Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:22 +0430 on Sunday May 5th 2019

دانشگاه گنبد کاووس
نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"
دوره هفتم، شماره اول، بهار ۹۸
http://jair.gonbad.ac.ir

# تأثیر سطوح مختلف سلنیوم آلی جیره بر شاخص‌های کیفی گناد، تولید مثل و شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی ماهی کاراس طلایی *Carassius gibelio* (Bloch, 1782)

علی خاکشور[۱]، محمدرضا کلباسی*[۲]، عبدالحسین شاهوردی[۳]
[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد شیلات، گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران
[۲]استاد گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران
[۳] دانشیار پژوهشگاه رویان، گروه سلول‌های بنیادی و زیست شناسی تکوینی، تهران، ایران

تاریخ ارسال: ۹۴/۱۰/۱۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱/۱۸

**چکیده**

**سلنیوم ماده غذایی‌کمیاب و ضروری برای انسان‌ها و حیوانات است که از عملکرد طبیعی ایمنی، تولید مثل و سیستم عصبی حمایت و از بیماری‌های متعدد جلوگیری می‌نماید. این ماده کوفاکتور آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز است که از طریق کاهش رادیکال‌های آزاد شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی شامل ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (TAC) و مالون دی آلدئید (MDA) سرم خون مولدین ماهی کاراس طلایی (*C. gibelio*) و همچنین تأثیر آن بر کیفیت توسعه گنادی و شاخص‌های تولید مثل شامل رشد و بازماندگی لاروی مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور تعداد ۷۰ قطعه ماهی‌کاراس طلایی بالغ به مدت ۸ هفته با سطوح صفر و ۰/۵ میلی‌گرم سلنیوم آلی (Sel-plex) درکیلوگرم غذا (افزوده شده به جیره تجاری بیومار) مورد تغذیه قرار گرفتند. سپس با تزریق هورمون HCG بصورت مصنوعی تکثیر شدند. نتایج تحقیق در تیمار سلنیوم موید آن است که میزان TAC در سرم خون مولدین افزایش یافته و میزان MDA نیز کاهش معنی‌داری داشته است. همچنین مطالعات بافت‌شناسی نشان داد که در بافت بیضه مولدین تحت تیمار سلنیوم، مقادیر اسپرماتوزوآ بالغ به‌صورت معنی‌داری بیشتری از گروه شاهد بوده و در بافت تخمدان مولدین، رسیدگی جنسی در گروه شاهد در مرحله ۲ و در گروه تحت تیمار در مرحله ۵ بوده است. به‌علاوه مقادیر لقاح ۹۱/۱۷٪، بدشکلی ۸/۴۵٪ و بازماندگی۸۷٪ در تیمار سلنیوم (هر دو جنس تغذیه‌شده با سلنیوم) نسبت به گروه شاهد بهبود معنی‌داری را نشان داده است. بنابراین جیره حاوی ۰/۵ mg/kg سلنیوم آلی در مولدین ماهی کاراس طلایی موجب بهبود کیفیت توسعه گنادی و شاخص‌های تولید مثل مانند افزایش درصد لقاح و بازماندگی و کاهش بدشکلی لاروی در ماهی کاراس طلایی گردیده است.**

***واژه‌های کلیدی:*** *C. gibelio*، **سلنیوم آلی، هرمون HCG، شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی، شاخص‌های تولید مثل**

*نویسنده مسئول: kalbassi_m@modares.ac.ir



www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:22 +0430 on Sunday May 5th 2019

**مقدمه**

عناصر کم‌مصرف همانند مس، روی، منگنز، کبالت، آهن و سلنیوم نقش حیاتی در سیستم ایمنی، تولید مثل و متابولیسم طبیعی در رشد و تولید دارند. این عناصر در ساختار آنزیم‌های کلیدی سیستم ایمنی و تولید مثلی نقش کوفاکتوری و در متابولیسم انرژی و سنتز هورمون‌ها نقش دارند (Patching and Gardiner, 1999). سلنیوم نیز یکی از عناصر شیمیایی غیر فلزی و کمیاب است که بیشتر به صورت ترکیب یافت می‌شود. مصرف مقدار زیاد آن سمی بوده ولی در مقادیر کم برای فعالیت سلول‌ها لازم است. بیشتر سلنیوم مورد نیاز بدن از مواد غذایی تأمین می‌شود. مکمل سلنیوم به دو شکل معدنی و آلی وجود دارد. سلنیت سدیم متداول‌ترین شکل معدنی آن است که در تغذیه دام و طیور مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به اینکه مکمل آلی سلنیوم قابلیت جذب بیشتری دارد، اخیراً تمایل زیادی برای استفاده از آن در تغذیه دام و طیور به‌وجود آمده است (Heindl *et al*., 2010; Edenns *et al*., 2000). این ماده یک آنتی‌اکسیدان قوی است. بنابراین از واکنش‌های شیمیایی زیان‌آور که در یاخته‌های بدن اتفاق می‌افتد، جلوگیری می‌کند. آنتی‌اکسیدان‌ها دو نوع می‌باشند. آنتی‌اکسیدان‌های پیش‌گیریکننده که شامل پروتئین‌هایی مثل آلبومین، سرولوپلاسمین و ... که متصل به فلزات هستند و جلوی تشکیل شدن گونه‌های اکسیژن فعال یا ROSها را می‌گیرند. به‌این‌ترتیب از شروع واکنش زنجیر-ه‌ای جلوگیری می‌کنند. درحالی‌که آنتی‌اکسیدان‌های جاروب‌کننده مثل ویتامین E، ویتامین C، آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز و سلنیوم ROSهای به‌وجود آمده را حذف می‌کنند تا از غشا پلاسمایی در برابر پراکسیداسیون لیپید حمایت کنند. همچنین در تقسیم‌بندی دیگر سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی به دو گروه آنزیمی و غیرآنزیمی تقسیم می‌شوند.

سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی مهم‌ترین عوامل آنتی‌اکسیدانی در درون سلول‌ها، آنزیم‌هایی همچون سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) و کاتالاز (CAT) را شامل می‌گردد. اما مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌هایی که در زمره سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی طبقه‌بندی می‌شوند ویتامین E (α توکوفرول) کارتنوئیدها، اسید آسکوربیک، اسید اوریک و بیلی‌روبین قابل ذکر است (Agarwal *et al*., 2005). اندازه‌گیری تمامی این آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی بنام ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (TAC) شناخته می‌شود و در مطالعات مختلف جهت نشان دادن میزان آنتی‌اکسیدان کل (قدرت مبارزه با رادیکال‌های آزاد) این شاخص گزارش می‌شود (Mahfouz *et al*., 2009). بارزترین اثر رادیکال‌های آزاد، پراکسیداسیون لیپیدی و کلاً فرآیندهای اکسیداتیوی در سلول‌ها، ایجاد اختلال در نظم و کار غشای سلول‌ها است به‌طوری‌که روند انتقال یون‌ها دستخوش تغییر می‌گردد و مختل می‌شود.



www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:22 +0430 on Sunday May 5th 2019

از محصولات فرآیندهای اکسیداتیوی می‌توان به تولید مالون‌دی‌آلدئید (MDA) اشاره کرد که میزان آن ارتباط مستقیمی با صدمات وارده به سلول‌ها توسط رادیکال‌های آزاد یا ROSها دارد. مالون دی آلدئید (MDA) در اثر پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه تولید می‌شود و به‌عنوان معیاری از پراکسیداسیون چربی‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. هرچه میزان TAC بیشتر باشد میزان MDA به‌دلیل خنثی‌سازی فعالیت‌های اکسیداتیوی کاهش پیدا خواهد کرد. مطالعات نشان می‌دهد که افزایش سطح اکسیداتیوی مایع سمینال از طریق مکانیسم‌های مختلف از جمله پراکسیداسیون لیپیدی غشای اسپرم، اختلال در متابولیسم اسپرماتوزوئید و کاهش توانایی بارورسازی آن سهم عمده‌ای در نقص عملکرد اسپرم موش دارد (Boitani and Puglisi, 2008). یکی از روش‌های ارزیابی اثر سلنیوم، بررسی وضعیت تکامل اسپرم و تخمک در بیضه و تخمدان به روش بافت‌شناسی می‌باشد که در مورد اثر سلنیوم بر کیفیت و تکامل اسپرماتوزوآ تحقیقات مناسبی در خصوص گونه‌های جانوری و انسان انجام شده است. اما در مورد تخمک و تخمدان در رابطه با اثر سلنیوم بررسی‌های محدودی گزارش شده است. در این ارتباط تاکنون گزارشی از تأثیر سلنیوم در بهبود شاخص‌های کیفی اسپرم ماهیان ملاحظه نگردید. لذا در این تحقیق با استفاده از ماهی کاراس طلایی (*Carassius gibelio auratus*) که در مطالعات تولید مثلی و کنترل هورمونی به‌دلیل تکثیر و پرورش راحت در شرایط اسارت به‌عنوان یک مدل استفاده می‌شود تأثیرات سلنیوم مورد ارزیابی قرار گرفت (Bjerselius *et al*., 1995).

با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانی سلنیوم و بهبود کیفیت گامت مولدین و همچنین نیاز ماهی به ۰/۱ تا ۰/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیوم (Lemly, 1998)، هدف از انجام مطالعه حاضر ارزیابی تأثیر دو سطح متفاوت سلنیوم آلی جیره (۰/۵ و صفر میلی‌گرم بر کیلوگرم غذا) بر شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی سرم خون، رشد و توسعه گنادی مولدین و در نهایت برخی از شاخص‌های تولید مثل شامل درصد لقاح، بدشکلی و بازماندگی لاروی ماهی کاراس طلایی می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

تعداد ۷۰ عدد ماهی مولد کاراس طلایی با میانگین وزنی ۰/۶۱±۶۷/۵ گرم و طول کل ۰/۲۳±۱۷ سانتی‌متر از یک مرکز پرورش ماهیان گرمابی در بندرگز واقع در استان گلستان تهیه و به سالن تحقیقاتی آبزیان دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شد. بعد از سپری کردن دوره سازگاری ۱۰ روزه مولدین به تانک‌های ۳۰۰ لیتری (۶ عدد نر و ۵ عدد ماده) برای هر تکرار مورد استفاده قرار گرفت. شرایط فیزیکی و شیمیایی آب در طول دوره نگه‌داری و سازگاری در جدول ۱ بیان‌شده است.



www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:22 +0430 on Sunday May 5th 2019

**جدول ۱- شرایط فیزیکی و شیمیایی آب پرورش مولدین ماهی کاراس طلایی (*C. gibelio*)**

| اسیدیته | دما (سانتی‌گراد) | شوری ppt | هوادهی | تعویض آب | تغذیه | دوره نوری (ساعت) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ۷/۵-۸/۵ | ۱۹/۹۰±۰/۱۷ | ۰/۴ | دائمی | روزی یک‌بار به میزان ۲۵٪ | روزی دوبار به میزان ۳٪ وزن بدن با جیره پلت | ۱۴روشنایی ۱۰ تاریکی |

ماهیان به‌مدت ۸ هفته با جیره تجاری بیومار فرانسه (بدون افزودن سلنیوم آلی) و جیره حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیوم آلی (سلنیوم مخمر Sel-Plex، شرکت وتاک) مورد تغذیه قرار گرفتند. غذای تجاری بعد از آسیاب شدن با مقادیر مورد نظر سلنیوم آلی مخلوط گردید و به اندازه ۲۰٪ وزنشان آب به آن‌ها افزوده شد. سپس به‌وسیله چرخ گوشت مجدداً به‌صورت پلت (۳mm-۵) درآمد. پلت‌ها در خشک‌کن به‌مدت ۱۲ ساعت خشک و تا زمان مصرف در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Abedian Kenari *et al*., 2011). ماهیان ابتدا در اول دوره زیست‌سنجی شدند و در انتهای دوره نیز شاخص‌های رشد شامل افزایش وزن بدن (WG)، ضریب رشد ویژه (SGR) و ضریب تبدیل غذایی (FCR) با استفاده از روابط زیر محاسبه گردید (Ricker, 1979).

$WG= W_2-W_1$ $W_2$ وزن ثانویه، $W_1$ وزن اولیه (گرم)

$SGR= [(\ln w_2-\ln w_1)] \div T \times 100$ T تعداد روزهای پرورش

$FCR= F / W_2 - W_1$ F میزان غذای مصرف‌شده (گرم)

به‌منظور رسیدگی همزمان مولدین، هورمون گنادوتروپین کوریون انسانی HCG به مولدین نر (۵-۱۰ IU/grb) و مولدین ماده (۱۵-۲۰ IU/grb) به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. ۱۲ تا ۱۶ ساعت پس از تزریق در دمای ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد ماهیان جهت اسپرم و تخم‌کشی آماده شدند.

پس از رسیدگی جنسی مولدین، آن‌ها را با استفاده از عصاره پودر گل میخک با غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم برلیتر بیهوش نموده و عملیات اخذ گامت و نهایتاً لقاح مولدین انجام پذیرفت. در این خصوص ابتدا اسپرم از سه مولد نر اخذ و در رقیق‌کننده با فرمول زیر به نسبت ۱:۶رقیق شد (Kusuda *et al*., 2004): NaCl 5.61g/L, KCl 5.23 g/L, $CaCl_2$-$2H_2O$ 0.33 g/L, $MgCl_2$-$6H_2O$ 0.22 g/L, $NaHCO_3$ 0.2 g/L, pH8.0) یک لوله مویین اسپرم از هر مولد در ۰/۵ cc رقیق‌کننده و با تخمک سه مولد ماده (۱ گرم از هر مولد ماده) مخلوط و لقاح داده شد. بعد از آن به‌وسیله محلول لقاح اولیه (۰/۲درصد اوره و ۲/۵ درصد نمک) به‌مدت ۳-۵ دقیقه با پر به آرامی هم‌زده شد. سپس تا رفع چسبندگی کامل تخم‌ها از محلول فوق با غلظت دو برابر استفاده شد. بعد از رفع چسبندگی، تخم‌ها در ۱۱عدد آکواریوم ۱۰ لیتری که ارتفاع آب ۱۰ سانتی‌متر بود انتقال داده شدند.



www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:22 +0430 on Sunday May 5th 2019

پس از گذشت دو روز از لقاح تخم‌های قارچ‌زده و مرده جمع‌آوری و شمارش شد. بعد از گذشت ۴-۵ روز و خروج کامل لاروها از تخم، میزان بدشکلی و بازماندگی اولیه لاروی ثبت شد و پس از جذب کیسه زرده و شنای آزاد لاروها تغذیه آغازی با ناپلی آرتمیا دو بار در روز در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد شروع شد. جهت تغذیه و مدیریت راحت‌تر لاروها تعداد آن‌ها به ۱۰۰ عدد در هر آکواریوم کاهش داده شد. یک ماه پس از تغذیه با آرتمیا میزان بازماندگی نهایی محاسبه گردید.

سرم خون مولدین (۳ مولد از هر تکرار که باهم مخلوط شده بود) پس از سانتریفوژ در دور ۳۰۰۰g به‌مدت ۱۵ دقیقه به‌دست آمد. اندازه‌گیری غلظت مالون دی‌آلدئید سرم خون به روش TBA[1] با استفاده از روش تیوباربیتوریک اسید که توسط رائو و همکاران (Rao *et al*., 1989) ابداع شده بود، اندازه‌گیری شد. براساس این روش ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه به همراه ۹۰۰ میکرولیتر آب مقطر در لوله آزمایشگاه ریخته شد و به هر لوله ۵۰۰ میکرولیتر معرف TBA اضافه گردید. سر لوله‌ها توسط ورقه‌های آلومینیومی کاملاً پوشانده شد و به‌مدت یک ساعت در حمام آب جوش قرار گرفت. پس از خنک شدن در دمای اتاق، لوله‌ها مجدداً در g ۴۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. در نهایت جذب نوری محلول رویی در طول موج ۵۳۴ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. بعد از رسم منحنی استاندارد عدد مورد نظر در رابطه بدست آمده قرار داده شد تا غلظت MDA محاسبه و به‌صورت nmol/mg protein گزارش گردد.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های تام سرم خون مولدین به روش FRAP[2] که اولین بار توسط بنزیه (Benzie, 1996) ابداع گردید با اندکی تغییر اندازه‌گیری شد. بدین منظور ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌ها را به ۳ میلی‌لیتر محلول FRAP (شامل بافر استات، محلول کلرورفریک و محلول تری‌پریدیل تریازین) که دمای آن ۳۷ درجه سانتی‌گراد بود اضافه گردید و جذب نوری آن در مقابل آب مقطر در طول موج ۵۹۳ نانومتر اسپکتروفوتومتر قرائت شد. محلول به‌مدت ۴ دقیقه در حمام آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و مجدداً میزان جذب قرائت گردید. اختلاف دو مقدار جذب را به‌دست آورده و با استفاده از محلول‌های استاندارد مطابق روش اشاره شده منحنی استاندارد رسم شد و با استفاده از آن مقدار ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌های مورد آزمایش مشخص گردید.

ابتدا ماهیان کشته شدند (۳ عدد از هر تیمار) و گناد آن‌ها خارج شد و با استفاده از ماده تثبیت‌کننده بوئن ( حاوی ۷۵٪ اسیدپیکریک اشباع، ۲۰٪ اسید استیک و ۵٪ فرمالین) نمونه‌های بافت تثبیت شدند. پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت محلول بوئن تخلیه و مراحل بعدی عملیات بافت‌شناسی (آب‌گیری، شفاف‌سازی، نفوذ پارافین، قالب‌گیری) و برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون تهیه و با روش

1. Thiobarbituric acid
2. ferric reducing of antioxidants power



www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:22 +0430 on Sunday May 5th 2019

هماتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی انجام شد و با استفاده از میکروسکوپ نوری و عدسی‌های ۱۰ و ۴۰ لام‌های بافت‌شناسی مورد مطالعه و عکس‌برداری قرار گرفت (Heidari *et al*., 2009).

پس از نرمال‌سازی داده‌ها، جهت آنالیز نتایج شاخص‌های تکثیر از آزمون واریانس یک‌طرفه One way ANOVA و جهت آنالیز نتایج شاخص‌های رشد از آزمون T-Test استفاده شد و جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد (P<۰/۰۵) استفاده شد.

## نتایج

نتایج حاصل از تأثیر تغذیه سطوح متفاوت سلنیوم آلی در جیره مولدین ماهی کاراس طلایی به مدت ۸ هفته بر برخی پارامترهای رشد در جدول ۲ ارائه شده است. بر این اساس میزان افزایش رشد (WG) و ضریب تبدیل غذایی (FCR) در مولدین تحت تیمار سلنیوم (جیره حاوی ۰/۵ میلی‌گرم سلنیوم در کیلوگرم غذا) به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد (جیره تجاری) بود (P<۰/۰۵).

**جدول ۲- شاخص‌های رشد (میانگین ± انحراف معیار) مولدین ماهی کاراس طلایی (*C. gibelio*) تغذیه شده با دو سطح مختلف سلنیوم آلی.**

| شاخص تیمار | وزن اولیه (گرم) | وزن نهایی (گرم) | افزایش وزن (گرم) | ضریب تبدیل غذایی | نرخ رشد ویژه (گرم در روز) | بازماندگی (درصد) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| شاهد | ۶۸/۲۵±۰/۶۱ | ۸۲/۶۰±۱/۴۰ | ۱۴/۳۵±۱/۴۸$^{b}$ | ۳/۱۱±۰/۳۶$^{b}$ | ۴/۱۴±۰/۰۹$^{a}$ | ۱۰۰ |
| تیمار سلنیوم ۰/۵mg/kg | ۶۶/۹۲±۱/۰۶ | ۸۵/۸۳±۰/۹۰ | ۱۸/۹۱±۱/۳۴$^{a}$ | ۲/۰۷±۰/۱۶$^{a}$ | ۴/۱۲±۰/۰۱$^{a}$ | ۱۰۰ |

حروف انگلیسی غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد (p<۰/۰۵).

نتایج حاصل از تأثیر تغذیه سطوح متفاوت سلنیوم آلی جیره در بعضی از فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی خون مولدین کاراس طلایی در جدول ۳ ارائه شده است. مطابق این جدول در میزان TAC خون مولدین تفاوت معنی‌داری وجود دارد و میزان آن در جنس نر تیمار سلنیوم به‌طور معنی‌داری از هر دو جنس تیمار شاهد بیشتر می‌باشد. میزان MDA نیز در جنس نر تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر از مولدین تحت تیمار سلنیوم بود (P<۰/۰۵).



www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:22 +0430 on Sunday May 5th 2019

**جدول ۳- فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی خون (میانگین± انحراف معیار) مولدین ماهی کاراس طلایی (*C. gibelio*)**

| تیمارها | شاخص جنس ماهی | ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (میلی مول بر لیتر) | مالون دی آلدئید (نانو مول بر میلی‌گرم پروتئین) |
|---|---|---|---|
| تیمار | نر | ۱/۲۹±۰/۴۶$^{bc}$ | ۹/۹۵±۰/۶۰$^{b}$ |
| شاهد | ماده | ۱/۴۸±۰/۴۷$^{b}$ | ۶/۴۰±۱/۴۴$^{a}$ |
| تیمار سلنیوم ۰/۵Mg/kg | نر | ۱/۹۸±۰/۱۵$^{a}$ | ۷/۳۰±۰/۱۷$^{a}$ |
| | ماده | ۱/۲۴±/۰۲$^{d}$ | ۴/۶۶±۰/۳۳$^{a}$ |

حروف انگلیسی غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد (p<۰/۰۵).

نتایج حاصل از تغذیه سلنیوم آلی مولدین در شاخص‌های تولید مثل ماهی کاراس طلایی در جدول ۴ ارائه شده است. تیمار شاهد با حرف A، تیمار سلنیوم با حرف B و جنسیت نر و ماده به‌ترتیب با علامت‌های♂ و♀ مشخص‌شده‌اند. براساس نتایج به‌دست آمده در تلاقی گروه ♂B*♀B (هر دو جنس تحت تیمار سلنیوم) درصد لقاح، بازماندگی و بدشکلی نسبت به دیگر تلاقی‌ها به‌طور معنی‌داری بهبود یافته بود (P<۰/۰۵). همچنین تلاقی گروه ♂A*♀A (هر دو جنس از تیمار شاهد) نیز نامناسب‌ترین شاخص‌های تولید مثل را دارا بودند (P<۰/۰۵).

**جدول ۴- شاخص‌های تکثیر (میانگین ± انحراف معیار) در مولدین ماهی کاراس طلایی (*C. gibelio*)**

| نوع تلاقی | تعداد تخم اولیه | درصد لقاح | درصد بدشکلی لاروی | درصد بازماندگی لاروهای سالم |
|---|---|---|---|---|
| ♂A*♀A | ۶۲۸/۳۳±۰/۸۸ | ۸۰/۲۱±۰/۱۶$^{c}$ | ۱۲/۷۶±۰/۰۵$^{d}$ | ۷۸ |
| ♂A*♀B | ۶۱۷/۶۶±۰/۶۶ | ۸۱/۱۶±۰/۰۶$^{b}$ | ۱۱/۵۶±۰/۱۰$^{c}$ | ۷۹ |
| ♂B*♀A | ۶۰۳/۶۶±۰/۸۸ | ۸۱/۲۷±۰/۲۷$^{b}$ | ۱۱/۲۱±۰/۱۳$^{b}$ | ۸۱ |
| ♂B*♀B | ۵۹۴/۳۳±۰/۸۸ | ۹۱/۰۸±۰/۰۱$^{a}$ | ۸/۲۵±۰/۰۵$^{a}$ | ۸۷ |

حروف انگلیسی غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

♂-گامت نر♀-گامت ماده؛ A- تیمار شاهد، B- تیمار سلنیوم

نتایج مطالعه توسعه گنادی و وضعیت گامت مولدین در شکل‌های ۱ و ۲ براساس روش گنتن و همکاران (Genten *et al*., 2009) ارائه شده است که طبق شکل ۲ بیضه هر دو گروه از ماهیان در مرحله بالغ است. با این تفاوت که در بیضه ماهی تیمار شاهد علاوه بر اسپرماتوزوآ، اسپرماتوسیت ثانویه و اسپرماتید نیز در لوبول‌ها قابل‌مشاهده است. اما در بیضه مولدین تحت تیمار سلنیوم لوبول‌ها تنها حاوی مقدار زیادی اسپرماتوزآ بالغ می‌باشد و اسپرم‌های نابالغ در لوبول‌ها دیده نمی‌شود. تخمدان این ماهیان نیز در شکل۲ قابل‌مشاهده است که طبق آن تخمدان مولدین تیمار شاهد از نظر رسیدگی



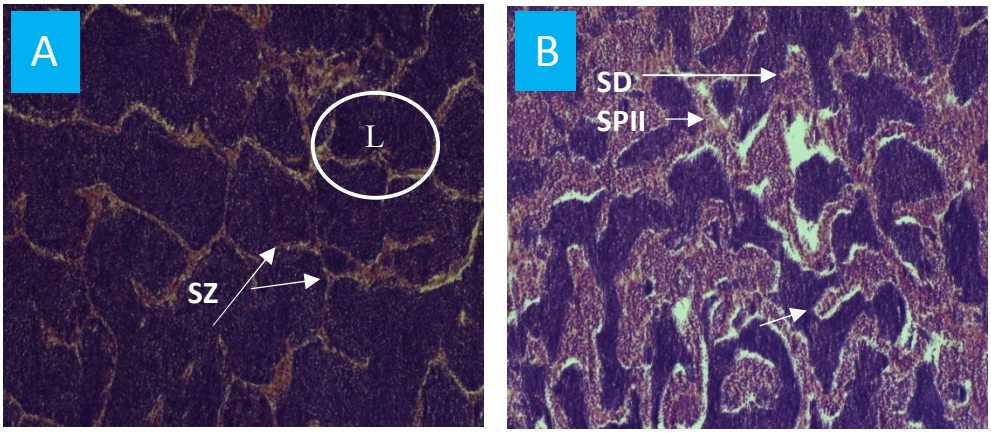
www.SID.ir

Archive of SID

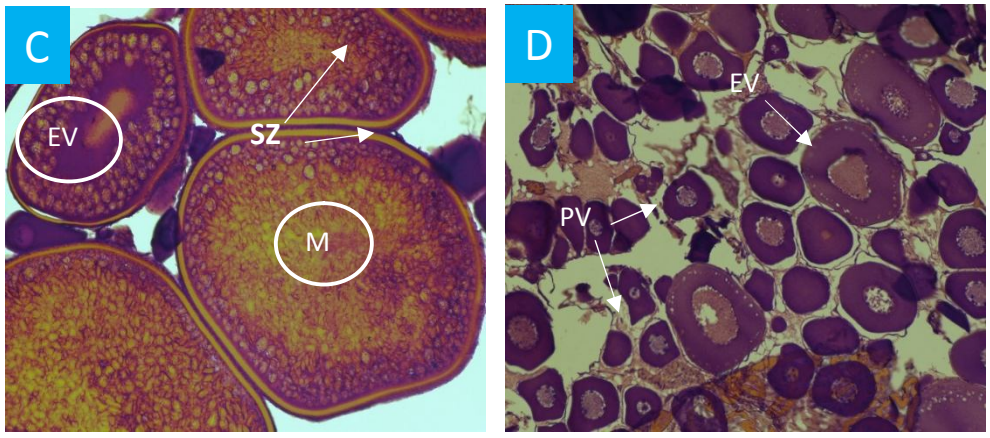


Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:22 +0430 on Sunday May 5th 2019

جنسی در مرحله ۲ (پیش زرده سازی) قرار دارد. اما تخمدان مولدین تحت تیمار سلنیوم از نظر رسیدگی جنسی در مرحله ۵ (مرحله بلوغ یا رسیدگی) دیده می‌شود.




**شکل ۱- گناد ماهیان نر کاراس طلایی (*C. gibelio*) A- لوبول‌های بیضه ماهی سرشار از تنها اسپرم‌های رسیده (تحت تیمار سلنیوم)- رنگ‌آمیزی با روش هماتوکسیلین-ائوزین (۱۰X) B- لوبول‌های بیضه ماهی دارای اسپرماتوزوآ، اسپرماتید و اسپرماتوسیت (تیمار شاهد) SZ- اسپرماتوزوآ SD- اسپرماتید SPII- اسپرماتوسیت ثانویه L- لوبول**




**شکل ۲- تخمدان ماهیان ماده کاراس طلایی (*C. gibelio*) (۱۰X) C- تخمدان در مرحله ۵ بلوغ یا رسیدگی، (تحت تیمار سلنیوم) D- تخمدان در مرحله ۲ پیش زرده سازی، (تیمار شاهد) PV- پیش زرده سازی EV- مرحله ابتدایی زرده سازی M- تخمک زرده سازی کرده (رسیده).**



www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:22 +0430 on Sunday May 5th 2019

## بحث و نتیجه‌گیری

نتایج تحقیقات گذشته نشان داده است که ترکیبات سلنیوم می‌تواند نقش مثبتی در رشد بعضی از گونه‌های ماهیان داشته باشد. در این خصوص اثر رژیم غذایی ترکیب‌شده با سلنیوم در گربه‌ماهی کانالی نشان داد که سلنیوم می‌تواند رشد را تحت تأثیر قرار داده و وزن نهایی در گروهی که با جیره حاوی سلنیوم تغذیه شده بودند نسبت به گروه شاهد افزایش یافته است (Gatlin and Wilson, 1984). همچنین محققین در مطالعه‌ای که روی لارو کپور معمولی انجام دادند دریافتند لاروی که با جیره حاوی سلنیوم تغذیه شده بود به‌طور معنی‌داری دارای طول و رشد بیشتری نسبت به گروه شاهد بود و میزان مرگ و میر آن‌ها از گروه شاهد کمتر بود (Nastova *et al*., 2014). نتایج تحقیق حاضر نیز نشان می‌دهد مولدینی که با جیره حاوی سلنیوم آلی تغذیه شده‌اند به‌طور معنی‌داری دارای افزایش وزن (WG) و ضریب تبدیل غذایی (FCR) بهتری نسبت به گروه شاهد هستند که با تحقیقات ذکرشده همسو است. این امر احتمالاً به‌دلیل جذب بهتر سلنیوم آلی در بدن، کاهش استرس و بیماری‌های احتمالی در ماهیان می‌باشد. زیرا که سلنیوم آلی به‌طور فعال از مسیرهای اسیدآمینه جذب می‌شود. بیشتر سلنیوم آلی نیز در بدن حفظ می‌شود تا بافت‌های بدن سلنیوم آلی را برای مواقع ضروری مثل استرس مصرف کنند. اما سلنیوم معدنی از روده کوچک جذب می‌شود و اغلب از آن نیز دفع می‌شود. جذب بهتر در روده و عملکرد مثبت سلنیوم آلی در حفظ بافت‌ها، موجب شده است به‌طور گسترده با سلنیوم معدنی در تغذیه دام و طیور جهت افزایش رشد و تولید جایگزین شود (Guyot *et al*., 2007).

طبق تحقیقات انجام شده روی سرم خون ماهی قزل‌آلا که در معرض سم ارگانوفسفره دیازیون قرارگرفته بودند، سطح ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (TAC)در تیمار سم دیازیون به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد و تیمار سلنیوم کاهش پیداکرده بود و با بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدی، میزان شاخص مالون‌دی‌آلدهاید (MDA)، در گروهی که در معرض سم دیازیون قرار گرفته‌اند به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود (Mirvaghefi *et al*., 2014). در خصوص تغییرات آنتی‌اکسیدانی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بین میزان TAC و MDA خون مولدین تفاوت معنی‌داری وجود دارد. به‌طوری‌که میزان TAC در مولدین نر تحت تیمار سلنیوم نسبت به مولدین ماده همین تیمار و همچنین مولدین نر و ماده تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر می‌باشد. شاخص MDA در مولدین جنس نر (تیمار شاهد) به‌طور معنی‌داری بیشتر از مولدین ماده همین تیمار و همچنین مولدین نر و ماده گروه تیمار یافته با سلنیوم بوده است. افزایش TAC در خون مولدین ماهی کاراس طلایی در تیمار سلنیوم احتمالاً می‌تواند براثر تغذیه میزان مناسب سلنیوم آلی و در پی آن افزایش بعضی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی باشد. همچنین افزایش MDA نیز در تیمار شاهد احتمالاً می‌تواند براثر عدم



www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:22 +0430 on Sunday May 5th 2019

حضور مقدار مناسب سلنیوم آلی در جیره و آنتی‌اکسیدان‌ها باشد که در نهایت موجب افزایش MDA می‌شود.

در خصوص اثر سلنیوم بر تولید مثل جانوران (به‌غیر از آبزیان) بخصوص تأثیر آن بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پلاسمای سمینال اسپرم، به‌دلیل کاهش اثر منفی رادیکال‌های آزاد مطالعات زیادی انجام شده است. از مهم‌ترین این آنزیم‌ها می‌توان به آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز اشاره کرد. که میزان مناسب آن در بافت بیضه، محتوای آنتی‌اکسیدانی مایع منی و فعالیت ATPase را افزایش می‌دهد و موجب بهبود کیفیت اسپرم و در نهایت تولید مثل خواهد شد (Marin-Guzman *et al*., 1997). به‌دلیل دشواری تحقیق بر تولید مثل مولدین ماهی، در مورد بررسی اثر یک ماده یا عنصر در تولید مثل و شاخص‌های لاروی مولدین گزارشات بسیار محدود است. اما اثر سمیت محیطی این ماده یا مواد در تولید مثل و لارو مولدین آن‌ها مورد ارزیابی قرارگرفته است. وجود بیش از حد سلنیوم در محیط رشد مولدین تیلاپیا و افزایش این عنصر در اندام تولید مثلی نشان داد که بین مولدینی که در محیط غنی از سلنیوم زندگی کرده و مولدین دیگر (گروه شاهد) درصد لقاح و تفریخ تفاوت معنی‌داری دیده نشده است (Gillespie and Baumann, 1986). همچنین در مطالعاتی که اخیراً روی تولید مثل ماهی زبرا انجام شد، همزمان سلنیوم و جیوه (Se+Hg) در دوزهای متفاوت به جیره اضافه شد که نتایج آن نشان داد افزایش سلنیوم جیره می‌تواند تأثیرات منفی جیوه بر رشد و بقا را در ماهیان بالغ و لارو آن‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش دهد. اما افزایش همزمان سلنیوم و جیوه در جیره نیز خود می‌تواند تا حدودی باعث کاهش بعضی شاخص‌های تولید مثل مانند رشد و بازماندگی لاروی شود (Penglase *et al*., 2014).

در مطالعه حاضر نیز اثر تغذیه سطوح متفاوت سلنیوم آلی بر تولید مثل ماهی کاراس طلایی (گلدفیش) و شاخص‌های تکثیر آن بررسی شد که طبق آن تلاقی ماهیان در تیماری که هر دو جنس آن با ۰/۵ mg/kgسلنیوم در جیره تغذیه شده بودند، به‌طور معنی‌داری بالاترین درصد لقاح و بازماندگی و کمترین بدشکلی را داشتند. اما تلاقی تیماری که هر دو جنس با غذای تجاری تغذیه شده بودند به‌طور معنی‌داری نسبت به دیگر تیمار و تلاقی‌ها دارای کمترین درصد لقاح و بازماندگی و نهایتاً بیشترین بدشکلی بودند. این نتایج می‌تواند احتمالاً حاکی از آن باشد که تیماری که در جیره آن‌ها میزان مناسب سلنیوم (در بیشتر ماهیان بین ۰/۳ تا ۰/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم ذکر شده) استفاده شده بود، حضور سلنیوم باعث افزایش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی به‌خصوص گلوتاتیون پراکسیداز شده و این آنزیم موجب کاهش آسیب‌های پراکسیداسیونی لیپیدی در مایع سمینال و غشای سلول اسپرم که دارای میزان زیادی چربی می‌باشد شده است. در نتیجه از آسیب‌های سلولی به گامت مولدین سلول اسپرم و تخمک جلوگیری شده است و افزایش کیفیت گامت و در نهایت بهبود شاخص‌های تولید مثل را در پی داشته است.



www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:22 +0430 on Sunday May 5th 2019

همانطور که اشاره شد باتوجه به اثر مثبت سلنیوم و آنتی‌اکسیدان‌ها بر تکامل اسپرم در بیضه و تولید مثل، در مطالعه‌ای که اثر تجویز دوزهای مختلف سلنیوم بر موش‌های مسن و جوان انجام شد، پس از بررسی‌های بافت‌شناسی (بررسی مقاطع بافتی بیضه و وضعیت تکامل گامت) و آنالیز اسپرم (مورفولوژی طبیعی و میزان درصد زنده ماندن اسپرم‌ها) نتایج نشان داد که به دنبال تجویز ۰/۲ mg/ kg سلنیوم، کیفیت برخی از پارامترهای اسپرمی موش افزایش می‌یابد (Mohammadi *et al*., 2008). نتایج تحقیق حاضر نیز نشان می‌دهد مولدینی که با میزان مناسب سلنیوم (۰/۵ mg/kg) تغذیه شده بودند اسپرم و تخمک آن‌ها در اندام تولید مثلی (بیضه و تخمدان) در مرحله بالاتری از نظر رسیدگی جنسی قرار داشته است و تخمک و اسپرم بالغ بیشتری در گناد آن‌ها قابل مشاهده است. در تیمار شاهد اسپرماتوزوآی بالغ به میزان کمتری در لوله‌های لوبول دیده می‌شود و همراه آن‌ها تعداد زیادی از اسپرماتوسیت‌های ثانویه و اسپرماتید نیز قابل‌مشاهده است. اما در مولدینی که تحت تیمار سلنیوم (۰/۵ mg/kg) قرارگرفته اند، لوبول‌ها به‌طور کامل از اسپرماتوزوآی بالغ پر بوده و اسپرم‌های نابالغ نیز (اسپرماتوسیت، اسپرماتید و...) در لوبول دیده نمی‌شود. این امر نشان می‌دهد که گامت در مرحله بالاتر یا بهتری از رسیدگی جنسی نسبت به تیمار شاهد قرار دارد. وضعیت تکامل تخمک‌ها در تیمار شاهد نشان نیز می‌دهد که از نظر رسیدگی جنسی تخمدان در مرحله ۲ (مرحله پیش زرده سازی) قرار دارد که از مشخصه‌های این مرحله می‌توان به وجود اووگونی‌هایی با اندازه کوچک و چندضلعی که دارای یک هسته بزرگ و کروی می‌باشند اشاره کرد. ماهی تحت تیمار سلنیوم نیز از نظر رسیدگی جنسی تخمدان در مرحله ۵ (مرحله بلوغ یا رسیدگی) قرار دارد. از مشخصه‌های این مرحله این است که در تخمک‌ها دانه‌های زرده به‌شدت افزایش یافته و توده‌های بزرگ‌تر زرده در تخمک‌ها قابل مشاهده است. این رسیدگی و تکامل بیشتر و بهتر اسپرم و تخمدان در تیمار سلنیوم را می‌توان احتمالاً ناشی از تأثیر مثبت سلنیوم بر تولید مثل دانست. زیرا که اثر مثبت سلنیوم به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان در حفاظت آن از تمامی سلول‌ها (به‌خصوص سلول‌های جنسی) در برابر رادیکال‌های آزاد و شرایط استرس‌زا ثابت شده است و میزان مناسب این عنصر می‌تواند باعث بهبود فاکتورهای کیفی گامت در اندام‌های تولید مثلی و همچنین توسعه طبیعی گناد شود (Behne *et al*., 1982).

به‌طور کلی باتوجه به نتایج به‌دست آمده از این تحقیق، می‌توان چنین عنوان نمود که افزودن ۰/۵ mg/kgسلنیوم آلی در جیره مولدین ماهی کاراس طلایی می‌تواند فاکتورهای رشد، آنتی‌اکسیدانی و توسعه گنادی در این ماهی را تحت تأثیر قرار دهد. بدین‌صورت که میزان ضریب تبدیل غذایی در تیمار سلنیوم بهتر شده بود و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (TAC) خون در جنس نر تیمار سلنیوم بیشتر بوده اما میزان مالون‌دی‌آلدهاید (MDA) در تیمار شاهد افزایش‌یافته بود، همچنین توسعه گنادی در هردو جنس تیمار سلنیوم در وضعیت مناسب‌تری از نظر رسیدگی جنسی قرار داشت. لذا سلنیوم



www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:22 +0430 on Sunday May 5th 2019

می‌تواند برای هر دو جنس مولدین (نر و ماده) جهت بهبود کیفیت گامت آن‌ها مفید واقع شود. زیرا که شاخص‌های تولید مثل (درصد لقاح، بازماندگی و بدشکلی لاروی) ماهیانی که هر دو جنس آن‌ها با سلنیوم تغذیه شده بودند به‌طور معنی‌داری دارای وضعیت بهتری بود. از طرف دیگر، مطالعه اثر سلنیوم آلی بر شاخص‌های تولید مثل به‌خصوص جنس ماده نیازمند بررسی دقیق‌تری می‌باشد تا بتوان به درک بهتر و عمیق‌تری نسبت به اثر این عناصر، در تولید مثل ماهیان رسید.

## تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر با استفاده از حمایت مالی و امکانات دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس به انجام رسید. با تشکر از آقای امیرحسین اسماعیلی و تمامی کسانی که ما را در انجام این طرح یاری نمودند.

## منابع

Abedian Kenari A., Sotoudeh E., Rezaei M.H. 2011. Dietary Soybean Phosphatidyl Choline Effects Growth Performance and Lipolytic Enzyme Activity in Caspian Brown Trout (*Salmo Trutta Caspius*) Alevin. Aquaculture Research, 42(1):655-663.

Agarwal A., Prabakaran S.A., Said T.M. 2005. Prevention of oxidative stress injury to sperm. Journal of Andrology, 26(6): 654-660.

Behne D., Hofer T., Von Berswardt- Wallrabe R., Elger W. 1982. Selenium in the testis of the rat: studies on its regulation and its importance for the organism. Journal of Nutrition, 102(11): 1682-1687.

Benzie I.F.F. 1996. Lipid peroxidation: a review of causes consequences measurements and dietary influences. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 47(5): 233-262.

Bjerselius R., Olsen K.H., Zheng W. 1995. Endocrine, gonadal and behavioral responses of male crucian carp (*Carassius carassius*) to the hormonal pheromone 17_20 dihydroxy-4-pregnen-3-one. Chemical Senses Journal, 20: 221-230.

Boitani C., Puglisi R. 2008. Selenium a Key Element in Spermatogenesis and Male Fertility. Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, 82(3): 65-73.

Edenns F.W., Carter T.A., Parkhurt C.R. 2000. Effect of selenium source and litter type on broiler feathering. The Journal of Applied Poultry Research, 9: 407-413.

Gatlin D.M., Wilson R.P. 1984. Dietary selenium requirement of fingerling channel cat fish. Journal of Nutrition, 114: 627-633.



www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:22 +0430 on Sunday May 5th 2019

Genten F., Terwinghe E., Danguy A. 2009. Atlas of Fish Histology. Science Publishers, CRC Press. USA. 224 P.

Gillespie R.B., Baumann P.C. 1986. Effects of high tissue concentrations of selenium on reproduction by bluegills. Transactions of the American Fisheries Society, 115(2): 208-213.

Guyot H., Spring P., Andrieu S., Rollin F. 2007. Comparative responses to sodium selenite and organic selenium supplements in Belgium blue cows and calves. Livestock Science, 111: 259-263.

Heidari B., Shabanipour N., Savari A., Yavari V., Hosseini N. 2009. The oocyte development of Kutum (*Rutilus frisii kutum*) with special emphasis on the zona radiata structure. Animal Reproduction, 6: 465-472.

Heindl J., Ledvinka Z., Tumova E., Zita L. 2010. The importance, utilization and sources of selenium for poultry: a review. Journal of the Science of Food and Agriculture, 41: 55-64.

Kusuda S., Teranishi T., Koide N., Nagai T., Arai K., Yamaha E. 2004. Pluripotency of cryopreserved blastomeres of the goldfish. Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology, 301(2): 131-138.

Lemly A.D. 1998. Pathology of selenium poisoning in fish. In: Frankenberger WT, Engberg R.A. (Eds.). Environmental Chemistry of Selenium, Marcel Dekker, New York, USA, pp: 281-296.

Mahfouz R., Sharma R., Sharma D., Sabanegh E., Agarwal A. 2009. Diagnostic value of the total antioxidant capacity (TAC) in human seminal plasma. Fertility and Sterility, 91: 805-811.

Marin-Guzman J., Mahan D.C., Chung Y.K., Pate J.L., Pope W.F. 1997. Effects of Dietary Selenium and Vitamin E on Boar Performance and Tissue Responses. Semen Quality and Subsequent Fertilization Rates in Mature Gilts. Journal of Animal Science, 75(11): 2994-3003.

Mirvaghefi A., Poorbagher H., Asadi F. 2014. Studying the effect of vitamin E selenium and C supplement on antioxidant defense activity and lipid peroxidation index of rainbow trout (*Oncorohynchus mykiss*) in exposure to subacute Diazinon. Journal of Applied Ichthyological Research, 2(1): 75-92. (In Persian).

Mohammadi S., Movahedin M., Mowla S.J. 2008. Antioxidant effects of selenium on sperm parameters and testicular structure in young and aged mice. Journal of Reproduction & Infertility, 9(3): 41-5.

Nastova R., Gjorgovska N., Kostov V. 2014. Selenium supplementation in fish nutrition. AgroLife Scientific Journal, 3(1): 104-107.

Patching S.G., Gardiner P.H.E. 1999. Recent developments in Se metabolism and chemical speciation:a review. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 13: 193-214.



www.SID.ir

Archive of SID



Penglase S., Hamre K., Ellingsen S. 2014. Selenium and mercury have a synergistic negative effect on fish reproduction. Aquatic Toxicology, 149: 16-24.

Rao B., Souflir J.C., Martin M., David G. 1989. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. Gamete Research Journal, 24: 127-34.

Ricker W.E. 1979. Growth Rates and Models. Fish Physiology, 8: 677-743.



Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:22 +0430 on Sunday May 5th 2019

www.SID.ir