Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University

Research on Animal Production, Vol. 17, Issue 1, 2026 p: 150- 161

OPEN ACCESS

Research Paper

The Effect of Adding Sex Hormones and Medicinal Plant Extracts to the Diet on Offspring Sex and the pH Levels of Eggs and Blood in Laying Hen Breeders

Zeinab Bardel[1], Ali Asghar Saki[2] and Asghar Mirzaie-Asl[3]

1- Ph.D. Candidate, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran
2- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran, (Corresponding authors: alisaki34@yahoo.com)
3- Associate Professor, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Received: 20 September, 2025 Revised: 30 November, 2025 Accepted: 30 December, 2025

Extended Abstract

Background: In the laying hen industry, the slaughter of day-old male chicks not only raises ethical concerns but also results in significant economic losses. Costs would be reduced, and performance would be improved if only female chicks could be produced for the laying hen industry and only male chicks for the broiler industry. Research is exploring ways to influence the sex of offspring in poultry. Several studies have examined the effects of steroid hormone injections on the sex of offspring and have shown that the sex of poultry can be affected to some extent by this method. However, injection methods can cause high stress in birds, which necessitates the investigation of alternative and less stressful techniques. One of these alternative methods is nutrition. The effect of hormones in poultry feed on the offspring sex ratio has not yet been thoroughly studied, and only a small number of studies have addressed this issue. However, further research in this field is needed to reach a definitive conclusion. These studies have suggested that the effect of hormones is through changes in blood hormone levels, but the exact mechanism of this process remains unknown. In addition, various studies have reported the effects of phytoestrogens in feed on steroid hormones, and some studies have shown their effects on embryonic sex when injected intra-amniotically. The effect of medicinal plants in poultry feed on offspring sex remains unknown. In humans and some animals, pH has been implicated in sex determination, but data on their effect on poultry offspring sex are scarce. This study aimed to investigate the effect of testosterone and progesterone, as well as garlic and fennel extracts, on sex ratio and egg and blood pH in layer breeder hens. Additionally, the relationship between offspring sex and blood and egg pH was examined in this research.

Methods: In this study, 100 Hy-Line W80 layer breeder hens were used in five treatments, five replicates, and four hens in each replicate in a completely randomized design. The experimental treatments included 1- a control diet (based on corn-soybean meal) 2- a control diet + 1 mg of testosterone/kg diet, 3- a control diet + 1 mg of progesterone/kg diet, 4- a control diet + 400 mg of dry fennel extract/kg diet, and 5- a control diet + 400 mg of dry garlic extract/kg diet. The experiment was conducted for 5 weeks.

During the experiment, the pH values of eggs (albumin and yolk) and plasma were measured weekly by a pH meter. At the end of the experiment, egg quality was evaluated based on the yolk index, albumin index, shape index, yolk percentage, albumen percentage, shell ratio, and Haugh unit. To determine genetic sex, DNA was extracted from the embryo tissues. Specific primers were designed for the CHD-1 gene. Then, the PCR reaction was performed using designed primers, and the PCR product was electrophoresed on the agarose gel. The obtained data were analyzed by the SAS statistical software.

Results: The male sex ratio increased by testosterone treatment, and the female sex ratio increased by progesterone, fennel, and garlic treatments compared to the control group in a near-significant manner ($P = 0.0565$). The week significantly affected plasma pH. In the first week of the experimental period, plasma pH in different treatments decreased significantly compared to the control. In the third week, plasma pH in progesterone treatment increased significantly compared to the control, but testosterone, fennel, and garlic treatments did not show a significant difference from the control treatment. The effect of experimental treatments on plasma pH was not significant in the other weeks and in the entire period. The week significantly affected yolk and

Copyright ©2026 Bardel et al. Published by Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License which allows users to read, copy, distribute and make derivative works for non-commercial purposes from the material, as long as the author of the original work is cited properly.

albumin pH. In the fourth week of the experimental period, the experimental treatments reduced the albumin pH compared to the control, so that its pH decreased significantly in the fennel and garlic extract treatments compared to the control. Albumin pH decreased by progesterone and testosterone treatments, but not significantly compared to the control. The yolk pH was not affected by the experimental treatments ($P > 0.05$). In the other weeks and throughout the experimental period, the pH of the egg albumin and yolk in the different treatments did not show a significant difference compared to the control treatment. The egg quality traits (average shell thickness, shell ratio, shape index, yolk index, albumin index, yolk percentage, albumin percentage, and Haugh unit) were also not affected by all the treatments ($P > 0.05$).
Conclusion: The results of this experiment have shown that the use of testosterone and progesterone hormones and garlic and fennel extracts in the diet of laying hens in the amounts used could affect the sex ratio of the offspring to some extent without a negative effect on egg quality. Changes in blood pH were observed in the first and third weeks, and changes in egg white pH were noticed in the fourth week. In this study, however, the effect of experimental treatments on sex was not through their effect on blood or egg pH.
It is recommended to conduct further research using different bird species under different environmental conditions or over a longer period of time to better understand the relationship between sex, blood pH, and egg pH.

Keywords: Egg pH, Fennel extract, Garlic extract, Progesterone, Testosterone

How to Cite This Article: Bardel, Z., Saki, A. A., & Mirzaie-Asl, A. (2026). The Effect of Adding Sex Hormones and Medicinal Plant Extracts to the Diet on Offspring Sex and the pH Levels of Eggs and Blood in Laying Hen Breeders. *Res Anim Prod,* 17(1), 150-161. DOI: 10.61882/rap.2026.1546

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

مقاله پژوهشی

اثر افزودن هورمون‌های جنسی و عصاره گیاهان دارویی در جیره بر جنسیت نتاج، pH تخم‌مرغ و خون و کیفیت تخم‌مرغ در مرغ‌های مادر تخم‌گذار

زینب باردل[۱]، علی‌اصغر ساکی[۲] و اصغر میرزایی اصل[۳]

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
۲- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران، (نویسنده مسوول: alisaki34@yahoo.com)
۳- دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۶/۲۹ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۴/۰۹/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۰۹
صفحه: ۱۵۰ تا ۱۶۱

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: در صنعت پرورش مرغ تخم‌گذار، کشتار جوجه‌های نر یک‌روزه، علاوه بر ایجاد نگرانی‌های اخلاقی، زیان اقتصادی قابل‌توجهی دارد. اگر بتوان در صنعت مرغ تخم‌گذار فقط جوجه‌های ماده و در صنعت مرغ گوشتی فقط جوجه‌های نر تولید کرد، هزینه‌ها کاهش و عملکرد افزایش می‌یابد. پژوهشگران به‌دنبال روش‌هایی هستند تا بتوان جنسیت جوجه‌ها را تحت تأثیر قرار داد. مطالعات متعددی اثرات تزریق هورمون‌های استروئیدی بر جنسیت فرزندان را بررسی کرده‌اند و نشان داده‌اند که جنسیت طیور با این روش تا حدودی تحت تأثیر قرار می‌گیرد. با این‌حال، روش‌های تزریق می‌توانند تنش زیادی را در پرندگان ایجاد کنند و این مسئله نیاز به بررسی تکنیک‌های جایگزین و کم‌تنش تر را ضروری می‌کند. یکی از این جایگزین‌ها از طریق تغذیه است. اثر هورمون‌ها در خوراک طیور و تأثیر آن‌ها بر جنسیت فرزندان هنوز به‌خوبی بررسی نشده است و مطالعات محدودی به این موضوع پرداخته‌اند. با این‌حال، برای رسیدن به نتیجه قطعی تحقیقات بیشتر در این زمینه ضروری به‌نظر می‌رسد. این پژوهش‌ها احتمال داده‌اند که تأثیر هورمون‌ها از طریق تغییرات در سطح هورمون‌های خونی اعمال می‌شود، اما مکانیسم دقیق این فرآیند همچنان ناشناخته باقی مانده است. علاوه بر این، مطالعات مختلف تأثیر استروژن‌های گیاهی در خوراک بر هورمون‌های استرویییدی را گزارش کرده‌اند و برخی حتی اثرات تزریق آن‌ها در مایع آمنیوتیک را بر جنسیت جنین نشان داده‌اند. با این وجود، تأثیر استفاده از گیاهان دارویی در خوراک طیور بر جنسیت جوجه‌ها ناشناخته مانده است. در انسان و برخی دیگر از حیوانات، pH در تعیین جنسیت نقش داشته است، اما داده‌های مربوط به تأثیر آن بر جنسیت طیور کمیاب هستند. این مطالعه با هدف بررسی اثرات هورمون های جنسی تستوسترون و پروژسترون و گیاهان دارویی سیر و رازیانه بر نسبت جنسیتی جوجه‌ها، pH تخم‌مرغ و خون در مرغ‌های مادر تخم‌گذار و ارتباط بین جنسیت و pH خون و تخم‌مرغ انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، از صد قطعه مرغ مادر تخم‌گذار Hy-Line W80 به‌صورت پنج تیمار، پنج تکرار و چهار قطعه مرغ در هر تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل ۱- جیره شاهد (بر پایه ذرت-کنجاله سویا)، ۲- جیره شاهد + ۱ میلی‌گرم تستوسترون در کیلوگرم جیره، ۳- جیره شاهد + ۱ میلی‌گرم پروژسترون در کیلوگرم جیره، ۴- جیره شاهد + ۴۰۰ میلی‌گرم عصاره خشک رازیانه در کیلوگرم جیره و ۵- جیره شاهد + ۴۰۰ میلی‌گرم عصاره خشک سیر در کیلوگرم جیره بودند. آزمایش به‌مدت ۵ هفته انجام شد. طی مدت پژوهش، pH تخم‌مرغ (سفیده و زرده) و خون به‌صورت هفتگی با استفاده از pH متر اندازه‌گیری شد. در پایان پژوهش، کیفیت تخم‌مرغ بر اساس شاخص زرده، شاخص سفیده، شاخص شکل، درصد زرده، درصد سفیده، نسبت پوسته و واحد هاو ارزیابی شد. برای تعیین جنسیت ژنتیکی، DNA از بافت‌های جنینی استخراج شد. آغازگرهای اختصاصی برای ژن CHD-1 طراحی شدند. سپس، واکنش PCR انجام و محصول PCR توسط الکتروفورز با ژل آگارز بررسی شد. داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نسبت جنس نر توسط تیمار تستوسترون و نسبت جنس ماده توسط تیمارهای پروژسترون، رازیانه و سیر در مقایسه با گروه شاهد به‌صورت نزدیک به معنی‌دار افزایش یافتند (P = ۰/۰۵۶۵). هفته دارای اثر معنی‌داری بر pH پلاسما بود. در هفته اول دوره آزمایش، pH پلاسما در تیمارهای مختلف در مقایسه با شاهد به‌صورت معنی‌دار کاهش یافت. در هفته سوم، pH پلاسما در تیمار پروژسترون در مقایسه با شاهد به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت اما تیمارهای تستوسترون، رازیانه و سیر تفاوت‌های معنی‌داری با تیمار شاهد نشان ندادند. در سایر هفته‌ها و در کل دوره اثر تیمارهای آزمایشی بر pH پلاسما معنی‌دار نبود. اثر هفته دارای تأثیر معنی‌داری بر pH زرده و سفیده بود. در هفته چهارم دوره آزمایش، تیمارهای آزمایشی pH سفیده را در مقایسه با شاهد کاهش دادند به‌طوری‌که pH سفیده در تیمارهای عصاره رازیانه و عصاره سیر به‌صورت معنی‌داری در مقایسه با شاهد کاهش یافت. در تیمارهای پروژسترون و تستوسترون نیز pH سفیده کاهش یافت اما در مقایسه با شاهد معنی‌دار نبود. داده‌های مربوط به pH زرده توسط تیمارهای آزمایشی تحت تأثیر قرار نگرفتند (P > ۰/۰۵). در سایر هفته‌ها و در کل دوره آزمایش، pH سفیده و زرده تخم‌مرغ در تیمارهای مختلف در مقایسه با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. صفات کیفی تخم مرغ (میانگین ضخامت پوسته، نسبت پوسته، شاخص شکل، شاخص زرده، شاخص سفیده، درصد زرده، درصد سفیده و واحد هاو) نیز تحت تأثیر هیچ‌کدام از تیمارها قرار نگرفتند (P > ۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: به‌طورکلی، نتایج این پژوهش نشان دادند که استفاده از هورمون‌های تستوسترون و پروژسترون، عصاره‌های سیر و رازیانه در خوراک مرغ‌های مادر تخم‌گذار در مقادیر استفاده شده توانست بر نسبت جنسی فرزندان تا حدودی تاثیر بگذارد بدون این‌که تأثیر منفی بر کیفیت تخم‌مرغ داشته باشند. در هفته اول و سوم، تغییر در pH خون و در هفته چهارم تغییر در pH سفیده تخم‌مرغ مشاهده شد، با این‌حال، در این مطالعه، تأثیر تیمارهای آزمایشی بر جنسیت از طریق تأثیر آن‌ها بر pH خون یا تخم مرغ نبود. توصیه می‌شود که تحقیقات بیشتری با استفاده از گونه‌های مختلف پرندگان تحت شرایط محیطی متفاوت یا در یک دوره زمانی طولانی‌تر انجام شوند تا رابطه بین جنسیت، pH خون و pH تخم‌مرغ بهتر درک شود.

واژه‌های کلیدی: پروژسترون، pH تخم مرغ، تستوسترون، عصاره رازیانه، عصاره سیر

مقدمه

در صنعت پرورش مرغ تخم‌گذار، تقریباً ۵۰ درصد از جوجه‌ها به‌دلیل نر بودن کشتار می‌شوند، زیرا نه قادر به تولید تخم‌مرغ هستند و نه ژن‌هایی برای سرعت رشد برای پرورش به‌عنوان جوجه گوشتی دارند (Navara, 2013). کشتار جوجه‌های نر یک‌روزه، علاوه بر نگرانی‌های مربوط به رفاه حیوانات، از نظر

اقتصادی نیز اهمیت قابل‌توجهی دارد. در صورتی که بتوان در صنعت مرغ تخم‌گذار، فقط جوجه‌های ماده و در صنعت مرغ گوشتی، فقط جوجه‌های نر را تولید کرد، بهره‌وری به‌طور چشمگیری افزایش و مقدار ضایعات کاهش خواهد یافت (Navara, 2013). بسیاری از مطالعات به بررسی این موضوع پرداخته‌اند و در تلاش هستند تا روشی را بیابند که بتوانند با استفاده از آن جنسیت جوجه‌ها را در صنعت مرغ تخم‌گذار و گوشتی تحت تأثیر قرار دهند.

در بسیاری از مطالعات، اثر هورمون‌ها بر نسبت جنسیت در مرغ‌های مادر بررسی شده است تا از کشتار جوجه‌های نر یک‌روزه جلوگیری شود. به‌عنوان مثال، تحقیقات نشان داده‌اند که مادرانی با سطح تستوسترون بیشتر، نسبت جنسیت فرزندان خود را به نر تغییر می‌دهند (Wrobel *et al*., 2020a). همچنین، ایمپلنت تستوسترون در کبوترها نسبت جنس نر به ماده را افزایش داد (Goerlich *et al*., 2009). مطالعات مختلف تستوسترون را به‌عنوان محرک تنظیم‌کننده نسبت جنسیت پرندگان نشان می‌دهند اما هیچ اطلاعاتی در مورد زمان یا نحوه عملکرد تستوسترون برای تأثیر بر جنسیت نتاج ارائه نمی‌کنند (Wrobel *et al*., 2020a). گزارش شده است که کورتیکوسترون، پروژسترون و تستوسترون می‌توانند بر نسبت‌های جنسی در مقادیر زیاد یا کم قبل از تخمک‌گذاری تأثیر بگذارند (Al-Maksousi *et al*., 2019; Gam *et al*., 2011; Pinson *et al*., 2011). مشاهده شد که غلظت زیاد هورمون کورتیکوسترون منجر به غلظت زیاد پروژسترون در خون گردید (Etches & Croze, 1983). تفاوت در غلظت کورتیکوسترون باعث به‌هم خوردن تعادل هورمون‌های جنسی می‌شود. غلظت زیاد هورمون کورتیکوسترون با اثر بر غلظت تستوسترون و پروژسترون قبل از تخمک‌گذاری می‌تواند بر کروموزوم‌های جنسی و در نتیجه نسبت جنسی تأثیر بگذارد (DuRant *et al*., 2016). زمان و مقدار هورمون‌ها می‌توانند نسبت جنسی نر یا ماده را تحت تأثیر قرار دهند (Wrobel *et al*., 2020a).

از طرفی، گیاهان دارای استروژن می‌توانند اثراتی شبیه هورمون داشته باشند. استروژن‌های گیاهی ترکیبات گیاهی هستند که ساختمان آن‌ها شبیه استروژن‌های حیوانی است (Jefferson *et al*., 2007). برخی مطالعات نشان داده‌اند که سیر بر هورمون‌های خاصی مثل استروژن و پروژسترون تأثیر می‌گذارد (Jafari *et al*., 2023). لیگان‌ها استروژن‌های گیاهی موجود در سیر هستند (Musk *et al*., 1997; Zangeneh *et al*., 2022). رازیانه نیز سرشار از استروژن‌های گیاهی از جمله لیگنان است (Thompson *et al*., 1991). در برخی مطالعات، اثر گیاهان دارای استروژن بر پروژسترون و استروژن نشان داده شده است. استفاده از ۲۰۰ میلی‌گرم اسانس رازیانه در مرغ‌های تخم‌گذار، وزن تخم مرغ را افـزایش و خصوصیات پوسته تخم مرغ و رنـگ زرده را بهبـود بخشـید و بر فولیکول‌های زرد بزرگ تـأثیر معنی‌داری داشت که به‌علت خواص استروژنی آن است (Taki *et al*., 2014). گزارش شد که استفاده از اسانس رازیانه به مقدار ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در مرغ‌های تخم‌گذار به‌طور قابل‌توجهی بر مقدار استروژن تأثیر داشت (Taherkhani *et al*., 2018). یک مطالعه مروری نشان داد که رازیانه باعث کاهش استروژن و افزایش پروژسترون گردید (Manouchehri *et al*., 2023). از طرفی، استفاده از عصاره خشک سیر به مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خوراک جوجه‌های گوشتی، غلظت استروژن پلاسمای خون را در مقایسه با شاهد کاهش داد (Bardel, 2018).

مکانیسمی که با آن دستکاری نسبت جنسی در پرندگان اتفاق می‌افتد، ناشناخته است. در پرندگان، نرها هموگامت (ZZ) و ماده‌ها هتروگامت (ZW) هستند، بنابر این مادر جنسیت نتاج را تعیین می‌کند. در پرندگان، جنسیت در اولین تقسیم میوز (میوزI)، هنگامی‌که یک کروموزوم جنسی در تخمک نگه داشته می‌شود و دیگری به جسم قطبی می‌رود، تعیین می‌شود (Correa *et al*., 2005). میوز ۲ تا ۴ ساعت قبل از تخمک‌گذاری رخ می‌دهد (Olsen & Fraps, 1950). از مکانیسم‌های احتمالی تعیین جنسیت که بیشتر بیان‌شده است این است که استفاده از هورمون‌ها باعث افزایش غلظت آن‌ها در خون می‌شود و این افزایش هورمون ممکن است با جداسازی غیر تصادفی کروموزوم‌های Z و W در طول میوز I جنس فرزندان را تحت تأثیر قرار دهد. شواهد زیادی وجود دارند که نشان می‌دهند ماده‌ها می‌توانند نسبت جنسیت نتاج را قبل از لقاح تنظیم کنند. با توجه به مطالعات انجام‌شده در مورد اثر هورمون بر جنسیت پرندگ، واضح است که مسیری وجود دارد که از طریق آن هورمون‌های استروئیدی می‌توانند اطلاعات مربوط به محیط را به اندام‌های تولیدمثلی منتقل کنند به‌گونه‌ای که بر رشد و تکامل گامت‌ها و نتاج تأثیر بگذارند. اما این که این مسیر چگونه است در حد حدس و گمان باقی مانده است. با توجه به چنین مسیری، منطقی است که فرض شود هورمون‌های جنسی ممکن است در تغییر نسبت جنسی در پاسخ به شرایط محیطی و اجتماعی دخالت داشته باشند (Navara, 2018).

در بسیاری از سیستم‌های بیولوژیک، pH نقش مهمی در تنظیم واکنش‌های بیوشیمیایی و فرآیندهای فیزیولوژیک ایفا می‌کند. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که pH احتمالاً می‌تواند بر جنسیت برخی از گونه‌های حیوانی تأثیرگذار باشد. به‌عنوان مثال، نشان داده شده است که pH آب بر جنسیت ماهی‌ها تأثیر دارد (Reddon & Hurd, 2013)، به‌طوری‌که pH اسیدی آب جنس نر را افزایش داد (de Morais *et al*., 2020). علیرغم این اطلاعات، نشان داده شده است که pH محیط (از ۵/۵ تا ۹/۰) تأثیر معنی‌داری بر غنی‌سازی اسپرم‌های حامل کروموزوم‌های X و Y ندارد و بنابراین pH به‌تنهایی نمی‌تواند تأثیر مستقیمی بر نسبت جنسیت در گاوها داشته باشد (Raval *et al*., 2019). در انسان، pH قلیایی واژن با جنسیت مذکر و pH اسیدی با جنسیت مؤنث ارتباط معنی‌داری دارد. به‌عبارت‌دیگر، در شرایط pH قلیایی، احتمال بارداری با جنین مذکر و در شرایط pH اسیدی، احتمال بارداری با جنین مؤنث افزایش می‌یابد (Gaber *et al*., 2020)، اما اطلاعات زیادی در مورد اثر pH بر جنسیت طیور در دسترس نیست.

مطالعات مختلف تأثیر تزریق هورمون‌های جنسی به مرغ‌های مادر بر جنسیت نتاج را نشان داده‌اند، اما تأثیر این

هورمون‌ها در خوراک بر نتاج کمتر موردتوجه قرارگرفته است. پژوهشگران سه روش تزریق، ایمپلنت و خوراکی را برای افزایش طولانی‌مدت سطح کورتیکوسترون آزمایش کردند و دریافتند که تجویز از طریق غذا موفق‌ترین روش برای افزایش پایدار سطح کورتیکوسترون کبوتر ماده طی ۴ هفته بود و به عنوان یک روش غیر تهاجمی برای تغییر نسبت جنسی اولیه پیشنهاد شد (Goerlich, 2009). استفاده ازکورتیکوسترون به‌مدت ۱۴ روز در جیره کورتیکوسترون خون را افزایش داد. این محقق بیان کرد که افزایش این هورمون در خون همراه با توده بدن مرغ می‌تواند با میوز تداخل داشته باشد (Aslam, 2014). علاوه بر این، با توجه به این‌که استفاده از برخی گیاهان دارویی در خوراک می‌تواند بر هورمون‌های جنسی تأثیر داشته باشد اما اثر آن‌ها بر جنسیت قبل از تشکیل تخم‌مرغ کمتر مورد توجه قرار گرفته است و ارتباط pH تخم‌مرغ و جنسیت به‌عنوان یک مکانیسم احتمالی در طیور کمتر بررسی شده است. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر هورمون‌های استروئیدی و عصاره سیر و رازیانه در جیره مرغ‌های مادر تخم‌گذار بر نسبت جنسیت نتاج و ارتباط جنسیت نتاج توسط این مکمل ها با pH سفیده، زرده و خون است.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در دانشگاه بوعلی سینای همدان انجام شد. ابتدا صد قطعه مرغ مادر تخم‌گذار و ده قطعه خروس در سن ۶۵ هفتگی از شرکت مرغک خریداری و به مزرعه عباس‌آباد دانشگاه بوعلی سینای همدان منتقل شدند. مرغ‌ها به‌مدت ده روز به محیط جدید عادت داده شدند، و بعد از ۱۰ روز در قالب طرح کاملاً تصادفی به‌صورت پنج تیمار، پنج تکرار و چهار قطعه مرغ در هر تکرار تیماربندی شدند. هر دو قطعه خروس به یک تیمار اختصاص یافتند و دو روز یک‌بار داخل قفس‌ها جابجا می‌شدند. پژوهش به مدت ۵ هفته انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل ۱- جیره شاهد (جیره بر پایه ذرت و سویا)، ۲- جیره شاهد + یک میلی‌گرم تستوسترون در کیلوگرم جیره، ۳- جیره شاهد + یک میلی‌گرم پروژسترون در کیلوگرم جیره، ۴- جیره شاهد + عصاره خشک رازیانه (۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) و ۵- جیره شاهد + عصاره خشک سیر (۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) بودند.

مواد خوراکی استفاده‌شده در این آزمایش طبق توصیه شرکت مرغک استفاده شدند. عصاره خشک سیر و عصاره خشک رازیانه از شرکت توسعه شیمیایی جهاد دانشگاهی کرج و قرص خوراکی پروژسترون (نام تجاری مدروکسی پروژسترون استات، ساخت شرکت ایران هورمون، ایران) و تستوسترون (نام تجاری تستوسترون آندکانوات، ساخت شرکت Organon، فرانسه) از داروخانه خریداری شدند. جیره‌ها توسط نرم‌افزار UFFDA مطابق با توصیه کاتالوگ مرغ‌های مادر سویه هایلاین W80 (2016) بالانس شدند و عصاره‌های خشک سیر و رازیانه و پروژسترون و تستوسترون به آن‌ها اضافه شد.

برای اندازه‌گیری pH تخم مرغ هر هفته از هر تکرار دو عدد تخم مرغ جمع‌آوری و زرده و سفیده جدا شدند. زرده و سفیده به طور جدا همگن شدند و pH آنها از سه نقطه توسط pHسنج دیجیتال اندازه‌گیری شد (Ryu *et al*., 2011). برای اندازه‌گیری pH خون در هفته اول یک عدد مرغ از هر تکرار علامت زده شد و خون‌گیری از ورید بال انجام و درون لوله‌های حاوی هپارین ریخته شد. سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند، درون سانتریفیوژ با دور g ۱۶۱۰، به‌مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند و پلاسمای آن‌ها جدا شد. در نهایت، pH پلاسما با استفاده از دستگاه pH متر اندازه‌گیری شد (Allahverdi *et al*., 2013). تا پایان پژوهش، هر هفته از مرغ‌های علامت زده شده خون‌گیری شد به این صورت که از هر تکرار یک عدد مرغ، ۳-۴ ساعت قبل از تخمک‌ریزی و قبل از شروع به خوردن غذا خون‌گیری می‌شد. مرغ‌ها حوالی ساعت ۱۰ در ابتدای آزمایش شروع به تخم‌گذاری می‌کردند و تخمک‌ریزی حدود ۳۰ دقیقه بعد از تخم‌گذاری انجام می‌شد. در پایان هفته پنجم، از هر تکرار دو عدد تخم مرغ برای اندازه‌گیری کیفیت تخم‌مرغ انتخاب و صفات کیفی تخم‌مرغ به‌صورت زیر اندازه‌گیری شدند:

تخم‌مرغ‌ها ابتدا توزین و سپس روی سطح صاف شکسته شدند. طول، عرض و ارتفاع سفیده، و قطر و ارتفاع زرده توسط کولیس دیجیتال اندازه‌گیری شدند. زرده از سفیده جدا و وزن گردید. در نهایت، پوسته تخم مرغ‌ها برای پاک شدن از محتوای سفیده (بدون از بین بردن غشای داخلی) شسته شد. پوسته‌های شسته‌شده به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند تا خشک شوند. پس از خشک‌شدن، توسط ترازوی دیجیتال وزن شدند و ضخامت آن‌ها (از سه نقطه) توسط میکرومتر دیجیتال اندازه‌گیری و میانگین سه نقطه به‌عنوان ضخامت پوسته گزارش شد (Hanusová *et al*., 2015). برای اندازه‌گیری وزن سفیده تخم مرغ، وزن تخم مرغ از وزن پوسته و زرده کسر گردید (Hanusová *et al*., 2015).

شاخص زرده، شاخص شکل، درصد زرده، درصد سفیده و نسبت پوسته طبق فرمول کوپ‌بزبای و همکاران (Kop-Bozbay *et al*., 2021)، شاخص سفیده مطابق فرمول ییلدریم (Yildirim, 2017)، و واحد هاو طبق فرمول اده و همکاران (Edeh *et al*., 2020) محاسبه شدند.

در پایان هفته پنجم، به مدت دو روز، ۱۱۲ عدد از تخم‌مرغ‌های مناسب برای جوجه‌کشی جمع‌آوری و به دستگاه جوجه‌کشی منتقل شدند. در روز هفتم دوره جوجه‌کشی، تخم‌مرغ‌ها مورد نوربینی قرار گرفتند و تخم‌مرغ‌های بدون نطفه حذف شدند. قبل از ورود تخم‌مرغ‌ها به هچری، جنین‌ها از تخم خارج و با استفاده از کیت‌های مولکولی استخراج DNA شرکت سیناکولون (کرج، ایران) تعیین جنسیت شدند. به این منظور، ابتدا حدود ۲۰ میلی‌گرم از بافت گوشت جنین با چاقوی اسکارپر جراحی برش داده شد. سپس در هاون توسط نیتروژن مایع پودر شد و DNA مطابق با دستور کیت استخراج شد. پس از استخراج DNA، مقدار ۲ میکرولیتر از آن توسط دستگاه نانودراپ برای مشخص شدن غلظت DNA مورد ارزیابی قرار گرفت. پرایمرهای موردنظر برای ژن CHD-1 طراحی استروییدی شدند (Wang *et al*., 2019) و سپس واکنش PCR توسط پرایمرهای طراحی‌شده انجام شد (Aslam, 2014). محصول PCR توسط ژل آگارز ۱ درصد تهیه‌شده با محلول TBE مورد الکتروفورز قرار گرفت و در نهایت، باندهای

مورد نظر توسط دستگاه ژلداک مشاهده شدند (وجود دو باند Z و W در ژل آگارز جنین ماده و یک باند Z جنین نر را نشان می‌دهد).

آنالیز آماری

داده‌های به‌دست‌آمده از این پژوهش ابتدا وارد نرم‌افزار اکسل شدند و سپس توسط نرم‌افزار SAS 9.4 (2016) مورد آنالیز قرار گرفتند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. داده‌های جنسیت توسط آزمون کای اسکور دوطرفه مورد بررسی قرار گرفتند و سایر مدل‌های آماری به‌صورت زیر هستند.

داده‌هایی که به‌صورت هفتگی اندازه‌گیری می‌شدند و کیفیت تخم مرغ:

$Y_{ij}= \mu+T_i+E_{ij}$

Y_{ij}: مشاهده j از تیمار i، μ: میانگین مشاهدات، T_i: اثر تیمار، E_{ij}: اشتباه آزمایشی

مقایسه داده‌های هفته‌های مختلف:

$Y_{ijk}= \mu+T_i+W_j+T_i\times Y_j+Ea_{ik}+Eb_{ijk}$

Y_{ijk}: مشاهده مربوط به تیمار i در زمان اندازه‌گیری j در تکرار k، μ: اثر میانگین، T_i: تیمار، W_j: هفته، $T_i \times Y_j$: تیمار× هفته، Ea_{ik}: اشتباه اصلی، Eb_{ijk}: اشتباه فرعی

مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد و $P < ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

اثر تیمارهای آزمایشی بر جنسیت نتاج

تیمارهای آزمایشی استفاده شده در این آزمایش تأثیر معنی‌داری را بر جنسیت نتاج نشان ندادند (جدول ۱)، اما کم‌ترین درصد جنس ماده توسط تیمار تستوسترون و بیش‌ترین درصد جنس ماده توسط تیمار پروژسترون و عصاره‌های رازیانه و سیر مشاهده شدند ($P = ۰/۰۵۶۵$).

جدول ۱- اثر تیمارهای آزمایشی بر جنسیت نتاج در مرغ‌های مادر تخم‌گذار

Table1. The effect of experimental treatments on the offspring sex of layer breeder hens

درصد ماده Female percentage	تعداد جنین‌ها Number of embryos	تیمارهای آزمایشی Excremental treatments
46.67	15	شاهد (Control)
30.43	23	تستوسترون (Testosterone)
68.75	16	پروژسترون (Progesterone)
72.73	11	عصاره رازیانه (Fennel extract)
64.71	17	عصاره سیر (Garlic extract)
0.0565		مقدار P (P-value)

اثر تیمارهای آزمایشی بر pH تخم‌مرغ

هفته دارای تأثیر معنی‌داری برpH سفیده و زرده بود ($P < ۰/۰۵$). در هفته چهارم، تیمارهای آزمایشی pH سفیده را در مقایسه با شاهد کاهش دادند به‌طوری‌که pH سفیده در تیمارهای عصاره رازیانه و عصاره سیر و پروژسترون به‌صورت معنی‌داری در مقایسه با شاهد کاهش یافت ($P < ۰/۰۵$) اما pH زرده تحت تأثیر قرار نگرفت. در سایر هفته‌ها، pH سفیده و زرده تحت تأثیر قرار نگرفت. در کل دوره آزمایش، pH سفیده و زرده در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری را در مقایسه با شاهد نشان نداد ($P > ۰/۰۵$) (جدول ۲). در هفته‌های پنجم و دوم، بیشترین و در هفته سوم کم‌ترین مقدار pH زرده مشاهده شدند. در هفته‌های اول و دوم بیشترین و در هفته سوم کم‌ترین مقدار pH سفیده مشاهده شدند.

جدول ۲- اثر استفاده از تستوسترون، پروژسترون، عصاره رازیانه و عصاره سیر در جیره مرغ‌های مادر تخم‌گذار بر pH زرده و سفیده‌ی تخم‌مرغ

Table 2 .The effect of testosterone, progesterone, fennel extract, and garlic extract in the diet on yolk and albumin pH

کل دوره Whole period		هفته پنجم Week 5		هفته چهارم Week 4		هفته سوم Week 3		هفته دوم Week 2		هفته اول Week 1		
pH سفیده Albumin pH	pH زرده Yolk pH	pH سفیده Albumin pH	pH زرده Yolk pH	pH سفیده Albumin pH	pH زرده Yolk pH	pH سفیده Albumin pH	pH زرده Yolk pH	pH سفیده Albumin pH	pH زرده Yolk pH	pH سفیده Albumin pH	pH زرده Yolk pH	تیمارهای آزمایشی Excremental treatments
8.30	6.20	8.03	6.42	8.33[a]	6.24	7.93	5.93	8.58	6.36	8.63	6.03	شاهد Control
8.27	6.20	7.91	6.42	8.22[ab]	6.07	7.80	6.04	8.52	6.26	8.89	6.22	تستوسترون Testosterone
8.28	6.21	8.04	6.33	8.14[abc]	6.11	7.97	6.03	8.61	6.30	8.63	6.24	پروژسترون Progesterone
8.19	6.20	7.81	6.28	7.86[c]	6.14	7.99	6.04	8.41	6.29	8.85	6.24	عصاره رازیانه Fennel extract
8.29	6.15	8.11	6.20	8.00[bc]	6.10	8.01	6.01	8.55	6.25	8.76	6.20	عصاره سیر Garlic extract
0.0541	0.2441	0.1101	0.0652	0.0885	0.0448	0.1034	0.0449	0.1039	0.0427	0.1038	0.0639	SEM
0.6179	0.5485	0.3795	0.1644	0.0237	0.1772	0.6279	0.4431	0.7132	0.4578	0.3290	0.1868	مقدار P P-value تیمار Treatment
0.0001	0.0001											هفته Week
0.0789	0.0443											تیمار × هفته Treatment × Week

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

میانگین‌های با حروف غیر مشابه در هر ستون، تفاوت معنی‌دار در سطح آماری ۵ درصد را نشان می‌دهند.

SEM: Standard Error of Means

Means with different letters in each column indicate significant differences at the 5% statistical level

اثر تیمارهای آزمایشی بر pH پلاسما

هفته دارای تأثیر معنی‌داری بر pH پلاسما بود ($P < ۰/۰۵$). در هفته اول دوره آزمایش، pH پلاسما در تیمارهای مختلف در مقایسه با شاهد به‌صورت معنی‌دار کاهش یافت ($P < ۰/۰۵$). در هفته سوم، pH تیمار پروژسترون در مقایسه با شاهد به صورت معنی‌داری افزایش یافت اما سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان ندادند ($P < ۰/۰۵$). در سایر هفته‌ها و در کل دوره، اثر تیمارهای آزمایشی بر pH پلاسما معنی‌دار نبود ($P > ۰/۰۵$) (جدول ۳). در هفته‌های دوم و اول، بیشترین و در هفته سوم کم‌ترین مقدار pH خون مشاهده شدند.

جدول ۳- اثر استفاده از تستوسترون، پروژسترون، عصاره رازیانه و عصاره سیر در جیره بر pH پلاسمای مرغ‌های مادر تخم‌گذار
Table 3. The effect of testosterone, progesterone, fennel extract, and garlic extract in the diet on the plasma pH of layer breeder hens

تیمارهای آزمایشی Excremental treatments	Plasma pH					
	هفته اول Week1	هفته دوم Week2	هفته سوم Week3	هفته چهارم Week4	هفته پنجم Week5	کل دوره Whole period
شاهد Control	7.88[a]	7.87	7.64[b]	7.75	7.73	7.793
تستوسترون Testosterone	7.76[b]	7.89	7.72[ab]	7.78	7.79	7.772
پروژسترون Progesterone	7.73[b]	7.92	7.68[a]	7.70	7.73	7.770
عصاره رازیانه Fennel extract	7.76[b]	7.94	7.62[b]	7.68	7.72	7.750
عصاره سیر Garlic extract	7.72[b]	7.96	7.61[b]	7.72	7.74	7.748
SEM	0.0263	0.0531	0.0390	0.0495	0.0442	0.0257
مقدار P P-value						
تیمار Treatment	0.0035	0.7229	0.0265	0.6396	0.8102	0.7646
هفته Week						0.0001
تیمار × هفته Treatment × Week						0.0491

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

میانگین‌های با حروف غیر مشابه در هر ستون، تفاوت معنی‌دار در سطح آماری ۵ درصد را نشان می‌دهند.

SEM: Standard Error of Means
Means with different letters in each column indicate significant differences at the 5% statistical level.

اثر تیمارهای آزمایشی بر کیفیت تخم‌مرغ

تیمارهای آزمایشی استفاده‌شده تأثیر معنی‌داری بر صفات کیفی تخم مرغ (میانگین ضخامت پوسته، نسبت پوسته، شاخص شکل، شاخص زرده، شاخص سفیده، و واحد هاو) در هفته پنجم دوره آزمایش نشان ندادند (جدول ۴) ($P > ۰/۰۵$).

جدول ۴- اثر استفاده از تستوسترون، پروژسترون، عصاره رازیانه و عصاره سیر در جیره بر صفات کیفی تخم مرغ در مرغ‌های مادر تخم‌گذار
Table 4. The effect of testosterone, progesterone, fennel extract, and garlic extract in the diet on egg quality traits in laying hens

تیمارهای آزمایشی Excremental treatments	ضخامت پوسته (میلی‌متر) Shell thickness (mm)	نسبت پوسته Shell ratio	شاخص شکل Shape index	شاخص زرده Yolk index	شاخص سفیده Albumin index	درصد زرده Yolk percentage	درصد سفیده Albumin percentage	واحد هاو Haugh unit
شاهد Control	0.41	8.80	74.32	42.19	6.93	28.03	63.16	90.86
تستوسترون Testosterone	0.44	9.57	75.56	42.72	7.37	25.94	64.49	92.97
پروژسترون Progesterone	0.42	6.36	75.56	38.09	6.43	28.27	62.37	88.70
عصاره رازیانه Fennel extract	0.43	9.02	75.80	42.57	7.18	25.21	66.66	91.98
عصاره سیر Garlic extract	0.42	8.59	74.36	42.94	6.68	27.00	64.41	90.12
SEM	0.0156	0.3023	1.0793	2.0384	0.2893	1.5953	1.6259	1.1232
مقدار P P-value								
تیمار Treatment	0.5936	0.1807	0.7768	0.4308	0.1889	0.6122	0.4318	0.1350

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

SEM: Standard Error of Means

اثر تیمارهای آزمایشی بر جنسیت جنین و pH تخم‌مرغ و پلاسما

مطالعات بسیاری اثر تزریق هورمون‌های استرواییدی به پرندگان را بر جنسیت نتاج بررسی کرده‌اند و نشان داده‌اند که هورمون‌ها احتمالاً می‌توانند نسبت جنسی نتاج را تحت تأثیر قرار دهند، اما هنوز ناشناخته است که این هورمون‌ها چگونه و از طریق چه مکانیسمی جنسیت را تغییر می‌دهند. در بیشتر مطالعات اشاره شده است که احتمالاً این هورمون‌ها از طریق

تأثیر بر هورمون‌های خون و درنتیجه آن تأثیر بر تقسیم میوز اثر می‌کنند. اما روش تزریق تنش زیادی به پرندگان وارد می‌کند که نیاز به بررسی روش‌های جایگزین با تنش کمتر برای پرندگان را ضروری می‌سازد.

یکی از روش‌هایی که می‌تواند برای تغییر جنسیت نتاج مورد توجه قرار گیرد، تغذیه است. تحقیقات محدودی در مورد اثر هورمون‌ها در خوراک طیور بر جنسیت نتاج انجام شده‌اند. به عنوان مثال، استفاده از کورتیکوسترون در خوراک بر جنسیت نتاج بررسی شده است (Aslam, 2014). همچنین، در مطالعات مختلف به اثر گیاهان دارای استروژن در خوراک بر هورمون‌های استروییدی اشاره شده است و اثر برخی از آنها به صورت تزریق درون تخم مرغ بر جنسیت جنین انجام شده است اما اثر احتمالی آنها در خوراک بر جنسیت نتاج پرندگان مورد بررسی قرار نگرفته است.

pH از مکانیسم‌هایی است که در مطالعات مختلف بر تعیین جنسیت انسان و برخی حیوانات بررسی شده است؛ در شرایط pH قلیایی، احتمال جنین مذکر و در شرایط pH اسیدی، احتمال جنین مؤنث افزایش می‌یابد (Gaber *et al*., 2020). علاوه بر این، تحقیقات در ماهی‌ها نشان داده‌اند که pH اسیدی آب جنس نر را در مقایسه با ماده افزایش داد (de Morais *et al*., 2020).

با این وجود، تأثیرات مشابه در طیور کمتر بررسی شده‌اند و هدف از این تحقیق پرکردن این خلأ علمی و بررسی تأثیر pH و گیاهان دارویی و هورمون‌ها بر نسبت جنسیت نتاج در طیور بود.

تأثیر هورمون‌های استروییدی بر نسبت جنسی نتاج در پرندگان، موضوعی است که توجه زیادی را در علوم زیستی به خود جلب کرده است. در مطالعات بسیاری تستوسترون به عنوان تنظیم‌کننده نسبت جنسیت در پرندگان مطرح شده است، اما در خصوص زمان و نحوه تأثیر آن بر جنسیت فرزندان اطلاعات دقیقی در دسترس نیست و هنوز مبهم باقی مانده است (Wrobel, 2018) به‌علاوه، پروژسترون نیز نقش حیاتی در ایجاد شرایط مناسب برای تخم‌گذاری و توسعه نطفه ایفا می‌کند و تأثیرات آن بر نسبت جنسی فرزندان می‌توانند قابل‌توجه باشند. در کنار این هورمون‌ها، استروژن‌های موجود در برخی گیاهان نیز می‌توانند بر مکانیسم‌های هورمونی تأثیر بگذارند و به‌واسطه اثرات مشابه با استروژن‌های طبیعی، ممکن است نسبت جنسی فرزندان را تحت تأثیر قرار دهند.

در مطالعه حاضر، استفاده از هورمون‌های استروئیدی از نظر آماری تأثیر معنی‌داری بر جنسیت نتاج نشان نداد اما تستوسترون به‌صورت نزدیک به معنی‌دار جنس نر را افزایش داد که مطابق با نتایج محققانی است که به‌صورت تزریق و ایمپلنت از هورمون تستوسترون استفاده کردند (Goerlich *et al*., 2009; Rutkowska & Cichoń, 2006; Veiga *et al*., 2004)، به‌علاوه، رازیانه، سیر و پروژسترون جنس ماده را افزایش دادند. گزارش شده است که استفاده از هورمون‌های کورتیکوسترون، پروژسترون و تستوسترون در دوز کم یا زیاد قبل از تخمک‌گذاری می‌توانند بر نسبت جنسی نر و ماده تأثیر بگذارند (Al-Maksousi *et al*., 2019; Gam *et al*., 2011; Pinson *et al*., 2011). از طرفی، گزارش شده است که زمان و دوز هورمون‌ها بر این که نسبت نتاج به چه جنسی متمایل شود تأثیر دارند (Wrobel *et al*., 2020b). علاوه بر این، عواملی مانند استفاده از هورمون‌ها قبل از تلقیح، در دسترس بودن غذا، آب‌وهوا و عوامل مادری و پدری ممکن است دلایل زمینه‌ای برای تأثیرات فصل و سال و ماه بر نسبت جنسی فرزندان در برخی از گونه‌های دام باشند (Abecia *et al*., 2017).

در مطالعه‌ی حاضر، pH تنها در هفته چهارم توسط رازیانه، سیر و پروژسترون کاهش یافت، اما در کل دوره تأثیر معنی‌داری در نتایج مشاهده نشد. درحالی‌که جنسیت تا حدودی تحت تأثیر قرار گرفت هر چند که از نظر آماری معنی‌دار نبود. در تحقیقاتی که در مورد انسان انجام شده است تأثیر رازیانه بر pH واژن نشان داده شده است (Abedi *et al*., 2018). همچنین، گزارش شده است که گیاهان دارای استروژن باعث بهبود pH واژن می‌شوند. تحقیقاتی اندکی در مورد تأثیر pH بر جنسیت در طیور وجود دارد. در تحقیقی که از جیره اسیدی و قلیایی به‌منظور تغییر pH خون در لگهورن سفید و رودایلندر قرمز انجام شد، تغییرات pH خون تأثیری بر نسبت جنسی جوجه‌ها نداشت (Wilcox, 1959). در مطالعات پیشین روی موش‌ها، مشخص شده است که pH خون بر pH واژن تأثیر دارد و بنابراین مخاط رحم که در شرایط pH زیاد (قلیایی) قرار دارد اسپرم حاوی کروموزوم y را ترجیح می‌دهد درحالی‌که pH نسبتاً کم (اسیدی) اسپرم حاوی کروموزوم x را مدنظر قرار می‌دهد. ازاین‌رو، تغییرات pH خون در جنس نر می‌تواند بر نسبت جنسی فرزندان تأثیر بگذارد (Weir, 1955). همچنین، نشان داده شد که هیچ یک از pH اسیدی یا قلیایی واژن موش‌ها تأثیری بر جنسیت فرزندان نداشت (Balaci *et al*., 2009). در مورد انسان نیز نشان داده شده است که pH واژن می‌تواند بر جنسیت تأثیر داشته باشد (Gaber *et al*., 2020). در این مطالعه، اثر مواد استفاده شده بر جنسیت جنین و در نتیجه pH پلاسما و تخم‌مرغ بررسی شد. در این راستا، هیچ رابطه‌ی معناداری بین pH تخم‌مرغ و پلاسما با جنسیت مشاهده نشد. در هفته‌های مختلف تنها pH سفیده در هفته چهارم و pH خون در هفته اول توسط تیمارهای مختلف در مقایسه با شاهد کاهش یافت. طبق تحقیقات گذشته، دما، سن مرغ و زمان تأثیر معنی‌داری بر pH سفیده و زرده داشتند (Akyurek & Okur, 2009) که احتمالاً علت تغییر مشاهده‌شده در هفته چهارم تأثیر موارد ذکرشده باشد.

کیفیت تخم مرغ

از آنجایی‌که کیفیت تخم مرغ بر جوجه‌کشی تأثیر می‌گذارد، در مطالعه حاضر اثر مواد استفاده‌شده به‌منظور تغییر جنسیت بر صفات کیفی تخم مرغ نیز بررسی شد. نتایج نشان دادند که تیمارهای آزمایشی تأثیر معنی‌داری بر صفات کمی و کیفی تخم مرغ نشان ندادند. در برخی از مطالعات، اثرات مثبتی از رازیانه بر صفات کمی و کیفی تخم مرغ مشاهده شده‌اند. به‌عنوان مثال، استفاده از سطوح ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خوراک، اسانس رازیانه، ضخامت پوسته و وزن پوسته را بهبود بخشید اما تأثیر معنی‌داری بر شاخص شکل و واحد هاو نشان نداد (Taki *et al*., 2014). استفاده از اسانس رازیانه به مقدار

۱۰ میلی‌گرم روزانه، به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در مرغ‌های تخم‌گذار به‌طور قابل‌توجهی بر تولید تخم مرغ، وزن تخم مرغ، وزن زرده، استروژن، کلسیم، وزن کبد، چربی شکمی و فولیکول‌های سفید بزرگ تأثیر داشت (Taherkhani *et al*., 2018). نشان داده شده است که مکمل دارای استروژن گیاهی در بلدرچین، کیفیت تخم و عملکرد را بهبود بخشید (Akdemir & Sahin, 2009)، بنابر این، پیشنهاد شده است که رازیانه دارای ترکیبات استروژن‌مانند است که باعث تولید تخم می‌شود. اما در مطالعه حاضر تأثیری مشاهده نشد که می‌تواند به علت نوع پرنده، شرایط آزمایش، یا نحوه استفاده از رازیانه (در مطالعه حاضر عصاره) و یا دوز رازیانه باشد. اسانس رازیانه (۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) باعث کاهش واحد هاو و افزایش وزن و ضخامت پوسته تخم‌مرغ در مرغ‌های تخم‌گذار شد (Nasiroleslami & Torki, 2010). علاوه بر تولید تخم‌مرغ، توده تخم‌مرغ و رنگ زرده در مرغ‌های تخم‌گذار بهبود یافت (Abou-Elkhair *et al*., 2018). همچنین، گزارش‌هایی در مورد عدم تأثیر رازیانه بر صفات کمی و کیفی تخم مرغ ارائه شده‌اند. در بررسی اثر عصاره رازیانه در سطوح ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خوراک همراه با ویتامین D3 بر عملکرد و جوجه‌درآوری مرغ‌های مادر گوشتی در سن ۷۶ تا ۸۴ هفتگی نشان داده شد که درصد سفیده و زرده، واحد هاو، واحد وزن به سطح پوسته، درصد و ضخامت پوسته تحت تأثیر قرار نگرفت (Kazemifard *et al*., 2013) و استفاده از عصاره رازیانه در سن ۹۶ تا ۱۰۲ هفتگی پس از تولک‌بری کیفیت پوسته تخم‌مرغ را بهبود بخشید (Kazemifard *et al*., 2017). گزارش شد که افزودن اسانس رازیانه، واحد هاو و همچنین کیفیت پوسته تخم‌مرغ را تحت تأثیر قرار داد (Nasiroleslami & Torki, 2010). در بلدرچین‌های تخم‌گذار، پارامترهای کیفی تخم‌مرغ تحت تأثیر سطوح مختلف دانه‌های رازیانه (۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹ درصد جیره) قرار نگرفتند (Buğdaycı *et al*., 2018). استفاده از ۷۵۰ میلی‌گرم رازیانه در کیلوگرم خوراک بلدرچین‌های تخم‌گذار وزن تخم‌مرغ و آلبومین را بهبود داد (Souza *et al*., 2020). همچنین، استفاده از سیر در برخی مطالعات دارای تأثیر مثبت و در برخی مطالعات بدون تأثیر بر صفات کمی و کیفی تخم مرغ بود درحالی‌که در این مطالعه تأثیر معنی‌داری مشاهده نشد. استفاده از ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد پودر سیر در جیره مرغ‌های تخم‌گذار تنها وزن آلبومین، وزن زرده و شاخص زرده را تحت تأثیر قرارداد و بر سایر پارامترهای کیفی تخم‌مرغ معنی‌دار نبود (Mousa *et al*., 2019). ارتفاع زرده، واحد هاو و ضخامت پوسته تخم‌مرغ تازه با مکمل عصاره سیر کهنه در جیره به‌طور قابل‌توجهی بهبود یافتند. این محققین گزارش کردند که مطالعات بیشتری برای ارزیابی مکانیسم تأثیر عصاره سیر کهنه‌شده در جیره بر کیفیت تخم‌مرغ و ترکیب زرده تخم‌مرغ در مرغ‌های تخم‌گذار مورد نیاز هستند (Hossain *et al*., 2016). از طرف دیگر، استفاده از یک درصد پودر سیر در جیره مرغ‌های تخم‌گذار بر ضخامت پوسته، وزن مخصوص تخم‌مرغ و وزن پوسته اثری نداشت اما واحد هاو را بهبود بخشید (Motamedi & Mehdizade Taklimi, 2017). در مطالعه دیگر، استفاده از پودر سیر در جیره مرغ‌های تخم‌گذار تأثیر معنی‌داری بر شاخص آلبومین، شاخص پوسته، وزن پوسته، واحد هاو در مرغ‌های تخم‌گذار نشان داد (Kolawole & Folake, 2019). تزریق ۲۰۰ میکروگرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن تستوسترون (یک بار در هفته به‌مدت یک ماه) در ۱۲۸ عدد پولت مادر تخم‌گذار قبل از بلوغ جنسی در فصل تابستان انجام و پارامترهای کیفی تخم‌مرغ مانند شاخص شکل، شاخص زرده، شاخص سفیده، واحد هاو، قطر پوسته و وزن زرده و سفیده و پوسته بررسی شدند. نتایج نشان دادند که تنها شاخص و وزن سفیده توسط تستوسترون در مقایسه با شاهد افزایش یافتند و سایر پارامترها تحت تأثیر قرار نگرفتند (Goma *et al*., 2021). در بررسی تزریق پروژسترون (۱ و ۲ میلی‌گرم به‌ازای هر جوجه) به ۶۰ عدد جوجه طلایی عربی ۲۶ هفته، نشان داده شد که تزریق پروژسترون تأثیر قابل‌توجهی بر تولید تخم‌مرغ داشت (Natsir *et al*., 2021). در مطالعه‌ای که اثر تزریق ۰/۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن پروژسترون در ۱۰۰ مرغ هایلاین، ۲ و ۵ ساعت بعد از تخم‌گذاری بر کیفیت پوسته تخم‌مرغ بررسی شد، تزریق ۲ ساعت بعد از تخم‌گذاری کیفیت پوسته تخم مرغ را به‌صورت معنی‌داری بهبود داد (Zhang *et al*., 2020). در مطالعه‌ی حاضر، هورمون‌های استروئیدی و عصاره گیاهان دارویی اثر معنی‌داری را بر کیفیت تخم‌مرغ نشان ندادند که علت آن می‌تواند عوامل مختلفی مانند نحوه استفاده از مواد استفاده شده، مقدار آنها در خوراک، سن پرنده و غیره باشد.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی، نتایج این پژوهش نشان دادند که استفاده از هورمون‌های تستوسترون و پروژسترون و عصاره‌های سیر و رازیانه در جیره، در مقادیر استفاده‌شده در این پژوهش توانست بدون این که تأثیر منفی بر کیفیت تخم‌مرغ بگذارند جنسیت را تا حدودی تحت تأثیر قرار داد هر چند که از نظر آماری معنی‌دار نبود. احتمال می‌رود که اثر تیمارهای آزمایشی از طریق تأثیر بر pH خون و تخم مرغ نباشد؛ با این وجود، باید بررسی‌های بیشتری در مطالعات بعدی انجام شوند. پیشنهاد می‌شود که این تحقیق در انواع مختلف پرندگان با شرایط محیطی متفاوت و یا در بازه زمانی بیشتر و با سایر مواد و گیاهان دارویی با مقدار متفاوت‌تر برای درک بهتر از ارتباط جنسیت مرغ با pH خون و تخم‌مرغ انجام شود.

References

Abecia, J.-A., Arrébola, F., & Palacios, C. (2017). Offspring sex ratio in sheep, cattle, goats and pigs: influence of season and lunar phase at conception. *Biological Rhythm Research*, *48*(3), 417-424. https://doi.org/doi: 10.1080/09291016.2016.1268325

Abedi, P., Najafian, M., Yaralizadeh, M., & Namjoyan, F. (2018). Effect of fennel vaginal cream on sexual function in postmenopausal women: a double blind randomized controlled trial. *Journal of Medicine and Life*, *11*(1), 24.

Abou-Elkhair, R., Selim, S., & Hussein, E. (2018). Effect of supplementing layer hen diet with phytogenic feed additives on laying performance, egg quality, egg lipid peroxidation and blood biochemical constituents. *Animal Nutrition*, *4*(4), 394-400. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.05.009

Akdemir, F., & Sahin, K. (2009). Genistein supplementation to the quail: effects on egg production and egg yolk genistein, daidzein, and lipid peroxidation levels. *Poultry Science*, *88*(10), 2125-2131. https://doi.org/10.3382/ps.2009-00004

Akyurek, H., & Okur, A. A. (2009). Effect of storage time, temperature and hen age on egg quality in free-range layer hens. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, *8*(10), 1953-1958.

Al-Maksousi, S. K., Al-Hayani, W. K., & Hussein, F. M. (2019). Effect of the level of corticosteron hormone in the blood of local iraqi chicken mothers on the sex ratio of the produced offsprings. *Plant Archives*, *19*(2), 1411-1415.

Allahverdi, A., Feizi, A., Takhtfooladi, H. A., & Nikpiran, H. (2013). Effects of heat stress on acid-base imbalance, plasma calcium concentration, egg production and egg quality in commercial layers. *Global Veterinaria*, *10*(2), 203-207. https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2013.10.2.7286

Aslam, M. A. (2014). *Offspring sex ratio bias and sex related characteristics of eggs in chicken* [PhD. Thesis, Wageningen University and Research].

Balaci, I.-M., Pàll, E., & Groza, S. (2009). The influence of vaginal pH in mice over the sex of the offspring. *Cluj Veterinary Journal*, *162*, 41-50. https://doi.org/10.22055/ivj.2020.229207.2254

Bardel, Z. (2018). The effect of in ovo injection of Letrozole, *Urtica dioica* root and garlic extracts on sex differentiation and growth performance of broiler chickens [M.Sc. Thesis, Bu-Ali Sina University]. [In Persian]

Buğdaycı, K. E., Oğuz, F. K., Oğuz, M. N., & Kuter, E. (2018). Effects of fennel seed supplementation of ration on performance, egg quality, serum cholesterol, and total phenol content of egg yolk of laying quails. *Revista Brasileira de Zootecnia*, *47*, e20170160. https://doi.org/10.1590/rbz4720170160

Correa, S. M., Adkins-Regan, E., & Johnson, P. A. (2005). High progesterone during avian meiosis biases sex ratios toward females. *Biology Letters*, *1*(2), 215-218. https://doi.org/10.1098/rsbl.2004.0283

de Morais, I. d. S., Reis, V. R., & de Almeida, F. L. (2020). The influence of the water pH on the sex ratio of tambaqui colossoma macropomum (CUVIER, 1818). *Aquaculture Reports*, *17*, 100334. https://doi.org/10.1016/j. aqrep.2020.100334

DuRant, S. E., Hopkins, W. A., Carter, A. W., Kirkpatrick, L. T., Navara, K. J., & Hawley, D. M. (2016). Incubation temperature causes skewed sex ratios in a precocial bird. *Journal of Experimental Biology*, *219*(13), 1961-1964. https://doi.org/10.1242/jeb.138263

Edeh, H., Osita, C., Nwoga, C., Ani, A., & Okwor, J. (2020). The effect of bodyweight variation on laying performances of Shaver brown hen in humid tropical environment. *Nigerian Journal of Animal Science*, *22*(1), 83-90.

Etches, R., & Croze, F. (1983). Plasma concentrations of LH, progesterone, and corticosterone during ACTH-and corticosterone-induced ovulation in the hen (*Gallus domesticus*). *General and Comparative Endocrinology*, *50*(3), 359-365. https://doi.org/10.1016/0016-6480(83)90256-3

Gaber, M. A., Allam, N. H., & Saleh, S. A. (2020). Effect of vaginal pH in preconceptional fetal sex determination. *Menoufia Medical Journal*, *33*(3), 1063-1066. https://doi.org/10.4103/mmj.mmj_338_18

Gam, A. E., Mendonça, M. T., & Navara, K. J. (2011). Acute corticosterone treatment prior to ovulation biases offspring sex ratios towards males in zebra finches Taeniopygia guttata. *Journal of Avian Biology*, *42*(3), 253-258. https://doi.org/10.21608/jpd.2021.203960

Goerlich, V. (2009). Manipulative mothers: Maternal steroid hormones and avian offspring sex ratio.

Goerlich, V. C., Dijkstra, C., Schaafsma, S. M., & Groothuis, T. G. (2009). Testosterone has a long-term effect on primary sex ratio of first eggs in pigeons—in search of a mechanism. *General and Comparative Endocrinology*, *163*(1-2), 184-192. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.01.004

Goma, A., Tawfeek, M., & El Kelawy, H. (2021). Impact of royal jelly, gibberellic acid and testosterone treatments on some productive, egg quality traits and economic efficiency in local chicken strain, during the summer season of egypt. *Journal of Productivity and Development*, *26*(4), 843-863. https://doi.org/10.21608/jpd.2021.203960

Hanusová, E., Hrnčár, C., Hanus, A., & Oravcová, M. (2015). Effect of breed on some parameters of egg quality in laying hens. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, *18*(1), 20-24. https://doi.org/10.15414/afz.2015.18.01.12-24

Hossain, M., Begum, M., & Kim, I. (2016). Effect of Leuconostoc mesenteroides KCCM35046 fermented aged garlic extract on egg production, egg quality, odour gas emissions, targeted E. coli colony, haematological characteristics and fatty acids composition of egg yolk in laying hens. *Journal of Applied Animal Research*, *44*(1), 458-465. https://doi.org/10.1080/09712119.2015.1091327

Jafari, F., Khalilzadeh, S., & Nejatbakhsh, F. (2023). Therapeutic effects of garlic (*Allium sativum*) on female reproductive system: A systematic review. *Heliyon*, *9*(12), e22555. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22555

Jefferson, W. N., Padilla-Banks, E., & Newbold, R. R. (2007). Disruption of the female reproductive system by the phytoestrogen genistein. *Reproductive Toxicology*, *23*(3), 308-316. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.11.012

Kazemifard, M., Kermanshahi, H., Rezaei, M., & Golian, A. (2013). Effect of different levels of fennel extract and vitamin D3 on performance, hatchability and immunity in post molted broiler breeders. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, *3*(4), 733-745.

Kazemifard, M., Kermanshahi, H., Rezaei, M., Golian, A., & Hosseini, S. J. (2017). Effect of different levels of calcium, phosphor and vitamin d3 with fennel extract on, performance and egg shell quality in post molted ross broiler breeders [Research]. *Research on Animal Production*, *8*(15), 33-41. https://doi.org/10.29252/rap.8.15.33. [In Persian]

Kolawole, F. S. O., & Folake, A. O. (2019). Egg traits and productive performance of Isa-brown laying hens fed garlic supplemented diets. *Asian Journal of Applied Sciences*, *7*(4), 398-403. https://doi.org/10.24203/ajas.v7i4.5845

Kop-Bozbay, C., Akdag, A., Bozkurt-Kiraz, A., Gore, M., Kurt, O., & Ocak, N. (2021). Laying performance, egg quality characteristics, and egg yolk fatty acids profile in layer hens housed with free access to chicory-and/or white clover-vegetated or non-vegetated areas. *Animals*, *11*(6), 1708. https://doi.org/10.3390/ani11061708

Manouchehri, A., Abbaszadeh, S., Ahmadi, M., Nejad, F. K., Bahmani, M., & Dastyar, N. (2023). Polycystic ovaries and herbal remedies: A systematic review. *JBRA Assisted Reproduction*, *27*(1), 85.

Motamedi, S. M., & Mehdizade Taklimi, S. M. (2017). The effects of different levels of garlic and fenugreek powder on performance, egg quality and hematological parameters and antibody titer of commercial laying hens. *Research on Animal Production*, *8*(15), 124-130. https://doi.org/10.29252/rap.8.15.124. [In Persian]

Mousa, B. H., Awad, A. M., Alhamdani, H., Nafea, H. H., & Alhamdani, A. A. (2019). Inclusion of Garlic (*Allium Sativum*.) and Turmeric (*Curcuma longa* L.) powder to laying hens' diets on egg quality traits, bacterial population and intestinal histomorphology. *Annals of Tropical Medicine and Public Health*, *22*(4), S373. https://doi.org/10.36295/ASRO.2019.221224

Musk, S., Clapham, P., & Johnson, I. (1997). Cytotoxicity and genotoxicity of diallyl sulfide and diallyl disulfide towards Chinese hamster ovary cells. *Food and Chemical Toxicology*, *35*(3-4), 379-385. https://doi.org/10.1016/S0278-6915(97)00120-8

Nasiroleslami, M., & Torki, M. (2010). Including essential oils of fennel (*Foeniculum vulgare*) and ginger (*Zingiber officinale*) to diet and evaluating performance of laying hens, white blood cell count and egg quality characteristics. *Advances in Environmental Biology*, *4*(3), 341-345.

Natsir, M. H., Ciptadi, G., & Susilawati, T. (2021). Egg production, fertility, hatchability and luteinizing hormone profile of progesterone hormone injected to arabic gold chicken (*Gallus turcicus*). *Journal of World's Poultry Research*, *11*(1), 73-82. https://doi.org/10.36380/jwpr.2021.10

Navara, K. J. (2013). The role of steroid hormones in the adjustment of primary sex ratio in birds: compiling the pieces of the puzzle, *53*(6), 923- 937. https://doi.org/10.1093/icb/ict083

Navara, K. J. (2018). Hormones rule the roost: hormonal influences on sex ratio adjustment in birds and mammals. In *Choosing Sexes: Mechanisms and Adaptive Patterns of Sex Allocation in Vertebrates* (pp. 123-154). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71271-07

Olsen, M. W., & Fraps, R. M. (1950). Maturation changes in the hen's ovum. *Journal of Experimental Zoology*, *114*, 475-489. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71271-07

Pinson, S. E., Parr, C. M., Wilson, J. L., & Navara, K. J. (2011). Acute corticosterone administration during meiotic segregation stimulates females to produce more male offspring. *Physiological and Biochemical Zoology*, *84*(3), 292-298. https://doi.org/10.1086/659373

Raval, N., Shah, T., George, L., & Joshi, C. (2019). Effect of the pH in the enrichment of X or Y sex chromosome-bearing sperm in bovine. *Veterinary World,* 12(8), 1299-1303. https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.1299-1303

Reddon, A. R., & Hurd, P. L. (2013). Water pH during early development influences sex ratio and male morph in a West African cichlid fish, Pelvicachromis pulcher. *Zoology*, *116*(3), 139-143. https://doi.org/10.1016/j.zool.2012.11.001

Rutkowska, J., & Cichoń, M. (2006). Maternal testosterone affects the primary sex ratio and offspring survival in zebra finches. *Animal Behaviour*, *71*(6), 1283-1288. https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2005.07.025

Ryu, K. N., No, H. K., & Prinyawiwatkul, W. (2011). Internal quality and shelf life of eggs coated with oils from different sources. *Journal of Food Science*, *76*(5), S325-S329. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02177.x

Souza, A. V. d., Morais, M. V. M., Rocha, M. C., Souza, R. M. d., Valentim, J. K., Pietramale, R. T. R., Silva, N. E. M., Moraleco, D. D., & Lima, H. J. D. á. (2020). Influence of fennel in Japanese Quail Diet over egg quality and behavior aspects. *Boletim de Indústria Animal*, *77*, 1-13. https://doi.org/10.17523/bia.2020.v77.e1477

Taherkhani, R., Ghiasi, H., & Ebrahimi, M. (2018). The effect of using fennel on plasma estrogen and performance of laying hens. *Journal of Biochemical Technology*, *2*, 115-122.

Taki, A., Salari, S., Bojarpour, M., Sari, M., & Taghizadeh, M. (2014). The effect of *foeniculum vulgare* essence on production performance, egg quality and reproductive parameters of laying hens. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *6*(2), 140-149. https://doi.org/10.22067/ijasr.v6i2.21963

Thompson, L. U., Robb, P., Serraino, M., & Cheung, F. (1991). Mammalian lignan production from various foods. *Nutrition and Cancer*, *16*(1), 43-52. https://doi.org/10.1080/01635589109514139

Veiga, J. P., Viñuela, J., Cordero, P. J., Aparicio, J. M., & Polo, V. (2004). Experimentally increased testosterone affects social rank and primary sex ratio in the spotless starling. *Hormones and Behavior*, *46*(1), 47-53. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2004.01.007

Wang, Y., Jin, G., Ma, M., & Xiang, X. (2019). Sex differences in serum steroid hormone levels during embryonic development in hen eggs. *Poultry Science*, *98*(11), 6053-6062. https://doi.org/10.3382/ps/pez270

Weir, J. (1955). Male influence on sex ratio of offspring in high and low blood-pH lines of mice. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a106578

Wilcox, F. (1959). Blood pH and sex Ratio in Chickens. *Poultry Science*, *38*(4), 959-964. https://doi.org/10.3382/ps.0380959

Wrobel, E. R. (2018). *Responsiveness of the chicken germinal disc region to testosterone and corticosterone* [Master of Science (MS), University of Georgia].

Wrobel, E. R., Bentz, A. B., Lorenz, W. W., Gardner, S. T., Mendonca, M. T., & Navara, K. J. (2020b). Corticosterone and testosterone treatment influence expression of gene pathways linked to meiotic segregation in preovulatory follicles of the domestic hen. *Plos One*, *15*(5), e0232120. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232120

Wrobel, E. R., Molina, E., Khan, N. Y., Akingbemi, B. T., Mendonca, M. T., & Navara, K. J. (2020a). Androgen and mineralocorticoid receptors are present on the germinal disc region in laying hens: Potential mediators of sex ratio adjustment in birds? *General and Comparative Endocrinology*, *287*, 113353. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.113353

Yildirim, A. (2017). Changes in quality characteristics during storage time of eggs from layer hens fed diet supplemented with Panax ginseng Meyer leaf extract. *Progress in Nutrition*, *19*(2), 197-204. https://doi.org/10.23751/pn.v19i2.4867

Zangeneh, S., Kakeshian, S., Shirali, S., Savari, A., Najafzadeh Varzi, H., Movahedinia, A., & Zakeri, M. (2022). Survey on feeding with soy (*Glycine max)* and garlic (*Allium sativum*) phytoestrogens on histological structure of ovary in Yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*). *Journal of Marine Science and Technology*, *21*(3), 62-70. https://doi.org/10.22113/jmst.2019.129873.2154. [In Persian]

Zhang, J., Wang, Z., Wang, X., Sun, L., Rajput, S. A., & Qi, D. (2020). The paradoxical effects of progesterone on the eggshell quality of laying hens. *Journal of Structural Biology*, *209*(2), 107430. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2019.107430