بررسی تاثیر آستاگزانتین جیره غذایی بر ذخیره آستاگزانتین تخمک و قابلیت لقاح در مولدین قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)[1]

امیر عباس بازیار لاکه[2] محمد رضا احمدی[3] باقر مجازی امیری[4]

چکیده

با انجام این آزمایش اثر غلظت آستاگزانتین موجود در جیره غذایی بر تجمع آن در تخمک و در نتیجه درصد لقاح آن مورد بررسی قرار گرفت. برای این کار ماهیان مولد ماده قزل آلای رنگین کمان(*Oncorhynchus mykiss*)در قالب یک طرح کاملا تصادفی با سطوح مختلف غلظت رنگدانه کاروتنوئیدی آستاگزانتین در جیره غذایی، شامل ۰/۰۷(کنترل) ، ۱۲/۴۶، ۳۳/۳۳، ۶۵/۱ و۹۲/۹۱ میلیگرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذا تحت سیستم فتوپریود مصنوعی تا حصول رسیدگی جنسی نهایی مورد تغذیه قرار گرفتند. پس از گذشت شش ماه از شروع تغذیه، علایم رسیدگی جنسی در مولدین مشاهده شد و سپس برای تکثیر مصنوعی آماده گردیدند. به منظور فراهم نمودن اسپرم مورد نیاز برای لقاح دادن تخمک‌های کلیه تیمارهای آزمایشی، اسپرم همگن شده چهار عدد مولد نر قزل آلای رنگین کمان که به منظور جلوگیری از کیفیت ضعیف اسپرم توسط غذای حاوی ۳۳/۳۳ میلیگرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذا تغذیه شده بودند، مورد استفاده قرار گرفت.

مولدین ماده تخم‌هایی با محتوای آستاگزانتینی۲۹/۷۹ -۲/۰۳ میلیگرم آستاگزانتین بر کیلوگرم تخمک تولید کردند که تفاوت معنی‌داری در خصوص محتوای آستاگزانتینی تخمک در بین تیمارها مشاهده گردید($p<0/05$). اگرچه تفاوت معنی‌داری در خصوص قابلیت لقاحی تخمک(درصد لقاح) بین تیمارهای حاوی مقادیر آزمایشی آستاگزانتین مشاهده نگردید($P>0/05$) ولی در مقایسه با تیمار کنترل این اختلاف معنی‌دار بود($p<0/05$)و علاوه بر آن رابطه رگرسیونی معنی‌داری نیز بین مقدار آستاگزانتین موجود در تخم هر یک از تیمارهای آزمایشی با قابلیت لقاحی تخمک(درصد لقاح) مشاهده گردید($p<0/05$) که بیانگر اثر مثبت آستاگزانتین موجود در تخم بر قابلیت لقاحی تخمک و همچنین تایید کننده نقش شبیه هورمون باروری برای رنگدانه آستاگزانتین بودند.

واژه‌های کلیدی: *تغذیه، مولدین، آستاگزانتین، قابلیت لقاح، قزل آلای رنگین کمان.*

---

[1] – تاریخ دریافت: ۸۳/۳/۱۶، تاریخ پذیرش: ۸۳/۱۲/۲۴

[2]- دانش آموخته مقطع کارشناسی ارشد شیلات دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران (E-mail: aa_bazyar@yahoo.com)

[3]- دانشیار دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

[4]- دانشیار دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران

مقدمه

ماهیان انرژی بسیار زیادی را در چرخه تولید مثلی خود مصرف می‌کنند و در این میان آزاد ماهیان به عنوان ماهیان بالارو(*Anadromous*) بیشترین انرژی را مصرف می‌کنند. ماهیان آزاد به طور نسبی دارای تعداد تخم کم و دارای دوره رشد و نمو جنینی طولانی‌تری نسبت به سایر گونه‌ها می‌باشند. بنابراین تولید تخم‌هایی با نرخ لقاح بالاتر برای آزاد ماهیان بسیار مهم می‌باشد و به همین دلیل به دست آوردن تخم‌هایی با کیفیت مطلوب در قزل آلای رنگین کمان به منظور حصول تولید مثلی موفق و همچنین موفقیت در کمیت و کیفیت ماهیان نسل بعد به دلیل هماوری کمتر خانواده آزاد ماهیان نسبت به ماهیان دیگر دارای اهمیت بالایی می‌باشد(۵). تخم‌های بزرگ‌تر ماهی در گونه‌های مختلف از ماهیان نیاز به مقادیر بالاتری از رنگدانه‌های کاروتنوئیدی برای فعالیت‌های متابولیکی در طی مراحل جنینی دارند و همبستگی بین زمان نمو جنینی با مقدار غلظت کاروتنوئید در تخم هر گونه وجود دارد(۱۶). بنابراین، مدیریت تغذیه مولدین در تکثیر آنها دارای اهمیت بالایی می‌باشد در این ارتباط امروزه مقدار رنگین شدن تخم یکی از معیارهای تشخیص کیفیت تخم در بیشتر مزارع تکثیر و پرورش ماهیان سردابی به حساب می‌آید. لذا تخم‌های گرفته شده از مولدین را به دو دسته تخم‌های مات (Pale eggs) و تخم‌های رنگین شده (Pigmented eggs) تقسیم‌بندی می‌کنند (۶). علت رنگین شدن تخم آزاد ماهیان جذب کارتنوئیدهایی می‌باشد که از طریق جیره غذایی آنها چه در طبیعت و چه در محیط پرورشی وارد بدن ماهی می‌شود. کارتنوئید موجود در غذا پس از جذب در روده وارد خون شده و در عضله، کبد و پوست تجمع می‌یابد و در طی تشکیل تخم یا رشد گنادی از عضله و کبد به سمت تخمدان‌های در حال رشد انتقال و در تخم‌ها تجمع می‌یابند.(۱۴، ۱۸ و۱۳). رنگ قرمز تخم آزاد ماهیان در طبیعت به دلیل وجود کارتنوئید آستاگزانتین است که مهم‌ترین رنگدانه کاروتنوئیدی یافت شده در آزاد ماهیان وحشی است. در حالی‌که این رنگ در ماهیان پرورشی بسته به نوع کارتنوئیدی که در جیره غذایی آنها مصرف می‌شود، می‌تواند حاصل از رنگدانه آستاگزانتین و یا کانتاگزانتین باشد. (Craik & Harvey,۱۹۸۶ و۱۹۸۴ Torrissen) پرورش دهندگان ماهی رنگ تخم را به عنوان یک مشخصه ارزشمند در بیان کیفیت تخم محسوب می‌کنند (Hartman *et al.*, ۱۹۴۷ و) و (۱۹۶۴ و Yarzhombek) معتقدند در تخم‌هایی که رنگین شدگی بالایی وجود دارد، درصد لقاح بالا و پایین‌ترین نرخ مرگ و میر از زمان لقاح تاتغذیه فعال در آنها وجود دارد. به همین دلیل تعدادی از فرضیه‌های بیان شده در این زمینه برای رنگدانه آستاگزانتین و دیگر کارتنوئیدها در ماهیان نیازمند بررسی‌های عملی بیشتری است (Craik, ۱۹۸۵) (Torrissen *et al.*,۱۹۹۰) (۱۹۸۶ و Choubert) در خصوص اثر کارتنوئیدها و عملکرد زیستی آنها در چرخه تولید مثلی ماهیان تحقیقاتی صورت گرفته است و چند نقش تولید مثلی برای آنها بیان گردیده است. یکی از مهم‌ترین عملکردهای زیستی مطرح در مورد آستاگزانتین، نقش هورمون باروری این رنگدانه است که می‌تواند باعث افزایش قابلیت لقاح تخمک (درصد لقاح) گردد (Hartman ۱۹۴۷ *et al.*,) ولی وجود دست‌آوردهای ضد و نقیض در این مورد ضرورت تحقیقات بیشتری را الزامی می‌نماید. لذا در مطالعه حاضر سعی شد اثر مهم‌ترین رنگدانه کارتنوئیدی یعنی آستاگزانتین بر روی قابلیت باروری تخمک (درصد لقاح) بر روی ماهی قزل آلای رنگین کمان مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

ویژگی‌های دوره پرورش

برای انجام این تحقیق مزرعه تکثیر و پرورش قزل آلای رنگین کمان شرکت سهامی خاص قزل ماهی واقع در روستای حلج شهرستان زیوه در استان آذربایجان غربی، به عنوان یکی از واحد های نمونه تکثیر و پرورش قزل آلای کشور، انتخاب گردید. مولدین دو ساله قزل آلای رنگین کمان با وزن و طول متوسط به ترتیب ۱۱۱/۷۷ ± ۸۴۵/۵ گرم و ۸± ۴۲/۶ سانتیمتر انتخاب گردیدند. تعداد ۶ عدد استخر سیمانی به ابعاد ۱×۱×۸ متر در سالن فتوپریود

مصنوعی مزرعه فوق جهت نگهداری مولدین ماده و نر انتخاب شدند. استخرهای یادشده شماره گذاری و یک تا پنج به ماهیان مولد ماده جهت پنج تیمار آزمایشی و استخرشماره شش به مولدین نر اختصاص یافت. تعداد ۸۵ عدد مولد ماده در پنج استخر سیمانی به تعداد مساوی هفده عدد در هر استخر و به طور کاملاً تصادفی توزیع شدند. مولدین نر نیز دریک استخر به منظور تهیه اسپرم موردنیاز جهت تکثیر مصنوعی خارج از فصل، نگهداری گردیدند.

سیستم فتوپریود مصنوعی مورد استفاده در این تحقیق به دو دوره سه ماهه تقسیم گردید که تعداد ساعات روشنایی و تاریکی سه ماهه اول به ترتیب، ۱۸ساعت (۶ صبح تا ۱۲ شب) و ۶ ساعت (۱۲ شب تا ۶ صبح) و سه ماهه دوم به ترتیب، ۶ ساعت (۹ صبح تا ۳ بعدازظهر) و ساعت ۱۸ (۳ بعدازظهر تا ۹ صبح) بود. تنظیم ساعات تاریکی و روشنایی توسط ساعت دیجیتالی اتوماتیک که در مرکز کنترل سیستم فتوپریود نصب شده بود ،کنترل می شد. به منظور ایجاد روشنایی مصنوعی در سالن فتوپریود از لامپ‌های فلوئورسنت کم مصرف استفاده گردید و شدت روشنایی در سطح آب استخرهای مذکور توسط دستگاه نورسنج با دقت ۲۰۰ لوکس در کل دوره سنجیده شد.و مقدار متوسط شدت روشنایی کل دوره در سطح آب ۷۶/۵ لوکس برآورد گردید.

آب ورودی استخرهای ذکر شده از یک حلقه چاه عمیق تامین گردید که پس از هوادهی و عبور از یک فیلتر شنی به منظور جلوگیری از ورود هر گونه منبع تغذیه‌ای خارجی از طریق آب ورودی، وارد سالن فتوپریود می‌شد. دبی متوسط کل دوره پرورش برای هر استخر سیمانی ۰/۸لیتر بر ثانیه بود. غلظت اکسیژن محلول، پی-اچ(pH) و درجه حرارت آب با دستگاه(TWT) اندازه‌گیری شدند و دامنه تغییر هر یک از فاکتورهای فوق به ترتیب

۷/۸ -۷/۵ میلیگرم بر لیتر، ۷/۷- ۷/۵ و ۱۴/۸ - ۱۱/۶ درجه سانتیگراد برآورد گردید. به منظور تغذیه مولدین هر یک از تیمارهای آزمایشی، از غذای مخصوص مولدین قزل آلای رنگین کمان BFT (شرکت خوراک دام، طیور و آبزیان بهپرور) که به آنها رنگدانه کاروتنوئیدی سنتزی آستاگزانتین ۸ درصد(CAROPHYL®pink) به مقدار متفاوت اضافه شده بود، استفاده گردید (جدول ۱). پنج جیره غذایی با مقادیر مختلف از رنگدانه آستاگزانتین موجود در هر یک از این جیره‌ها که به ترتیب حاوی ۰/۰۷(کنترل) ،۱۲/۴۶، ۳۳/۳۳، ۶۵/۱ و ۹۲/۹۱ میلیگرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذا بودند، برای تغذیه مولدین مورد نظر انتخاب گردید. مقدار غذای مصرفی مورد نیاز مولدین بر اساس میانگین وزن بدن ماهیان زنده و درجه حرارت آب طبق جدول غذادهی تنظیم گردید. ماهیان به مقدار یک درصد وزن بدن در سه وعده غذایی در ساعات ۹ صبح، ۱۲ ظهر و ۳ بعدازظهر در طول ساعات روشنایی در کل دوره فتوپریود غذادهی می‌شدند. غذای مصرفی تیمارهای آزمایشی به صورت جداگانه درون ظروف مخصوص در پوشیده و مجزا و شماره گذاری شده روی استخر مربوط به همان تیمار قرار داده و توسط پیمانه‌های توزین شده برای هر روز به ماهیان غذا داده می‌شد. ماهیان مولد ماده درون استخرهای شماره یک تا پنج توسط تیمارهای غذاهایی شماره یک تا پنج و ماهیان مولد نر درون استخر شماره شش توسط تیمار غذایی شماره سه تغذیه شدند. به منظور برآورد محتوای آستاگزانتینی غذای ماهی، از غذای مورد تغذیه ماهیان بر طبق روش استاندارد کارخانه سازنده، نمونه‌های کاملا تصادفی بر داشت و به آزمایشگاه ارسال شد.

مرحله تکثیر مصنوعی و اندازه گیری قابلیت لقاح تخم

پس از اتمام دوره فتوپریود و پایان یافتن تغذیه توسط جیره‌های غذایی آزمایشی، مولدین هر یک از تیمارهای آزمایشی به صورت جداگانه و هر پنج روز یکبار برای بررسی رسیدگی نهایی پس از بیهوشی در مخلوط پودر گل میخک و آب(۳۰ گرم پودر گل میخک+۶۰ لیتر آب)، مورد بررسی قرار می‌گرفتند. ماهیان رسیده با بستن پارچه‌ای سفید در ناحیه ساقه دمی علامت‌گذاری گردیدند و مجددا در همان استخرها تا هنگام تخمک و اسپرم‌گیری رها می‌شدند. مولدین استخرهای آزمایشی به مدت ۳۰ روز

مورد بازبینی قرار گرفتند تا از رسیدگی جنسی همه آنها اطمینان حاصل شود.

جدول۱- ترکیب شیمیایی جیره های غذایی مورد آزمون در تحقیق

ترکیب غذائی	تیمار۱(کنترل)	تیمار۲	تیمار۳	تیمار۴	تیمار۵
درصد پروتئین	۳۷/۰۳ ± ۰/۴۴	۳۶/۷± ۰/۳	۳۶/۳ ± ۰/۲	۳۶/۶۱± ۰/۳۹	۳۵/۸۵ ± ۰/۴۲
درصد چربی	۱۲/۵۳ ± ۱/۰۲	۱۳/۷۷± ۱/۱۱	۱۴ ± ۰/۵۲	۱۲/۹۹± ۰/۵۴	۱۲/۳ ± ۰/۵۳
درصد فیبر	۲/۵۱± ۰/۰۶	۲/۴۸± ۰/۰۷	۲/۳۵ ± ۰/۰۶	۲/۴۸ ± ۰/۰۸	۲/۴۲ ± ۰/۰۷
درصد خاکستر کل	۸/۸± ۰/۱۵	۸/۶۵± ۰/۱۵	۸/۵۴ ± ۰/۱۰	۸/۴۴ ± ۰/۱۷	۸/۶۶ ± ۰/۱۹
درصد رطوبت	۱۳/۶۸± ۰/۶۸	۱۳/۶۲± ۰/۶۴	۱۳/۶۴ ۰/۴۹	۱۴/۴۸± ۰/۶۲	۱۴/۵۳ ± ۰/۶۸
مقدار آستاگزانتین (میلی گرم بر کیلوگرم)	۰/۰۷± ۰/۰۱	۱۲/۴۶± ۰/۸	۳۳/۳۳± ۳/۳	۶۵/۱± ۲/۴۵	۹۲/۹۱± ۲/۸

برای انجام عملیات تکثیر مصنوعی از استخر شماره یک به دلیل اینکه در کل دوره یک‌ماهه بازرسی رسیدگی جنسی فقط ۳ مورد رسیدگی اتفاق افتاد،۳ عدد ماهی مولد ماده رسیده و از هر یک از استخرهای شماره دو تا پنج تعداد ۵ عدد مولد ماده رسیده انتخاب گردیدند. به منظور تهیه اسپرم موردنیاز نیز از استخر شماره شش، ۴ عدد مولد نر رسیده انتخاب گردید. پس از بیهوش نمودن مولدین رسیده در مخلوط پودر گل میخک و آب، تخم‌های به دست آمده از هر ماهی مربوط به هر یک از تیمارهای آزمایشی به‌صورت جداگانه درون ظروف علامت‌گذاری شده ریخته شدند. قبل از انجام مرحله لقاح از تخمک‌های حاصل از ماهیان هر یک از تیمارهای آزمایشی مقداری نمونه به طور کاملا تصادفی برای برآورد تعداد تخم در گرم و نیز محتوای آستاگزانتینی تخمک برداشته شد و سپس بقیه تخمک‌ها با اسپرم همگن شده، چهار ماهی نر به روش معمول کارگاه لقاح داده شدند. در این عمل بلافاصله پس از اضافه کردن اسپرم، تخمک‌ها به مدت ۳۰ ثانیه هم زده شدند و سپس حدود ۲۵ سی سی محلول نمک طعام ۰/۶ درصد به هر یک از لگن‌ها اضافه شد و دوباره به مدت ۲-۱ دقیقه هم زده شدند. سپس برای شستشوی تخم‌ها مقداری از آب سالن انکوباسیون به لگن‌های کوچک اضافه گردید و تخم‌ها کاملاً به هم زده شدند. پس از هم زدن، تخم‌ها به سالن انکوباسیون انتقال داده شدند و چندین بار توسط آب سالن انکوباسیون جهت هم دما شدن تخم‌ها و خروج پوسته‌های اضافی تا شفاف شدن کامل آب، شستشو داده شدند. سپس لگن‌های حاوی تخم به مدت ۴۰-۳۵ دقیقه بدون دستکاری باقی مانده تا تخم‌ها آب جذب کرده و کاملاً سفت شوند. با توجه به تعداد تخم در گرم اندازه‌گیری شده برای هر مولد و همچنین داشتن وزن تخم موجود در هر لگن تعداد کل تخم‌های موجود در هر لگن به دست آمده و ثبت گردید و به عنوان تعداد کل تخم‌های موجود در هر سینی انکوباسیون محسوب شد.

تخم‌های لقاح یافته درون هر یک از لگن‌های علامت‌گذاری شده، پس از آب کشیدن به درون ظروف آلومینیومی توری به ابعاد ۵×۱۰×۲۵ سانتیمتر واقع در سینی انکوباتورهای کالیفرنیایی با همان علامت انتقال داده شدند. هشت ساعت پس از خوابانیدن تخم‌های لقاح یافته به منظور به‌دست آوردن درصد لقاح، از تخم‌ها نمونه‌برداری

شد. نمونه‌برداری تخم‌ها به‌طور کاملاً تصادفی و با هم زدن ملایم کل تخم‌های درون سینی از طریق یک پیمانه معیار و به تعداد کاملاً یکسان برای هر یک از آنها انجام گرفت. از هر یک از ظروف سینی انکوباسیون تعداد ۱۲۵ عدد تخم نمونه‌برداری گردید. تخم‌های نمونه‌برداری شده به منظور تعیین درصد لقاح درون محلول (۷ گرم نمک طعام آزمایشگاهی+۵۰ سی‌سی اسید استیک گلاسیال+۱۰۰۰ سی‌سی آب مقطر) قرار داده شدند(۵). پس از حدود ۱۰ دقیقه در قطب حیوانی تخم‌های لقاح یافته و سالم یک لکه سفید رنگی ظاهر شد که بر این اساس و با جداسازی و شمارش تخم‌های ناقص و لقاح نیافته و تعداد تخم‌های سالم طبق رابطه ذیل درصد لقاح نمونه برداشتی محاسبه گردید:

$$\text{درصد لقاح} = \frac{\text{تعداد تخم‌های سالم نمونه}}{\text{تعداد کل تخم‌های نمونه}} \times ۱۰۰$$

خالص سازی و اندازه گیری آستاگزانتین موجود در غذا و تخم ماهی

نمونه‌های آزمایشی غذا و تخم ماهی به صورت منجمد در نیتروژن مایع به موسسه تحقیقاتی AKVAFORSK کشور نروژ فرستاده و تا موقع آزمایش و در حین انتقال در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. اندازه‌گیری آستاگزانتین موجود در غذا بر اساس روش کار (Weber,۱۹۹۰) انجام گردید. برای خالص سازی آستاگزانتین موجود در غذا، در ابتدا نمونه غذا هر تکرار یکنواخت گردید و سپس به مقدار ۵ گرم از آن برداشت گردید و بعد از آن برای برداشتن لایه ژلاتینی اطراف دانه‌های کاروفیل پینک آنزیم پروتئاز (Maxatase Bv, Delft, Tke Model., International Netherlands) به آنها اضافه گردید. مقدار آنزیم ۳۰ میلیگرم بود که این کار در درون یک ارلن حجمی ۲۵۰ میلی لیتری انجام گردید. سپس مقدار ۱۰ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید و به مدت۳۰ دقیقه درون یک حمام آب گرم اولتراسونیک ۵۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از اتمام زمان مذکور، مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول به محتویات ارلن اضافه و بعد توسط دی کلرو متان به حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر رسید. این مخلوط توسط کروماتوگرافی ستونی باز بر روی Silica60 (Merck, Darmstadt, Germany, No: ۷۷۳۳) ریخته شد و عصاره به دست آمده در تبخیرکننده چرخشی، تبخیر گردید. پس از اضافه کردن محلول n- هگزان و استون به نسبت ۸۶ به ۱۴ و حل کردن عصاره به دست آمده، مقدار رنگدانه آستاگزانتین توسط روش کروماتوگرافی مایع با بازده بالا HPLC بر طبق روش کار بجرکنگ و همکاران[1] ۲۰۰۰ (۲) اندازه‌گیری شد. برای خالص‌سازی آستاگزانتین موجود در تخم ماهی، به نمونه‌های تخم ماهی مقدار ۲ میلی‌لیتر اتانول حاویppm ۵۰۰ بوتیل هیدروکسی تولوئن و یک میلی‌لیتر آب مقطر یونیزه شده اضافه گردید و نمونه‌ها توسط هم زن (WHIRL MIXER ,FISONS, ENGLAND) به مدت ۲۰ ثانیه هم زده شدند. به مخلوط حاضر ۶ میلیلیتر کلروفورم اضافه گردید و به مدت ۲۰ ثانیه هم زده شد. پس از مدتی سکون به مدت ۱۰ دقیقه دوباره هم زده شدند و بعد سانتریفیوژ گردیدند(ca۱۷۰۰rpm ،۱۰ min) تقریبا ۴ میلیلیتر از محلول بالایی در فاز بالایی را طبق روش (Bjerkeng et al., ،۱۹۷۷) برداشته و نمونه مورد نظر به مدت ۳۰ ثانیه هم زده شد و بعد به مدت ۱۰ دقیقه و در یک محیط تاریک نگهداری و سپس دوباره ۳۰ ثانیه هم زده شد و بعد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند (۱۸°c و rpm ۱۵۰۰). حدود ۲ میلی‌لیتر از قسمت بالایی نمونه را که حاوی آستاگزانتین حل شده در کلروفورم بود را توسط پیپت در لوله آزمایش ریخته و در یک حمام آب گرم در درجه حرارت °c ۴۰ به همراه برقراری جریان ملایمی از گاز نیتروژن قرار داده تا تمام حلال بخار گردد. پس از بخار حلال، نمونه مورد نظر در ۳ میلی‌لیتر استون ۲۰درصد حل شده در n-هگزان حل گردید و به درون لوله های آزمایشی فیلتر گردیدند (.srp minisart;۰/۴۵μm Satrorius, Germany ۱۵) و

[1]- Bjerkeng et al.

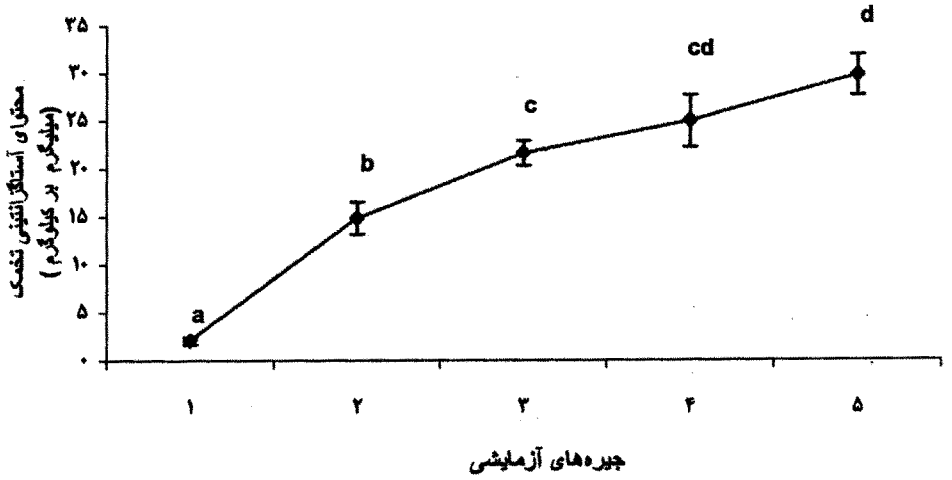
درب آنها فورا بسته شد. نمونه‌های به دست آمده توسط روش کروماتوگرافی مایع با بازده بالا HPLC و بر طبق روش کار بجرکنگ و همکاران۲۰۰۰ (۲) اندازه‌گیری گردید.

تجزیه و تحلیل داده ها

طرح آماری مورد استفاده در این تحقیق، یک طرح کاملاً تصادفی(CRD) بود. تعداد تکرارها برای ترکیبات مختلف تیماری یکسان نبود به طوری که در تیمار کنترل به دلیل اینکه در کل دوره بازبینی رسیدگی جنسی فقط سه مورد رسیدگی نهایی اتفاق افتاد ۳ عدد ماهی ماده و در سایر تیمارها ۵ عدد ماهی ماده به عنوان تکرار برای هر تیمار انتخاب گردیدند. به همین دلیل این طرح به صورت یک طرح کاملاً تصادفی با رویه نامتعادلGLM آنالیز شد. قبل از انجام تجزیه واریانس (ONE WAY ANOVA)، نرمال بودن داده‌های به دست آمده حاصل از اندازه‌گیری‌ها در نرم افزار Minitab نسخه ۱۳/۱ و با استفاده از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف کنترل گردید و با توجه به نرمال بودن داده‌ها نیازی به تبدیل داده‌ها وجود نداشت. پس از کنترل نرمال بودن داده‌ها، تجزیه واریانس و مقایسه میانگین (آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵) با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۶/۰۳ انجام گردید. بین مقادیر آستاگزانتین موجود در تخم و درصد لقاح با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۱ خط رگرسیونی برازش داده شد.

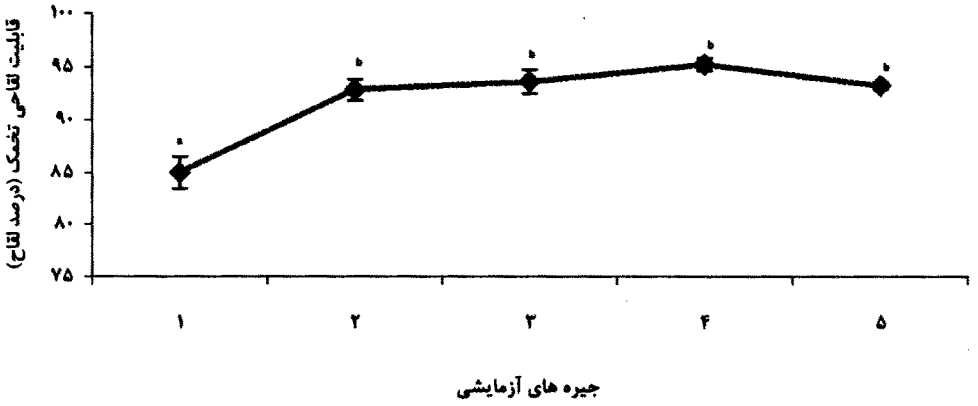
نتایج

غلظت رنگدانه آستاگزانتین در جیره غذایی اثر معنی داری بر محتوای آستاگزانتین موجود در تخم قزل آلا داشت ($P<0/05$) به طوری که با افزایش مقدار آستاگزانتین در جیره غذایی، مقدار آستاگزانتین موجود در تخمک افزایش یافت. مقادیر آستاگزانتین موجود در تخمک حاصل از هر یک از تیمارهای آزمایشی یک تا پنج به ترتیب ۰/۳۹± ۲/۰۳۵، ۳/۷۴± ۱۴/۸۳، ۲/۸۸± ۲۱/۶، ۶/۰۵± ۲۴/۹۴ و ۴/۸۱ ± ۲۹/۷۹ بود که بیشترین و کمترین مقدار به ترتیب مربوط به تیمارهای شماره چهار و یک(کنترل) بودند (شکل ۱).



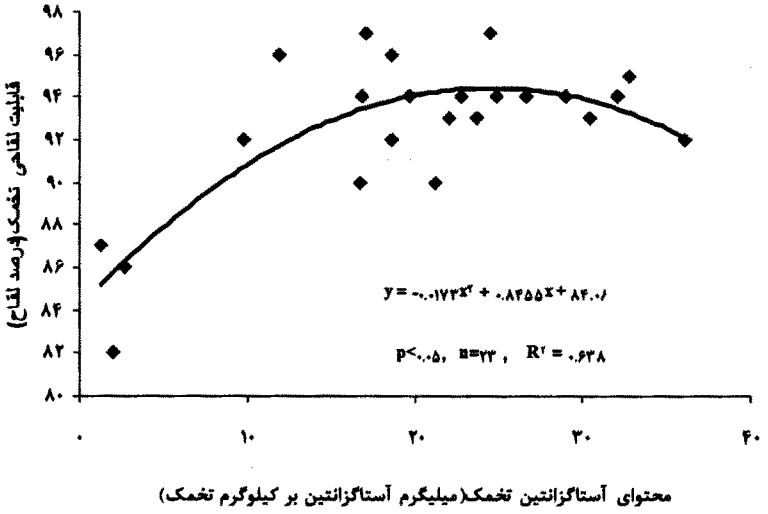
شکل۱- تاثیر مقدار آستاگزانتین جیره غذایی مولدین بر غلظت آستاگزانتین تخمک

اگرچه اختلاف معنی‌داری بین درصد لقاح تیمارهای غذایی حاوی مقادیر مختلف آستاگزانتین(تیمار دو تا پنج) مشاهده نگردید (P>۰/۰۵) ولی تیمار کنترل با کمترین مقدار درصد لقاح، تفاوت معنی‌داری با تیمارهای چهار گانه دیگر داشت (P<۰/۰۵). با افزایش غلظت آستاگزانتین در جیره غذایی مقدار درصد لقاح نیز زیاد شد به طوری که درصد لقاح هر یک از تیمارهای آزمایشی یک تا پنج به ترتیب۱/۵۲± ۸۵، ۱/۰۱± ۹۲/۸، ۱/۱۲± ۹۳/۶، ۰/۵۸± ۹۵/۲و ۰/۳۷± ۹۳/۲ بود که کمترین و بیشترین مقدار به ترتیب مربوط به تیمارهای شماره یک(کنترل) و چهار بود. (شکل ۲).



شکل ۲- تاثیر مقدار غلظت آستاگزانتین موجود در جیره غذایی مولدین بر قابلیت لقاحی تخمک

با برازش مدل رگرسیونی برای به دست آوردن رابطه بین مقدار آستاگزانتین موجود در تخم و درصد لقاح، مشاهده گردید که این دو فاکتور در سطح بالایی با یکدیگر ارتباط دارند (P<۰/۰۵) (شکل۳).



شکل۳- همبستگی بین محتوای آستاگزانتینی تخمک و قابلیت لقاح پذیری تخمک(درصد لقاح)

بحث و نتیجه گیری

با رشد ماهیان آزاد غلظت رنگدانه‌های آستاگزانتین و کانتاگزانتین در عضله افزایش می‌یابد (۱۹۸۱، Torrissen ea al.,) و در طی رشد تخمدان‌ها کارتنوئیدها از عضله و کبد به سمت تخمدان‌های در حال رشد حرکت کرده و سپس در تخمک‌ها تجمع می‌یابند (۱۳ و ۲۱) محتوای کارتنوییدی تخم و نیز رنگ نارنجی ناشی از آن بستگی تام به کارتنویید کل انباشته شده که در حین زرده گیری از غذای مصرفی دریافت می‌گردد، دارد. در ماهیان متعلق به خانواده آزاد ماهیان اختلافی در مقدار غلظت کارتنویید موجود در عضله و تخمک هم در درون گونه‌ها و هم بین گونه‌ها وجود دارد(۶). بیشترین کارتنوییدهای تجمع یافته در تخمک‌های قزل‌آلای رنگین کمان در گلبول‌های چربی تخمک‌های نابالغ وجود دارد در حالی که مقدار بسیار کمی در ارتباط با HDF (high density fraction) یا ترکیبات با چگالی بالاتر همانند پروتیین‌ها که اصطلاحا به آنها کاروتنوپروتیین‌ها گویند، هستند(۱۷). آستاگزانتین موجود در تخمک آزاد ماهیان وحشی تغذیه شده با غذای طبیعی و آزاد ماهیان پرورشی تغذیه شده با غذای حاوی آستاگزانتین سنتزی، به صورت آزاد یا غیراستری است (۶، ۷ و ۱۱) در مطالعه حاضر نیز تنها فرم غیر استری رنگدانه آستاگزانتین در تخم‌ها یافت گردید و دامنه محتوای آستاگزانتین بین۲ تا ۲۹ میلی‌گرم در کیلوگرم بود. کریستانسن در سال ۱۹۹۶ در ماهی آزاد اقیانوس اطلس دامنه آستاگزانتین تخم را بین ۱۴/۷-۰ میلیگرم بر کیلوگرم و تورسیون نیز در سال ۱۹۸۵ در همان ماهی ۱۶/۴-۰/۴ میلیگرم بر کیلوگرم به دست آورد. دیگر محققین نیز سطح آستاگزانتین تخم را تا سطح ۱/۷۵ ± ۶/۴ میلیگرم بر کیلوگرم برای ماهی آزاد وحشی و کانتاگزانتین را ۲/۷ ± ۲۱/۲تا۳/۴ ± ۱۱/۸ میلیگرم بر کیلوگرم گزارش دادند (۷ و ۶). هارتمن و همکاران در سال ۱۹۴۷ ابراز نمودند که رنگدانه آستاگزانتین ممکن است همانند یک هورمون باروری در ماهی قزل آلا و دیگر ماهیان باعث افزایش درصد لقاح توسط تحریک و جذب اسپرماتوزوآ شود. برای مطالعه بیشتر این فرضیه، یک سری از مطالعات بعدها بر روی اثر آستاگزانتین و دیگر کارتنوییدها بر روی باروری تخم ماهیان انجام گردید. در یکسری از این مطالعات گزارش گردید که آستاگزانتین و کانتاگزانتین باعث افزایش درصد لقاح در قزل آلای رنگین کمان می شود (۸). پژوهش‌های انجام شده بیانگر این است که درصد لقاح بالاتری را در تخم‌های با رنگ پذیری بالا نسبت به تخم‌های با رنگ پذیری پایین می توان انتظار داشت (۶ و ۱۵) از طرف دیگر گوانتز در سال ۱۹۸۰ تفاوت معنی‌داری را در درصد لقاح ماهیان قزل آلای رنگین کمان تغذیه شده با چند سطح آستاگزانتین و کانتاگزانتین تغذیه شده بودند ،مشاهده نکرد ولی نرخ لقاح در تخم‌های با غلظت بالای آستاگزانتین بیشتر بود. این نتیجه توسط تورانگر نیز در سال ۱۹۸۶ مورد تائید قرار گرفت به طوری که او تفاوت معنی‌داری بین درصد لقاح ماهیان قزل آلای رنگین کمان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۱۰ درصد پودرکریل به عنوان منبع آستاگزانتین در مقایسه با آنهایی که هیچ مقداری از پودر کریل در جیره غذایی آنها مصرف نشده بود، مشاهده ننمود. نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر نیز تاکید بر این دارد که آستاگزانتین موجود در جیره غذایی ماهیان مولد در مقایسه با ماهیان مولدی که آستاگزانتین دریافت ننموده‌اند، دارای درصد لقاح بالاتری هستند.

در برخی از پژوهش‌ها نشان داده شده است که تفاوت در نرخ لقاح تخم ماهی می‌تواند ناشی از عوامل دیگری غیر از غلظت مواد کاروتنوییدی موجود در جیره غذایی باشد(۵). در بیشتر مطالعات قبلی انجام شده گروه‌هایی از تخم‌ها با محتوای آستاگزانتینی متفاوت مربوط به مزارع پرورش ماهی مختلف با یکدیگر مقایسه گردیدند. این تفاوت‌های بزرگ پیدا شده بیشتر به نظر می‌رسد که مربوط به بحث مدیریتی باشد که شامل تاریخچه تغذیه ماهیان، تخم و اسپرم کشی و برنامه‌کاری مراکز تکثیر هستند که مطمئناً با یکدیگر بسیار متفاوت می‌باشند و به تبع آن تفاوت زیادی در نرخ لقاح برای تخم‌های رنگین شده معمولی قزل آلای رنگین کمان و ماهی آزاد بیان شده است (۲۲، ۹ و ۱۰). یکی از مهم‌ترین و اساسی‌ترین فاکتورهای

دریافت شده موثر در بقا تخم قزل‌آلای رنگین‌کمان زمان تخم‌کشی پس از رسیدگی طبیعی می‌باشد (۳ و ۷). در مطالعه حاضر سعی گردید که شرایط تغذیه‌ای و محیطی و حتی ویژگی‌های مولدین کاملاً یکسان باشند، به طوری که تنها فاکتور متغییر در این تحقیق آستاگزانتین موجود در غذا بود و برای این که زمان تخم‌کشی پس از رسیدگی جنسی نیز اثری نداشته باشد مولدین برای جلوگیری از فوق رسیدگی هر ۵ روز یک‌بار کنترل می‌شدند و ماهیانی که در یک زمان رسیده بودند تکثیر می‌شدند. عامل دیگری که ممکن است بر روی باروری تخم اثر داشته باشد کیفیت اسپرم می‌باشد که برای رفع این مشکل از اسپرم مخلوط و همگن شده ۴ ماهی نر استفاده گردید تا اسپرم استفاده شده برای لقاح یکسان باشد و اثر اسپرم بر فاکتور مورد بررسی منتفی گردد. به طور کلی در مطالعه حاضر مصرف آستاگزانتین سنتزی (CAROPHYL® pink) در جیره غذایی مولدین و به تبع آن آستاگزانتین تجمع یافته در تخم به عنوان یک عامل موثر در کیفیت تخم و بالا بردن نرخ لقاح مشخص گردید. در این تحقیق اگرچه در بین تیمارهای آزمایشی که آستاگزانتین مصرف کرده بودند (تیمار دو تا پنج) در خصوص قابلیت لقاح تخمک تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید ولی با توجه به نتایج به دست آمده مشاهده گردید که مقدار رنگدانه آستاگزانتین موجود در جیره غذایی قزل آلای رنگین کمان از تیمار شماره دو به بعد باعث افزایش درصد لقاح نسبت به تیمار کنترل شده است لذا پیشنهاد می‌شود که رنگدانه آستاگزانتین بیشتر از مقدار (۱۲/۴۶) میلیگرم بر کیلوگرم در جیره غذایی مولدین ماده استفاده شود زیرا که از این مقدار به پایین درصد لقاح به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد. بنابراین به نظر می‌رسد که رنگدانه آستاگزانتین در افزایش قابلیت لقاح تخم قزل آلا مو ثر است و استفاده از این رنگدانه در جیره غذایی مولدین ماده قزل‌آلا پیشنهاد می‌شود.

منابع

1-Bjerkeng, B., Følling, M., Lagocki, S., Storebakken, T., Olli, J.J., Alsted, N., 1997. Bioavailability of all-*E*-astaxanthin and *Z*-astaxanthin isomers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 157, 63-82.

2-Bjerkeng, B., Hatlen, B., Jobling, M., 2000. Astaxanthin and its metabolites idoxanthin and crustaxanthin in flesh, skin, and gonads of sexually immature and maturing Arctic charr (*Salvelinus alpinus* (L.)). Comp. Biochem. Physiol. [B] 125B, 395-404.

3-Bromage,N.,Randall,C.,Thrush,M.,Davis,B.,Springate,J.,Duston,J.and Barker,G.,1992.Broodstock management,fecundity,egg quality and timing of egg production in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss).Aquaculture,100:141-166.

4-Choubert,G.1986.Carotenoid pigments and their role in the reproduction of fish,Roche publication: 1-15

5-Christiansen,R and Torrissen,O,J.,1997.Growth and survival of atlantic salmon,salmo salar L.fed comparition with cantaxanthin.Aquaculture,65,293-305

6-Craik,J.,1985. Egg quality and egg pigment content in salmonid fishes.Aquaculture,47:61-88.

7-Craik,J.C.A and Harvey,S.M.,1986.The carotenoids of eggs wild and farmed atlantic salmon, and their changes during development to the start of feeding.J.Fish Biol.,29:549-565.

8-Deufel,J.,1975:Physiologische wirkungen von carotinoiden bei salmoniden.Hydrologie,37:244-248.(in german).

9-Escaffre, A.M.;Billard,R. 1979. Evolution de la Fe'condabilite' des ovules de truite arc-en-ciel salmo gairdneri laisse's dans la cavite' abdominale au cours de la pe'riode post ovulatoire. Bull. fr. Piscic., 272, 57-70 .

10-Eskelinen P.,1989.Effect of different diets on egg production and egg quality of atlantic salmon salmo salar L.Aquaculture ,79:275-281.

11-Glover,M.;Morton,R.A.;Rosen,D.G ., 1951. Astaxanthin, Cholestrol and Lipids in Developing salmon eggs.Biochem.j.,50,425-42913-Hartman.M. Medem,F.G.;Kuhn,R.; Bielig,H.j. 1947. Untersuchngen uber die berfruchtungs stoffe der Regenbogeforellle.Z.Naturforsch.,2,330-343.
12-Hartman M., Medem F.G.,Kuhn R.,Bielig H.j. 1947. Untersuchngen Uber die Berfruchtungs Stoffe der Regenbogeforellle. Z.Naturforsch.,2,330-343.
13-Kitahara,T. 1983. Behavior of Carotenods in the Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) During Development. Bull. Jap. Soc.Sci.Fish.,50(3),531-536.
14-Loginova,T.A.,1967. Carotenoid of Rainbow Trout in the Development of Gonads and the eggs.In: The Metabolism and Biochemistry of fishes.Vysshaya Shkova Press,Moscow,pp.336-340(in russian).
15-Mikulin, A.Y.;Soin,S.G. 1975. The Functional Significance of Carotenoids in the Embryonic Development of Toleost.J.Ichthyol.,15(5),749-759.
16-Mikulin, A, E, 2003. The influence of Carotenoids Contained in the Eggs Upon the Offspring Quality at Artificial Fish Breeding,Proceeding Book,International Symposium ,Cold Water Aquaculture, September -13,2003,Russia.
17-Nakagawa,h.and Tsuchiya,T., 1976. Studies on Rainbow Trout Egg (*Salmo gairneri irideus*)VI. Changes Oflipid Composition In Yolk During Development. J.Fish. Anim.Husb., Hiroshima Univ., 15:35-46
18-Steven.D.M., 1948. Studies on Animal Carotenoids.1. Carotenoids of Brown Trout, J.Exp. Biology, 25:369-387.
19-Torrissen,O.J.,Hardy,R.W.and Shearer ,K.D.,Scott.T.M.and Stone,F.E,1990. Effect of Dietray Lipid on Apparent Digestibility Coefficients for Cantaxanthin in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), Aquaculture, 88:351-362.
20-Torrissen.o., 1984. Pigmentation of Salmonids. Effect of Carotenoids in Eggs and Start Feeding Diet on Survival and Growth Rate. Aquacaulture,43, 185-193.
21-Torrissen, K.R.andTorrissen .O.J.,1985. Protease Activities and Carotenoid Level During the Sexual Maturation of Atlantic Salmon (*Salamo salar*). Aquaculture, 50:113-122.
22-Tveranger.B.,1986. Effect of Pigment Content in Broodstock Diet on Subsequent Fertilization Rate, Survival and Growth Rate of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Offspring. Aquaculture.53:85-93.
23-Weber, S., 1990. Revised Supplement: Determination of stabilized, Added Astaxanthin in Fish Feeds and Premixes with HPLC. In: Keller, H.E. (Ed.), Analytical Methods for Vitamins and Carotenoids in Feed, Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland, Index no. 2264, 4 p.
24-Yarzhombek,A.A.,1964.Carotenoid and Trout Farming. Sb.Tekhnicheskoy Informatsii VNIRO. No. 6pp. 20-25 (in russian).

The Effect of Different Astaxanthin Concentrations on Its Retention in Ovule and Consequently Fertilization Rate in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)

A. A. Bazyar Lakeh[1] M.R. Ahmadi[2] B. Majazi Amiri[3]

Abstract

A completely randomized experimental design was conducted to evaluate the effect of dietary astaxanthin on egg astaxanthin content as well as fertilization rate in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) brood stocks .Different levels of astaxanthin in fish diet containing0.07, 12.46, 33.33, 65.01 and 92.91 mg/kg constituted the treatments. Brood fish were reared under artificial photoperiodic system for a six-month period till sexual maturation, then prepared for artificial propagation. Homogenous sperm of four males (to avoid poor sperm quality they had been fed with diet supplemented with astaxanthin at a rate of 33.33 mg/kg) were used for fertilization. Female broods produced eggs containing astaxanthin, ranging from 2.035 to 29.79 mg/kg. There were significant differences observed among treatments as regards egg astaxanthin content ($p<0.05$).Although there weren't significant differences among experimental treatments as regards fertilization rate ($p>0.05$) but there was a significant difference observed as compared to control group ($p<0.05$). A significant regression relationship was observed between egg astaxanthin content and fertilization rate ($p<0.05$) that demons trated the positive effect of egg astaxanthin content on egg fertility and also confirmed the hormone like role of astaxanthin in fish fecundity.

Keywords: Astaxanthin, Fertilization rate, Rainbow trout.

1-Former Graduate Student of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran (E-mail: aa_bazyar@yahoo.com)
2- Associate professor, Faculty of Veterinary, University of Tehran
3- Associate professor, Faculty of Natural Resources, University of Tehran