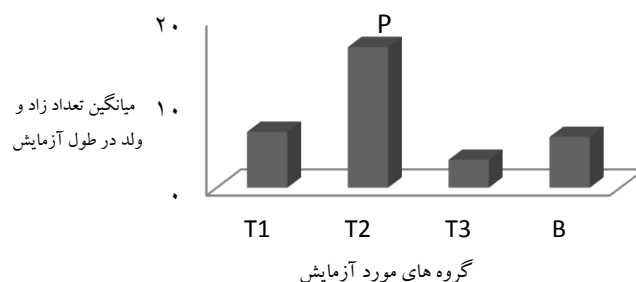
زادآوری

در این تحقیق تاثیر مقادیر مختلف عصاره رازیانه بر زمان بلوغ و تعداد نوزادان متولد شده ماهی گوپی بررسی گردید. با توجه به پائین بودن سن ماهیان انتخابی، اولین نوزاد در تیمار ۱ و پس از گذشت ۱۰۲ روز از شروع دوره آزمایش متولد شد. در این تیمار تا پایان دوره آزمایش مجموعاً ۲۰ نوزاد متولد گردید که به‌طور میانگین به ازای هر گروه ۶/۶۷ قطعه بچه ماهی می‌باشد. در تیمار تیمار ۲ اولین تولد پس از گذشت

تعداد نوزادان متولد شده در ۴ گروه از لحاظ آماری در سطح $P < 0/05$ بررسی و نتایج زیر به دست آمد (شکل ۳).

در بین تیمار ۱ و ۲ تفاوت بین میانگین زاد و ولد معنی دار بود ($P = 0/3$). در بین تیمارهای ۲ و ۳ نیز

اختلاف معنی دار به دست آمد ($P = 0/012$). هم چنین بین تیمار ۲ و گروه شاهد اختلاف معنی دار ($P = 0/023$) ارزیابی گردید.



شکل ۳: مقایسه میانگین زاد و ولد ماهی گوپی در تیمارهای مختلف و گروه شاهد

بحث

طی سالیان متمادی درمان با گیاهان داروئی اساس و حتی در برخی موارد تنها طریق درمان بیماری‌ها در انسان و دام‌های اهلی محسوب می‌شده است. از کاربرد گیاهان داروئی در صنعت آبرزی پروری مدت زمان زیادی نمی‌گذرد. به عنوان مثال گل میخک در بیهوشی آبزبان مدت کوتاهی است که به کار برده می‌شود (مهرابی، ۱۳۸۰). گیاهان داروئی با داشتن کمترین عوارض جانبی بر روی آبزبان می‌توانند کاربرد فراوانی در درمان بیماری‌ها و یا به صورت مکمل‌های غذائی جهت افزایش رشد و یا افزایش میزان تکثیر و هم چنین بازماندگی تخم‌ها و لاروها داشته باشند. در این تحقیق، تاثیر عصاره رازیانه بر رشد و تولید مثل ماهی گوپی برای اولین بار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل پس از ۱۳۳ روز تغذیه ماهی‌ها با میزان مختلف عصاره نشان دهنده تاثیر معنادار عصاره رازیانه بر افزایش وزن

ماهی گوپی می‌باشد. این تاثیر در مقادیر مختلف عصاره متفاوت بوده است. بیشترین تاثیر عصاره تیمار ۲ مشاهده شد. ارتباط بین افزایش وزن ماهی گوپی با افزایش تولید مثل در گروه‌های دریافت کننده عصاره نیز مشاهده گردید. به عبارت دیگر میزان تولید مثل در تیمار ۲ که دارای رشد بیشتری بوده، افزایش معناداری نسبت به دیگر گروه‌ها داشته است. با توجه به ترکیبات شیمیائی موجود در عصاره رازیانه می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که فیتواستروژن‌های موجود در عصاره رازیانه نقش به سزائی در تغییرات ایجاد شده در گروه‌های مختلف مورد آزمایش داشته است. این تغییرات در گروه شاهد مشاهده نشد.

تخم‌دان ماهی‌های خانواده پی سیلانیده همانند غدد تناسلی دیگر مهره داران توانائی تولید هورمون‌های استروئیدی را دارند. این هورمون‌ها در سلول‌های گرانولوزا که اطراف هر فولیکول در حال رشد را

است، و در تیمار ۱ دارو در حد پائین تر از حد آستانه بوده است. این موضوع در تحقیقی که بر روی گونه *Medeka (Oryzias Latipes)* انجام شد اثبات گردیده است و تاثیرات فیتواستروژن‌ها در حد زیر آستانه تاثیر کمی بر روی عملکرد تولید مثلی داشته است (Stefan et al., 2001).

در گونه‌های زنده‌زا، پس از بلوغ، فولیکول‌ها بلافاصله به یک اندازه نسبت به اثر القاکنندگی گنادوتروپین‌ها و استروژن حساس نمی‌شوند و در یک زمان فولیکول‌های کاملاً بالغ و فولیکول‌های لقاح یافته و جنین آماده رهاسازی همزمان در تخمدان وجود دارند (عمادی، ۱۳۸۵). در تحقیق دیگری تاثیر عصاره رازیانه بر ماهی گویی در سطح بافتی مورد بررسی قرار گرفت (نظری و همکاران، ۱۳۹۴). مقاطع بافتی تهیه شده در مراحل مختلف رشد در گروه‌های مختلف دریافت کننده عصاره، بیانگر تفاوت تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره بر توسعه بافتی و هم‌چنین تعداد فولیکول‌های موجود در تخمدان ماهی‌ها می‌باشد. به عبارتی دیگر، فیتواستروژن‌های موجود در رازیانه با استفاده طولانی مدت از آن در تغذیه ماهی گویی توانسته است تاثیرات موثری در روند تغییرات هورمونی و جنسی آن داشته باشد و باعث افزایش تعداد نوزادان شده است. نتایج تاثیر عصاره رازیانه بر ماهی گویی ماده با نتایج تحقیق Yilmaz و همکاران (۲۰۰۹) که تاثیر Genesin را بر روی گربه ماهی مطالعه نمودند مطابقت دارد. در جنس نر استروژن‌های مترشح از سلول‌های لیدینگ باعث بلوغ هرچه سریع‌تر و بیشتر اسپرماتوزوئیدهای ماهی می‌گردند (ستاری، ۱۳۸۱). در نتیجه تاثیر عصاره رازیانه بر ماهی گویی نر فعالیت سلول‌های لیدینگ افزایش یافته است. این تاثیر در تحقیق

احاطه کرده اند وجود دارند و باعث تکامل و بلوغ تخمک‌های نارس در گونه‌های زنده‌زا می‌گردند (عمادی، ۱۳۸۵). نتایج حاصل از تحقیقی که توسط Thiago و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی ماهیان خانواده Poecilidae انجام شد بیانگر این نکته مهم بود که افزایش میزان زرده در ماهیان استخوانی به واسطه افزایش تولید آن در کبد در پاسخ به هورمون ۱۷-بتا استرادیول می‌باشد. به همین دلیل تغذیه روزانه ماهی‌ها با غذای حاوی عصاره رازیانه نیز باعث افزایش بیشتر سطح استروژن‌های موجود در بدن ماهی در طول دوره آزمایش گردیده است. افزایش میزان استروژن در بدن ماهی از طریق غذا باعث افزایش سرعت تولید مثل در گروه‌های دریافت کننده نیز شده است. این تاثیر با تولد نوزادان در زمان کوتاه‌تر در گروه‌های دریافت کننده مشخص شده است.

تولد اولین نوزادها در گروه‌های تحت آزمایش با عصاره رازیانه پس از گذشت ۱۰۲ روز که مدت طولانی‌تری نسبت به حالت طبیعی و تکثیر در استخر می‌باشد نشان می‌دهد که فیتواستروژن‌ها تاثیر ضعیف‌تری در مقایسه با بتااسترادیول‌ها دارند. در تحقیقی که با عنوان تاثیر فیتواستروژن‌های گیاهی بر روی ماهی خاویاری سیری Siberian Sturgeon توسط Pellisero و همکاران (۱۹۹۱) انجام شد مشخص گردید که تاثیر فیتواستروژن‌های گیاهی مشابه اما ضعیف‌تر از تاثیر ۱۷-بتا استرادیول می‌باشد. تفاوت تعداد تولدها و هم‌چنین افزایش رشد در بین گروه‌های تحت آزمایش نشان داد که در تیمار ۲ بیشترین میزان رشد و تولد رخ داده است. این نکته بیانگر این موضوع است که مقدار داروی استفاده شده در این گروه به‌عنوان مقدار دارو در حد آستانه بوده

نظری و همکاران در سال ۱۳۹۴ تایید شده است. این نتایج با نتایج حاصله از تحقیق Kinnberg و Toft (۲۰۰۳) که تاثیر فیتواستروژن‌ها و همچنین بتا استرادیول را بر روی ماهی‌های گوبی نر بالغ بررسی کرده‌است مطابقت دارد.

با توجه به نتایج حاصل از این طرح و مقایسه آنها با نتایج قبلی، میتوان چنین نتیجه گیری نمود که عصاره رازیانه حاوی فیتواستروژن‌هایی است که تاثیراتی مشابه با ۱۷- بتا استرادیول‌های سنتتیک دارد و میتوان از آن در صنعت آبرزی پروری خصوصا ماهیان زینتی در راستای افزایش باروری و رشد استفاده نمود. همچنین پیشنهاد می‌شود تاثیر رازیانه بر روی دیگر آبزیان پرورشی به لحاظ رشد و باروری بررسی و مطالعه گردد.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم که از زحمات تمام کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نمایم.

منابع

۱. پورعباس، س.، کسمتی، م.، راسخ، ع.ر.، ۱۳۹۰. بررسی اثرات ضد اضطرابی گیاه رازیانه و نقش احتمالی سیستم گابا آرژیک و گیرنده‌های استروژن در این اثرات در موش‌های صحرایی ماده. مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی، ۱۵(۱)، ۱۳۴-۱۴۳.
۲. ترک زهرانی، ش.، اخوان امجدی، م.، مجاب، ف.، علوی مجد، ح.، ۱۳۸۶. بررسی تأثیر عصاره رازیانه (*Foeniculum vulgare*) بر دیسمنوره اولیه. فصلنامه باروری و ناباروری، ۸(۱)، ۵۲-۴۵.

۳. حاجی شریفی اصفهانی، ا.، ۱۳۸۶. اسرار گیاهان دارویی، انتشارات حافظ نور، چاپ هفتم، ۱۹۰-۱۷۴.
۴. ستاری، م.، ۱۳۸۱. ماهی شناسی (۱). رشت، انتشارات نقش مهر و دانشگاه گیلان. ۴۵۷ صفحه.
۵. شیخان، م.، ۱۳۸۱. زندگی ماهیان آکواریومی، مشهد، انتشارات آستان قدس رضوی. ۱۱۵ صفحه.
۶. عمادی، ح.، ۱۳۸۵. زنده‌زائی در جانوران، تهران، انتشارات علمی آریان، ۱۰۲ صفحه.
۷. مهربانی، ی.، ۱۳۸۰. پودر گل میخک، جایگزین طبیعی تری کابین متان سولفونات. مجله دانش بومی و توسعه. ۱(۳ و ۴).
۸. نورمند، ل.، آلبوغیش، ن.، نجف زاده، ح.، ۱۳۸۷. بررسی مقایسه‌ای اثرات عصاره گیاه رازیانه (فیتواستروژن) به عنوان یک داروی پیشگیری کننده از استئوپروز و استرادیول والرات (استروژن سنتتیک) بر روی ساختار بافتی سرویکس و واژن بعد از برداشت تخمدان موش صحرایی. پانزدهمین کنگره دامپزشکی ایران.

9. Kim, S.H., Park, M.J., 2012. Effects of phytoestrogen on sexual development. Korean J Pediatr. 55(8), 265-271.
10. Kinnberg, K., Toft, G., 2003. Effects of estrogenic and antiandrogenic compounds on the testis structure of the adult guppy (*Poecilia reticulata*). Ecotoxicol Environ Saf., 54(1), 16-24.
11. Nazari, A, Roozbehani, S., 2015. Influence of Fennel *Foeniculum Vulgar* Extract on Fertility, Growth rate and Histology of Gonads on Guppy *Poecilia reticulata*. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 15: 463-469.
12. Pelissero, C., Bennetau, B., Babin, P., Le Menn, F., Dunogues, J., 1991. The estrogenic activity of certain phytoestrogens in the siberian sturgeon *Acipenser baeri*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 38, 293-299.
13. Sadrefozalayi, S., Farokhi F., 2012. Histological studies on the PCO ovaries treated by aqueous fennel extract. Abstracts of 3rd

- (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). Pesq. Vet. Bras. 31(1), 87-93.
17. Yılmaz, E., Cek, S., Mazlum, Y., 2009. The Effects of Combined Phytoestrogen Administration on Growth Performance, Sex Differentiation and Body Composition of Sharptooth Catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 9, 33-37.
 18. ZHAO, E., Qing, M.U., 2010. Phytoestrogen Biological Actions on Mammalian Reproductive System and Cancer Growth. Sci Pharm. 79, 1-20.
 - International and 18th National Congress of Iranian Society for Reproductive Medicine.
 14. Stefan, S., Gutzeit H.O., 2001. Lasting Effects of Xeno- and Phytoestrogens on Sex Differentiation and Reproduction of Fish. Environmental Sciences. 8, 57-73.
 15. Tham, D.T., Gardner, C.D., Haskell, W.L., 1998. Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. J Clin Endocrinol Metab. 83(7), 2223-2235.
 16. Rocha, T.L., Yamada, Á.T., Costa, R.M., Sabóia-Morais, S. M.T., 2011. Analyses of the development and glycoproteins present in the ovarian follicles of *Poecilia vivipara*