شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۵، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۱
صفحات ۲۵۴-۲۳۹

اثرات مکمل سازی جیره غذایی با ویتامین C، آستازانتین و لسیتین سویا بر برخی فراسنجه‌های بیوشیمیایی مایع تخمدانی و کارایی تولیدمثلی مولدین ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)

فراز پنجوینی[۱]، کوروش سروی مغانلو[۲*]، راحله طهماسبی[۳]، احمد ایمانی[۴]

۱. دانشجوی دکتری گروه شیلات و آبزیان، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه ایران
۲و۴. دانشیار گروه شیلات و آبزیان دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه ایران
۳. استادیار گروه شیمی تجزیه-کروماتوگرافی، جهاد دانشگاهی واحد آذربایجان غربی، ارومیه ایران

تاریخ ارسال: ۱۴۰۰/۰۹/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۱

چکیده

در تحقیق حاضر اثرات افزودن ویتامین C، آستازانتین و لسیتین سویا در جیره غذایی بر برخی فراسنجه‌های بیوشیمیایی مایع تخمدانی (پروتئین کل، آنزیم‌های ACP، ALP، LDH و AST) و کارایی تولیدمثلی (هماوری نسبی و درصد لقاح) در ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) بررسی شد. بدین منظور ۹ جیره آزمایشی مختلف ترکیبی از سطوح ۰، ۳۰۰ و ۷۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C، ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آستازانتین و ۰، ۶ و ۹ درصد لسیتین سویا ($C_0A_0L_0$، $C_{300}A_{50}L_0$، $C_{700}A_{100}L_0$، $C_0A_{50}L_6$، $C_{300}A_{100}L_6$، $C_{700}A_0L_6$، $C_0A_{100}L_9$، $C_{300}A_0L_9$، $C_{700}A_{50}L_9$) ساخته شد و مولدین (۰/۰۵±۲/۵۱ کیلوگرم) به‌مدت چهار ماه تغذیه شدند. پس از حصول رسیدگی جنسی و تخم‌کشی، مایع تخمدانی برای سنجش فراسنجه‌های بیوشیمیایی جدا و تخمک برای بررسی کارایی تولیدمثلی استفاده شد. بررسی نتایج نشان داد که میزان پروتئین کل مایع تخمدانی در تیمارهای $C_{300}A_{100}L_6$، $C_{700}A_{50}L_9$، $C_{700}A_0L_6$، $C_0A_{100}L_9$ و $C_{300}A_0L_9$ افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشت ($p<0/05$). همچنین کمترین مقادیر LDH در تیمارهای $C_{300}A_{100}L_6$، $C_0A_{100}L_9$ و $C_0A_{50}L_6$ بدست آمد که با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند ($p<0/05$). تیمارهای $C_{700}A_0L_6$ و $C_0A_{100}L_9$ دارای کمترین مقادیر AST و بیشترین مقادیر ALP بودند که با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند ($p<0/05$). بالاترین هماوری نسبی و درصد لقاح در تیمارهای $C_0A_{100}L_9$ و $C_{300}A_{100}L_6$ مشاهده شد که اختلاف معنی داری با تیمار شاهد داشت ($p<0/05$). به طور کلی می‌توان بیان کرد افزودن همزمان سطح ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C با مقادیر ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم استازانتین و ۶ درصد لسیتین منجر به کاهش آنزیم‌های AST و LDH در مایع تخمدانی و بهبود هماوری نسبی و درصد لقاح شد.

کلمات کلیدی: آستازانتین، کارایی تولیدمثلی، لسیتین سویا، ماهی آزاد دریای خزر، مایع تخمدانی، ویتامین C

* نویسنده مسئول: کوروش سروی مغانلو
Email: k.sarvimoghanlou@urmia.ac.ir

Journal of Fisheries
Vol. 75, No. 2, Summer 2022
pp. 239-254

Effects of dietary supplementation of vitamin C, astaxanthin and soybean lecithin on some biochemical indices of ovarian fluid and reproductive performance in Caspian brown trout broodstocks (*Salmo trutta caspius*)

Faraz Panjvini[1], Kourosh Sarvi Moghanlou[2*], Raheleh Tahmasebi[3], Ahmad Imani[4]

[1] Ph.D. Student, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran
[2, 4] Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran
[3] Department of Analytical chemistry-Chromatography, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Urmia, Iran

Received: 21-Dec-2021 **Accepted: 11-Jan-2022**

Abstract

In this study, the effects of different levels of dietary supplementation with vitamin C, astaxanthin and lecithin on some biochemical indices of ovarian fluid (Total protein, ACP, ALP, LDH and AST enzymes) and reproductive performance (fecundity and fertilization rate) of Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) were investigated. For this purpose, nine experimental diets were formulated and supplemented with different combinations of vitamin C at levels of 0, 300 and 700 mg kg-1 diet, astaxanthin at levels of 0, 50 and 100 mg kg-1 diet and soybean lecithin at levels of 0, 6 and 9% ($C_0A_0L_0$, $C_{300}A_{50}L_0$, $C_{700}A_{100}L_0$, $C_0A_{50}L_6$, $C_{300}A_{100}L_6$, $C_{700}A_0L_6$, $C_0A_{100}L_9$, $C_{300}A_0L_9$, $C_{700}A_{50}L_9$) and broodstocks (2.51±0.05 kg) were fed for four months. After maturation and stripping, ovarian fluid was separated for biochemical indices and oocytes used for reproductive performance. Based on the results, a significantly increase was observed in the total protein content of ovarian fluid of fish fed with the treatments $C_{300}A_{100}L_6$, $C_{700}A_{50}L_9$, $C_{700}A_0L_6$, $C_0A_{100}L_9$ and $C_{300}A_0L_9$ compared to the control ($p<0.05$). Also, the lowest LDH were obtained in treatments $C_{300}A_{100}L_6$, $C_0A_{100}L_9$ and $C_0A_{50}L_6$, which were significantly different from the control ($p<0.05$). Treatments $C_{700}A_0L_6$ and $C_0A_{100}L_9$ had the lowest AST and the highest ALP values, both of which were significantly different from the control ($p<0.05$). The highest fecundity and fertilization rate were observed in $C_0A_{100}L_9$ and $C_{300}A_{100}L_6$ treatments which were significantly different from the control ($p<0.05$). In conclusion, dietary supplementation of 300 mg kg^{-1} vitamin C with 100 mg kg^{-1} astaxanthin and 6% lecithin led to a decrease in AST and LDH enzymes activity and improvement of fecundity and fertilization rates.

Keywords: Astaxanthin, Reproductive performance, Soybean lecithin, *Salmo trutta caspius*, Ovarian fluid, Vitamin C

Corresponding author: Kourosh Sarvi Moghanlou Email: k.sarvimoghanlou@urmia.ac.ir

۱. مقدمه

یکی از موثرترین روش‌ها برای حفظ ذخایر آبزیان، تحقیق در زمینه عملکرد دستگاه تولید مثل و شناسایی کلیه فاکتورهای موثر در ارتقا و توسعه ساختارهای آن است (Higuera-Ciapara *et al.*, 2006). موفقیت تولید مثلی یکی از مهمترین اتفاقاتی است که می‌تواند سازگاری و بقای فرد، گونه و یا جمعیت را در مسیر تکامل میسر سازد. انجام تحقیقات در زمینه زیست‌شناسی تولیدمثل گونه‌های مختلف آبزیان در مدیریت ذخایر و رسیدن به هدف بهره‌برداری پایدار ضروری است. در واقع لازمه تکثیر مصنوعی، استفاده از ترکیبات مناسب برای تحقق بهتر رسیدگی نهایی، اوولاسیون و تخم‌ریزی است. از این رو، مدیریت تولید سلول‌های جنسی در محیط‌های پرورشی ضروری است (Sparre, 1998). در بسیاری از ماهیان پرورشی، بویژه ماهیان که به تازگی وارد چرخه تکثیر و پرورش مصنوعی شده‌اند، عملکرد تولید مثل و کیفیت لارو ماهیان غیرقابل پش‌بینی بوده و بطور عمده تحت تأثیر کیفیت و کمیت تغذیه مولدین قرار دارد. بهبود اقلام و مواد غذایی مورد استفاده در تغذیه مولدین نه تنها باعث بهبود کیفیت تخمک و اسپرم استحصالی می‌شود، بلکه طی تکامل تخمدان، مواد غذایی اندوخته شده به اووسیت‌ها انتقال پیدا می‌کند، که نیازهای تغذیه‌ای جهت رشد و تکامل جنین را تا زمان جذب کیسه زرده و تغذیه خارجی فراهم می‌کند. این مراحل در آزاد ماهیان که دارای تخم‌های بزرگ و دوره انکوباسیون طولانی هستند، حائز اهمیت است و محتوای کمی و کیفی زرده نقش مهمی در این ارتباط دارد (Palace and Werner, 2006). با وجود اهمیت زیاد مواد مغذی در جیره‌ی غذایی مولدین، انجام مطالعه روی تغذیه‌ی مولدین به دلیل هزینه بالای آن محدود می‌باشد (Izquierdo *et al.*, 2001). طی روند رسیدگی جنسی، جانوران به طور معمول میزان سوخت و ساز بالاتری دارند که به طور بالقوه می‌تواند باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژنی (ROS) شده و در صورت کمبود آنتی‌اکسیدان‌ها منجر به استرس اکسیداتیو گردد (Speakman, 2008). آنتی اکسیدان‌ها مولکول‌هایی هستند که قابلیت آهسته کردن یا جلوگیری از اکسید شدن سایر مولکول‌های زیستی/حیاتی را دارا هستند. این مولکول‌ها با حذف رادیکال‌های آزاد، به عنوان واسطه‌ای برای پایان‌دادن این زنجیره، وارد واکنش می‌شوند و از سوی دیگر با اکسیداسیون خود، سایر واکنش‌های اکسیداتیو را مهار می‌کنند (Mohebbi *et al.*, 2012).

از مهمترین ترکیبات آنتی اکسیدانی غیر آنزیمی می‌توان به ویتامین‌ها به ویژه ویتامین C و E اشاره کرد. ویتامین C یا ال-آسکوربیک اسید با فرمول مولکولی ($C_6H_8O_6$) یکی از ویتامین‌های مهم محلول در آب است که در بسیاری از گیاهان و گونه‌های جانوری از گلوکز و سایر قندهای ساده، ساخته می‌شود. ماهیان به دلیل اینکه فاقد آنزیم ال-گلونولاکتون اکسیداز ند، نمی‌توانند گلوکز را به اسید آسکوربیک تبدیل کنند، بنابراین لازم است مقادیر کافی ویتامین C در جیره‌ی ماهیان وجود داشته باشد (Falahatkar *et al.*, 2006). ویتامین C با سرکوب پراکسیداسیون چربی غشای سلولی (از جمله غشای اطراف سلول و غشای درون اندامک‌های داخل سلولی) از آسیب سلولی جلوگیری می‌کند (Ngo *et al.*, 2019) و به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی زیستی از افزایش سطح ROS، تجمع آسیب DNA و بروز آپوپتوز (مرگ برنامه ریزی شده) در تخمدان جلوگیری می‌کند (Verlhac *et al.*, 1996; Kere *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2019). گزارش شده است که غلظت ۲۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C در ماهی قزل آلای رنگین کمان موجب افزایش غلظت هورمون تستسترون در سرم و افزایش غلظت ویتامین C در سرم و تخمک‌های استحصالی شده است (Dabrowski *et al.*, 1995). همچنین ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) تغذیه شده با ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C هماوری مطلق و نسبی بالاتری را نشان داده است (Suloma *et al.*, 2017).

کاروتنوئیدها در واقع رنگدانه‌های موجود در ترکیبات/سلول‌های گیاهی و جانوری و مسئول ایجاد

رنگ‌های زرد، نارنجی و قرمز در آنها هستند (Elmadfa and Majchrzak, 1998). این رنگدانه‌ها در تخمک موجوداتی که مواد زرده را در تخمک خود ذخیره می‌سازند، تجمع می‌یابند (Blount *et al.*, 2002). اگر مقدار کاروتنوئیدها در جیره‌ی غذایی مولدین ماده کم باشد، ممکن است توانایی تولید تخمک و یا تخم‌های با کیفیت بالا در آنها محدود شود (Biard *et al.*, 2006). آستازانتین (۳ و ۳-۶- دی هیدروکسی، کاروتن - ی ۴ دی اون) کتوکاروتنوئید قرمز رنگی است که در گیاهان، جانوران، باکتری‌ها و قارچ‌ها شناسایی شده است (Johnson and An, 1991) و عملکردهای گوناگونی از جمله تجمع رنگدانه در بافت خون، ایجاد رنگ در محصول، بهبود در عملکرد زیستی، ثبات در غشای سلولی، بهبود سلامتی و ایمنی از طریق حذف رادیکال‌های آزاد، مقاومت در برابر استرس‌های محیطی مانند استرس دما، فشار اسمزی و کاهش اکسیژن محلول در آب را دارند (Latscha, 1989; Darachai *et al.*, 1998). یکی از عملکردهای زیستی مهم در مورد آستازانتین، نقشی است که این رنگدانه مانند یک هورمون ایفا کرده و باعث باروری تخمک می‌شود. این ترکیب می‌تواند باعث افزایش قابلیت لقاح تخمک (افزایش درصد لقاح) توسط تحریک و جذب اسپرماتوزوآ گردد (Hartmann *et al.*, 1947). اعتقاد بر این است که در تخم‌هایی که در آنها رنگین شدگی بالایی وجود دارد، درصد لقاح بالا و پایین‌ترین نرخ مرگ و میر از زمان لقاح تا تغذیه‌ی فعال وجود دارد (Yasir and Qin, 2010).

لسیتین یک واژه کلی برای گروهی از چربی‌های زرد مایل به قهوه‌ای می‌باشد که از اسید فسفریک، کولین، اسیدهای چرب، گلیسرول، گلیکولیپید، تری گلیسرید و فسفولیپیدهایی مانند فسفاتیدیل کولین، فسفاتیدیل اتانول‌امین و فسفاتیدیل اینوزیتول تشکیل شده است (Thompson *et al.*, 2003). لسیتین با اثر بر متابولیسم چربی و کاهش مصرف انرژی موجب بهبود کارایی مصرف غذا، رشد و بازماندگی ماهیان و سخت پوستان می‌شود (Hung *et al.*, 1997). همچنین لسیتین با تاثیر بر تولید آنتی بادی‌ها و تحریک سیستم ایمنی (سلولی و خونی) باعث بهبود سیستم ایمنی می‌شود. اثر مثبت لسیتین بر کارایی تولید مثلی نیز در چند گونه از ماهیان گزارش شده است. در مطالعه‌ای که روی ماهی گورخری (*Danio rerio*) صورت گرفت، جیره‌ی آزمایشی حاوی فسفولیپید منجر به تحریک تخم‌ریزی مولدین شد، در صورتی که مولدینی که با غذای تجاری تغذیه شده بودند، اصلا تخم‌ریزی نکردند (Diogo *et al.*, 2015). Jamali و همکاران (۲۰۱۹) بهبود کارایی تولید مثلی مولدین *Aequidens rivulatus* تغذیه شده با آرتمیای غنی شده با لسیتین سویا را گزارش کردند. تغذیه با فسفولیپیدها می‌تواند از طریق زرده سازی بر کارایی تولید مثلی اثر گذار باشد؛ به این‌گونه که ممکن است فسفولیپیدها باعث افزایش متابولیسم چربی‌ها و بهبود انتقال آن‌ها از کبد به تخمدان شوند (Wu *et al.*, 2007; Sui *et al.*, 2009) و همچنین به علت کارایی بالاتر استفاده از تری‌گلیسریدها به عنوان منبع انرژی در مراحل ابتدایی لاروی، تکامل لاروی را تسهیل بخشد (Kaitaranta and Ackman, 1981; Tocher *et al.*, 2008; Jamali *et al.*, 2019).

ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) از جمله ماهیان مهاجر رودکوچ دریای خزر و از گونه‌های مهم اقتصادی و در معرض خطر انقراض دریای خزر می‌باشد. از نکات مهم در تولیدمثل این ماهی اعمال مدیریت صحیح تغذیه و تامین مواد ضروری جیره برای بالا بردن کارایی تولیدمثلی مولدین می‌باشد. در این راستا با توجه به ارزش و اهمیت این آبزی به عنوان یک گونه بومی دریای خزر، آزمایش‌های تغذیه‌ای برای دستیابی به جیره غذایی مناسب این ماهی ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین هدف تحقیق حاضر بررسی اثرات همزمان سطوح مختلف ویتامین C، آستازانتین و لسیتین سویا بر تغییرات فراسنجه‌های بیوشیمیایی مثل پروتئین کل، آنزیم‌های لیتیک (ACP و ALP) و متابولیک (LDH و AST) در مایع تخمدانی، هماوری نسبی و قابلیت لقاح مولدین ماده ماهی آزاد دریای خزر است.

۲. مواد وروش‌ها

۱.۲. تهیه و ذخیره سازی مولدین

این تحقیق در مرکز تکثیر خصوصی واقع در شهرستان ارومیه انجام پذیرفت. بدین منظور ابتدا تعداد ۷۲ قطعه مولد ماده ماهی آزاد دریای خزر با میانگین سن ۳ سال، پس از زیست‌سنجی (۰/۰۵±۲/۵۱ کیلوگرم) در مخازن بتونی طولی با حجم ۱۵۰۰ لیتر با تراکم ۸ قطعه مولد در هر مخزن ذخیره سازی شد. قبل از شروع آزمایش ماهی‌ها به مدت دو هفته با شرایط مخازن و جیره آزمایشی سازگار شدند. طی دوره آزمایش میانگین دما، اکسیژن محلول و دبی آب به ترتیب ۰/۶۳± ۱۰/۴۱ درجه سانتی‌گراد، ۰/۱۳±۱۰/۲۱ میلی‌گرم در لیتر و ۲۰ لیتر بر ثانیه بود.

۲.۲. ساخت غذا

برای این منظور از جیره غذایی تجاری اکسترود مولدین قزل‌آلا با درصدهای پروتئین خام: ۴۵، چربی خام: ۱۵، فیبر خام: ۳، فسفر قابل جذب: ۰/۹ و رطوبت: کمتر از ۱۰ درصد و انرژی قابل هضم: ۴۳۰۰ Cal/Kg، ساخت شرکت بیضاء به عنوان جیره پایه استفاده شد. مکمل‌های ویتامین C (شرکت لابراتوارهای سیانس، ایران)، آستازانتین (Kaesler Nutrition GmbH, Germany) و لسیتین (Shankar, India)، با توجه به تیمارهای غذایی، به ازای هر کیلوگرم غذا محاسبه و به جیره غذایی تجاری افزوده شد به طوری که ابتدا پودرهای ویتامین C و آستازانتین همراه با ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر به جیره پایه اسپری شدند سپس لسیتین سویا به تشتک حاوی غذا اضافه شده و به خوبی هم زده شد تا دان‌های غذایی با لایه‌ای از لسیتین پوشانده شوند، در ادامه به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق (۲۲ درجه سانتی‌گراد) خشک شدند. به منظور محافظت غذاها و جلوگیری از رها شدن ویتامین C و آستازانتین و ورود آنها به محیط آب، غذاهای آماده شده به روش فوق، طبق روش Ramsden و همکاران (۲۰۰۹)، توسط لایه‌ای از ژلاتین گاوی پوشانیده شد. بدین منظور ابتدا محلول ۲ درصد ژلاتین گاوی در آب مقطر تهیه و روی تمامی جیره‌های غذایی آزمایشی به صورت یکنواخت اسپری گردید. در پایان غذاها به مدت ۱۲ ساعت دیگر در دمای اتاق خشک شدند. در نهایت دان‌های تهیه شده در کیسه‌های فریزر یک کیلوگرمی به همراه مقداری ژل نم گیر با ثبت تاریخ ساخت غذا و نوع تیمار در یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد.

۳.۲. تیمارهای آزمایشی

این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی و در ۹ تیمار آزمایشی با ۳ تکرار انجام پذیرفت (جدول ۱). طول دوره آزمایش ماهیان چهار ماه بود. طی این دوره، تغذیه ماهیان بر اساس یک درصد وزن بدن آنها و در یک وعده غذایی (در یک ساعت معین) انجام شد (Lovell, 2003).

جدول ۱- تیمارهای آزمایشی شامل افزودن سطوح مختلف ویتامین C، آستازانتین و لسیتین به جیره پایه

تیمارها	ویتامین C (mg/kg)	آستازانتین (mg/kg)	لسیتین سویا (٪)
$C_0A_0L_0$	۰	۰	۰
$C_{300}A_{50}L_0$	۳۰۰	۵۰	۰
$C_{700}A_{100}L_0$	۷۰۰	۱۰۰	۰
$C_0A_{50}L_6$	۰	۵۰	۶
$C_{300}A_{100}L_6$	۳۰۰	۱۰۰	۶
$C_{700}A_0L_6$	۷۰۰	۰	۶
$C_0A_{100}L_9$	۰	۱۰۰	۹
$C_{300}A_0L_9$	۳۰۰	۰	۹
$C_{700}A_{50}L_9$	۷۰۰	۵۰	۹

۴.۲. شاخص‌های مایع تخمدانی

۱.۴.۲. نمونه برداری از مایع تخمدانی

پس از اتمام دوره‌ی آزمایش و چهار روز پس از حصول رسیدگی، از هر مخزن پرورشی سه ماهی (۳ تکرار) به صورت کاملا تصادفی صید شد. مولدین با پودر گل میخک (۲۲۰ ppm، ۱۰ دقیقه) بیهوش شدند (Coffman and Goetz, 1998; Kazemi *et al.*, 2021) سپس تخم‌کشی از آنها صورت گرفت. در هنگام تخم‌کشی با ریختن تخمک‌ها روی توری، مایع تخمدانی از توری عبور داده و پس از جدا سازی، به درون میکروتیوب‌های ۲ میلی لیتری انتقال داده شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده، سریعا در یخ خشک قرار داده شد و به فریزر ۸۰- منتقل گردید.

۲.۴.۲. سنجش پروتئین کل مایع تخمدانی

ارزیابی و تعیین شاخص پروتئین کل مایع تخمدانی با استفاده از کیت کمی شرکت پارس آزمون و در دستگاه اتوآنالایزور (Erma INC, Biochemical Analyzer, Model: AE-600F, Japan) صورت گرفت (Roosta *et al.*, 2014; Poursaeid *et al.*, 2015; Roosta *et al.*, 2019).

۳.۴.۲. سنجش آنزیم‌های لیتیک (ACP و ALP) و متابولیک (LDH و AST) مایع تخمدانی

آنزیم‌های اسید فسفاتاز (ACP)، آلکالین فسفاتاز (ALP)، آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) و لاکتات‌دهیدروژناز (LDH) مایع تخمدانی به ترتیب با روش‌های Bergmeyer (۱۹۸۵)، Kind و King (۱۹۵۴)، Reitman و Frankel (۱۹۵۷)، Babson و Babson (۱۹۷۳) و مطابق دستورالعمل کیت‌های تجاری شرکت پارس آزمون (ParsAzmoon, Tehran, Iran) اندازه‌گیری شد (Roosta *et al.*, 2019).

۵.۲. سنجش هماوری نسبی و قابلیت لقاح

۵،۱.۲. تعیین میزان هماوری نسبی

پس از تخم‌کشی از ماهیان و جداسازی مایع تخمدانی، ابتدا وزن کل تخمک استحصالی را بدست آورده سپس ۲۰ گرم از تخمک‌های هر مولد (۳ تکرار) جهت شمارش تعداد تخمک‌ها نمونه‌گیری شد (Agh and Irani, 2021).

$$\text{هماوری نسبی} = \frac{\text{تعداد کل تخم‌های استحصالی از مولد ماده}}{\text{وزن مولد ماده (کیلوگرم)}}$$

۲.۵.۲. استحصال تخمک و اسپرم و انجام لقاح

در زمان جداسازی تخمک‌ها و مایع تخمدانی، تخمک هر ماهی بصورت جداگانه در تشت‌های پلاستیکی جمع‌آوری شد. اسپرم مورد نیاز برای لقاح نیز از تعداد ۹ ماهی نر استحصال و با هم مخلوط و برای انجام لقاح استفاده شد. به منظور انجام لقاح از روش لقاح خشک استفاده شد. به طوری که پس از اضافه کردن مخلوط اسپرم به تخمک‌ها به مدت ۳۰ ثانیه به آرامی با پر هم‌زده شد. سپس حدود ۲۵ سی‌سی محلول کلرید سدیم ۰/۶ درصد به هر یک از تشت‌ها اضافه و دوباره به‌مدت ۲-۱ دقیقه هم زده شد. در ادامه برای شستشوی تخم‌ها مقداری از آب مزرعه به آنها اضافه و تخم‌ها کاملا بهم زده شدند. تخم‌ها چندین بار توسط آب مزرعه جهت هم دما سازی و خروج پوسته‌های اضافی تا شفاف شدن کامل آب شستشو داده شدند. تشت‌های حاوی تخم به‌مدت ۴۰-۳۵ دقیقه بدون دستکاری باقی ماندند تا آب جذب کرده و سفت شوند. در انتها تخم‌های لقاح یافته به سینی‌های کالیفرنیایی انتقال داده شدند (Akbari Nargesi *et al.*, 2020).

۳.۵.۲. تعیین درصد لقاح

۸ ساعت پس از خوابانیدن جهت تعیین درصد لقاح از تخم‌ها نمونه برداری شد. نمونه برداری از تخم‌های موجود در درون سینی به صورت کاملا تصادفی و با استفاده از یک پیمانه‌ی معیار و به تعداد کاملا یکسان برای هر یک

از آنها انجام گرفت. از هر یک از ظروف سینی انکوباسیون تعداد ۱۰۰ عدد تخم نمونه برداری شده و به منظور تعیین درصد لقاح درون محلول (۷ گرم نمک طعام آزمایشگاهی + ۵۰ سی‌سی اسید استیک گلاسیال + ۱۰۰۰ سی‌سی آب مقطر) قرار داده شدند. پس از حدود ۱۰ دقیقه، تخم‌های لقاح یافته و سالم (با ظهور لکه جنینی در قطب حیوانی) از لقاح نیافته متمایز شده و درصد لقاح مطابق فرمول زیر محاسبه شد (Geffen and Evans, 2000).

$$\text{درصد لقاح} = \frac{\text{تعداد تخم لقاح یافته}}{\text{تعداد کل تخم}} \times ۱۰۰$$

۶.۲. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

قبل از انجام تجزیه واریانس، نرمال بودن داده‌های بدست آمده با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف بررسی شد. برای تجزیه واریانس داده‌های نرمال از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. برای مقایسه میانگین تیمارهای مختلف از آزمون توکی استفاده شد و سطح معنی داری آزمون‌ها P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد. نتایج به صورت "میانگین ± انحراف معیار" ارائه شدند. برای انجام تحلیل‌های آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

۳. نتایج

۱.۳. نتایج پروتئین کل مایع تخمدانی ماهی آزاد دریای خزر

سنجش پروتئین کل مایع تخمدانی ماهی آزاد دریای خزر تغذیه شده با تیمارهای آزمایشی (شکل ۱) نشان داد که بیشترین مقدار پروتئین کل در ماهیان گروه $C_{700}A_{50}L_9$ (۶۱/۳۳±۳/۵۱ mg/dl) وجود دارد همچنین کمترین مقدار آن در ماهیان گروه شاهد، $C_0A_0L_0$ (۲۹/۳۳±۲/۵۱ mg/dl) مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با یکدیگر داشتند (p<۰/۰۵).

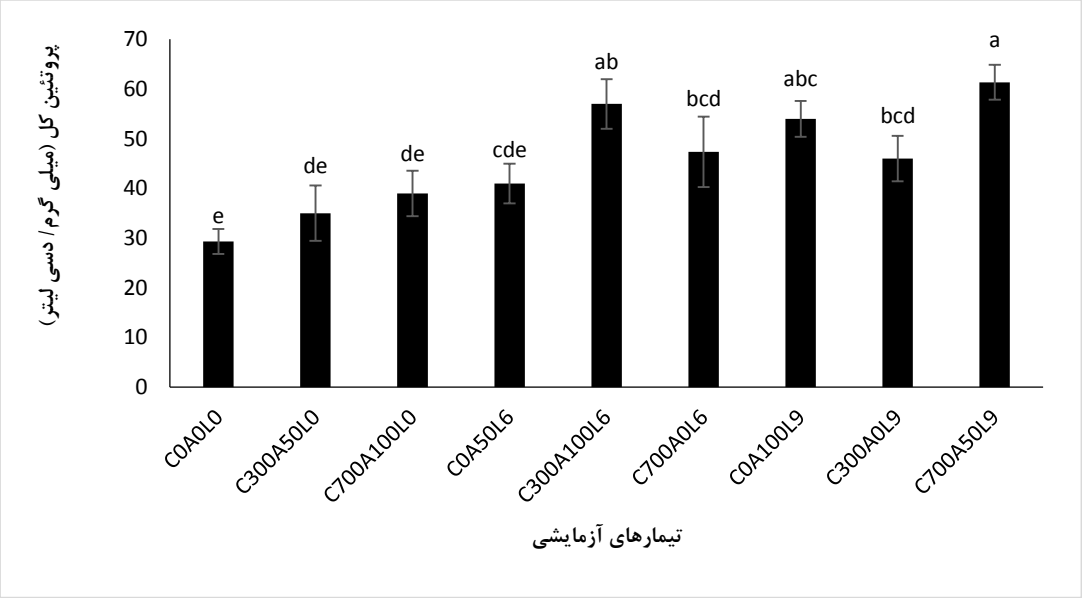
۲.۳. نتایج آنزیم‌های لیتیک (ACP و ALP) و متابولیک (LDH و AST) مایع تخمدانی ماهی آزاد دریای خزر

نتایج سنجش آنزیم‌های لیتیک (ACP و ALP) و متابولیک (LDH و AST) مایع تخمدانی در جدول ۲ ارائه شده است. اختلاف معنی‌داری برای آنزیم ACP در بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد (p>۰/۰۵) با این حال بیشترین و کمترین میزان این آنزیم در تیمارهای $C_0A_{50}L_6$ (۳/۵±۱/۶۹ u/l) و $C_0A_{100}L_9$ (۱/۹۳±۰/۰۵ u/l) بدست آمد. بیشترین میزان آنزیم ALP در ماهیان تیمارهای $C_0A_{100}L_9$ (۹۱±۱/۰۰ u/l) و $C_{700}A_0L_6$ (۸۵/۶۶±۱۰/۷۸ u/l) مشاهده شد. همچنین کمترین مقدار آن در ماهیان تیمار $C_0A_0L_0$ (۴۸±۴/۳۵ u/l) بود و اختلاف معنی‌داری با همدیگر داشتند (p<۰/۰۵).

در مورد آنزیم LDH، بیشترین میزان در تیمارهای $C_0A_0L_0$ (۴۶۲±۲۶/۵۱ u/l) و $C_{300}A_{50}L_0$ (۴۵۴/۶۶±۱۸/۵۰ u/l) بدست آمد با این حال کمترین مقادیر این آنزیم در تیمارهای $C_0A_{100}L_9$ (۲۳۹±۴۵/۳۵ u/l) و $C_{300}A_{100}L_6$ (۲۴۰±۱۶/۵۲ u/l) مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نشان دادند (p<۰/۰۵). همچنین بیشترین میزان سنجیده شده برای آنزیم AST در تیمارهای $C_0A_0L_0$ (۴۵/۶۶±۴/۷۲ u/l)، $C_0A_{50}L_6$ (۴۵/۳۳±۴/۹۳ u/l) و $C_{300}A_{50}L_0$ (۴۵±۵/۲۹ u/l) و کمترین مقادیر برای تیمارهای $C_{700}A_0L_6$ (۲۱±۲/۰۰ u/l) و $C_0A_{100}L_9$ (۲۲/۳۳±۲/۵۱ u/l) بود و اختلاف معنی‌داری داشتند (p<۰/۰۵).

۳.۳. نتایج هماوری نسبی

شکل ۲ نتایج مربوط به هماوری نسبی مولدین ماده ماهی آزاد دریای خزر در تیمارهای آزمایشی را نشان می‌دهد. بیشترین میزان میانگین هماوری نسبی در تیمار $C_0A_{100}L_9$ (۸۸۱±۲۵) بدست آمد که تنها با تیمارهای $C_0A_0L_0$ (۶۴۰±۳۸) و $C_{300}A_{50}L_0$ (۷۰۲±۲۳) اختلاف معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵).



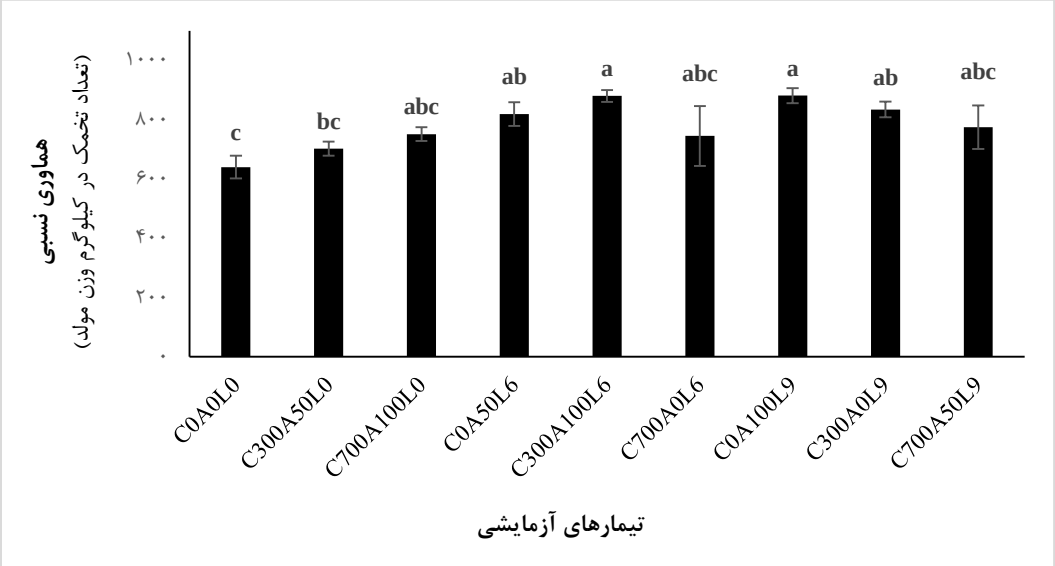
شکل ۱- نمودار میزان پروتئین کل مایع تخمدانی استحصالی از مولدین ماده ماهی آزاد دریای خزر تغذیه شده با جیره‌های مختلف آزمایشی

جدول ۲- نتایج سنجش آنزیم‌هایACP، ALP، AST و LDH مایع تخمدانی ماهی آزاد دریای خزر تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی

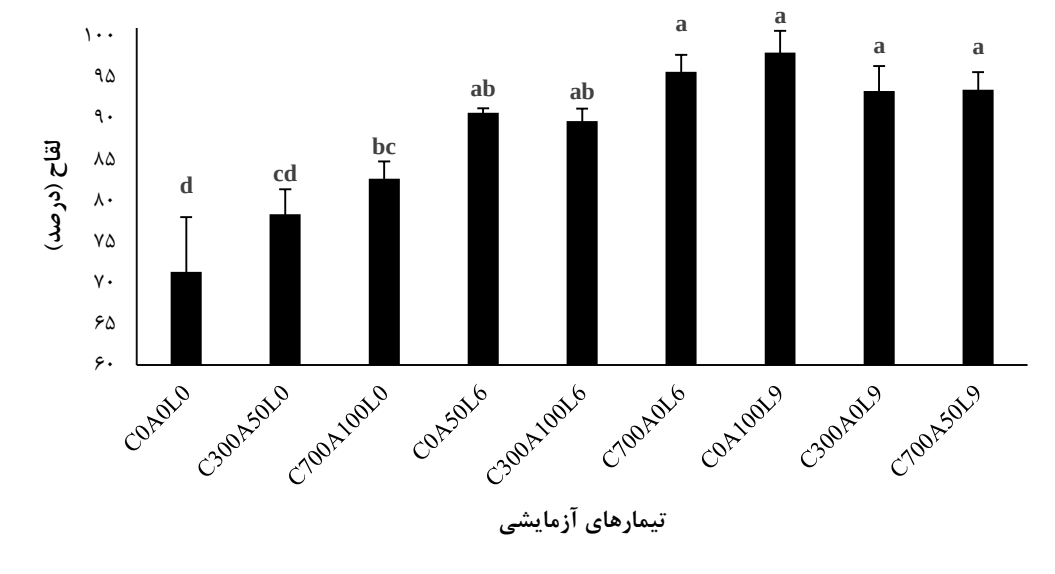
تیمار	ALP (u/l)	ACP (u/l)	AST (u/l)	LDH (u/l)
$C_0A_0L_0$	۴۸±۴/۳۵^{d}	۳/۱۵±۰/۱۰	۴۵/۶۶±۴/۷۲^{a}	۴۶۲±۲۶/۵۱^{a}
$C_{300}A_{50}L_0$	۵۴/۳۳±۳/۰۵^{cd}	۲/۷۱±۰/۲۱	۴۵±۵/۲۹^{a}	۴۵۴/۶۶±۱۸/۵۰^{a}
$C_{700}A_{100}L_0$	۶۲/۳۳±۶/۴۲^{bcd}	۲/۳۸±۰/۱۲	۴۴±۴/۵۸^{ab}	۴۰۵/۳۳±۳۷/۴۴^{ab}
$C_0A_{50}L_6$	۶۳/۳۳±۹/۰۷^{bcd}	۳/۵±۱/۶۹	۴۵/۳۳±۴/۹۳^{a}	۲۶۷/۳۳±۳۱/۰۶^{c}
$C_{300}A_{100}L_6$	۶۳/۶۶±۱/۵۲^{bcd}	۲/۸±۰/۱۵	۳۵/۳۳±۱/۵۲^{abc}	۲۴۰±۱۶/۵۲^{c}
$C_{700}A_0L_6$	۸۵/۶۶±۱۰/۷۸^{a}	۲/۲۵±۰/۱۴	۲۱±۲/۰۰^{d}	۳۲۶±۳۳/۹۵^{bc}
$C_0A_{100}L_9$	۹۱±۱/۰۰^{a}	۱/۹۳±۰/۰۵	۲۲/۳۳±۲/۵۱^{d}	۲۳۹±۴۵/۳۵^{c}
$C_{300}A_0L_9$	۷۴/۶۶±۳/۲۱^{ab}	۲/۰۱±۰/۱۱	۲۷/۶۶±۷/۳۷^{cd}	۳۹۶±۸/۸۸^{ab}
$C_{700}A_{50}L_9$	۶۷/۶۶±۶/۰۲^{bc}	۲/۴۷±۰/۴۷	۳۲/۶۶±۰/۵۷^{bcd}	۳۷۶/۶۶±۴۹/۹۷^{ab}

۴.۳. نتایج درصد لقاح

نتایج درصد لقاح شکل ۳ نشان می‌دهد که تیمار شاهد ($C_0A_0L_0$) دارای کمترین میزان میانگین (۷۱/۳۳±۶/۶۵ درصد) است و تنها با تیمار $C_{300}A_{50}L_0$ (۷۸/۳۳±۳/۰۵) اختلاف معنی‌داری نداشت ($p>0/05$). بیشترین میزان درصد لقاح در تخم‌های ماهیان گروه $C_0A_{100}L_9$ (۹۸±۲/۶۴ درصد) مشاهده شد که با تیمارهای $C_0A_0L_0$، $C_{300}A_{50}L_0$ و $C_{700}A_{100}L_0$ اختلاف معنی داری داشت ($p<0/05$).



شکل۲- نمودارهماوری نسبی مولدین ماده ماهی آزاد دریای خزر تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی مختلف



شکل ۳- درصد لقاح تخمک‌های استحصالی از مولدین ماده ماهی آزاد دریای خزر تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی مختلف

۴. بحث و نتیجه‌گیری نهایی

بررسی فراسنجه‌های بیوشیمیایی مایع تخمدانی ماهی می‌تواند برای پیش بینی کیفیت تخمک، فعل و انفعالات جنسی و عملکرد اسپرم استفاده شود. ترکیبات آن همچنین می‌تواند برای تدوین شرایط کشت برای مطالعات آزمایشگاهی استفاده شود (Zadmajid *et al.*, 2019). آنزیم‌های لیتیک (ACP و ALP) کاتالیزورهایی هستند که در کاتابولیسم فسفولیپیدها و تخریب پروتئین زرده دخیل هستند (Sire *et al.*, 1994). آنزیم‌های پروتئولیتیک نقش مهمی در لیز اپیتلیوم فولیکولار هنگام تخلیه تخمک‌های بالغ دارند (Iwamatsu and Ohta, 1977; Oshiro and Hibiya, 1982; Berndtson and Goetz, 1989) و ممکن است طی این فرآیند آزاد شوند. آن‌ها

همچنین در وزیکول‌های زرده تخمک‌ها مشاهده می‌شوند (Sire *et al.*, 1994). AST و LDH آنزیم‌هایی هستند که از سلول‌های آسیب دیده دفع می‌شوند و بنابراین افزایش سطوح آنها نشان دهنده آسیب و یا تخریب غشاء سلولی است (Devlin, 1992; Kazemi *et al.*, 2021). همانند پروتئین مایع تخمدانی، طبق اطلاعات نویسنده تا کنون تحقیقی به اثرات تغذیه مولدین ماده بر مقادیر آنزیم‌های لیتیک (ACP و ALP) و متابولیک (LDH و AST) مایع تخمدانی صورت نگرفته است و اکثر مطالعات به بررسی این آنزیم‌ها در مراحل مختلف فوق رسیدگی و اثرات تغییرات آنها بر میزان درصد لقاح ماهیان متمرکز بوده است (Mohagheghi Samarin *et al.*, 2015). برای مثال بالا بودن درصد لقاح در اواسط فصل تولید مثل در سپرماهی (*Scophthalmus maximus*) با سطوح بالای ALP و سطوح پایین ACP و AST مرتبط بود (Jia *et al.*, 2015). همراستا با نتایج مطالعات ذکر شده در این تحقیق، درصد لقاح در مایع تخمدانی ماهیانی که ALP بالا و مقادیر ACP، AST و LDH پایینی داشتند، بیشتر بود. می‌توان دلیل این امر را به اثرات آنتی اکسیدانی ویتامین C و آستاگزانتین که می‌تواند باعث جلوگیری از پراکسیداسیون غشای فسفولیپیدی تخمک‌ها شود، نسبت داد. Kazemi و همکاران (۲۰۲۱) گزارش دادند که تغذیه مولدین نر قزل‌آلای رنگین کمان از منابع مختلف عنصر روی (Zn) باعث کاهش معنی‌دار مقادیر AST، ACP و LDH و افزایش معنی‌دار ALP سمینال پلاسمای اسپرم، نسبت به تیمار کنترل می‌شود. آنها دلیل این امر را به اثرات آنتی اکسیدانی Zn در حفظ یکپارچگی غشاء فسفولیپیدی اسپرم‌ها از طریق مکانیسم تولید اکسید نیتریک بیان کردند. Wu و همکاران (۲۰۱۱) گزارش دادند که این مکانیسم از یکپارچگی ساختار و عملکرد اسپرم محافظت کرده و با کاهش پراکسیداسیون چربی، مقادیر اسپرم‌های غیرطبیعی را در حین ذخیره‌سازی کاهش داده و بقا و سلامت اسپرم را طولانی می‌کند.

از پروتئین‌های مایع تخمدانی به عنوان شاخصی برای سنجش کیفیت تخمک استفاده می‌شود. پروتئین‌های مایع تخمدانی به نوبه خود بر پیری پس از تخمک گذاری، مدت زمان ذخیره تخمک (در تخمدان و حفره شکمی)، توانایی لقاح، کیفیت تخمک، اتصال (چسبندگی) تخمک، مهار پروتئاز و پاسخ‌های ایمنی تأثیر می‌گذارند (Zadmajid *et al.*, 2019). Zadmajid و همکاران (۲۰۱۹) در مقاله مروری خود بیان کردند که غلظت‌های بالایی از پروتئین‌ها در مایع تخمدانی وجود دارد به طوری که تفاوت‌های درون و بین گونه‌ای زیادی در آنها مشاهده می‌شود. با توجه به اطلاعات نویسنده، تا کنون تحقیقی به اثرات تغذیه بر شاخص‌های بیوشیمیایی مایع تخمدانی انجام نشده است اما با این حال مطالعاتی محدودی روی تغییرات مایع تخمدانی در اثر فوق رسیدگی تخمک‌ها انجام شده است. برای مثال Jia و همکاران (۲۰۱۵) میزان پروتئین کل مایع تخمدانی را در اوایل، اواسط و انتهای فصل تخم‌ریزی ماهی *Scophthalmus maximus* بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که با افزایش مدت زمان ذخیره تخمک در حفره‌ی شکمی (نزدیک شدن به انتهای فصل تخم‌ریزی و احتمال فوق رسیده شدن تخمک‌ها) مقادیر پروتئین کل مایع تخمدانی افزایش می‌یابد؛ هرچند کمترین میزان پروتئین کل مایع تخمدانی در اواسط دوره تخم‌ریزی به دست آمد. با این حال برای به حداقل رساندن اثرات فوق رسیدگی تخمک‌ها، در این تحقیق از تمامی مولدین در روز چهارم پس از رسیدگی جنسی تخمک کشی شد (Coffman and Goetz, 1998). Lahnsteiner و همکاران (۲۰۰۱) نیز افزایش پروتئین مایع تخمدانی را با افزایش میزان فوق رسیدگی تخمک‌های کپور ماهیان (cyprinid) نشان داد و بیان کردند که منشاء افزایش پروتئین مایع تخمدانی می‌تواند تغییر فعالیت سنتزی تخمدان، نشت از سلول‌ها یا تجزیه تخمک‌ها درون تخمدان باشد. در ادامه Aegerter و Jalabert (۲۰۰۴) غلظت پروتئین مایع تخمدانی را ۱۴ روز پس از رسیدگی جنسی در دو دمای ۱۷ و ۱۴ درجه سانتی‌گراد بررسی کردند و نتایج آنها نشان داد که غلظت پروتئین مایع تخمدانی در دمای ۱۷ بیشتر از ۱۴ درجه

سانتی‌گراد بود. این محققین گزارش دادند که این افزایش غلظت در اثر شکسته شدن تخمک‌ها در زمان تخم‌کشی نیست بلکه احتمالاً به دلیل تغییر فعالیت ترشحی تخمدان‌ها است.

Ciereszko و همکاران (۲۰۰۰) و Dietricha و همکاران (۲۰۱۴) گزارش دادند که اکثر پروتئین‌های مایع سمینال پلاسما و خون مشابه یا دقیقا همسان هستند. به علاوه Dietricha و همکاران (۲۰۱۴) بیان کردند که پروتئین‌های شناسایی شده در مایع سمینال پلاسمای ماهی *Cyprinus carpio* در تنظیم تحرک اسپرم، اسپرم زایی، محافظت از پایداری غشاء لیپیدی سلول اسپرم و محافظت آنتی اکسیدانی دخیل هستند. به علاوه سایر محققین نشان دادند که مکمل سازی جیره غذایی با ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آستازانتین موجب افزایش پروتئین کل سرم خونی در گربه ماهی *Pelteobagrus fulvidraco* خواهد شد (Liu *et al.*, 2016). همچنین شواهدی وجود دارد که مصرف ویتامین C موجب افزایش پروتئین کل سرم خونی در ماهیان می‌شود (Zehra and Khan, 2012). در مورد لسیتین (فسفولیپیدها) اطلاعات کمتری وجود دارد، اما با این حال افزایش فسفولیپید جیره‌های غذایی ماهی آزاد دریای خزر موجب افزایش مقدار لیپوپروتئین های سرم خونی شد (Jenabi Haghparast *et al.*, 2019). با توجه به مطالعات اشاره شده، افزایش پروتئین کل مایع تخمدانی ممکن است در نتیجه افزایش پروتئین‌های سرم خونی باشد.

از دیگر نتایج این تحقیق افزایش هماوری نسبی مولدین در نتیجه‌ی تغذیه با ویتامین C، آستازانتین و لسیتین سویا بود. مطالعات قبلی نشان داده است که افزودن ویتامین C (Dawood and Koshio, 2016)، آستازانتین (Lim *et al.*, 2017) و همچنین لسیتین سویا (Wu *et al.*, 2007; Sui *et al.*, 2009; Diogo *et al.*, 2015; Jamali *et al.*, 2019) می‌تواند باعث افزایش هماوری و درصد لقاح در آبزیان شود. برای مثال جیره غذایی حاوی ۲/۵ درصد پودر اسپیرولینا (*Spirulina*) به عنوان یک منبع کاروتنوئیدی، توانست درصد لقاح و تعداد تخمک های استحصالی از مولدین سیچلاید (*Pseudotropheus acei*) را افزایش دهد (Güroy *et al.*, 2012). همچنین افزودن آستازانتین به جیره غذایی *Scylla tranquebarica* (Thien and Yong, 2017)، *Astacus leptodactylus* (Barim-Oz and Sahin, 2016)، *Gadus morhua* (Hansen *et al.*, 2016)، *Penaeus monodon* (Huang *et al.*, 2008) و *Carassius auratus* (Tizkar *et al.*, 2015) موجب افزایش درصد لقاح و یا هماوری شد. به علاوه مکمل سازی جیره‌غذایی با ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم ویتامین C در *Oreochromis niloricus* افزایش هماوری و درصد لقاح را به همراه داشت (Suloma *et al.*, 2017). همچنین افزودن ویتامین C به جیره غذایی موجب بهبود کارایی تولید مثلی *Scophthalmus maximus* (Lavens *et al.*, 1999)، *Oncorhynchus mykiss* (Sand nes *et al.*, 1984; Dabrowski *et al.*, 1995) و *Anguilla japonica* (Shahkar *et al.*, 2015) شد. همانند آستازانتین و ویتامین C، افزودن فسفولیپید (لسیتین) به جیره غذایی توانست میزان هماوری را در *Litopenaeus vannamei* (Maneii *et al.*, 2019)، *Danio rerio* (Diogo *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2020)، *Oplegnathus fasicatus* (Yong *et al.*, 2007)، *Fundulus heteroclitus* (Blickley *et al.*, 2014) و *Eriocheir sinensis* (Wu *et al.*, 2007; Sui *et al.*, 2009) افزایش دهد. نتایج مطالعات ذکر شده با نتایج این تحقیق هم‌راستا است. افزایش هماوری و همچنین افزایش آنزیم ALP در این تحقیق می‌تواند نشان از افزایش فعل و انفعالات تخمدانی باشد. برای مثال در آبزیان مشخص شده است که لسیتین سویا (به عنوان یک منبع فسفولیپیدی) باعث افزایش انتقال زرده توسط لیپوپروتئین‌ها به تخمدان‌ها و در انتها به تخمک‌ها می‌شود (Zhou *et al.*, 2019). می‌توان اینگونه استنباط کرد که افزایش فسفولیپید جیره غذایی می‌تواند میزان فعل و انفعالات تخمدانی را افزایش دهد و با وقوع اوولاسیون و پاره شدن فولیکول‌های تخمدانی و آزاد سازی تخمک‌ها به حفره‌ی شکمی، میزان پروتئین

بیشـــتری به درون مایع تخمدانی انتشـــار (انتقال) خواهد یافت.

نتیجه‌گیری نهایی

به عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان کرد که تغذیه مولدین ماهی آزاد دریای خزر با ویتامین C، آستازانتین و لسـیتین سویا منجر به افزایش فعل و انفعالات تخمدانی و مقـادیر پروتئین کـل مـایع تخمـدانی و در نتیجـه تولیـد تخمک‌های بیشـــتر شـــد. همچنین این مواد توانســـتند یکپـارچگی غشـــاء تخمک‌ها را افزایش داده به طوری که مقادیر AST و LDH که از نشـــانه‌های آســـیب ســـلولی هســـتند، در مایع تخمدانی ماهیان تغذیه شده با این مواد کاهش دهند و در نهایت، موجب افزایش هماوری نسبی و درصـد لقاح تخمک‌های استحصالی گردیدند. به طور کلی نتایج نشـــان داد که مکمل ســـازی جیره‌غذایی با ۳۰۰ مـیـلی‌گرم بر کیلوگرم ویتـامین C، ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آستازانتین و ۶ درصد لسیتین سویا موجب بهبود کیفیت مایع تخمدانی و همچنین افزایش هماوری نســبی و درصـد لقاح مولدین ماهی آزاد دریای خزر خواهد شـد. البتـه تحقیقـات بیشـــتری برای درک رابطه بین تغذیه و مشـخصـات بیوشیمیایی مایع تخمدانی و تکامل جنین در ســـنین مختلف ماده‌ها و فصـــول تخم‌ریزی مختلف، نیاز است.

۵. منابع

References

Aegerter, S., Jalabert, B., 2004. Effects of post-ovulatory oocyte ageing and temperature on egg quality and on the occurrence of triploid fry in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 231(1-4), 59-71.

Agh, N., Irani, A., 2021. Effects of Artemia powder in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) broodstock diet on the egg quality. *Journal of Aquaculture Development* 15(2), 1-13.

Akbari Nargesi, E., Falahatkar, B., Sajjadi, M.M., 2020. Dietary supplementation of probiotics and influence on feed efficiency, growth parameters and reproductive performance in female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) broodstock. *Aquaculture Nutrition* 26(1), 98-108.

Babson, A.L., Babson, S.R., 1973. Kinetic colorimetric measurement of serum lactate dehydrogenase activity. *Clinical chemistry* 19(7), 766-769.

Barim-Oz, O., Sahin, H., 2016. The influence of dietary antioxidant on ovarian eggs and levels of vitamin E, C, A, astaxanthin, β-carotene and oxidative stres in tissues of *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz) during reproduction. *Cellular Molecular Biology* 62(14), 1-10.

Berndtson, A.K., Goetz, F.W., 1989. Metallo-protease activity increases prior to ovulation in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and yellow perch (*Perca flavescens*) follicle walls. *Biology of reproduction* 42(2), 391-398.

Biard, C., Surai, P.F., Møller, A.P., 2006. Carotenoid availability in diet and phenotype of blue and great tit nestlings. *Journal of Experimental Biology* 209(6), 1004-1015.

Blickley, T.M., Matson, C.W., Vreeland , W.N., Rittschof, D., Di Giulio, R.T., McClellan-Green, P.D., 2014. Dietary CdSe/ZnS quantum dot exposure in estuarine fish: bioavailability, oxidative stress responses, reproduction, and maternal transfer. *Aquatic toxicology* 148, 27-39.

Blount, J., Surai, P., Houston, D., Møller, A., 2002. Patterns of yolk enrichment with dietary carotenoids in gulls: the roles of pigment acquisition and utilization. *Functional Ecology* 16(4), 445-453.

Ciereszko, A., Glogowski, J., Dabrowski, K., 2000. Biochemical characteristics of seminal plasma spermatozoa of freshwater fishes and the relation to semen biology, quality and cryopreservation. In: Tiersch TR, PM, M. (Eds.), Cryopreservation of aquatic species. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, pp. 20–48.

Coffman, M.A., Goetz, F.W., 1998. Trout ovulatory proteins are partially responsible for the anti-proteolytic activity found in trout coelomic fluid. *Biology of reproduction* 59(3), 497-502.

Dabrowski, K., Ciereszko, R., Blom, J., Ottobre, J., 1995. Relationship between vitamin C and plasma concentrations of testosterone in female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish physiology biochemistry* 14(5), 409-414.

Darachai, J., Piyatiratitivorakul, S., Kittakoop, P., Nitithamyong, C., Menasveta, P., 1998. Effects of astaxanthin on larval growth and survival of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Advances in shrimp biotechnology* 117-121.

Dawood, M.A., Koshio, S., 2016. Vitamin C supplementation to optimize growth, health and stress resistance in aquatic animals. *Reviews in Aquaculture* 10(2), 334-350.

Devlin, T.M., 1992. Textbook of biochemistry: with clinical correlations. John Wiley-Sons, (No. 577.1 TEX).

Dietrich, M.A., Arnold, G.J., Nynca, J., Fröhlich, T., Otte, K., Ciereszko, A., 2014. Characterization of carp seminal plasma proteome in relation to blood plasma. *Journal of proteomics* 98, 218-232.

Diogo, P., Martins, G., Gavaia, P., Pinto, W., Dias, J., Cancela, L., Martínez-Páramo, S., 2015. Assessment of nutritional supplementation in phospholipids on the reproductive performance of zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton, 1822). *Journal of Applied Ichthyology* 31, 3-9.

Elmadfa, I., Majchrzak, D., 1998. Carotinoide und Vitamin A in Fischproben. *European Journal of Nutrition* 37(2), 207-210.

Falahatkar, B., Dabrowski, K., Arslan, M., Rinchard, J., 2006. Effects of ascorbic acid enrichment by immersion of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) eggs and embryos. *Aquaculture Research* 37(8), 834-841.

Geffen, A., Evans, J., 2000. Sperm traits and fertilization success of male and sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 182(1-2), 61-72.

Güroy, B., Şahin, İ., Mantoğlu, S., Kayalı, S., 2012. Spirulina as a natural carotenoid source on growth, pigmentation and reproductive performance of yellow tail cichlid *Pseudotropheus acei*. *Aquaculture International* 20(5), 869-878.

Hansen, Ø.J., Puvanendran, V., Bangera, R., 2016. Broodstock diet with water and astaxanthin improve condition and egg output of brood fish and larval survival in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Aquaculture Research* 47(3), 819-829.

Hartmann, M., Medem, F.G., Kuhn, R., Bielig, H.-J., 1947. Untersuchungen über die Befruchtungsstoffe der Regenbogenforell. *Zeitschrift für Naturforschung B* 2, 330-349.

Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L., Goycoolea, F., 2006. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Critical reviews in food science* 46(2), 185-196.

Huang, J.H., Jiang, S.G., Lin, H.Z., Zhou, F.L., Ye, L., 2008. Effects of dietary highly unsaturated fatty acids and astaxanthin on the fecundity and lipid content of pond-reared *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. *Aquaculture Research* 39(3), 240-251.

Hung, S., Berge, G., Storebakken, T., 1997. Growth and digestibility effects of soya lecithin and choline chloride on juvenile Atlantic salmon. *Aquaculture Nutrition* 3(2), 141-144.

Iwamatsu, T., Ohta, T., 1977. Fine structure of loach oocytes during maturation in vitro. *Development, Growth Differentiation* 19(3), 213-226.

Izquierdo, M., Fernand ez-Palacios, H., Tacon, A., 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* 197(1-4), 25-42.

Jamali, H., Ahmadifard, N., Noori, F., Gisbert, E., Estevez, A., Agh, N., 2019. Lecithin-enriched Artemia combined with inert diet and its effects on reproduction and digestive enzymes of *Aequidens rivulatus*. *Aquaculture* 511, 734253.

Jenabi Haghparast, R., Sarvi Moghanlou, K., Mohseni, M., Imani, A., 2019. Effect of dietary soybean lecithin on fish performance, hemato-immunological parameters, lipid biochemistry, antioxidant status, digestive enzymes activity and intestinal histomorphometry of pre-spawning Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). *Fish & shellfish immunology* 91, 50-57.

Jia, Y., Niu, H., Meng, Z., Liu, X., Lei, J., 2015. Biochemical composition of the ovarian fluid and its effects on the fertilization capacity of turbot *Scophthalmus maximus* during the spawning season. *Journal of fish biology* 86(5), 1612-1620.

Johnson, E.A., An, G.-H., 1991. Astaxanthin from microbial sources. *Critical Reviews in Biotechnology* 11(4), 297-326.

Kaitaranta, J.K., Ackman, R.G., 1981. Total lipids and lipid classes of fish roe. *Comparative Biochemistry Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 69(4), 725-729.

Kazemi, E., Nazari, S., Sourinejad, I., Pourkazemi, M., Paknejad, H., Eslamloo, K., 2021. Effect of different dietary zinc sources on seminal plasma enzymatic activity, antioxidant, and immune-related gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International* 29(6), 2731-2750.

Kere, M., Siriboon, C., Lo, N.-W., Nguyen, N.T., Ju, J.-C., 2012. Ascorbic acid improves the developmental competence of porcine oocytes after parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transplantation. *Journal of Reproduction Development* 59(1), 78-84.

Kind, P., King, E., 1954. Estimation of plasma phosphatase by determination of hydrolysed phenol with amino-antipyrine. *Journal of clinical Pathology* 7(4), 322.

Lahnsteiner, F., Urbányi, B., Horvath, A., Weismann, T., 2001. Bio-markers for egg quality determination in cyprinid fish. *Aquaculture* 195(3-4), 331-352.

Latscha, T., Year. The role of astaxanthin in shrimp pigmentation. In: (Eds.), Proceeding of Advances in Tropical Aquaculture, Workshop at Tahiti, French Polynesia, 20 Feb-4 Mar 1989, 319-325.

Lavens, P., Lebegue, E., Jaunet, H., Brunel, A., Dhert, P., Sorgeloos, P., 1999. Effect of dietary essential fatty acids and vitamins on egg quality in turbot broodstocks. *Aquaculture International* 7(4), 225-240.

Lim, K.C., Yusoff, F.M., Shariff, M., Kamarudin, M.S., 2017. Astaxanthin as feed supplement in aquatic animals. *Reviews in Aquaculture* 10(3), 738-773.

Liu, F., Shi, H.-z., Guo, Q.-s., Yu, Y.-b., Wang, A.-m., Lv, F., Shen, W.-b., 2016. Effects of astaxanthin and emodin on the growth, stress resistance and disease resistance of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Fish & Shellfish Immunology* 51, 125-135.

Lovell, R.T., 2003. Diet and fish husband ry. In: (Eds.), Fish Nutrition. Elsevier, pp. 703-754.

Maneii, K., Oujifard, A., Ghasemi, A., Mozanzadeh, M.T., 2019. Reproductive performance and vitellogenin mRNA transcript abundance in the hepatopancreas of female *Litopenaeus vannamei* fed diets with different soy lecithin content. *Animal Reproduction Science* 211, 106228.

Martins, G., Diogo, P., Santos, T., Cabrita, E., Pinto, W., Dias, J., Gavaia, P.J., 2020. Microdiet formulation with phospholipid modulate zebrafish skeletal development and reproduction. *Zebrafish* 17(1), 27-37.

Mohagheghi Samarin, A., Policar, T., Lahnsteiner, F., 2015. Fish oocyte ageing and its effect on egg quality. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 23(3), 302-314.

Mohebbi, A., Nematollahi, A., Dorcheh, E.E., Asad, F.G., 2012. Influence of dietary garlic (Allium sativum) on the antioxidative status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research* 43(8), 1184-1193.

Ngo, B., Van Riper, J.M., Cantley, L.C., Yun, J., 2019. Targeting cancer vulnerabilities with high-dose vitamin C. *Nature Reviews Cancer* 19(5), 271-282.

Oshiro, T., Hibiya, T., 1982. Protease secretion of ovarian follicles in the loach Misgurnus anguillicaudatus, suggesting the presence of ovulation-inducing enzymes. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 48(5), 623-628.

Palace, V.P., Werner, J., 2006. Vitamins A and E in the maternal diet influence egg quality and early life stage development in fish: a review. *Scientia Marina* 70(s2), 41-57.

Poursaeid, S., Falahatkar, B., Van Der Kraak, G., 2015. Short-term effects of cortisol implantation on blood biochemistry and thyroid hormones in previtellogenic great sturgeon *Huso huso*. *Comparative Biochemistry Physiology Part A: Molecular Integrative Physiology* 179, 197-203.

Ramsden, C.S., Smith, T.J., Shaw, B.J., Hand y, R.D., 2009. Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout,(*Oncorhynchus mykiss*): no effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain. *Ecotoxicology* 18(7), 939-951.

Reitman, S., Frankel, S., 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *American Journal of Clinical Pathology* 28(1), 56-63.

Roosta, Z., Ghiasi, S., Falahatkar, B., 2019. Comparative study on hormones and biochemistry indices in plasma, ovarian fluid and oocytes of LHRHa2-induced female Stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*). *Aquaculture Research* 50(1), 139-145.

Roosta, Z., Hajimoradloo, A., Ghorbani, R., Hoseinifar, S.H., 2014. The effects of dietary vitamin C on mucosal immune responses and growth performance in Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) fry. *Fish Physiology & Biochemistry* 40(5), 1601-1607.

Sand nes, K., Ulgenes, Y., Braekkan, O.R., Utne, F., 1984. The effect of ascorbic acid supplementation in broodstock feed on reproduction of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 43(1-3), 167-177.

Shahkar, E., Yun, H., Kim, D.-J., Kim, S.-K., Lee, B.I., Bai, S.C., 2015. Effects of dietary vitamin C levels on tissue ascorbic acid concentration, hematology, non-specific immune response and gonad histology in broodstock Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 438, 115-121.

Sire, M.F., Babin, P.J., Vernier, J.M., 1994. Involvement of the lysosomal system in yolk protein deposit and degradation during vitellogenesis and embryonic development in trout. *Journal of Experimental Zoology* 269(1), 69-83.

Sparre, P., 1998. Introduction to tropical fish stock assessment. Part 1. Manual. FAO Fish. Tech. Paper. 306, 1-407.

Speakman, J.R., 2008. The physiological costs of reproduction in small mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363(1490), 375-398.

Sui, L.Y., Wu, X., Wille, M., Cheng, Y., Sorgeloos, P., 2009. Effect of dietary soybean lecithin on reproductive performance of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards) Broodstock. *Aquaculture International* 17(1), 45-56.

Suloma, A., Tahoun, A., Mabrok, R., 2017. Development of Brood-stock Diets for Nile tilapia Under Hapa-in-Pond Hatchery System; Optimal Dietary Vitamin C Level for the Optimum Reproductive Performance and Fry Survival. *Journal of Aquaculture Research & Development* S2, 1-4.

Thien, F.Y., Yong, A.S.K., 2017. Effect of different maturation diets on reproductive performance of the broodstock of purple mangrove crab, *Scylla tranquebarica*. *Borneo Journal of Marine Science and Aquaculture* 1, 44-50.

Thompson, K., Muzinic, L., Christian, T., Webster, C., Manomaitis, L., Rouse, D., 2003. Lecithin requirements of juvenile Australian red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture Nutrition* 9(4), 223-230.

Tizkar, B., Kazemi, R., Alipour, A., Seidavi, A., Naseralavi, G., Ponce-Palafox, J.T., 2015. Effects of dietary supplementation with astaxanthin and β-carotene on the semen quality of goldfish (*Carassius auratus*). *Theriogenology* 84(7), 1111-1117.

Tocher, D.R., Bendiksen, E.Å., Campbell, P.J., Bell, J.G., 2008. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture* 280(1-4), 21-34.

Verlhac, V., Gabaudan, J., Obach, A., Schüep, W., Hole, R., 1996. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 143(2), 123-133.

Wu, C., Zhang, W., Mai, K., Xu, W., Zhong, X., 2011. Effects of dietary zinc on gene expression of antioxidant enzymes and heat shock proteins in hepatopancreas of abalone *Haliotis discus* hannai. *Comparative Biochemistry Physiology Part C: Toxicology Pharmacology* 154(1), 1-6.

Wu, X., Cheng, Y., Sui, L., Zeng, C., Southgate, P.C., Yang, X., 2007. Effect of dietary supplementation of phospholipids and highly unsaturated fatty acids on reproductive performance and offspring quality of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards), female broodstock. *Aquaculture* 273(4), 602-613.

Yasir, I., Qin, J.G., 2010. Effect of dietary carotenoids on skin color and pigments of false clownfish, *Amphiprion ocellaris*, Cuvier. *Journal of the World Aquaculture Society* 41(3), 308-318.

Yong, A.S.K., Seoka, M., Takaoka, O., Ji, S.C., Biswas, A.K., Takii, K., Kumai, H., 2007. Effect of dietary docosahexaenoic acid and soybean lecithin on spawning performance, egg and broodfish fatty acid and lipid class of striped knifejaw, *Oplegnathus fasciatus*. *Aquaculture Science* 55(3), 449-458.

Zadmajid, V., Myers, J.N., Sørensen, S.R., Butts, I.A.E., 2019. Ovarian fluid and its impacts on spermatozoa performance in fish: a review. *Theriogenology* 132, 144-152.

Zehra, S., Khan, M.A., 2012. Dietary vitamin C requirement of fingerling, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton), based on growth, feed conversion, protein retention, hematological indices, and liver vitamin C concentration. *Journal of the World Aquaculture Society* 43(5), 648-658.

Zhou, C., Zhang, X., Zhang, Y., ShiYang, X., Li, Y., Shi, X., Xiong, B., 2019. Vitamin C protects carboplatin-exposed oocytes from meiotic failure. *Molecular Human Reproduction* 25(10), 601-613.

Zhou, Q.-C., Shi, B., Jiao, L.-F., Jin, M., Sun, P., Ding, L.-Y., Yuan, Y., 2019. Hepatopancreas and ovarian transcriptome response to different dietary soybean lecithin levels in *Portunus trituberculatus*. *Comparative Biochemistry Physiology Part D: Genomics Proteomics* 31(3), 100600.