Archive of SID

مقایسه تأثیر عصاره اتانولی ریزوم گیاه خولنجان (*Alpinia officinarum*)و ۱۷- آلفا متیل تستوسترون بر شاخص های کیفی اسپرم درماهی مولی نر بالغ (*Poecilia latipinna*)

طاهره ناجی [۱]*؛ همایون حسین زاده صحافی [۲]؛ سمیرا بنفشی [۱]

tnaji2002@gmail.com

۱-گروه علوم پایه ، واحد علوم دارویی ، دانشگاه آزاد اسلامی ، تهران ، ایران.

۲-سازمان تحقیقات شیلات ، تهران ، ایران .

تاریخ دریافت: اردیبهشت۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: تیر۱۳۹۴

چکیده

در این تحقیق اثرات ۱۷- آلفا متیل تستوسترون و عصاره گیاه خولنجان بر سیستم تولید مثلی و سیستم آدرنال (هورمون کورتیزول) در ماهی مولی بالغ نر بررسی شد. بدین منظور ، پس از کلر زدایی آب آکواریوم ها ، ۱۰۰ عدد ماهی نر بالغ مولی با میانگین وزنی ۱±۳گرم در آکواریوم رها شد . سازگاری ماهی ها به مدت ۴۸ ساعت انجام شد . سپس فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب مثل دما ، pH ، سختی آب و فشار اکسیژن محاسبه شد . آزمایش در ۱۰ گروه انجام شد . (۲ گروه کنترل و ۸ گروه تیمار) هر گروه شامل ۱۰ عدد ماهی نر و بالغ بود . ماهیان تیمار خولنجان ، عصاره گیاه با مقادیر ۱۰، ۲۰ ، ۳۰ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم و ماهیان تیمار ۱۷- آلفا متیل تستوسترون با مقادیر ۱ ، ۵، ۱۰و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت کردند . تزریق بصورت داخل عضله ای در عضله زیرباله پشتی ، بصورت ۱ روز در میان و به مدت ۲۰ روز انجام شد . سپس ماهی ها بیهوش شدند . بافت بیضه آن ها جدا و در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شد . آزمایشات زیست سنجی ماهی ها شامل اندازه گیری طول و وزن انجام شد . سپس مقایسه بافت شناسی بیضه تیمارها با گروه های شاهد انجام شد . نتایج نشان داد که شاخص گنادو سوماتیک در مقادیر ۳۰ و ۵۰ میلی گرم از گیاه خولنجان افزایش یافت ($P<۰/۰۱$).

کلمات کلیدی : خولنجان ، ۱۷ آلفا متیل تستوسترون ، ماهی مولی ، اسپرم ، شاخص های کیفی.

*نویسنده مسئول

www.SID.ir

Archive of SID

۱.مقدمه

سیستم تولید مثل در ماهیان همکاری مجموعه ای از دستگاههاست که تحت هدایت و فرمان سیستم عصبی و هورمونی به چرخه خود ادامه می دهد . از مهمترین فاکتورهای داخلی و یا فیزیولوژیک که بر تولید مثل ماهی مؤثر است می توان به فاکتورهای اندوکراینی و محور هیپوتالاموس – هیپوفیز – گناد اشاره کرد (۱) .

اختلالات جنسی و مسائل مربوط به آن از دیر باز یکی از مشکلات جامعه ی علمی و پزشکی بوده است . این اختلالات می تواند هم از نظر جسمی و هم روحی زندگی فرد را تحت تأثیر قرار دهد (۱۹). گیاهان دارویی متعددی از جمله گیاه خولنجان ، برای رفع این مشکل در طب سنتی ملل مختلف استفاده شده اند . این گیاهان از طریق اثر بر قسمت های مختلف سیستم تولید مثلی بر روی میزان اسپرماتوژنز و خصوصیات و رفتارهای جنسی مؤثرند (۲۲) .گیاهان مختلف تیره زنجبیل جهت افزایش اسپرماتوژنز و بهبود رفتارهای جنسی مورد استفاده قرار گرفته اند . بطور مثال عصاره آبی ریزوم گیاه *Alpinia calcarata* به صورت خوراکی درموش های نر باعث افزایش سطح تستوسترون خون و افزایش رفتارهای جنسی شده است (۱۷).ماهی مولی در سال های اخیر به علت شباهت بالای ژنتیکی ، فیزیولوژیک و فارماکولوژیک با انسان ، جهت ارزیابی مختلف مواد طبیعی و دارویی بکار برده شده است (۱). بطور کلی مولی ها ،ماهیان بسیار مقاومی هستند و برای حفظ جمعیت خود در مناطق زیستشان بسیار شایسته هستند . این ماهیان همه چیز خوارند و غذاهای متنوعی را می پذیرند و بطور عمده از غذای پولکی و کرم فشرده استفاده می کنند و به علت فعالیت زیاد و پرخوری دارای سوخت و ساز بدنی آنها زیاد می باشد. تکثیر این ماهی ها خیلی راحت و به سهولت انجام می شود و به خوردن بچه های خودشان زیاد علاقه نشان نمی دهند (۱).

با توجه به اینکه اثر گیاه خولنجان با نام علمی (*Alpinia officinarum*) بر سیستم تولید مثلی ماهیان تا کنون بررسی نشده ، لذا در تحقیق حاضر اثرات این گیاه برتحریک سیستم تولید مثلی ماهی مولی نر بالغ (*Poecilia latipinna*) ، مورد بررسی قرار گرفت .

۲. مواد وروش ها

این تحقیق در سال ۱۳۹۲ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی تهران صورت پذیرفت . ماهی مولی نر بالغ از یکی از کارگاه های پرورش ماهیان زینتی در تهران تهیه گردید . این ماهیان در یک گروه تکثیری بودند . فاکتورها ی فیزیکوشیمیایی آب در آغاز ، میانه وپایان آزمایشات اندازه گیری گردید . دما بین ۲۸-۲۴ درجه سانتی گراد ، pH بین ۸-۷ و درجه سختی بین ۱۰۰-۵۰ میلی گرم در لیتر کربنات کلسیم تنظیم گردید . پس از کلرزدایی آب آکواریوم ها ، ماهیان نر بالغ با دامنه وزنی ۱±۳گرم در آب رها سازی شده و به مدت ۷۲ ساعت با محیط سازگار شدند . آزمایش در ۱۰ گروه (۲ گروه شاهد و ۸ گروه تیمار) در ۳ تکرار که هر گروه شامل ۱۰ عدد ماهی نر بالغ بود انجام گرفت . غلظت های مختلف ۱۰،۲۰،۳۰و ۵۰ میلی گرم در هر کیلو گرم وزن بدن برای گیاه خولنجان و نیز مقادیر ۱.۵،۱۰و۲۰ میلی گرم در هر کیلو گرم وزن بدن برای ۱۷ آلفا متیل تستوسترون بود. با توجه به اینکه عصاره خولنجان پس از حل در الکل اتیلیک ، به گروه های تیمار تزریق گردید ، لذا ۰/۰۲ سی سی اتانول ۸۰ درصد هم به ماهیان گروه کنترل تزریق گردید . گروه شاهد نیز بدون تزریق بود . تزریق ها به صورت عضلانی و یک روز در میان پس از بیهوش کردن ماهیان با PI_{222} (شرکت پارس ایمن دارو)

www.SID.ir

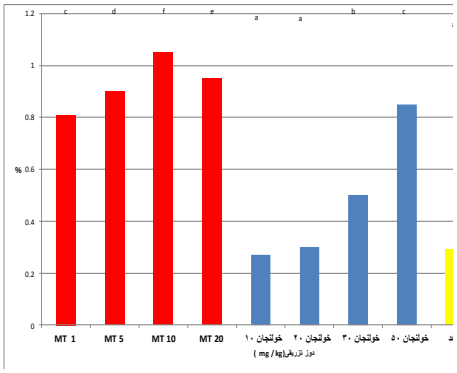
Archive of SID

در عضله زیر باله پشتی صورت گرفت (۲). پس از تزریق، ماهی های هر گروه در آکواریوم مربوطه رهاسازی شدند . همه تیمارها روزی یکبار بررسی می شدند تا ماهیان مرده از آکواریوم ها خارج گردند.آزمایشات سه بارتکرارشد. در طول آزمایشات برای کنترل شرایط محیط تمام فاکتور های فیزیکو –شیمیایی نظیر اندازه گیری اکسیژن،pH ،درجه حرارت و سختی آب اندازه گیری شد. در پایان روز هفتم ، ماهی ها با استفاده از PI_{222} مجدداً بیهوش شده ، سپس با استفاده از خط کش زیست سنجی (طول استاندارد) و ترازوی دیجیتال (با دقت ۰/۰۱ گرم)(وزن) کل مورد بررسی قرار گرفت . سپس ماهیان بیهوش شده و بافت بیضه آنها خارج شد . پس از توزین بیضه ها به تفکیک هر تیمار ، تعدادی بیضه از هر تیمار به عنوان نمونه در محل فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد و پس از انجام مراحل پاساژ بافت ، برش گیری با دستگاه میکروتوم به ضخامت ۸ میکرومترو رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلین ائوزین در زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند . سپس شاخص گنادی ، GSI بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید . که در آن Wg وزن گنادو و W ، وزن کل بدن ماهی است (۱۱) .

$$GSI = \frac{wg}{w} \times 100$$

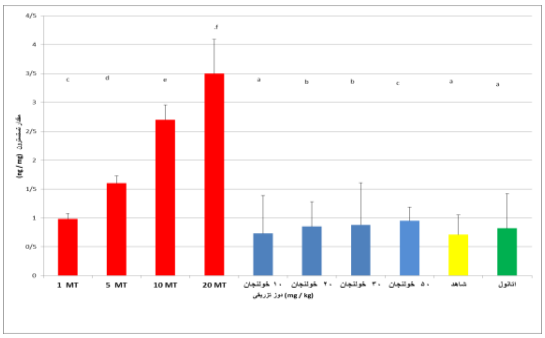
جهت تجزیه و تحلیل داده ها و بررسی معنی دار بودن اختلافات مشاهده شده در تیمارهای مختلف از نظر شاخص گنادوسوماتیک (GSI) و سایر موارد بررسی شده ، از نرم افزار SPSS و روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One – way ANOVA) و مقایسه میانگین توسط آزمون دانکن استفاده شد . برای ترسیم نمودار نیز از نرم افزار Excel استفاده گردید .

۳.نتایج



شکل ۱ . مقایسه شاخص رشد گنادی (GSI%) در تیمارهای مختلف پس از انجام تزریق (انحراف معیار ± میانگین) با سطح اطمینان ۹۵٪

شاخص رشد گنادی در تیمارهای مختلف در شکل ۱ نشان داده شده است. در دو تیمار ۳۰ و ۵۰ میلی گرم بر کیلو گرم خولنجان ، افزایش این شاخص دیده شد (P< ۰/۰۱).

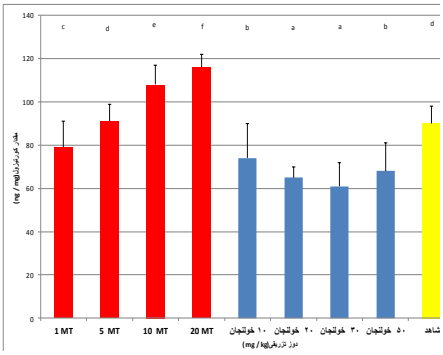


شکل ۲ . مقایسه ی میزان تستوسترون در تیمارهای مختلف. (انحراف معیار ± میانگین) با سطح اطمینان ۹۵٪ .حروف یکسان نشان دهنده معنی نبودن وحروف غیر یکسان نشان دهنده معنی دار بودن داده ها می باشد.

میزان تستوسترون درتیمارهای مختلف درشکل ۲ نشان داده شده است.میانگین تستوسترون در کلیه ی تیمارهای خولنجان به میزان کمی افزایش یافت.

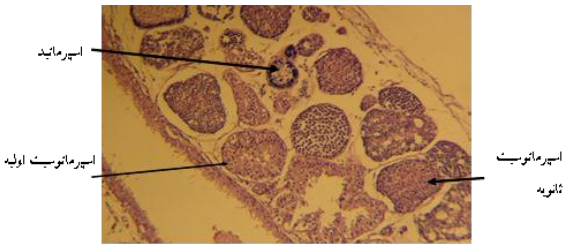
www.SID.ir

Archive of SID

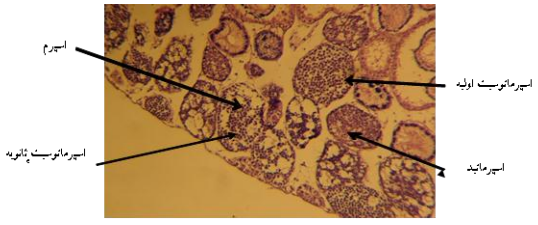


شکل ۳ . مقایسه میزان کورتیزول در تیمارهای مختلف پس از انجام تزریقات .(انحراف معیار ± میانگین) با سطح اطمینان ۹۵

میانگین کورتیزول در تیمارهای مختلف در شکل ۳ نشان داده شده است که در تیمارهای خولنجان کاهش و در تیمارهای ۱۷ آلفا متیل تستوسترون افزایش یافته است و با تیمارهای شاهد اختلاف معنادار دارد($P<0/01$) .

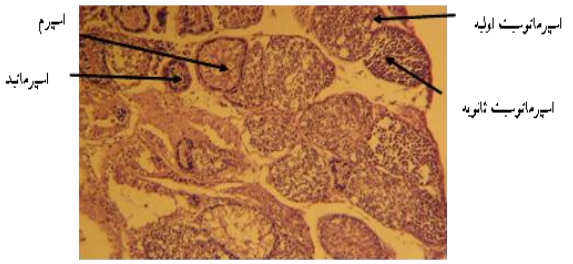


شکل ۴. مقطعی از بافت بیضه گروه شاهد ، مراحل ابتدای بلوغ اسپرماتوزوئیدها ، تعدادی لوبول حاوی اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتوسیت ثانویه وهمچنین اسپرماتید دیده می شود (رنگ آمیزی H&E ، بزرگنمایی ۴۰×)



شکل ۵. مقطعی از بافت بیضه گروه کنترل (تزریق اتانول) ،مراحل ابتدایی بلوغ اسپرماوزوئیدها تعدادی لوبول حاوی اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتوسیت ثانویه

، اسپرماتید و توده ی اسپرم (رنگ آمیزیH&E، بزرگنمایی ۴۰×)



شکل ۶. مقطعی از بافت بیضه تیمار خولنجان ۵۰ $\frac{mg}{kg}$ ، مراحل انتهایی بلوغ اسپرماتوزئیدها لوبول ها بیشتر حاوی توده اسپرم (رنگ آمیزیH&E، بزرگنمایی ۴۰×)

مقایسه ی مقاطع بافتی تیمارهای خولنجان با گروه شاهد و گروه کنترل نشان داد که تعداد لوبول های حاوی اسپرم در مقادیر بالای خولنجان افزایش یافت.

۴.بحث و نتیجه گیری

بررسی نتایج حاصل از درصد شاخص گنادی حاکی از آن است که گیاه خولنجان باعث افزایش این شاخص شد و در اثر افزایش مقدار عصاره گیاه، این شاخص به میزان بیشتری افزایش یافت . همچنین هورمون ۱۷- آلفا متیل تستوسترون نیز باعث افزایش شاخص گنادی شد که با تیمارهای شاهد اختلاف معنی دار داشت($P<0/01$) و میزان این افزایش ، از شاخص رشد گنادی تیمارهای۱۷- آلفا متیل تستوسترون بیشتر بود ولی در مقدار ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم کاهش میزان GSI ایجاد شد که این به دلیل اثر سمیت ۱۷- آلفا متیل تستوسترون در غلظت های بالا ایجاد شد (شکل ۱) . نتایج حاصل از سنجش هورمونی حاکی از آن است که عصاره گیاه خولنجان و همچنین ۱۷- آلفا متیل تستوسترون در ماهی گردیدند . ولی ، باعث افزایش سطح تستوسترون ۱۷- آلفا متیل تستوسترون افزایش بیشتری در میزان

www.SID.ir

Archive of SID

تستوسترون ایجاد کرد (شکل ۲) .همچنین در مورد سطح خونی هورمون کورتیزول ، مشاهده شد که عصاره گیاه خولنجان باعث کاهش سطح کورتیزول شد و در واقع اثر آرام بخشی و کاهش استرس روی ماهی ها داشت که این کاهش استرس در دوز ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم بیشتر از بقیه بود و با سایر مقادیر دارای اختلاف معنی دار بود ($P<۰/۰۱$) . در حالی که تیمارهای ۱۷- آلفا متیل تستوسترون ، در سطح کورتیزول خونشان نسبت به گروه شاهد افزایش قابل توجهی مشاهده شد ($P<۰/۰۱$) (شکل ۳) .نتایج بافت شناسی بیضه نشان داد که گیاه خولنجان باعث افزایش بلوغ سلول های جنسی در لوبول های بیضه شد و همچنین ۱۷- آلفا متیل تستوسترون نیز باعث افزایش بلوغ اسپرم ها در لوبول های بیضه شد و با افزایش دوز ، به تدریج تعداد لوبول های حاوی اسپرم و اسپرماتید، افزایش یافت . این افزایش هم در اثر تزریق عصاره گیاه و هم در اثر تزریق ۱۷- آلفا متیل تستوسترون مشاهده شد ولی تاثیری که ۱۷- آلفا متیل تستوسترون در بلوغ اسپرم ها داشت از اثر عصاره گیاه بیشتر بود (شکل ۶) .در سال 2005*Ratnasooria* و همکارانش با آزمایشی که بر روی موش های نر انجام دادند ، با دادن عصاره آبی گیاه *Alpinia calcarata* به این حیوانات به صورت خوراکی مشاهده کردند که در مقادیر پایین ۱۵۰mg/kg و ۲۵۰ تغییرات زیادی از لحاظ رفتارهای جنسی در حیوانات مورد آزمایش مشاهده نشد . ولی در غلظت های بالاتر شامل ۵۰۰ mg/kg افزایش سطح تستوسترون و رفتارهای جنسی و میزان اسپرماتوژنز در آن ها مشاهده شد که این مشاهدات اثرات افزایش باروری و توانایی جنسی را نشان داد . که افزایش میزان اسپرم بدلیل اثرات افزاینده گیاه در سطح تستوسترون خون در حیوانات بوده است (۱۷) . همچنین *Mura* و همکارانش در سال 1991 با مطالعه ای که روی ماهی *Anguilla japonica* انجام دادند با کشت بیضه ماهی در محیط حاوی ۱۰ میلی گرم بر میلی لیترهورمون ۱۱- کتوتستوسترون انجام دادند بعد از ۲۱ روز شاهد بلوغ بیضه و افزایش اسپرماتوژنز در آن شدند . تستوسترون از طریق اثر بر سلول های سرتولی باعث تولید هورمون های دیگر می شود که این هورمون ها باعث پیشرفت اسپرماتوژنز می شوند (۱۶). *Walla* و همکارانش در سال ۲۰۱۲ ،مطالعه ای روی ماهی *O.niloticus* انجام دادند ومشاهده کردند که استفاده از ۱۷- آلفا متیل تستوسترون به ماهی پس از ۶ ماه باعث افزایش وزن ماهی ها شد ولی کاهش قابل ملاحظه ای در *GSI* ایجاد نکرد (۸) .همچنین در این ماهی ها کاهش قابل ملاحظه ای در سطح تستوسترون مشاهده نشد (۲۱). همچنین در این آزمایش اختلاف معنی داری از لحاظ وزن در تیمارهای مختلف تستوسترون مشاهده نشد. *Little & Edward* در سال 2004 نشان دادند که افزایش وزن ناشی از ۱۷-آلفا متیل تستوسترون در نرها بیش تر از ماده ها بود (۱۳) . افزایش وزن در نرها به دلیل اثر آندروژن های آنابولیک بر فاکتور رشد شبه انسولین است . *Riley* و همکارانش در سال 2004نشان دادند که این ماده باعث ازدیاد تولید پروتئین در ماهیچه ها ، از طریق افزایش بیان ژن تولید پروتئین در سلول های ماهیچه ای می شود (۱۸). *Lone & Matty* در سال 1980 نشان دادند که ۱۷-آلفا متیل تستوسترون باعث افزایش هضم غذاهای پروتئینی می شود و از این طریق رشد ماهی را افزایش می دهد(۱۴). Higgs و همکاران در سال ۱۹۷۶ دریافتند که ۱۷-آلفا متیل تستوسترون باعث افزایش تولید هورمون رشد در ماهی سالمون گردید (۱۰).در سال ، Abdelhamid, 2009 و همکارانش مشاهده کردند که تستوسترون اگزوژن ، تولید هورمون گنادتروپین از هیپوفیز را سرکوب می کند و مانع تولید هورمون طبیعی و اندروژن

www.SID.ir

Archive of SID

در مـــاهی تیلاپیـــا گردیـــد (۳).در مطالعـــه ی EL-Halawany در سال ، 2002مشاهدات هیستولوژیک بین گروههـای تیمـار تستوسـترون و گـروه کنتـرل تفـاوت قابـل ملاحظـه ای مشـاهده نشـد (۹). در حـالی کـه *Mehrim* و همکارانش در سال 2006تغییرات غیر نرمال هیسـتولوژیک را در تیمارهای ۱۷-آلفامتیل تستوسترون مشاهده کردند کـه شامل تخریب سلول های جوانه ای و لوله های اسپرم بر بـود (۱۵).در سال Dailiah,2011 با آزمایشی که روی رت های نر و ماده انجام داد مشاهده کرد که بـا دادن ترکیبـی از عصاره چند گیاه که شامل گیـاه (*Alpinia calcarata*) بود ، پس از ۴۵ روز افزایش قابل ملاحظه ای در وزن مـوش ها نسبت به گروه کنتـرل مشـاهده شـد (۸).در سـال 2012 *Sotoh* و همکارانش بـا پژوهشـی کـه انجـام دادنـد ، نشـان دادنـد کـه بخـار عصـاره گیـاه(*Alpinia zerumbert*)درموش سوری باعث کاهش اضطراب و استرس مـی شـود (۲۰). در مطالعه ای کـه در سـال 2011توسـط Andrea و همکارانش انجام شد ، نسبت تستوسـترون بـه کـورتیزول در بزاق ۱۷۸ نمونه انسان بالغ ، اندازه گیری شد و مشـاهده شـد که این نسبت درمشکلات روحی فرد تغییری نمی کند(۵) . در مطالعـه دیگـری کـه در سـال ۲۰۰۵ توسـط *Kayek* و همکارانش انجام گرفت میزان کـورتیزول و تستوسـترون در حالت استراحت و در هنگام ورزش کردن اندازه گیری شـد و میـزان هـر دو هورمـون در حالـت ورزش کـردن افـزایش یافت (۱۲) .در حالی کـه Bambino و Hsueh در سـال 1981 و همکارانش و Cumming در سـال 1983 نشـان داده بودند که با افزایش کورتیزول در هنگام ورزش ، میزان تستوسـترون کـاهش مـی یابـد (۶,۷) .در حـالی کـه تحقیـق Kayek مشـخص شـد کـه میـزان تستوسـترون در هنگـام استراحت پایین است . یعنی در هنگام ورزش کردن ایـن دو هورمون با هم ارتباط منفی معنی داری داشته ولی در هنگـام استراحت ارتباطی بین آن ها مشـاهده نمـی شـود (۱۲) . ایـن نشان می دهـد کـه مقـادیر بـالای کـورتیزول باعـث کـاهش تستوسترون می شود و در واقع با هم رابطه ی عکس دارند.

منابع

۱.نـوری مـوگهی ، م. ح. ، نبـوی ، م .ب . ، محمـد زاده ثاقـب، ح.ر. ، حیـدری ، ز. ،مروتـی ، ح . ، موحـد نیـا ، ع.۱۳۹۰. فیزیولوژی ماهیان . انتشارات دانشگاه تهران . ص ۱۰۰ .

۲.ناجی، ط. ،حسین زاده، ه ، صـفاری، م. ۱۳۹۳.بررسـی اثـرات فیتـو اسـتروژنی عصـاره بابونـه (*Matricaria recutita*) بـر رشـد ورسـیدگی اووسـیت هـای مـاهی گـــورامی ســـه خـــال (*Trichogaster trichopterus*).مجله علمی شیلات ایران . سال بیست وسوم. ص۹۵-۸۵ .

3.Abdelhamid, A.M., A. I . Mehrim., M. F.O.Salem and H.A.Eyosuf . 2009. All male mono sex Nile Tilapian (*Oreochromis niloticus*), pros and cons. Egypt Basic AppI. Physioil . 8 :P41-57 .

4.Abdelhamid , A.M., Khalili, F,F and El barbarg, M.1998. Effect of using graded levels of gibberellic acid in diets differing in the crude protein levels on performance and chemical composition of Nile tilapia fingerlings . Egypt. J. quat . Biol & Fish . 2:P 221-233.

5. Andrea , G ., A. Raine ., Robert A., Schug, Yu Gao ., Douglas, A and Granger,B. 2011. Increase tetosterone to cortisol in psychopathy . J. Abmnorm psychol.120 :P389-399.

6.Bambino, TH and Hsueh AJ.1981. Direct inhibitting effect of Glucocorticoids upon testicular luteinizing hormone receptor and steroidogenesis invivo and in vitro . Endocrinology.108.

www.SID.ir

Archive of SID

7.Cumming, D.C., Quigey , M.E and Yen , S.C.1983. Acute suppression of circulating testosterone levels by cortisol in men.
8.Dailiah Roopha, P. 2011. Natural product antioxidants for oxidative stress induced by xenobiotics in the reproductive physiology of wistar rats . thesis of Ph.D. 5.P.20-43 .
9.El- Halawany , M. 2002. Effect of treatment with 17- α methyl testosterone on growth performance feed and nutrient utilization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): M.V. sc. Thesis (animal production).110.
10.Higgs, D.A., Donaldson , E. M., Dye H.M and Mc bride, J.R.1976. Influence of bovine growth hormone and L-thyroxine on growth , muscle composition and histological structure of the gonads, thyroid, pancreas and Pituitary of Coho salmon(*Oncorhychus kisutch*) Res. Board can . 22:P 1585- 1603.
11.Htun- Han , C.1997. The Reporduction biology of the dablimnda in the north sea gonodosmoatic index, hepato somatic index and condition factor . Fish Biol .13:P 369-378 .
12.Kayek, B., Anexaw, M. and Anthong, C. 2005 . Relationship Between Circulating cortisol and tetesostrone in fluence of physical exercise. Journal of sport science and medicine .4:P7.83.
13.Little , D and Edwards , D.2004. Impact of nutrition and season on pond culture A., performance of monosex and minex – sex Nile Tilapia. Aquaclature .232: P279-292 .
14.Lone , K.D. and Matty , A.1980 . The effect of feeding methyltestostrone on growth and body comparison of common crap (*Cyprinus carpio*): Gen. Comp. Endocri . 40: P704-424 .
15.Mehrim , A. I ., Abdelhamid, A.M., Abdou- shousha, A., Salem , M.F.I and El-sharawy .2006. Nutritious attempts to detoxify aflatoxin daiets of tilapia fish . Clinical , Biochemical and Histological Parameters .Journal of the Arabian aquaculture society .1:P69-90
16.Mura, T., Yamuchi. K., Takahashi . H., Nagahama. Y.1991. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the mal Japanese eel (*Anguilla japonica*) proc. Natl . Acal . USA. 88 : P5774-5778 .
17.Ratnasooria, W.D. and Jayakody . J. 2005. Effects of Aqueos extract of Alpina calcarata Rhizomes on reproductive competence of male rats . Acta biologica Hungarica. 57:P23-35 .
18.Riley, L.G., Hirano, T and Grau, E.G. 2004. Estradiol 17. Beta and dihydro testosterone differentially regulate vitelogenine and insulin like growth factor –I Production in primary hepatocytes of tilapia *Oreochromis mossamibicus*. Comp. biochem. Physiol. C, toxicol . pharmaco. 138 : P177-186 .
19.Sharma,V., Thakar, M., Singh chauhan,N.,Kumar dixio,v. 2009.Evaluation of the anabolic, aphrodisiac and reproductive activity of Anacyclus pyrethrum DC in male ruts. Scientia pharmaceurica.77: P97-110 .
20. Sotoh,M., shuichi, L., Etsuko, k and ken- ichi y. 2012 . Effects of exposure to plant derived odorants on behavior on the concentration of stress – related hormones in steers isolated under a novel invironment . animal science invironment . 84:P159-164 .
21.Wala ,M ., Salah, El., Din Azab, M.E., Hindi,A.D., Shaheen , A. 2012. Some physiological studies on induced monosex Nile tilapia using 17- α methyl testosterone. The global journal of fisheries and aqua. 5:P209-224 .
22.Wun, C., xie jing , xi., Paul pui,

www.SID.ir

Archive of SID

H.1986. Fertilize regulating agents from traditional Chinese medicine . Elsevier.5:P1-44.

www.SID.ir