Arshive of SID

تعیین سطوح باقیمانده کاروتنوئید آستازانتین در مراحل مختلف رشد و نمو جنینی و لارو و تأثیر آن بر برخی شاخص‌های ایمنی در ماهی استرلیاد پرورشی (*Acipenser ruthenus*)

ابراهیم فداکار[۱]، محمود بهمنی*[۲]، ایوب یوسفی جوردهی[۲]

۱- گروه شیلات، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

۲- بخش فیزیولوژی و بیوشیمی، مؤسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران، صندوق پستی: ۳۴۶۴ - ۴۱۶۳۵.

تاریخ دریافت: ۲۳ اردیبهشت ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: ۱۸ مهر ۱۳۹۶

چکیده

این تحقیق با هدف تعیین اثر کاروتنوئید آستازانتین بر سیستم ایمنی و تعیین سطوح باقیمانده آن در مراحل مختلف رشد و نمو جنینی و لارو در ماهی استرلیاد پرورشی (*Acipenser ruthenus*) به‌انجام رسید. چهار غلظت از آستازانتین شامل: ۰ (شاهد)، ۱۵، ۴۵ و ۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره به جیره ماهیان افزوده شد. ۴۸ عدد ماهی پیش مولد استرلیاد (با میانگین وزنی ۱۴/۵ ±۶۰۰ گرم) که از نظر شرایط ظاهری سالم بودند؛ انتخاب، و پس از انتقال به مخازن فایبرگلاس نیم‌تنی، به‌مدت ۶ ماه با جیره حاوی درصدهای مختلف آستازانتین تغذیه شدند. پس از تکثیر مولدین سطوح باقیمانده آستازانتین در مراحل رشد جنینی پایش گردید. براساس نتایج حاصل بیشترین درصد لقاح در غلظت ۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم مشاهده شد. درصد شکوفایی تخم ماهیان در تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری کمتر از سطوح ۴۵ و ۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم آستازانتین در جیره بود. حداقل سطوح کاروتنوئید کل، باقیمانده آستازانتین، در مرحله پس از جذب کیسه‌زرده (PY) مشاهده گردید که در مقایسه با سایر مراحل اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P<۰/۰۵$). حداقل سطوح باقیمانده کانتازانتین و بتا - کاروتن در مرحله پس از جذب کیسه‌زرده مشاهده گردید که در مقایسه با مرحله اوولاسیون (قبل از لقاح) کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P<۰/۰۵$). براساس نتایج حاصل از بررسی شاخص‌های ایمنی، سطوح لیزوزیم در غلظت‌های مختلف آستازانتین اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد در مولدین نشان نداد ($P>۰/۰۵$). سطوح ایمنوگلوبولین M (IgM) در غلظت‌های ۴۵ و ۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم به‌طور معنی‌داری کمتر از تیمار با غلظت ۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم بود ($P<۰/۰۵$). نتایج نشان داد که سطوح $C_۴$ در غلظت ۴۵ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره به‌طور معنی‌داری کمتر از سایر غلظت‌ها و تیمار شاهد بود ($P<۰/۰۵$). براساس نتایج حاصل، سطوح $C_۳$ در غلظت‌های ۴۵ و ۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره به‌طور معنی‌داری کمتر از سایر غلظت‌ها و تیمار شاهد بود ($P<۰/۰۵$). با توجه به نتایج حاصل، سطوح باقیمانده کاروتنوئیدها در مراحل مختلف رشد جنینی تاسماهی استرلیاد متفاوت بوده و افزودن آستازانتین به‌میزان ۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم به جیره سبب بهبود سیستم ایمنی در مقایسه با تیمار شاهد گردید که افزودن آن به جیره مولدین تاسماهی استرلیاد قابل توصیه است.

کلمات کلیدی: تاسماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*)، آستازانتین، تکثیر مصنوعی، شاخص‌های رشد، ایمنی.

* عهده‌دار مکاتبات (✉). mahmoudbahmani@ymail.com

www.SID.ir

Arshive of SID

مقدمه

تغذیه در مولدین گونه‌های مختلف ماهی یکی از اصلی‌ترین عوامل مؤثر بر فرایند تولیدمثلی مولدین پرورشی و وحشی به‌شمار می‌رود. این امر نه تنها در تولید تخمک و اسپرم با کیفیت بالا اثرگذار است، بلکه در میزان بازماندگی لاروها و تولید بچه‌ماهیان مقاوم نیز نقش دارد. کاروتنوئیدها نه تنها یکی از گروه‌های وسیع و گسترده رنگدانه‌های طبیعی‌اند، بلکه مسئول عملکردهای گسترده‌ای نیز می‌باشند. جانوران قادر به سنتز و تولید این مواد نیست. بنابراین، جانوران برای تأمین این مواد محتاج جیره غذایی خود هستند. یکی از عمده‌ترین کاروتنوئیدهای یافت‌شده در موجودات آبزی، آستازانتین می‌باشد که به‌مقدار فراوانی در بدن سخت‌پوستان و ماهیان مشاهده می‌شود (Bjerkeng *et al*., 1997). در محیط پرورشی عمده‌ترین منابع کاروتنوئیدی برای ماهیان تولیدات سنتزی آستازانتین می‌باشد (Bjerkeng and Perge, 2000).

در زمان رسیدگی گناد در ماهیان ماده آستازانتین متصل شده به عضله وارد خون شده، به سمت تخمدان‌ها رفته و در تخمک‌ها انباشته می‌شود. یکی از معیارهای کیفیت بالای تخم‌های تولیدی محتوای آستازانتین آنهاست که برای تکثیر مصنوعی مهم بوده و تولید تخم‌هایی با بازماندگی بالا یکی از ضروریات آبزی‌پروری است (Christiansen *et al*., 1994). در سال‌های اخیر، از رنگدانه‌های کاروتنوئیدی مثل آستازانتین در جیره غذایی آزادماهیان استفاده می‌شود و باعث افزایش کیفیت رنگ و همچنین جلوگیری از اکسیدشدن چربی قزل‌آلا طی مراحل نگهداری در یخچال می‌شود (Jensen *et al*., 1993). کاروتنوئیدها علاوه بر ایجاد رنگ باعث بهبود شاخص‌های تولیدمثلی مولدین آزادماهیان و در نتیجه بهبود رشد و نمو جنینی تخم‌ها و بازماندگی لاروهای آنها می‌شوند. برای ماهی آزاد، آستازانتین حتی به‌عنوان یک ریزمغذی اساسی به‌منظور رشد و بقای بچه‌ماهیان در نظر گرفته می‌شود (Chistiansan *et al*., 1995). بازیار و همکاران (۱۳۸۴)، تأثیر آستازانتین جیره غذایی بر ذخیره آستازانتین و قابلیت لقاح در مولدین قزل‌آلای رنگین‌کمان را مورد مطالعه قرار دادند. میزان آستازانتین در تخم‌ها ۲۹/۷۹ – ۲/۰۳ میلی‌گرم آستازانتین بر کیلوگرم تخمک در تیمارهای مختلف بود.

Sawanboonchun و همکاران (۲۰۰۸)، با افزودن آستازانتین در جیره غذایی مولدین روغن ماهی (ماهی کاد، *Gadus morhua*) به‌مدت ۲ ماه باعث بهبود کارایی تخم‌ها نسبت به گروه شاهد شد. محققین با انجام تحقیقات به این نتیجه رسیده‌اند که کاروتنوئیدهای تخم در مراحل جنینی و لاروی در حفاظت تخم از عوامل مضر محیطی تأثیر گذارند (Craik and Harvey, 1984). کاروتنوئیدها با تجمع در کبد و انتقال به تخمدان و سپس اووسیت‌ها تغییرات معنی‌داری را در بهبود رسیدگی جنسی مولدین فراهم می‌آورند. لذا بررسی میزان تغییرات ناشی از مصرف کاروتنوئیدهای مختلف در مراحل رسیدگی جنسی ماهیان ضروری به‌نظر می‌رسد. با توجه به مطالب ذکر شده و اهمیت قابل ملاحظه کاروتنوئیدها در فعالیت‌های بیولوژیک و فیزیولوژیک ماهیان، و فقدان بررسی اثرات رنگدانه‌ها بر ماهیان خاویاری، این تحقیق با هدف تعیین سطوح باقیمانده آستازانتین و اثرات بر سیستم ایمنی ماهی استرلیاد پرورشی (*Acipenser ruthenus*) به‌انجام رسید.

www.SID.ir

Arshive of SID

مواد و روش‌ها

مراحل اجرایی این تحقیق از خرداد ماه سال ۱۳۹۲ تا فروردین ۱۳۹۳ در مؤسسه تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دریای خزر (رشت) انجام شد. روش انجام آزمایش جهت بررسی انتقال کاروتنوئید به لارو تاس‌ماهی استرلیاد در قالب یک طرح کاملاً تصادفی (CRD) برنامه‌ریزی و اجرا شد. در ابتدا تعداد ۴۸ قطعه پیش‌مولد ماهی استرلیاد ۱۴/۵ ±۶۰۰ گرم که از نظر شرایط ظاهری سالم بودند و در مرحله III رسیدگی جنسی قرار داشتند، به ۱۲ مخزن فایبرگلاس منتقل شدند. در هر مخزن ۴ عدد مولد استرلیاد ذخیره‌سازی گردید. ماهیان جهت سازگاری با شرایط جدید محیطی (اکسیژن، دما و pH) به‌مدت ۶ ماه با غذای کنسانتره متداول مورد استفاده برای تغذیه ماهیان خاویاری تغذیه گردیدند. آب مورد نیاز مخازن از آب رودخانه و چاه تأمین می‌شد. نمونه‌برداری‌ها به‌صورت فصلی انجام شد. این تحقیق در ۴ تیمار و ۳ تکرار شامل تیمار شاهد (جیره فاقد کاروتنوئید افزودنی)، جیره حاوی آستارانتین به‌مقدار ۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره، تیمار، جیره حاوی آستازانتین به‌مقدار ۴۵ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره و جیره حاوی آستازانتین به‌مقدار ۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره برنامه‌ریزی و اجرا گردید. جهت افزودن کاروتنوئید به جیره غذایی مولدین از روش (Davies, 1985) استفاده گردید. به این منظور، از غذای مولدین خاویاری با ۴۲٪ پروتئین و ۱۴٪ چربی استفاده شد (جدول ۱) (بهمنی و همکاران، ۱۳۹۱).

جدول ۱: ترکیبات شیمیایی و عناصر تشکیل‌دهنده جیره غذایی

آنالیز غذایی							
ترکیبات	پروتئین خام	چربی خام	سلولز خام	خاکستر	فسفر کل	کلسیم	سدیم
درصد (٪)	۴۲	۱۴	۳/۴	۸/۳	۱/۱۴	۱/۹۳	۰/۴۸
ترکیبات غذایی							
مواد معدنی		روغن کانولا		روغن ماهی			
کنجاله سویا		پودر کانولا		کولین کلراید			
پودر ماهی		آرد گندم		مکمل‌های ویتامینی			

به‌منظور حل‌کردن رنگدانه‌ها از روغن ماهی استفاده گردید. بدین‌منظور، آستازانتین سنتتیک با نام تجاری Carophyllpink (با ۱۰ درصد ماده مؤثره ساخت شرکت DSM آلمان) در آب با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد ریخته و روغن ماهی را به آن افزوده و محلول با یک همزن برقی مخلوط و محلول حاصل با غذای ماهی مخلوط شد. غذادهی به‌میزان ۱ درصد وزن بدن و به‌دفعات دو بار در روز صورت پذیرفت. دوره نوری بر اساس چرخه طبیعی روزانه و دبی آب ورودی ۶ لیتر در دقیقه بود. در عملیات تکثیر، پس از استحصال و بررسی کمی و کیفی مواد تناسلی، مایع تخمدانی به کمک توری ظریف جدا گردید و پس از اندازه‌گیری وزن تخمک به‌مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر اسپرم مناسب برای هر ۵۰ گرم تخمک با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب سالن

www.SID.ir

Arshive of SID

انکوباسیون مخلوط و به‌مدت ۵ دقیقه مخلوط شد و آنگاه آب و اسپرم مازاد تخلیه گردید و بلافاصله جهت رفع چسبندگی محلول کائولن با غلظت ۱۰ گرم در لیتر به‌مقدار ۲۰۰ میلی‌لیتر به آن اضافه و به‌مدت ۴۵ دقیقه بهم زده شد. سپس تخم‌ها با تراکم ۵۰۰ گرم وارد هر سینی انکوباتور یوشچنکوو که قبلاً ضد عفونی شده بودند، گردید. فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب استخر به‌صورت روزانه (دما، اکسیژن محلول، با دستگاه Multi Para meter WTW مورد سنجش قرار گرفت (جدول ۲).

جدول ۲: مقادیر پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب مورد استفاده طی انجام آزمایش‌ها

پارامتر	میزان
دما (°C)	۱۶/۸۳ ±۰/۴۵
pH	۷/۱۱ ±۰/۱۲
اکسیژن محلول (mg/l)	۶/۸۵ ±۰/۳۹

به‌منظور بررسی روند تغییرات کاروتنوئیدهای اختصاصی طی مدت انکوباسیون و طی مراحل اصلی رشد و نمو جنینی شامل: تخمک، بلاستولا، گاسترولا، مورولا و قبل از تفریخ از تخم‌های هر انکوباتور نمونه‌برداری شده (تعداد ۳ نمونه از هر مرحله) و در دمای ۸۰- سانتی‌گراد نگهداری گردید. جهت اندازه‌گیری کاروتنوئید کل در جیره‌های تهیه شده، نمونه تخمک و تخم تحت آزمایش از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. خونگیری با استفاده از سرنگ‌های ۲ میلی‌لیتری از ناحیه ساقه دمی ماهیان به‌عمل آمد. نمونه‌های پلاسما جهت انجام آنالیزهای مربوط به ایمنی‌سنجی به آزمایشگاه ویرومد رشت منتقل شد. در پایان دوره، با توجه به شرایط درجه حرارت آب و با تزریق هورمون محرک گنادوتروپینی $LHRH_{A2}$ به‌میزان ۵ میکروگرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن ماهی مولد، عملیات تکثیر مصنوعی مولدین آغاز شد. بلافاصله پس از تخمک‌گیری از هر مولد ماده مقداری تخمک (حدود ۵ گرم) جهت سنجش سطوح باقیمانده آستازانتین نمونه‌برداری و به‌صورت منجمد در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت اندازه‌گیری کاروتنوئید کل از روش اسپکتروفتومتری استفاده گردید. به‌منظور سنجش میزان کاروتنوئیدهای اختصاصی از دستگاه Performance HPLC (High) Liquid Chromatograohy در روش طراحی شده برای اندازه‌گیری کاروتنوئیدها در ماهی استفاده گردید (Page and Davies, 2003).

روش اندازه‌گیری شاخص‌های ایمنی

روش مورد استفاده برای اندازه‌گیری ایمونوگلوبولین M روش Immunoturbidimetric می‌باشد. در این روش IgM با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال موجود در محلول‌های تامپون تشکیل کمپلکس داده و باعث کدر شدن محلول می‌شوند. شدت کدورت ایجاد شده با مقدار IgM رابطه مستقیم داشته و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Minineph ساخت(Bindingsite, UK) در طول موج ۳۴۰nm با بلانک (آب مقطر) خوانده می‌شود. اندازه‌گیری لیزوزیم با استفاده از روش کدورت‌سنجی انجام پذیرفت. بدین‌منظور، سوسپانسیونی از باکتری *میکروکوکوس لیزودیکتی کوس*[1] تهیه و به‌میزان ۲۵ میکرولیتر از سرم به آن افزوده شده و سریعاً خوانده شد. پس از یک ساعت، سطوح آن دوباره اندازه‌گیری گردید. کاهش هر یک

[1] - *Micrococcus lysodeikticus*

www.SID.ir

Arshive of SID

هزارم OD (عبور نور) در دقیقه معادل یک واحد فعالیت آنزیم لیزوزیم می‌باشد. بنابراین، بعد از یک ساعت هر عددی که خوانده شود از مقدار اولیه کسر و تقسیم بر ۶۰ شده که معادل مقدار فعالیت آنزیم در دقیقه است (Ellis, 1997). اندازه‌گیری C_3 و C_4 با استفاده از روش نفلومتری[1] صورت می‌پذیرد. در این روش C_3 و C_4 موجود در نمونه سرم (به‌طور جداگانه) با آنتی‌بادی ضد C_3 و C_4 در محلول تشکیل کمپلکس داده و باعث کدر شدن محلول می‌گردد. در نفلومتر، نور تک رنگ موازی در طول موج‌های بین ۴۰۰ تا ۸۴۰ نانومتر به این محلول تابانده شده که پس از برخورد به کمپلکس، آنتی‌بادی و آنتی‌ژن متفرق شده که به‌میزان تفرق با مقدار C_3 و C_4 نسبت مستقیم دارد.

به‌منظور بررسی توزیع نرمال داده‌ها در گروه‌ها و تکرارها و جهت تشکیل تیمارها از آزمون Kolmogorov-Smirnov استفاده گردید. در صورت نرمال‌بودن داده‌ها به‌منظور مقایسه آماری بین گروه‌ها در تیمارها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (Oneway - anova) و پس از انجام آزمون همگن‌سازی واریانس‌ها (Test of Homogeneity of Variances) جهت مقایسه گروه‌ها با یکدیگر از آزمون دانکن استفاده شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۱ و جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel ۲۰۰۷ استفاده شد.

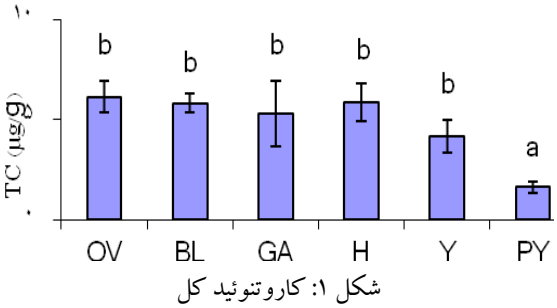
نتایج

نتایج آنالیز باقیمانده کاروتنوئیدها

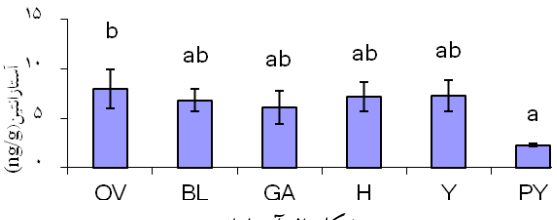
براساس نتایج حاصل از اندازه‌گیری سطوح کاروتنوئید کل، آستازانتین و کانتازانتین در مراحل مختلف رشد جنینی، کمترین میزان آن در مرحله پس از جذب کیسه‌زرده (PY) مشاهده گردید که در مقایسه با سایر مراحل اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P<0/05$) (شکل ۱). حداقل سطوح باقیمانده آستازانتین و کانتازانتین در مرحله پس از جذب کیسه زرده (PY) مشاهده گردید که در مقایسه با مرحله اوولاسیون (قبل از لقاح) کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P<0/05$) (شکل‌های ۲ و ۳). حداقل سطوح باقیمانده بتا – کاروتن در مرحله پس از جذب کیسه‌زرده (PY) مشاهده گردید که در مقایسه با مرحله اوولاسیون (قبل از لقاح) کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P<0/05$) (شکل ۴).

تغییرات میزان کاروتنوئیدها در مراحل مختلف رشد و نمو جنینی در تاسماهی استرلیاد

OV: اوولاسیون، BL: بلاستولا، GA: گاسترولا، H: هچری، Y: جذب کیسه‌زرده، PY: پس از جذب کیسه‌زرده (شکل‌های ۱ تا ۴).



شکل ۱: کاروتنوئید کل

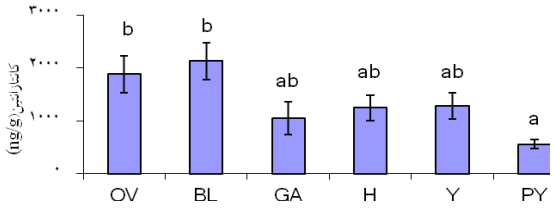


شکل ۲: آستازانتین

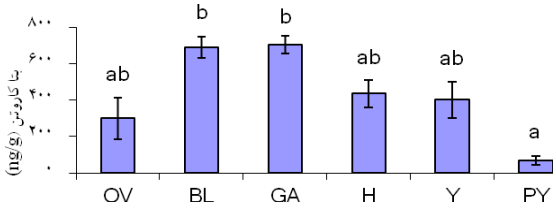
[1]- Nephelometry

www.SID.ir

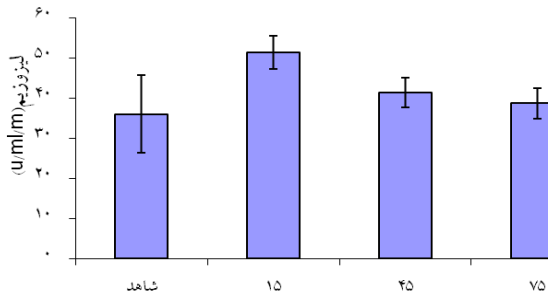
Arshive of SID



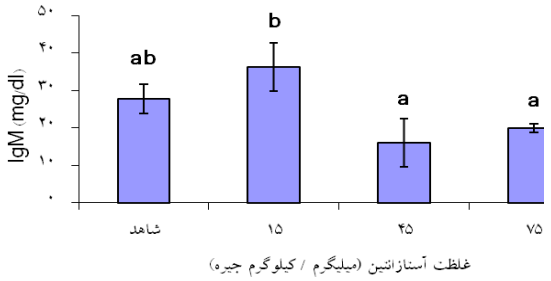
شکل ۳: کانتازانتین



شکل ۴: بتا کاروتن



شکل ۵: تغییرات سطوح لیزوزیم



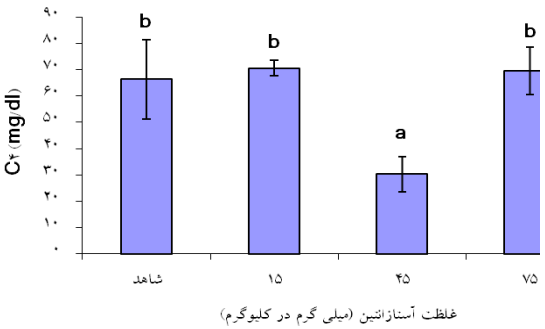
شکل ۶: تغییرات سطوح IgM

نتایج برخی شاخص‌های ایمنی

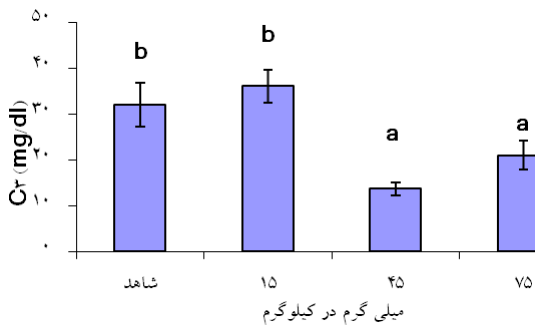
سطوح لیزوزیم در غلظت‌های مختلف آستازانتین اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نشان نداد (P>۰/۰۵) (شکل ۵). سطوح ایمنوگلوبولین M (IgM) در غلظت‌های ۴۵ و ۷۵ میلی‌گرم آستازانتین در کیلوگرم جیره به‌طور معنی‌داری کمتر از تیمار با غلظت ۱۵ میلی‌گرم در لیتر بود (P<۰/۰۵). ولی با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداد (P>۰/۰۵) (شکل ۶). سطوح C_4 در غلظت ۴۵ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره به‌طور معنی‌داری کمتراز سایر غلظت‌ها و تیمار شاهد بود (P<۰/۰۵) (شکل ۷). سطوح C_3 در غلظت‌های ۴۵ و ۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره به‌طور معنی‌داری کمتر از سایر غلظت‌ها و تیمار شاهد بود (P<۰/۰۵) (شکل ۸).

تغییرات سطوح شاخص‌های ایمنی در غلظت‌های مختلف آستازانتین (شکل‌های۵ تا ۸)

حروف نامشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است.



شکل ۷: تغییرات سطوح C_4



شکل ۸: تغییرات سطوح C_3

www.SID.ir

Arshive of SID

نتایج شاخص‌های تولیدمثلی

نتایج نشان داد که شاخص‌های مقدار تخمک، تعداد تخمک (هم‌آوری کاری)، هم‌آوری مطلق و هم‌آوری نسبی در تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر غلظت‌های مختلف آستازانتین در ماهی استرلیاد بود ($P<۰/۰۵$) (جدول ۳).

جدول ۳: نتایج شاخص‌های تولیدمثلی در ماهیان استرلیاد تغذیه شده با غلظت‌های مختلف آستازانتین

شاخص‌ها	غلظت آستازانتین (mg/kg)			
	۰ (شاهد)	۱۵	۴۵	۷۵
مقدار تخمک (گرم)	۱۳۷a	۶۸^{c}	۹۵^{b}	۹۳^{b}
تعداد تخمک (هم‌آوری کاری)	۱۳۸۲۹^{a}	۷۵۴۰^{c}	۷۰۶۶^{c}	۹۳۴۵^{b}
هم‌آوری مطلق	۱۷۹۷۸^{a}	۹۸۰۱^{c}	۱۲۴۳۶^{b}	۱۲۹۶۵^{b}
هم‌آوری نسبی	۱۷۸۷۱^{a}	۹۱۳۶^{c}	۱۰۵۵۵^{c}	۱۴۱۹۸^{b}
تعداد لارو استحصالی (قطعه)	۳۴۵۸^{a}	۱۸۸۵^{c}	۱۷۶۶^{c}	۲۳۳۶^{b}

حروف نامشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

بحث

آستازانتین به‌منظور پاسخ‌های ایمنی ماهی و میگو جهت حداکثر بقاء و رشد استفاده می‌شود. کاروتنوئیدها نقش‌هایی در فیریولوژی و سلامتی ماهی بازی می‌کنند. کاروتنوئیدها مواد مغذی اساسی هستند که باید در تمام جیره‌های غذایی آبزیان در حداقل سطح ۱۰ – ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم غذای خشک اضافه شوند. یک مطالعه اخیراً در نروژ نشان داد که فرای (fry) ماهی اقیانوس اطلس یک رشد قطعی و بازماندگی آشکاری را با استفاده آستازانتین نشان داد (Christiansen *et al.*, 1992).

در تحقیق حاضر سطوح کاروتنوئیدها در مراحل مختلف رشد جنینی در تاسماهی استرلیاد به‌طور معنی‌داری تغییر کرد ($P<۰/۰۵$). وجود کاروتنوئیدها در گناد آبزیان دریایی، آب شیرین و پرورشی مختلف گزارش شده است و ترکیب کاروتنوئیدها در این آبزیان از گونه‌ای به گونه دیگر متفاوت می‌باشد. در این میان درصد وجود رنگدانه آستازانتین که عمده‌ترین کاروتنوئید یافت شده در محیط‌های آبی می‌باشد بین صفر تا ۹۵٪ کاروتنوئید کل گزارش شده است. در گناد برخی از این آبزیان کاروتنوئیدها به فرم آزاد و در برخی دیگر به فرم استری قرار دارند (Grung *et al.*, 1993). طی رشد عضله ماهی آستازانتین هضم شده در روده ناشی از غذای مصرفی چه در طبیعت و چه در محیط پرورشی در عضله آزادماهیان تجمع می‌یابد و طی رشد و نمو تخمدانی کاروتنوئیدهای ذخیره شده در عضله و کبد به سمت گنادها انتقال داده می‌شوند و در تخمک‌ها انباشته می‌شوند (Jitariu *et al.*, 1975). به‌همین دلیل محتوای کاروتنوئید تخمک و رنگ ناشی از آن بستگی تام به مقدار کاروتنوئید کل انباشته شده

www.SID.ir

Arshive of SID

دارد که ناشی از جیره‌ی غذایی بوده و طی زرده‌گیری مصرف شده است. در زرده‌گیری، تخمدان‌ها برخلاف رشد عضله، سریعاً رشد می‌کنند و انتقال کاروتنوئیدها به گنادها از عضله ممکن است در ارتباط با پیوندهای شیمیایی با زرده یا لیپوپروتئین‌های HDL و VHDL باشد (Kitahara *et al*., 1984). در آزادماهیان یک تنوع بزرگ در محتوای کاروتنوئید عضله و تخم هم در بین گونه و هم در درون گونه وجود دارد (Christiansen *et al*., 1994). پس از سپری‌شدن دوره انکوباسیون و تبدیل‌شدن تخم به لاروهای در مرحله تغذیه فعال، مقدار قابل ملاحظه‌ای از محتوای آستازانتین موجود در تخم طی مرحله‌ی رشد و نمو جنینی کاهش می‌یابد و مقدار باقیمانده در مقایسه با محتوای آستازانتین تخمک ناچیز می‌باشد. غلظت بالای آستازانتین و پایین بتاکاروتن در تخم‌های آزادماهیان (Christiansen *et al*., 1994) بیان می‌کند که آستازانتین می‌تواند بسیار مهم تر از بتاکاروتن در تبدیل به ویتامین A باشد و کاهش در مقدار غلظت آستازانتین می‌تواند نشان‌دهنده این باشد که آستازانتین به‌عنوان پیش‌ساز ویتامین A طی رشد و نمو جنینی مورد نیاز بوده و از نظر متابولیک فعال می‌باشد (Schiedt, 1998). در خصوص کاهش محتوای آستازانتینی از مرحله تخمک به مرحله لاروی نتایج متفاوتی بدست آمده است. به‌طوری‌که، در برخی از این مطالعات تفاوت معناداری از لحاظ کاهش غلظت کاروتنوئیدها طی رشد و نمو جنینی قزل‌آلای رنگین‌کمان مشاهده نشد (Miki *et al.*, 1982). کاهشی در محتوای آستازانتین تخم ماهی Lumpfish مشاهده گردید (Steven, 1948). همین‌طور Craik and Harvey (۱۹۸۴)، کاهش ناچیزی در حدود ۴-۲ میلی‌گرم در کیلوگرم تخم ماهی طی رشد و نمو جنینی دیدند که نشان‌دهنده عملکرد متابولیکی کاروتنوئیدها طی این دوره بود. تنها Jitariu و همکاران (۱۹۷۵)، یک افزایش غیرقابل توجیه در محتوای آستازانتین تخم طی رشد و نمو جنینی مشاهده کردند (Steven, 1949). این مقدار پایین محتوای کاروتنوئید تخم (۰/۲۶ ppm) احتمالاً ناشی از عدم اطمینان از اندازه‌گیری آنها ناشی می‌شود.

تنها Jitariu و همکاران (۱۹۷۵)، یک افزایش غیرقابل توجیه در محتوای آستازانتین تخم طی رشد و نحو جنینی مشاهده کردند (Steven, 1949) که به‌دلایل مقدار پایین محتوای کاروتنوئید تخم (۲۶ppm) احتمالاً عدم اطمینان از اندازه‌گیری آن‌ها ناشی می‌شود. به‌نظر می‌رسد که نقش عمده‌ی کاروتنوئیدهای تخم برای تولید و توسعه کروماتوفورهای پوست بدن لارو باشد (Torrissen *et al*., 1984). بنابراین، آستازانتین و دیگر کاروتنوئیدها می‌توانند اهمیت حیاتی در حفاظت از بچه‌ماهیان وحشی از رودخانه و در استخرهای پرورشی در برابر تشعشع نور خورشید داشته باشند (Torrissen, 1990).

کاروتنوئیدها یک منبع رنگدانه‌سازی در جنین هستند. نشان داده شده که غنی‌سازی جیره غذایی با آستازانتین افزایش کیفیت تخم را در ماهی دریایی سیم قرمز دریائی (*Sparus aurata*) و تن دم‌زرد (*Seriola quinqueradiata*) باعث می‌شود (Verakunpiriya *et al.*, 1997). نشان داده شده که جیره غنی شده با کاروتنوئید آستازانتین باعث ارتباط مثبت بین رنگدانه‌بندی تخم و ارتقاء درصد لقاح و درصد بقای تخم قزل‌آلای رنگین‌کمان (Harris and Bird, 2000) و بهبود کیفیت تخم در ماهی کاراس (*Carrasius auratus*) (Tizkar *et al.*, 2013و تیزکار و همکاران،

www.SID.ir

Arshive of SID

۱۳۸۷) شده است. در گونه ماهی کاد (*Cadus morhua*) ماهیان مولدی که با غذای غنی‌شده با آستازانتین تغذیه شده بودند، تخمک کمتری تولید کردند که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت. این یافته‌ها تأیید می‌کنند که اضافه‌کردن آستازانتین به جیره غذائی ماهیان مولد ماده کاد و ذخیره آن در تخم‌ها باعث ارتقاء کیفیت تخم می‌شود.

در تحقیق حاضر، سطوح شاخص‌های ایمنی در برخی غلظت‌های آستازانتین به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P<0/05$). Amar و همکاران (۲۰۰۴)، بهبود سیستم ایمنی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) را مشاهده کردند. مقدار آستازانتین در این مطالعه ۲۰۰ mg/kg و مقدار بتا-کاروتن ۱۰۰ mg/kg بود.

در مطالعه Amar و همکاران (۲۰۰۴)، فعالیت لیزوزیم سرم با استفاده از جلبک *D.salina* افزایش پیدا کرد. بتا- کاروتن در ساخت ویتامین A دخیل بوده و کاهش‌دهندهٔ اکسیژن آزاد است و این خصلت می‌تواند بر سیستم ایمنی هم از طریق مسیرهای آنتی‌اکسیدآنی و هم مسیرهای رتینوئیک تاثیر بگذارد. *D. salina* دارای مقادیر زیاد ایزومر هندسی ۹ــ سیس بتا - کاروتن می‌باشد که نشان داده شده که نسبت به ایزومر ترانس بتا - کاروتن در بهبود بخشیدن ارتباط بین دو سلول از طریق نقطه اتصال (Gap Junction) مؤثرتر هستند (Zhang *et al.*, 1991). لیزوزیم به‌وسیله لکوسیت‌ها ترشح می‌شوند و نشانگر فعالیت لکوسیت‌ها می‌باشد که همزمان با فعالیت فاگوسیتوزی افزایش می‌یابد (Poulsen *et al.*, 2001). همچنین فعالیت لیزوزیم همراه با شاخص‌های فاگوسیتوزی در ماهی تغذیه شده با بتا- کاروتن و آستازآنتین افزایش می‌یابد (Amar *et al.*, 2004). پس افزایش فعالیت لیزوزیم به‌وسیله بتا- کاروتن به عنوان یک محرک ایمنی می‌تواند در نظر گرفته شود (Sakai, 1999) و دارای توانایی شکستن رادیکال‌های آزاد می‌باشد (Nakano *et al.*, 1995).

آستازانتین دارای عملکردهای بیولوژیکی اساسی شامل حفاظت در مقابل اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع (PUFA) و حفاظت در مقابل اثرات اشعه UV می‌باشد (Guerin *et al.*, 2003). براساس نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نرخ رشد و بقای ماهیان با تیمارهای آزمایشی تحت تأثیر قرار نگرفت که این نتایج با نتایج مطالعات قبلی مطابقت دارد (Kalinowski *et al.*, 2005).

اختلاف معنی‌داری بین محتوای آستازانتین پوست بعد از ۴ ماه تغذیه با جیره‌های حاوی آستازانتین با منابع طبیعی با دوزهای ۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم و ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وجود نداشت. این بیان می‌دارد که زانتوفیل‌های پوست که حاوی قطره در کاروتنوئید هستند که با کمترین سطح جیره رنگدانه اشباع می‌شوند. Booth و همکاران (۲۰۰۴)، نتیجه مشابه‌ای را در مورد Red Snapper تغذیه شده با جیره‌های حاوی ۳۶ میلی‌گرم یا ۷۲ میلی‌گرم آستازانتین غیراستریفه به مدت ۶ هفته، به‌دست آوردند. کاروتنوئیدها در محیط آزمایشگاهی، آنتی‌اکسیدان‌های قوی هستند و با ویتامین E به‌صورت سینرژیک عمل می‌کنند (Bell *et al.*, 2000). ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی آستازانتین ممکن است استرس اکسیداتیوی را کم کرده و اثرات بیولوژیکی سودمندی داشته باشد و با سلامتی ماهی مرتبط باشند Higuera (Hossein و همکاران، ۲۰۰۶). از طرف دیگر ماهیان دارای کاروتنوئید خاص گونه‌ای هستند.

www.SID.ir

Arshive of SID

براساس نتایج حاصل، افزودن رنگدانه آستازانتین در سطح ۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره غذایی مولدین تاسماهی استرلیاد بهبود کیفیت تخمک و تقویت سیستم ایمنی گردید. بنابراین، افزودن رنگدانه آستازانتین به جیره غذایی پیش‌مولدین و مولدین تاسماهی استرلیاد قابل توصیه است.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم از زحمات کلیه کسانی که مارا در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

منابع

۱. بازیار، ا.م.، احمدی، م.ر.، مجازی امیری، ب.، ۱۳۸۴. بررسی تأثیر استازانتین جیره غذایی بر ذخیره آستازانتین تخمک و قابلیت لقاح در مولدین قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله منابع طبیعی ایران. جلد ۵۸ (۱)، ۱۲۳ – ۱۱۳.

۲. بهمنی، م.، یوسفی جوردهی، ا.، پوردهقانی، م.، کاظمی، ر.، یزدانی، م.ع.، حلاجیان، ع.، دژندیان، س.، ۱۳۹۱. گزارش نهایی پروژه بررسی امکان تکثیر مصنوعی شیپ و تاسماهی ایرانی پرورشی. انتشارات مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، ۱۱۴ صفحه.

۳. تیزکار، ب.، سوداگر، م.، بهمنی، م.، حسینی، ع.، چمنی، م.، ۱۳۸۷. تأثیر جیره‌های تکمیلی حاوی آستازانتین و بتاکاروتن بر شاخص‌های تولیدمثلی ماهی طلایی (*Carassius auratus*) و استرس ناشی از تراکم در مرحله انکوباسیون. فصلنامه محیط زیست جانوری، ۴ (۴).

4. Amar, E.C., Kiron, V., Satoh, S., Watanabe, T., 2004. Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. Fish and Shellfish Immunology, 16 (4), 527-537.
5. Bell, J.G., McEvoy, J., Tocher, D.R., Sargent, J.R., 2000. Depletion of á-tocopherol and astaxanthin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects autoxidative defense and fatty acid metabolism. Journal of Nutrition, 130, 1800-1808.
6. Bjerkeng, B., Folling, 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.
7. Bjerkeng, B., Berge, G.M., 2000. Apparent digestibility coefficients and accumulation of astaxanthin E/Z isomers in Atlantic salmon (Salmo salar L.) & and Atlantic halibut (*Hypoglossus hypoglossus*). Comparative Biochemistry and Physiology, 127B, 423-432.
8. Booth M.A., Warner - Smith, R.J., Allan, G.L. Glencross, B.D., 2004. Effects of dietary astaxanthin sources and light manipulation on the skin colour of Australian snapper *Pagrus auratus* (Bloch & Scheider, 1801). Aquaculture Research, 35, 458 - 464.
9. Christiansen, R., Waagbb, R., Torrissen, O.J., 1992. Effects of polyunsaturated fatty acids and vitamin E on flesh pigmentation in Atlantic salmon (*Salmo salar*). In: Kaushik, S.J., Luquet, P. (Eds.), Fish Nutrition in Practice. INRA Editions, Versailles, 339–343.
10. Christiansen, R., Lie, O., Torrissen, O. J., 1994. Effect of astaxanthin and vitamin A on Growth and survival during first feeding of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Aquaculture Research, 25(9), 903-914.
11. Christiansen, R., Lie, O., Torrissen, O.J., 1995. Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar* L), fed different dietary levels of astaxanthin. First-feeding fry. Aquaculture Nutrition, 1, 189–198
12. Christiansen, R., Torrissen, O.J., 1997. Effects of dietary astaxanthin supplementation on fertilization and egg survival in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture, 153, 51–62.
13. Craik, J.C.A., Harvey, S.M., 1984. Egg quality in rainbow trout: the relation between egg viability, selected aspects of egg composition, and time of stripping. Aquaculture, 40, 115-134.
14. Davies, B.H., 1985. Carotenoid metabolism in animals: a biochemist's view. Pure and Applied Chemistry, 57, 679–684.
15. Ellis, A.E., 1977. The leucocytes of fish: A review. Journal of Fish boilogy, 11, 453-491.

www.SID.ir

Arshive of SID

broodstock (*Gadus morhua*). Institute of Aquaculture, University of Stirlin, Scotland, UK. 24 P.
28. Schiedt, K., 1998. Absorbtion and metabolism of Carotenoids in birds, fish and crustaceans. In: Britton G., liaaen-Jensen S., Pfander H., (Eds.) carotenoids. Biosynthesis and Metabolism, Birkauser, Base., Switzerland, 3, 285-358.
29. Steven, D.M., 1948. Studies on Animal Carotenoids. 1. Carotenoids of the Brown Ttout. Journal of Experimental Biology, 25, 369-387.
30. Sakai, M., Kobayashi, M., Kawauchi, H., 1996. In vitro activation of fish phagocytic cells by GH, prolactin and somatolactin. Journal of Endocrinology, l151, 113-118.
31. Steven, D.M., 1949. Studies on Animal Carotenoids. 2. Carotenoids in the reproductive cycle of the brown Trout. Journal of Experimental Biology, 26, 295-303.
32. Tizkar, B., Soudagar1, M., Bahmani2, M., Hosseini1, S.A., Chamani, M., 2013. The Effects of Dietary Supplementation of Astaxanthin and B-caroten on the Reproductive Performance and Egg Quality of Female Goldfish (*Carassius auratus*). Caspian Journal of Environmental Sciences, 2013, 11(2), 217-231.
33. Torrissen, O.J., 1990. Biologycal activites of carotenoids in fishes. In: Takeda. M., Watanabe. T. (Eds.). Thecurrent Status of Fish Nutrition in Aquaculture.Japon Center, Tokyo.Japan, 387-399.
34. Torrissen, O.J., 1984. Pigmentation of salmonids-effect of carotenoids in eggs and start-feeding diet on survival and growth rate. Aquaculture, 43, 185–193.
35. Torrissen, O.J., Hardy, R.W., Shearer, K.D., 1989. Pigmentation of salmonids- carotenoid deposition and metabolism. In: Stickney, R.R., Kennish, M.J., Anderson, R.S. (Eds.), Reviews in Aquatic Science, 1, 209–225.
36. Zhang, L.X., Cooney, R.V., Vertram, J.S., 1991. Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: Relationship to their cancer chemopreventive action. Carcinogenesis, 12, 2109-2114.
37. Verakunpiriya, V., Watanabe, T., Mushiake, K., Kiron, K., Satoh, S., Takeuchi, T., 1996. Effect of broodstock diets on the chemical components of milt and eggs produced by yellowtail. Fisheries Science, 62:610–619.
16. Grung, M., Svendsen, Y.S., Liaaen-Jensen, S., 1993. The carotenoids of eggs of wild and farmed cod (*Gadus morhua*). Comparative Biochemistry and Physiology, 106B, 237-242.
17. Guerin, M., Huntley, M.E., Olaizola, M., 2003. Hematococuus astaxzanthin. Applications for human health and nutrition. Trends Biotechnology, 21(5), 210-6.
18. Harris, J., Bird, D.J., 2000. Supernatants from leucocytes treated with melanin-concentrating hormone (MCH) and a-melanocyte. Veterinary Immunology and Immunopathology 76(1-2):117-24.
19. Jensen, A.M., Waiwood, R., Peterson, H., 1993. Water balance in eggs of striped bass (*Morone saxatilis*. Journal of Fish biology, 43(3), 345-353.
20. Jitariu, M., Chera, E., Duca, E., Linck, G., Rotimberg, P., Szilagyi, I., 1975. Lipidocarotenoid metabolism in. Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) during embryogenesis; Rev. Roum. Biol., Ser. Biol. Anim, 20, 269-274.
21. Kalinowski, C.T., L.E. Robaina, H. Fernandez-Palacios, D. Schuchardt, and M. S. Izquierdo., 2005. Effect of different carotenoid sources and their dietary levels on red porgy (*Pagrus pagrus*) growth and skin colour. Aquaculture, 244:223.
22. Kitahara, T., 1984. Behavior of carotenoids in the Chum (*Oncorhynchus keta*) during development; Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish, 50(3), 531-536.
23. Miki, W., Yamaguchi, K.K., Konosu, S., 1982. Comparision of carotenoids the ovaries of marine fish and shellfish; Comparative Biochemistry and Physiology, 77B, 7-11.
24. Nakano, T., Tosa, M., Takeuchi, M., 1995. Improvement of biochemical features in fish health by red yeast and synthetic astaxanthin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 1570–1573.
25. Page, G.I. and Davies, S.J., 2003. Hepatic carotenoid uptake in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) using an isolated organ perfusion model. Aquaculture, 225, 405 – 419.
26. Poulsen, L. K., T. K. Hansen, *et al.*, 2001. "Allergens from fish and egg." Allergy, 56 (Suppl. 67),: 39-42.
27. Sawanboonchun, J., William, J., Roy, Derek, A., Robertson, J., Gordon, B., 2008. The impact of dietary supplementation with Astaxanthin on egg quality in Atlantic cod

www.SID.ir