

بررسی اثر عصاره هیدروالکلی گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgare*) بر بیان ژن‌های مرتبط با تولیدمثل (گیرنده استروژنی و ویتلوژنین) در ماهی ماده گورخری (*Danio rerio*)

منصوره عبدالمنافی، علی شعبانی*، رقیه صفری

گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

*نویسنده مسئول: ali_shabany@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۲۰

تاریخ دریافت: ۹۷/۴/۲۷

چکیده

در این تحقیق تأثیر استفاده از عصاره هیدروالکلی رازیانه در جیره غذایی بر بیان ژن‌های مرتبط با تولیدمثل ویتلوژنین (Vtg) و گیرنده استروژن (ER α) در جنس ماده ماهی گورخری (*Danio rerio*) بررسی شد. تعداد ۶۰۰ قطعه بچه‌ماهی گورخری با میانگین وزنی 0.1 ± 0.15 گرم در ۴ تیمار و ۳ تکرار با جیره‌ی غذایی پایه همراه با سه سطح ۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره غذایی عصاره به مدت ۶ هفته تغذیه شدند. بعد از این دوره و مشخص شدن جنسیت، جنس نر از آزمایش خارج و جنس ماده به مدت ۱ ماه به وسیله همان جیره‌های حاوی عصاره تغذیه شدند. در انتهای دوره جهت مطالعات ژنتیکی از کبد نمونه‌برداری و استخراج RNA انجام شد. برای سنتز cDNA از کیت SuPrimeScript RTase استفاده شد و cDNA حاصله با استفاده از پرایمرهای ژن‌های مذکور و ژن بتا اکتین به عنوان ژن رفرنس در Real Time PCR استفاده شد. ارزیابی بیان ژن‌ها افزایش بیان را در تیمارهای تغذیه شده با عصاره در مقایسه با تیمار کنترل نشان داد. میزان بیان ژن ویتلوژنین و گیرنده استروژن آلفا در گروه‌های تغذیه شده با تیمار حاوی ۱۰۰ و ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($P > 0.05$)، اما تیمار حاوی ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره افزایش معنی‌داری ($P < 0.05$) نسبت به دو تیمار دیگر نشان داد. نتایج نشان می‌دهد که استفاده از عصاره هیدرو الکی رازیانه می‌تواند به عنوان یک راهبرد جدید در بهبود عملکرد تولیدمثلی مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: تولیدمثل، رازیانه، ماهی گورخری، بیان ژن.

مقدمه

بچه ماهیان و پرورش می‌باشد. بنابراین کنترل کامل رسیدگی جنسی و تخم‌ریزی یک نیاز اولیه جهت سرمایه‌گذاری موفق در آبی‌پروری می‌باشد (Marimuthu et al., 2009). به‌طور کلی عوامل موثر بر رشد و رسیدگی دستگاه تولید مثل ماهیان را می‌توان به دو دسته عمده شامل عوامل داخلی (عوامل ژنتیکی، فیزیولوژیک و کلیه فرآیندهای مربوط به غدد درون‌ریز) و عوامل خارجی (نور، تغذیه، pH و نیز برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی، حرارت، شوری آب) (Hoar et al., 1983) تقسیم‌بندی نمود.

بسیاری از آبزیان که در شرایط اسارت پرورش داده می‌شوند، در فرایند تولید مثل دچار اختلال می‌شوند که علت را باید در فراهم نبودن شرایط طبیعی (بستر تخم‌ریزی، جریان آب، کیفیت آب و عمق آب) دانست که پاسخ‌های محیطی مناسب را برای تحریک در ماهیان القا نمی‌نمایند (سوداگر و همکاران،

تکثیر و پرورش ماهیان زینتی ظرف چند دهه اخیر در ایران توسعه چشم‌گیری داشته است، به‌طوری‌که در حال حاضر در ایجاد اشتغال و تجارت داخلی نقش مهمی دارد و هر ساله گونه‌های جدید و تجاری جهت تکثیر و پرورش وارد ایران می‌شود. بخش اعظم پرورش ماهیان زینتی در ایران مربوط به گونه‌های آب شیرین است (عادلی، ۱۳۸۹). در این میان ماهی زبرا (*Danio rerio*) با توجه به سهولت تکثیر و تولیدمثل و رژیم غذایی همه چیزخواری، توانسته است نظر علاقه‌مندان زیادی را به خود جلب کند و در بسیاری از آزمایش‌ها از آن به‌عنوان مدل آزمایشگاهی استفاده می‌کنند (Saddhe et al., 2013).

در بسیاری از گونه‌های قابل پرورش ماهی، غیرقابل پیش‌بینی بودن و بی‌ثباتی کارایی تولیدمثل یکی از مهم‌ترین فاکتورهای محدودکننده در تولید

کنترل محور HPG به کار روند (Albert, 1980). بهبود عملکرد تولیدمثلی در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی فیتواستروژن بر تولیدمثل تاس ماهی سیبری (*Acipenser baerii*) (Pellisero et al., 1991)، زبرا (*Danio rerio*) (Kausch et al., 2007)، گورامی سه‌خال (*Trichogaster trichopterus*) (سپهر و همکاران، ۱۳۹۰)، گورامی سه‌خال (*Trichogaster tricogaster*) (حسین زاده‌صحافی و همکاران، ۱۳۹۴)، ماهی قرمز (*Carassius auratus*) (نژادمقدم، ۱۳۹۵)، گوپی (*Poecilia reticulata*) (Nazari and Roozbehani., 2015)، سیکلید گورخری (*Cichlasoma nigrofasciatum*) (Sotoudeh and Yeganeh., 2016)، گزارش شده است، اما مطالعات در زمینه اثر فیتواستروژن‌ها بر بیان ژن‌های تولیدمثلی در آبیان محدود است.

با توجه به این‌که مطالعه‌ای در رابطه با تأثیر رازیانه به‌عنوان یک گیاه حاوی ترکیبات فیتواستروژنیک بر بیان ژن‌های تولیدمثلی صورت نگرفته است، بنابراین مطالعه حاضر با هدف تعیین اثرات به‌کارگیری عصاره هیدروالکلی رازیانه به‌عنوان یک گیاه حاوی ترکیبات فیتواستروژن بر بیان ژن‌های تولیدمثلی (گیرنده استروژنی و ویتلوژنین) در ماهیان ماده گورخری به‌عنوان یک مدل تحقیقاتی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

۶۰۰ قطعه ماهی زبرای گورخری 0.1 ± 0.15 گرمی ۲۰ روزه از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان زینتی شصت کلا گرگان تهیه و به سالن آبی‌پروری آبی‌پروری شهید ناصر فضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شد و در شرایط طبیعی در ۴ تیمار آزمایشی (۳ تکرار) توزیع و به‌مدت ۲/۵ ماه با جیره‌های غذایی پایه همراه با عصاره رازیانه با دزهای ۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره غذایی (Sotoudeh and

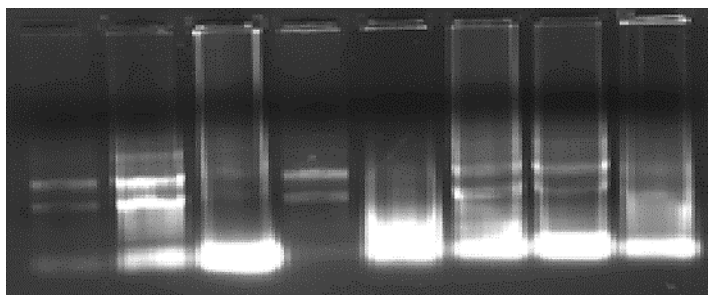
۱۳۹۵). بنابراین تولیدمثل موفق آبیان در شرایط اسارت به‌عنوان یکی از موضوعات کلیدی در صنعت آبی‌پروری می‌باشد. امروزه هورمون‌ها به‌عنوان ابزاری در جهت بهبود و تکثیر در فرایند تکثیر و پرورش آبیان به‌کار گرفته می‌شوند، اما به‌دلیل تجمع طولانی مدت در بدن، سبب ایجاد اختلال در دستگاه تولیدمثلی آبیان می‌گردند، بنابراین با توجه به معایب هورمون‌ها و عدم گزارش اثرات منفی استروژن‌های صنعتی در فیتواستروژن‌ها، استفاده از این استروژن‌های اگزوژن طبیعی در صنعت آبی‌پروری مطرح گردید (ریگی و همکاران، ۱۳۹۵).

فیتواستروژن‌ها ترکیبات گیاهی هستند که از نظر ساختاری، مشابه استروژن در حیوانات می‌باشند و چندین گروه از ترکیبات از جمله لیگنان‌ها، ایزوفلاونونئیدها، لاکتون‌ها، کومستان‌ها و رسورسیلیک اسید را در بر می‌گیرند (Anthony et al., 1995) و در گیاهان مختلفی از جمله غلات، گیاهان خانواده نخود و علوفه‌ها، در مقادیر مختلف و در قسمت‌های متفاوت از گیاه و دانه‌ها، بر اساس رقم، محل جغرافیایی و سال رشد گیاه وجود دارند که پس از ورود به دستگاه گوارش ممکن است دفع یا جذب شده و یا به ترکیباتی شکسته شوند که آن‌ها نیز فیتواستروژن‌های قوی باشند (ریگی و همکاران، ۱۳۹۵). فیتواستروژن‌ها به آسانی تجزیه شده، در بافت‌ها ذخیره نمی‌شوند و مدت زمان کمی در بدن باقی می‌مانند. بنابراین هرگاه این ترکیبات به‌عنوان جزئی از یک رژیم غذایی معمولی مصرف شوند به احتمال قوی ایمن و سودمند هستند (ترابی زاده و فلاحی، ۱۳۸۲).

گیاه رازیانه با نام علمی *Foeniculum vulgare* از خانواده چتریان *Umbrelliferae* (زرگری، ۱۳۷۵) حاوی ترکیبات مهمی نظیر آنتول، فنشون، پینن، کامفن و فلاندرن می‌باشد. فیتواستروژن‌های موجود در رازیانه تأثیراتی مشابه با ۱۷-بتا استرادیول‌های مصنوعی داشته (نظری و روزبهانی، ۲۰۱۴) و می‌توانند به‌عنوان جایگزین در

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه.

نام پرایمر	توالی (۳-۵)	دمای اتصال (C°)	کارایی پرایمر	کد دسترسی	بافت
Vtg1 q-PCR	GCCAAAAAGCTGGGTAAACA	۶۰	٪۹۹	BC139513	کبد
Vtg1 q-PCR	AGTTCCGTCTGGATTGATGG				
ERα q-PCR	GGTCCAGTGTGGTGTCTCT	۶۰	٪۹۵	AF349412	کبد
ERα q-PCR	AGAAAGCTTTGCATCCCTCA				
B- actin q-PCR	AGCAGATGTGGATCAGCAAG	۶۰	٪۹۹	AF057040	کبد
B- actin q-PCR	TACCTCCCTTTGCCAGTTTC				



شکل ۱ - کیفیت RNA استخراج شده از کبد ماهی زبرا روی ژل آگارز ۱٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید.

پرایمر ژن رفرنس بتا اکتین (جدول ۱) توسط کیت سایبر بایو پارس (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) در دستگاه IQ5 (شرکت بیورد آمریکا) و با استفاده از نرم‌افزار بایورد IQ5 اپتیکال برای بافت‌های کبد در ۴ تکرار تکنیکی انجام شد. به‌منظور اطمینان از بهینه بودن شرایط qPCR، سری غلظت‌های مختلف (۱، ۱/۲، ۱/۵، ۱/۱۰، ۱/۲۰، ۱/۵۰) از نمونه‌های cDNA مخلوط از تیمارهای متفاوت از بافت‌های مذکور تهیه و با هر دو پرایمر هدف و رفرنس در ۳ تکرار تکثیر و کارایی پرایمر (E) تعیین شد (Bustin et al., 2009).

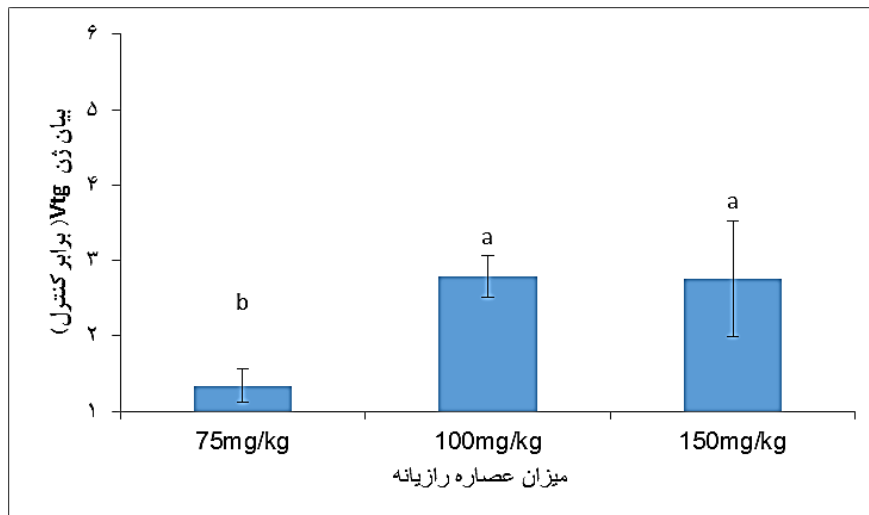
آنالیز آماری: داده‌های به‌دست‌آمده جهت تعیین بیان نسبی ژن VTG و ERα (مرتبط با فعالیت تولیدمثلی) نسبت به بتا اکتین با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ مورد آنالیز قرار گرفتند. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ورژن ۱۶) انجام و نتایج به‌صورت میانگین \pm انحراف‌معیار گزارش شد.

نتایج

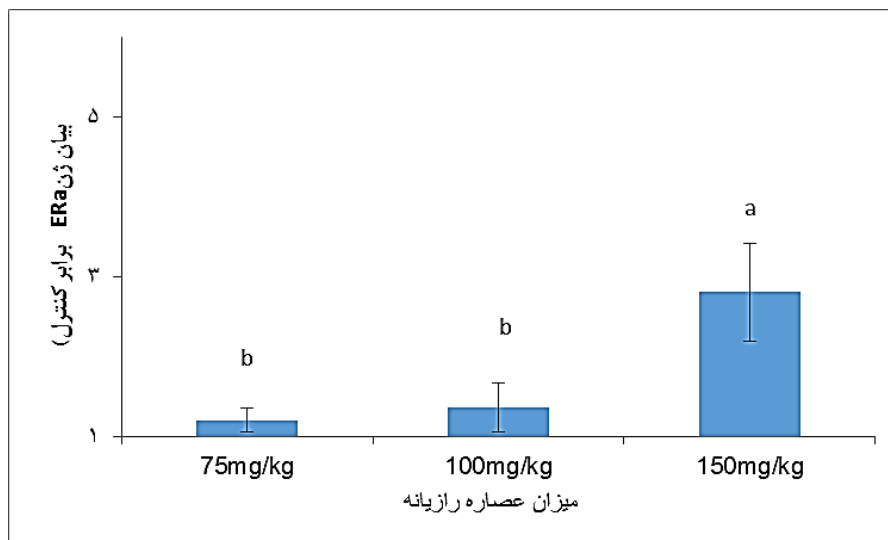
از لحاظ کمی و کیفی RNA استخراج شده مورد ارزیابی قرار گرفت. مقادیر به‌دست‌آمده از سنجش RNA در محدوده ۱/۷ تا ۲/۲ قرار داشتند که بیان

(Yeganeh, 2016) تغذیه شدند. بعد از این دوره، جنس نر ماهی گورخری را جدا و جنس ماده ماهی گورخری را به‌مدت ۱ ماه دیگر به‌وسیله همان جیره‌های غذایی غذایی شد. در پایان دوره از بافت کبد ماهیان نمونه‌برداری و جهت مطالعات مولکولی در ازت مایع قرار داده و سپس تا شروع آزمایش‌ها در فریزر ۸۰- نگهداری شدند.

استخراج RNA، سنتز و بررسی cDNA سنتز شده: RNA کل از ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه بافت کبد هموژن شده با ازت مایع با استفاده از تریوزول و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج می‌شود. کیفیت RNA کل با استفاده از الکتروفورز، ژل آگارز ۱/۵ درصد و کمیت با استفاده از نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه نانوفتومتر (IMPLEN-P100) ارزیابی شد. ساخت رشته اول cDNA با استفاده از کیت SuPrimeScript RTase انجام شد. cDNAهای سنتز شده و تا شروع آزمایش‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. طراحی پرایمرها برای ژن‌های VTG و ERs (مرتبط با تولیدمثل) با استفاده از نرم‌افزار پرایمر-۳ انجام و واکنش qPCR بعد از بهینه‌سازی دما و مواد مصرفی، در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با استفاده از پرایمر qPCR طراحی شده برای ژن‌های مذکور و



شکل ۲ - تغییرات بیان نسبی ژن ویتلوژنین (Vtg) به بتا اکتین در ماهی گورخری تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره هیدروالکلی رازیانه (حروف کوچک اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) بین تیمارها را نشان می‌دهد).



شکل ۳ - تغییرات بیان نسبی ژن گیرنده استروژن (ER-alfa) به بتا اکتین در ماهی گورخری تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره هیدروالکلی رازیانه (حروف کوچک اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) بین تیمارها را نشان می‌دهد).

معنی‌داری در میزان بیان این ژن در گروه تغذیه شده با ۷۵ mg/kg و ۱۰۰ و ۱۵۰ mg/kg با گروه ۷۵ mg/kg مشاهده شد (شکل ۲).

ارزیابی بیان ژن ERα، افزایش بیان این ژن را در گروه تغذیه شده با جیره حاوی عصاره هیدروالکلی رازیانه نسبت به گروه کنترل نشان داد. همچنین در گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره میزان بیان ژن به ترتیب ۱/۲، ۱/۳ و ۲/۸ برابر گروه کنترل بود که الگوی افزایشی وابسته به دوزی را نشان می‌دهد. اختلاف معنی‌داری در میزان بیان این ژن در گروه تغذیه شده

کننده غلظت مناسب RNA جهت سنتز cDNA است. در بررسی کیفی RNAها با استفاده از ژل الکتروفورز وجود دو باند مشخص ۱۸S و ۲۸S نشان‌دهنده کیفیت مناسب RNA است (شکل ۱).

ارزیابی بیان ژن VTG افزایش بیان این ژن را در گروه تغذیه شده با جیره حاوی عصاره هیدروالکلی رازیانه نسبت به گروه کنترل نشان داد. همچنین در گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره میزان بیان ژن به ترتیب ۱/۳۴، ۲/۷۹ و ۲/۷۶ برابر گروه کنترل بود که الگوی افزایشی وابسته به دوزی را نشان می‌دهد. اختلاف

با ۱۵۰ mg/kg با گروه ۷۵ mg/kg و ۱۰۰ عصاره را نشان داد (شکل ۳).

بحث

برخی از عصاره‌های گیاهی حاوی مواد فیتواستروژنی هستند و به لحاظ ساختاری و عملکردی شبیه به هورمون‌های استروئیدی (۱۷ بتا استرادیول) در حیوانات بوده و قادر به ایجاد اثرات استروژنی می‌باشند (Fowler, 1983). فیتواستروژن‌ها به تقلید از هورمون‌های استروئیدی می‌توانند اثرات کاهشی یا افزایشی بر تولیدمثل داشته باشند. افزایش بیان ژن VTG و ER α که می‌تواند در این مطالعه به وجود پلیمرهای آنتول مانند دی‌آنتول و فتوآنتول به‌عنوان فیتواستروژن گیاه رازیانه نسبت داده شود (Shamse Ardakani et al., 2005).

در ماهیان توسعه گناده ماده به دو فاز رشد و رسیدگی اووسیت تقسیم می‌شود، در فاز رشد ویتلوژنین تحت کنترل هورمون ۱۷ بتا استرادیول در سلول‌های کبدی تولید و توسط سیستم جریان خون به تخمک‌ها انتقال پیدا کرده و در توسعه و رسیدگی آن نقش پیدا می‌کند (Anderson et al., 1996). در لایه تکا کلسترول تحت فعل‌وانفعالات آنزیمی به تستوسترون تبدیل شده و در ادامه تستوسترون در لایه‌ی گرانولوزا به‌منظور تولید هورمون استروئیدی همانند استرادیول آروماتاز می‌شود (Nagahama et al., 1991; Aemen and Gay 2000; Berg et al., 2005; Drummond, 2006).

بیوفلاونوئیدهای موجود در کنجد و کرچک هندی می‌توانند تولید استروژن در جنس ماده گربه‌ماهی آفریقایی را افزایش داده و سبب تولید و بلوغ تخمک‌ها در تخمدان شوند (Dada and Adeparusi, 2012). همچنین اثر مهارکنندگی سایونین‌های موجود در برگ گیاه چریش (*Azadirachta Indica*) در ماهی تیلاپپای نیل گزارش شده است (Obaro et al., 2012). اثرات افزایشی عصاره هیدروالکلی دانه رازیانه بر غلظت

سرمی هورمون محرک فولیکولی (FSH) و کاهش دادن هورمون زرده‌ای و تستوسترون در رت‌های ماده نژاد ویستار مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک گزارش و به وجود ترکیب آنتول در این گیاه، نسبت داده شد (Karampoor et al., 2014). ستوده و یگانه (۲۰۱۶) نیز افزایش معنی‌دار میزان باروری و تعداد تخم، وزن گناده، شاخص گنادی، همآوری، درصد لفاح، درصد تخم‌گشایی و کاهش متوسط زمان رسیدگی جنسی در ماهی‌های ماده سیکلید گورخری (*Cichlasoma nigrofasciatum*) تغذیه شده با اسانس رازیانه را مشاهده نمودند. بهبود وضعیت تولیدمثلی و رشد تخمدان و رسیدگی اووسیت‌ها در ماهی ماده گورامی سه خال (*Trichogaster trichopterus*) تغذیه شده با رازیانه توسط ناجی و همکاران (۱۳۹۲) گزارش شد و اووسیت‌های در گروه شاهد در فاز اول (مرحله‌ی پیش هستکی) و در گروه‌های تغذیه شده با ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم رازیانه بر کیلوگرم وزن بدن ماهی) در مراحل پیش هستکی و شروع ویتلوژن و در گروه تغذیه شده با ۵۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم) در مرحله‌ی رسیدگی کامل جنسی قرار گرفتند. نظری و روزبهانی (۱۳۹۴) نیز بهبود وضعیت باروری، نرخ رشد و بافت گنادی ماهی گوپی (*Poecilia reticulata*) تحت تأثیر عصاره الکلی رازیانه را به فیتواستروژن‌های موجود در این گیاه که اثراتی مشابه با ۱۷-بتا-استرادیول سنتتیک نسبت دادند.

آروماتاز P450 (CYP19(a)) یک آنزیم استروئیدوژنیک کلیدی در تبدیل آندروژن به استروژن است که نقش مهمی را در تمایز جنسی و تکامل گناده ایفا می‌کند. بهبود شاخص‌های تولیدمثلی ماهیان از جمله افزایش رشد اووسیت‌ها، قطر تخم و شاخص گنادی، بقای بالای لاروها و افزایش بیان ژن CYP19(a,b) در ماهی گورخری تغذیه شده با جیره حاوی عصاره هیدروالکلی گیاه پنج انگشت (*Vitex agnus castus*) در مطالعه عنایت غلامپور و همکاران (۱۳۹۵) مشاهده و به اثر فلاونوئیدهای

vulgare) توسط (ناجی و همکاران، ۱۳۹۴) و عصاره بابونه (*Matricaria recutita*) (ناجی و همکاران، ۱۳۹۳) گزارش و تسریع رسیدگی اوسیت‌ها به خاصیت فیتواستروژنی این گیاهان نسبت داده شد که این گیاه می‌تواند همانند هورمون اولیه جنسی بر سطوح مختلفی از محور هیپوفیز-هیپوتالاموس-گناد اثر بگذارد. تقویت وضعیت تولیدمثلی، افزایش قطر تخمک، میزان باروری و شاخص گنادوسوماتیک با استفاده از جیره حاوی عصاره اتانولی دانه کلا (*Garcinia kola*) (Dada and Ajilore, 2009) و جیره حاوی دانه کنجد (*Sesamum indicum*) و کرچک هندی (*Croton zambesicus*) (Dada and Adeparusi, 2012) در ماهیان ماده گربه‌ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) مشاهده و به خاصیت فیتواستروژنی این گیاهان نسبت داده شد. نوروزی و فرخ روز (۲۰۱۴) اثر گیاه آلوئه‌ورا را بر هورمون‌های جنسی ماهی گرین‌ترور (*Aequidens rivulatu*) را مورد بررسی قرار دادند. افزایش میزان استرادیول ناشی از تأثیرات فیتواستروژنی این گیاه مشاهده نمودند. بهبود عملکرد تولیدمثلی، افزایش باروری و کیفیت اسپرم در جنس نر با استفاده از دانه کلا (*Garcinia Kola*) توسط (Dada et al., 2009)، در میوه‌ی درخت سوسیس (*Kigelia africana*) (Dada et al., 2010) در گربه‌ماهی آفریقایی، کدوتنبیل (*Cucurbita pepo*) در ماهی گورامی سه‌خال (ناجی و همکاران، ۱۳۹۱)، دانه کنجد (*Sesamum indicum*) در گربه‌ماهی آفریقایی (Dada, 2013)، گیاه خولنجان (*Alpinia officinarum*) در ماهی مولی (*Latipinna poeciloides*) (حسین‌زاده و همکاران، ۱۳۹۴)، کدوتنبیل شیاردار (*Telfairia occidentalis*) (Dada and Ejete-Iroh, 2015) در گربه‌ماهی آفریقایی گزارش و به خاصیت فیتواستروژنی این گیاهان نسبت داده شد.

با توجه به تأثیر مثبت عصاره هیدرو الکلی گیاه رازیانه بر بهبود و بیان ژن‌های مرتبط با تولیدمثل و

موجود در این گیاه افزایش سطح پروژسترون و تولید هورمون‌های دخیل در زرده‌سازی نسبت داده شد (Ghosal and Chakraborty, 2014). افزایش هورمون‌های تولیدمثلی (تستوسترون و آروماتاز) و بیان ژن‌های مرتبط با تولیدمثل (آروماتاز- α ، β ، ER β -A ER β -B) در به‌کارگیری جنیستئین در جیره غذایی مولدین ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus Kutum*) توسط (محمدرضایی و همکاران، ۱۳۹۵) و ماهی گورخری توسط (Sassi-Messai et al., 2009) گزارش شده و این افزایش به اثرات فیتواستروژنی ایزوفلاون‌های موجود در این ماده نسبت داده شده است. به جهت اهمیت زیاد جنیستئین مطالعات زیادی در رابطه با استفاده از آن در موجودات دیگر از قبیل رت صورت گرفته و اثرات افزایش بیان ژن‌های تولیدمثلی در این‌گونه گزارش شده است (Naciff et al., 2002). به‌کارگیری ایزوفلاون‌های روغن سویا در جیره غذایی ماهی گورامی سه‌خال (*Trichogaster trichopterus*) تسریع بلوغ به همراه داشت که می‌تواند به ساختمان مولکولی فیتواستروژن سویا (Rogerio, 1999). نسبت داده شود (ناجی و همکاران، ۱۳۸۹). اثرات به‌کارگیری عصاره هیدروالکلی گزنه (*Urtica dioica*) و بومادران (*Achillea millefolium*) باعث بهبود وضعیت تولیدمثلی جنس ماده ماهی قرمز (*Carassius auratus*) شد و درحالی‌که این اثر در جنس نر مشاهده نشد (نژادمقدم، ۱۳۹۵). خاصیت فیتواستروژنی ریشه گیاه ختمی (*Althaea officinalis*) بر شاخص‌های تولیدمثل در ماهی گورامی سه‌خال به اثبات رسیده و نشان داده شد که فلاونوئیدهای موجود در این گیاه خاصیت آگونیستی داشته و به رسپتورهای استروژنی متصل و باعث القای رشد و رسیدگی تخمک می‌گردند (امانی، ۱۳۹۲؛ Gudej, 1991; Kuiper, 1998). بهبود شاخص‌های تولیدمثلی در ماهی گورامی سه‌خال با استفاده از عصاره هیدروالکلی مرزنجوش (*Origanum*)

اولین کنفرانس اقیانوس‌شناسی خلیج‌فارس نهمین کنفرانس علوم و فنون دریایی ایران، ۶۰-۶۲.

سوداگر م، صدق‌پور ثابت س، ذکریایی ح، دادگر ش. ۱۳۹۵. بررسی اثر هورمون‌های اوپریم (SGnRHa) + دامپریدون، اوافکت (آنتاگونیست دوپامین + GnRH) و عصاره هیپوفیز بر بازده تکثیر مصنوعی ماهی سفید *Rutilus kutum*. نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی، ۴(۳): ۵۶-۵۴.

عادل، ا. ۱۳۸۹. بازار مبادلات ماهیان ایران-جهان. نخستین همایش ماهیان زینتی ایران. سازمان شیلات ایران. تهران. ۳۸-۳۵.

عنایت غلام‌پور ط، جعفری و، ایمانیور م، کلنگی میاندره ح. ۱۳۹۵. بررسی بیان ژن CYP19(a) و عملکرد تولیدمثلی ماهی گورخری (*Danio rerio*) تغذیه شده با جیره غنی‌شده با عصاره گیاه پنج‌انگشت (*Vitex agnus castus*). فیزیولوژی بیوتکنولوژی آبزیان، ۴(۳): ۳۸-۲۸.

محمدرضایی د، مجازی امیری ب، نعمت الهی م، مخدومی چ، هاشمی ص. ۱۳۹۵. اثر فیتواستروژن‌های جنیستئین و بتاسیتوسترول بر برخی شاخص‌های مؤثر در تولیدمثل ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*). مجله منابع طبیعی ایران، ۴۶(۴): ۴۶۱-۴۵۲.

ناجی ط، حسین‌زاده صحافی ه، امیددی س. ۱۳۹۱. بررسی اثر عصاره تخم کدوتنبل (*Cucurbita pepo*) و ۱۷بتا استرادیول بر روی محور HPG ماهی ماده گورامی سه خال (*Trichogaster trichopterus*). مجله پژوهش‌های علوم و فنون دریایی، ۵۳-۵۰.

ناجی ط، حسین‌زاده صحافی ه، باقری‌زبیری ص. ۱۳۹۴. اثرات LHRH-A2، بتا استرادیول و عصاره سرشاخه هوایی مرزنجوش (*Origanum vulgare*) بر القاء باروری در ماهی گورامی سه خال (*Trichogaster trichopterus*). نشریه توسعه آبی‌پروری، ۹(۳): ۶۸-۵۹.

ناجی ط، حسین‌زاده صحافی ه، سمائی ت، امانی نژاد پ. ۱۳۹۲. بررسی اثر عصاره گیاهی رازیانه (*Foeniculum vulgare*) بر رشد و رسیدگی اووسیت‌ها بر ماهی ماده گورامی سه خال

عدم وجود اثرات منفی استروژن‌های مصنوعی در گیاهان فیتواستروژن، به‌کارگیری این ماده می‌تواند به بهبود وضعیت تولیدمثلی در جنس ماده ماهی گورخری کمک نماید.

منابع

امانی ن. ۱۳۹۲. پایان‌نامه دکترا. مقایسه عصاره ختمی *Althea officinalis* و ۱۷بتا استرادیول بر رشد و رسیدگی اووسیت‌ها و بافت کبد در ماهی ماده نابالغ گورامی سه خال *Trichogaster trichopterus*. ۷۴-۷۸.

ترابی‌زاده ع.ف، فلاحی ع. ۱۳۸۲. نگاهی به استروژن‌های گیاهی. مجله زنان، مامائی و نازائی ایران، ۲(۶): ۸۵-۸۰.

حسین‌زاده صحافی ه، ناجی ط، بنفشی س. ۱۳۹۴. مقایسه تأثیر عصاره اتانولی خولنجان (*Alpinia officinarum*) و ۱۷-آلفا متیل تستوسترون بر شاخص‌های کیفی اسپرم در ماهی مولی نر بالغ (*Latipinna poecilia*) مجله آبزیان و شیلات، ۶(۲۲): ۴۷-۵۲.

روzbهانی ش، نظری ع. ۱۳۹۴. تأثیر عصاره اتانولی رازیانه (*Foeniculum vulgare*) بر رشد و باروری ماهی گوپی (*Poecilia reticulata*). نشریه آبی‌پروری، ۹(۳): ۲۹-۳۰.

روzbهانی ش، نظری ع، باقرزاده ژ. ۱۳۹۱. بررسی تأثیر عصاره اتانولی رازیانه (*Foeniculum vulgare*) بر رشد و باروری ماهی گوپی (*Poecilia reticulata*). اولین همایش ملی شیلات و آبزیان ایران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندرعباس، ۱۰-۱.

ریگی ف، ذکریایی ح، سوداگر م. ۱۳۹۵. نقش فیتواستروژن‌ها در تولیدمثل آبزیان. مجله آبزیان زینتی، ۳(۴): ۸-۱۰.

زرگری ع. ۱۳۷۵. گیاهان دارویی. انتشارات دانشگاه تهران. جلد دوم. ۱۱۳.

سپهر م، عربان ش، ناجی ط، یغمایی پ. ۱۳۹۰. بررسی اثرات هیستولوژیکی فیتواستروژن جنیستئین (*Genistein*) بر بافت تخمدان ماهی نابالغ گورامی سه خال با نام علمی *Trichogaster trichopterus*

- Bustin S.A., Bens V., Garson J.A., Hellemans, J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55(4), 611-622.
- Dada A., Adeparusi E. 2012. Dietary effects of two medicinal plants (*Sesamum indicum*) and (*Croton zambesicus*) on the reproductive indices in female African catfish (*Clarias gariepinus*) broodstock. *The Egyptian Journal of Aquatic Research* 38(4), 269-273.
- Dada A.A. 2013. Dietary Sesame Improves Reproductive Performance of Male African Catfish. *Journal of World Aquaculture* 66-67.
- Dada A.A., Ajilore V.O. 2009. Use of ethanol extracts of *Garcinia Kola* as fertility enhancer in female catfish *Clarias gariepinus* broodstock. *International Journal of Fisheries and Aquaculture* 1(1), 1-5.
- Dada A.A., Adeparusi E.O., Alale O.V. 2010. Effects of Medicinal Plant (*Kigelia Africana*) on Sperm Quality of African Catfish *Clarias Gariepinus* (Burchell, 1822) Broodstock. *Journal of Agricultural Science* 2(1), 194-196.
- Dada A.A., Adeparusi E.O. 2012. Dietary effects of two medicinal plants (*Sesamum indicum*) and (*Croton zambesicus*) on the reproductive indices in female African catfish (*Clarias gariepinus*) broodstock. *Egyptian Journal of Aquatic Research* (38), 269-273.
- Dada. A.A., Ajilore V.O. 2009. Use of ethanol extracts of *Garcinia kola* as fertility enhancer in female catfish *Clarias gariepinus* broodstock. *International Journal of Fisheries and Aquaculture* 1(1), 7-9.
- Dada A.A., Ejete-Iroh V.C. 2015. Dietary Fluted Pumpkin (*Telfairia occidentalis*) Improves Reproductive Indices in Male African Catfish (*Clarias gariepinus*) Broodstock. *Journal of Agricultural Science* 7(7), 230-232.
- Drummond A. E. 2006. The role of steroids in follicular growth. *Biologi Endocrinology* 4, 16.
- Fowler M.E. 1983. Plant poisoning in free-living wild animals: a review. *Journal of*
- Trichogaster trichopterus*). مجله آبیان و شیلات، ۴(۱۴): ۵۷-۵۲.
- ناجی ط، حسینزاده صحافی ه، صفاری م. ۱۳۹۳. بررسی اثرات فیتواستروژنی عصاره بابونه (*Matricaria recutita*) بر رشد و رسیدگی اووسیتها بر ماهی ماده گورامی سه خال (*Trichogaster trichopterus*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۳(۱): ۸۵-۹.
- ناجی زاده ط، حسینزاده صحافی ه، ثمری ز. جاذبی زاده، م. ک. ۱۳۸۹. بررسی اثر ایزوفلاونهای روغن سویا بر رشد و رسیدگی اووسیتها در ماهی گورامی سه خال ماده نابالغ (*Trichogaster trichopterus*). مجله علوم و فنون دریایی، ۵۷-۵۳.
- نژادمقدم ش. ۱۳۹۵. اثرات به کارگیری عصاره هیدرو الکلی گزنه (*Urtica dioica*) و بومادران (*Achillea millefolium*) در جیره بر شاخصهای خونی و بیوشیمیایی سرم خون، بافت شناسی گناد و هورمونهای جنسی در مولدین ماهی قرمز (*Carassius auratus*). پایان نامه کارشناسی ارشد رشته شیلات. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی. ۶۵-۶۸.
- Aemen T.A., Gay C.V. 2000. Simultaneous detection and functional response of testosterone and estradiol receptors in osteoblast plasma membranes. *Cell Biochemistry* 79, 620- 627.
- Albert P. 1980. Fennel and anise as estrogenic agents. *Journal of Ethnopharmacology* 2(4), 337-344.
- Anderson M.J., Miller M.R., Hinton D.E. 1996. In vitro modulation of 17- β -estradiol-induced vitellogenin synthesis: Effects of cytochrome P4501A1 inducing compounds on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells. *Aquatic Toxicology* 34(4), 327-350.
- Anthony M.S., Clarkson T.B., Weddle D.L. 1995. Effects of soy protein phytoestrogens on cardiovascular risk factors in rhesus monkeys. *Journal of Nutrition* 125, 803-804.
- Berg A.H., Thomas P., Olsson P.E. 2005. Biochemical characterization of the Arctic char (*Salvelinus alpinus*) ovarian progesterin membrane receptor. *Biologi Endocrinology* 3: 64-66.

- fennel *Foeniculum Vulgar* extract on fertility, growth rate and histology of gonads on guppy *Poecilia reticulata*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 463-469.
- Norouzi M., Farrokhrouz M. 2014. The effect of Aloe vera on growth and sex hormone of the fish *Aequidens rivulatu*. *Biological Forum* 6(2), 412-416.
- Obaro I.O., Nzeh C.G., Oguntoye S.O. 2012. Control of reproduction in *Oreochromis niloticus* (L) using crude extract of *Azadirachta Indica* Saponin. *Advances in Environmental Biology* 6(4), 1353-1356.
- 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.
- Rogério A.L. 1999. Treatment of the postmenopausal woman. 2th ed. Philadelphia, Lippincott. *Academic Press, USA* 4(6), 115-110.
- Saddhe A.A., Banerjee G., Jamdadeh R.A., Thete K.D. 2013. Zebrafish the reliable vertebrate model organism. *DCSI* 91, 172-182.
- Sassi-Messai S., Gibert Y., Bernard L., Nishio S., Lagneau K.F., Molina J., Andersson-Lendahl M., Benoit G., Balaguer P., Laude V. 2009. The Phytoestrogen Genistein Affects Zebrafish. Development through Two Different Pathways. *PLOS ONE* 4(3), 9-11.
- Shamse Ardakani M.R., Haji Akhoundi A., Jamshidi A.H., Abdi K.H. 2005. The study of volatile oil of *Foeniculum vulgare* miller, in their tissue culture and comparison with the whole plant. *Journal of Medicinal Plants* 4(15), 73-80.
- Sotoudeh A., Yeganeh S. 2016. Effects of supplementary fennel (*Foeniculum vulgare*) essential oil in diet on growth and reproductive performance of the ornamental fish, Convict cichlid (*Cichlasoma nigrofasciatum*). *Aquaculture Research* 10(36), 1-8.
- Wildlife Diseases* (19), 34- 43.
- Ghosal I., Chakraborty S.B. 2014. Effects of the aqueous leaf extract of *Basella alba* on sex reversal of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 9(2), 162-164.
- Gudej J. 1991. Flavonoids, phenolic acid and coumarins from the riits of *Althea officinalis*. *Planta Medica* 57(3), 284-285.
- Hoar W.S., Randoll D.J., Donaldson E.M. 1983. Part B, Behavior and Fertility Fish physiology. *Reproduction Control* (6), 477-479.
- Karampoor P., Azarnia M., Mirabolghasemi G., Alizadeh F. 2014. The Effect of hidroalcoholic extract of Fennel (*Foeniculum vulgare*) seed on serum levels of sexual hormones in female Wistar rats with Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS). *Arak Medical University Journal* 17(86), 70-78.
- Kausch U., Alberti M., Haindl S., Budczies J., Hock B. 2007. Biomarkers for exposure to estrogenic compounds: gene expression analysis in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology* (10), 15-16.
- Kuiper G.G.J.M. 1998. Intraction of estrogenic chemical and phytoestrogens with estrogen reseptor B. *Endocrinology* 139(10), 4252-63.
- Logambal S., Venkatalakshmi S., Michael R.D. 2000. Immunostimulatory effect of leaf extract of *Ocimum sanctum* in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Hydrobiologia* 430(1-3), 113-120.
- Marimuthu K., Jesu Arokiaraj A., Haniffa M.A. 2009. Effect of Diet Quality on Seed Production of the Spotted Snakehead *Channa punctatus* (Bloch). *Sustainable Agriculture* 1(1), 06-09.
- Naciff M., Lynn Jump M., Torontali S.M., Carr G.J., Tiesman J.P., Overmann G.J., Daston G.P. 2002. Gene expression profile induced by 17a-ethynyl estradiol, bisphenol a, and genistein in the developing female reproductive system of the rat. *National Dong Hwa University* 185-190.
- Nagahama Y., Matsuhisa A., Wamatsu T., Sakai N., Fukaoa S. 1991. An mechanism for the action 01 pregnant mare serum gonadotropin on aromatase actiVtgy in the ovarian 10Uicie of the medaca, *Oryzias Latipes*. *Expression Zoology* 259 p.
- Nazari A., Roozbehani S. 2015. Influence of

Effects of dietary administration of hydroalcoholic extract of fennel (*Foeniculum vulgare*) on expression of genes related to reproduction (Estrogen receptor and Vitellogenin) in female of zebrafish (*Danio rerio*)

Mansoureh Abdolmanafi, Ali Shabani*, Roghieh Safari

Department of Aquaculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

*Corresponding author: ali_shabany@yahoo.com

Received: 2018/7/18

Accepted: 2018/10/12

Abstract

The present study investigates the effect of dietary administration of the hydroalcoholic extract of fennel (*Foeniculum vulgare*) on expression of genes related to reproduction (ER-a and Vtg) in female zebrafish (*Danio rerio*). For this purpose, zebrafish with average weight of 0.15 ± 0.01 gr fed on diet supplemented with 0, 75, 100 and 150 mg/kg of diet for 6 weeks. After this period and sex determination, females fed with fennel for 1 month. At the end of feeding trial, RNA extracted from liver, cDNA synthesised with SuPrimeScript RTase kit and PCR were done using primers relate to Vtg, ER-a and Beta-actin as housekeeping genes. Evaluation of reproduction gene expression showed increase in fish fed fennel compare to control. Vtg and ER-a gene expression didn't show significant differences in fish fed 75 and 100 mg/kg ($P > 0.05$). Diet supplemented with 150 mg/kg of fennel showed significant increases compared to two other fennel-fed groups. According to the results it seems that using fennel could considered as a new strategy for improving reproductive performance.

Keywords: Reproduction, Fennel, Zebrafish, Gene expression.