مقاله علمی – پژوهشی:

تأثیر افزودن ویتامین C، آستازانتین و لسیتین سویا به جیره غذایی بر قابلیت لقاح و شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی مایع تخمدانی مولدین ماده ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*)

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

*k.sarvimoghanlou@urmia.ac.ir

۱- گروه شیلات و آبزیان دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۲- گروه شیمی تجزیه، جهاد دانشگاهی، واحد آذربایجان غربی، ارومیه، ایران.

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۱

چکیده

در تحقیق حاضر، اثرات افزودن ویتامین C، آستازانتین و لسیتین سویا به جیره غذایی بر قابلیت لقاح (درصد لقاح و تخم‌های چشم‌زده) و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) مایع تخمدانی ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*) بررسی شد. بدین‌منظور، ۹ جیره آزمایشی مختلف: $C_0A_0L_0$ (صفر میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C، صفر میلی‌گرم در کیلوگرم آستازانتین و صفر درصد لسیتین سویا)، $C_{300}A_{50}L_0$، $C_{700}A_{100}L_0$، $C_0A_{50}L_6$، $C_{300}A_{100}L_6$، $C_{700}A_0L_6$، $C_0A_{100}L_9$، $C_{300}A_0L_9$ و $C_{700}A_{50}L_9$ فرموله شد و مولدین (۰/۰۵±۲/۵۱ کیلوگرم) به مدت چهار ماه تغذیه شدند. پس از حصول رسیدگی جنسی و تخم‌کشی، مایع تخمدانی برای سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (AAE) و بررسی قابلیت لقاح آن، جدا شد. از مخلوط اسپرمی ۹ مولد نر برای سنجش قابلیت لقاح استفاده شد. نتایج حاکی از افزایش هماوری نسبی و AAE مایع تخمدانی بود. کمترین هماوری نسبی (۳۸±۶۴۰ تعداد تخمک در کیلوگرم وزن مولد)، فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و GPx (به‌ترتیب ۶۷/۶۰±۸۱۶/۳۳ واحد در میلی‌لیتر، ۰/۴۰±۱/۲۹ نانومول در دقیقه در میلی‌لیتر و ۰/۰۸±۱/۰۶ نانومول در دقیقه در میلی‌لیتر) در مایع تخمدانی ماهیان گروه $C_0A_0L_0$ مشاهده شد که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت ($p<0/05$). بالاترین درصد لقاح و درصد تخم‌های چشم‌زده در تیمار $C_{300}A_{100}L_6$ (به‌ترتیب ۶۶/۱۳±۹۱/۵ درصد و ۱/۳±۸۷/۶۳ درصد) به‌دست آمد که با تیمار آب شیرین (به‌ترتیب ۴/۱۶±۷۷/۶۶ درصد و ۵/۱±۴۷/۸۶ درصد) اختلاف معنی‌داری داشتند ($p<0/05$). طبق نتایج این تحقیق افزودن ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم آستازانتین به همراه حداقل ۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C و حداقل ۶ درصد لسیتین سویا می‌تواند موجب افزایش هماوری نسبی، قابلیت لقاح‌پذیری و AAE مایع تخمدانی ماهی آزاد دریای خزر شود.

لغات کلیدی: آستازانتین، تخم چشم‌زده، آنزیم آنتی‌اکسیدانی، لسیتین سویا، لقاح، مایع تخمدانی، ویتامین C

*نویسنده مسئول

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.10.6]

مقدمه

تغذیه مولدین در جهت بهبود گامت‌های استحصالی امری ضروری است (Izquierdo *et al.*, 2001). یکی از مهم‌ترین ترکیبات غذایی موثر بر تولید مثل، آنتی‌اکسیدان‌ها هستند. ماهی‌ها برای زنده‌ماندن به اکسیژن نیاز دارند، اما مصرف اکسیژن به تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) منجر می‌شود که می‌تواند به مولکول‌های زیستی آسیب وارد نماید. حذف ROS در موجودات زنده به‌وسیله سیستم آنتی‌اکسیدانی صورت می‌گیرد. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) طی یک واکنش جهشی[1]، مضرترین ROS (O^{-2}) را حذف می‌کند که اولین مرحله حیاتی برای تنظیم تولید O^{-2} درون سلولی در نظر گرفته می‌شود. محصولات این واکنش شامل اکسیژن مولکولی (O_2) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) است. پس از واکنش جهشی، گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) یا کاتالاز (CAT) می‌تواند H_2O_2 را به H_2O کاتالیز کند (Wang *et al.*, 2017). آنتی‌اکسیدان‌ها مولکول‌هایی هستند که از قابلیت آهسته کردن یا جلوگیری از اکسید شدن سایر مولکول‌های زیستی برخوردارند. این مولکول‌ها با حذف رادیکال‌های آزاد، به عنوان واسطه‌ای برای پایان‌دادن این زنجیره، وارد واکنش می‌شوند و با اکسیداسیون خود، سایر واکنش‌های اکسیداتیو را مهار می‌کنند (Mohebbi *et al.*, 2012). طی روند رسیدگی جنسی، جانوران به طور معمول میزان سوخت و ساز بالاتری دارند که به طور بالقوه می‌تواند باعث افزایش تولید ROSها و در صورت کمبود آنتی‌اکسیدان‌ها منجر به استرس اکسیداتیو گردد. تخمک ماهیان ماده بعد از فرآیند اوولاسیون در مایع تخمدانی ذخیره می‌شوند. حجم مایع تخمدانی در گونه‌های مختلف متفاوت است. با این‌حال در آزاد ماهیان شامل ۳۰-۱۰ درصد کل توده تخمکی می‌باشد. سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی در مایع تخمدانی برای ارزیابی کیفیت تخمک استفاده می‌شود (Zadmajid *et al.*, 2019).

ویتامین C یکی از ویتامین‌های مهم محلول در آب است و ماهیان به دلیل اینکه فاقد آنزیم ال-گلونولاکتون اکسیداز می‌باشند، نمی‌توانند گلوکز را به اسید آسکوربیک تبدیل کنند. بنابراین، لازم است مقادیر کافی ویتامین C در جیره ماهیان وجود داشته باشد (Ibiyo *et al.*, 2007). آستازانتین، به طور گسترده در ماهی‌ها رایج است. افزایش رشد جنینی و لاروی، محافظت سلولی در برابر آسیب‌های فتودینامیک، بهبود رشد و بلوغ جنسی، تشکیل اپوکسیدهای زنجیره‌ای (به عنوان ذخایر اکسیژن تحت شرایط بدون اکسیژن عمل می‌کنند)، مهار رادیکال‌های آزاد (ROSها) و تشکیل‌دهندگان مواد سیگنال‌دهی در تولید مثل از اثرات آستازانتین در ماهیان است (Tizkar *et al.*, 2015; Tizkar *et al.*, 2016). فسفولیپیدها یکی از اعضای خانواده چربی‌های مفید هستند که سازنده غلاف و لایه‌های چربی محافظ اطراف سلول‌های عصبی به‌شمار می‌روند. تحقیقات نشان می‌دهد که ماهیان و سخت‌پوستان نمی‌توانند به میزان کافی فسفولیپید مورد نیاز خود را برای حداکثر رشد بسازند. از این‌رو، فسفولیپید بایستی به جیره‌های آنها افزوده شود (Poston, 1991) و گنجاندن فسفولیپیدها به عنوان مکمل‌های غذایی در جیره غذایی بسیاری از گونه‌های ماهی می‌تواند عملکرد آبزی را بهبود بخشد (Tocher *et al.*, 2008). از جمله منابع مهم فسفولیپید، لسیتین سویا می‌باشد (Thompson *et al.*, 2003).

اثر مثبت لسیتین بر کارایی تولید مثلی *Eriocheir sinensis* (Wu *et al.*, 2007)، *Mystus cavasius* (Hossen *et al.*, 2014)، *Danio rerio* (Diogo *et al.*, 2015) و *Aequidens rivulatus* (Jamali *et al.*, 2019) گزارش شده است. Jenabi Haghparast و همکاران (۲۰۱۹) گزارش دادند که سطح ۶ درصد لسیتین سویا اثر مثبتی بر شاخص‌های خونی، آنتی‌اکسیدانی و رشد پیش مولدین *Salmo caspius* داشت. Ciji و همکاران (۲۰۲۱) نیز افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و گلوتاتیون-اس-ترانسفراز (GST) در لاروهای ماهی *Tor putitora* تغذیه شده با لسیتین گزارش کردند. آنها دلیل این امر را به خاصیت آنتی اکسیدانی زنجیره جانبی

[1] Dismutation reaction

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.10.6]

فسفولیپید که حاوی گروه‌های آمین/هیدروکسیل است، نسبت دادند.

قادری‌فهلیانی و همکاران (۱۳۹۴) بیشترین هماوری، تعداد در گرم تخمک، درصد لقاح و درصد چشم‌زدگی تخم‌ها را در مولدین قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با جیره‌های حاوی ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم آسکوربیک اسید گزارش کردند. Chen و همکاران (۲۰۱۵) نیز بهبود شاخص‌های رشد و افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در کبد ماهی *Micropterus salmoides* تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی ۱۴۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C و بیشتر از آن بیان کردند. نتایج مطالعه Saleh و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که مکمل سازی جیره غذایی با لسیتین سویا و ویتامین C در *Sparus aurata* باعث کاهش محتوای مالون‌دی‌آلدهید و افزایش معنی‌داری در بیان ژن آنزیم کاتالاز می‌شود.

Ahmadi و همکاران (۲۰۰۶) افزایش آستازانتین در تخم‌های استحصالی را به همراه اثر مثبت آستازانتین بر فعالیت‌های تولیدمثلی در مولدین ماده قزل‌آلای رنگین کمان تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی دوزهای مختلف آستازانتین بیان کردند. همچنین Palma و همکاران (۲۰۱۷) مولدین اسبک ماهی *Hippocampus guttulatus* را با دوزهای مختلف آستازانتین تغذیه کردند و نتایج این تحقیق نشان داد که آستازانتین به درون تخم‌ها انتقال پیدا کرده است و لاروهای استحصالی از تخم‌های حاوی آستازانتین کمتر در مقایسه با تخم‌های حاوی آستازانتین بیشتر، دارای اندازه کوچکتری بودند.

ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*) از گونه‌های بومی و در خطر انقراض دریای خزر است. از این‌رو، سازمان شیلات ایران در جهت بازسازی ذخایر این گونه سالانه هزاران بچه ماهی آزاد دریای خزر را رها سازی می‌کند (صیادبورانی و همکاران، ۱۳۹۱). در گونه‌های در خطر انقراض موفقیت تولید مثلی اهمیت ویژه‌ای دارد. از این‌رو، نقش تغذیه مولدین در موفقیت تولید مثل بسیار حساس است (Izquierdo *et al.*, 2001). این تحقیق با هدف بررسی پتانسیل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مایع تخمدانی به عنوان نشانگری برای سنجش کیفیت و قابلیت لقاح (درصد لقاح و درصد تخم‌های چشم‌زده) تخمک‌ها و ارتباط آن با تغذیه مولدین با جیره‌های غذایی مختلف صورت پذیرفت.

مواد و روش کار

محل انجام تحقیق

این تحقیق در مرکز تکثیر خصوصی روستای هنگروان، واقع در شهرستان ارومیه انجام شد. استخرهای آبراهه‌ای این مرکز با توری‌های پلاستیکی به پنج قسمت مساوی تقسیم شد به‌طوری‌که هر مخزن حجم ۱۵۰۰ لیتر آب داشت. طی دوره آزمایش میانگین دما، اکسیژن محلول و دبی آب به‌ترتیب ۰/۶۳±۱۰/۴۱ درجه سانتی‌گراد، ۰/۰±۲۱/۱۳ میلی‌گرم در لیتر و ۲۰ لیتر بر ثانیه بود. پس از جداسازی نرها از ماده‌ها، تعداد ۷۲ قطعه مولد ماده ماهی آزاد دریای خزر (میانگین سن ۳ سال) با میانگین وزنی ۰/۰۵±۲/۵۱ کیلوگرم در این مخازن بتونی با تراکم ۸ قطعه مولد در هر مخزن ذخیره‌سازی شد. قبل از شروع آزمایش مولدین ماهی آزاد دریای خزر در دوره نوری ۱۶:۸ (روشنایی: تاریکی) قرار گرفتند (آق و ایرانی، ۱۳۹۹). ماهی‌ها به مدت دو هفته با شرایط مخازن و جیره‌های آزمایشی سازگار شدند. مولدین ماده به مدت ۱۲۰ روز با جیره‌های آزمایشی تغذیه شدند.

تهیه و آماده‌سازی جیره غذایی

برای این منظور از جیره غذایی تجاری اکسترود مولدین قزل‌آلا ساخت شرکت بیضاء (جدول ۱) به عنوان جیره پایه استفاده شد. مکمل‌های ویتامین C (شرکت لابراتوارهای سئانس، ایران)، آستازانتین (Kaesler Nutrition GmbH, Germany) و لسیتین (Shankar, India)، با توجه به تیمارهای غذایی (جدول ۲)، به ازای هر کیلوگرم غذا محاسبه و به جیره غذایی تجاری افزوده شد به‌طوری‌که 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

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.10.6]

شده و به‌خوبی هم‌زده 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 مذکور با ژلاتین گاوی (۲ درصد) پوشانیده شد (Ramsden *et al.*, 2009). در پایان غذاها به مدت ۱۲ ساعت دیگر در دمای اتاق خشک شدند و در نهایت دان‌های تهیه شده در کیسه‌های فریزر یک کیلوگرمی به همراه مقداری ژل نم گیر در فریزر (۲۰- درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد. طی دوره آزمایش تغذیه ماهیان بر اساس یک درصد وزن بدن آنها صورت گرفت. تمامی ماهیان در یک وعده و ساعت ۱۰ صبح تغذیه شدند.

جدول ۱: مشخصات جیره غذایی تجاری (جیره پایه)

Table 1: Commercial diet composition (basic diet)

پروتئین خام	چربی خام	انرژی قابل هضم (کالری/ کیلوگرم)	فیبر خام	فسفر قابل جذب	رطوبت
۴۵٪	۱۵٪	۴۳۰۰	۳٪	۰/۹٪	کمتر از ۱۰٪

جدول ۲: تیمارهای آزمایشی حاوی سطوح مختلف ویتامین C، آستازانتین و لسیتین سویا

Table 2: Experimental treatments with different levels of vitamin C, astaxanthin and soybean lecithin

تیمارها	ویتامین C (میلی‌گرم در کیلوگرم)	آستازانتین (میلی‌گرم در کیلوگرم)	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

تیمارهای آزمایشی

این پژوهش در قالب یک طرح کاملا تصادفی با ۹ تیمار و سه تکرار انجام شد. مکمل‌های غذایی ویتامین C (صفر، ۳۰۰ و ۷۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) (Dabrowski *et al.*, 1995; Khara *et al.*, 2016)، آستازانتین (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم) (Dong *et al.*, 2021; Rashidian *et al.*, 2021) و لسیتین سویا (صفر، ۶ و ۹ درصد) (Jenabi Haghparast *et al.*, 2019) به‌ترتیب جدول ۲ به جیره غذایی پایه افزوده شد.

جداسازی مایع تخمدانی

چهار روز پس از حصول رسیدگی، مولدین با پودر گل میخک (۲۲۰ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۱۰ دقیقه) بیهوش شدند (Coffman and Goetz, 1998; Kazemi *et al.*, 2021) سپس تخم‌کشی از آنها صورت گرفت. هنگام تخم‌کشی، با ریختن تخمک‌ها روی توری، مایع تخمدانی جدا سازی شده و به درون میکروتیوب‌های ۲ سی‌سی انتقال داده شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده به‌سرعت در یخ خشک قرار داده شده و به فریزر (۸۰- درجه سانتی‌گراد) منتقل گردید.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.10.6]

هماوری نسبی

پس از تخم‌کشی از ماهیان و جداسازی مایع تخمدانی، ابتدا وزن کل تخمک استحصالی محاسبه می‌گردد. سپس ۲۰ گرم از تخمک‌های هر مولد (۳ تکرار) جهت شمارش تعداد تخمک‌ها نمونه گیری شد (Agh and Irani, 2021):

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

درصد لقاح و چشم‌زدگی تخم‌ها

تخمک ۵ ماده (تغذیه شده با تیمار شاهد) با یکدیگر مخلوط شدند و برای سنجش درصد لقاح مورد استفاده قرار گرفتند. ۳۰ کاسه که هر کدام حاوی ۴۵ گرم تخمک (تقریباً ۶۰۰ عدد تخمک) فراهم شد. اسپرم مورد نیاز برای لقاح نیز از تعداد ۹ ماهی نر استحصال و با هم مخلوط و برای انجام لقاح استفاده گردید. غلظت اسپرماتوزوآ مخلوط اسپرمی با لام هموسیتومتر[1] سنجش (Hatef *et al.*, 2009) و $۱۰^{۹} \times ۳/۳$ عدد در میلی‌لیتر تخمین زده شد. با توجه به اینکه کمترین مقدار اسپرماتوزوآ به ازاء هر تخمک برای لقاح در ماهی قزل‌الای رنگین کمان ۳۰۰۰۰۰-۳۰۰۰۰ به‌دست آمده است (Billard, 1992)، مخلوط اسپرمی به نسبت ۱:۱۰۰ در محلول ۸۰ میلی‌مول NaCl، ۴۰ میلی‌مول KCl، ۳۰ میلی‌مول Tris–HCl ، pH ۹/۰ رقیق سازی شد (Billard and Cosson, 1992) تا غلظت ۵۵۰۰۰ اسپرماتوزوآ به ازاء هر تخمک به‌دست آید. انجام عملیات لقاح مطابق دستورالعمل Hatef و همکاران (۲۰۰۹) صورت گرفت. اسپرم در قسمت کاملاً خشک و سمت مخالف تخمک‌ها در هر کاسه قرار گرفت و ۳۰ سی‌سی آب شیرین (به عنوان تیمار کنترل) یا مایع تخمدانی مولدین تغذیه شده با مکمل‌های غذایی، به آن اضافه شد. محتویات کاسه‌ها به آرامی هم‌زده شده و در ادامه برای شستشوی تخم‌ها مقداری از آب مزرعه به آنها اضافه و تخم‌ها کاملاً به‌هم زده شدند. تخم‌ها چندین بار با آب مزرعه جهت هم‌دماسازی و خروج پوسته‌های اضافی تا شفاف شدن کامل آب شستشو داده شدند. کاسه‌های حاوی تخم به مدت ۳۰ دقیقه بدون دستکاری باقی ماندند تا آب جذب کنند و سفت شوند. در انتها، تخم‌های لقاح یافته به سینی‌های کالیفرنیایی انتقال داده شدند.

۸ روز پس از خوابانیدن، جهت تعیین درصد لقاح، از تخم‌ها نمونه‌برداری شد. از هر یک از ظروف سینی انکوباسیون تعداد ۱۰۰ عدد تخم نمونه برداری شد و به منظور تعیین درصد لقاح درون محلول (۷ گرم کلرید سدیم + 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 ذیل محاسبه شد (Geffen and Evans, 2000):

$$\text{درصد لقاح} = (\text{تعداد تخم لقاح یافته} / \text{عدد تخم}) \times ۱۰۰$$

پس از گذشت ۳۵-۳۰ روز از لقاح، تعداد تخم‌های چشم زده شمارش شد و درصد چشم‌زدگی تخم مطابق فرمول ذیل محاسبه شد (Hatef *et al.*, 2009):

$$\text{درصد تخم‌های چشم زده} = (\text{تعداد تخم‌های چشم زده} / \text{۵۰۰ عدد تخم}) \times ۱۰۰$$

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (AAE) مایع تخمدانی

سنجش فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و GPx به‌ترتیب با روش‌های Marklund و Marklund (۱۹۷۴)، Goth (۱۹۹۱) و Paglia و Valentine (۱۹۶۷) به کمک دستگاه اسپکتوفتومتر و به‌ترتیب در طول موج‌های ۴۲۰، ۲۴۰ و ۳۴۳ نانومتر اندازه‌گیری شد.

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

قبل از انجام آنالیز واریانس، نرمال بودن داده‌های به‌دست آمده با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف بررسی شد. با توجه به این‌که داده‌های درصد تخم‌های چشم زده از توزیع نرمال برخوردار نبودند، جهت نرمال‌سازی آن از روش IDF.NORMAL در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ استفاده شد. آنالیز واریانس داده‌های نرمال با آزمون تجزیه واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) صورت گرفت

[1] Hemocytometer

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.10.6]

و برای مقایسه میانگین تیمارهای مختلف از آزمون توکی استفاده شد. سطح معنی‌داری تمامی آزمون‌ها $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شدند. برای انجام آنالیزهای آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج

هماوری نسبی

در جدول ۳، نتایج مربوط به هماوری نسبی مولدین ماده ماهی آزاد دریای خزر در تیمارهای آزمایشی ارائه شده است.

جدول ۳: هماوری نسبی مولدین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (SOD، CAT و GPx) مایع تخمدانی ماهی آزاد دریای خزر تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی

Table 3: The relative fecundity and the activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GPx) in the ovarian fluid of Caspian trout fed with experimental diets

تیمارها	هماوری نسبی (تعداد تخمک در کیلوگرم وزن مولد)	GPx (نانومول در دقیقه در میلی‌لیتر)	CAT (نانومول در دقیقه در میلی‌لیتر)	SOD (واحد در میلی‌لیتر)
$C_0A_0L_0$	۶۴۰/۰۹±۳۸/۳۱^{c}	۱/۰۶±۰/۰۸^{e}	۱/۲۹±۰/۴۰^{e}	۸۱۶/۳۳±۶۷/۶۰^{e}
$C_{300}A_{50}L_0$	۷۰۲/۴۲±۲۳/۹۸^{bc}	۲/۴۳±۰/۳۹^{c}	۲/۸۱±۰/۶۶^{cd}	۱۰۳۷/۶۶±۲۶/۰۰^{d}
$C_{700}A_{100}L_0$	۷۵۱/۴۴±۲۳/۱۲^{abc}	۱/۹۲±۰/۰۳^{d}	۲/۱۹±۰/۴۳^{de}	۱۱۶۹/۶۶±۶۱/۶۹^{d}
$C_0A_{50}L_6$	۸۱۹/۲۲±۳۹/۹۵^{ab}	۱/۸۷±۰/۱۰^{d}	۴/۰۰±۰/۱۰^{b}	۱۳۲۶/۶۶±۸/۰۸^{c}
$C_{300}A_{100}L_6$	۸۸۰/۳۸±۲۰/۳۷^{a}	۳/۷۵±۰/۱۵^{a}	۶/۰۶±۰/۰۶^{a}	۱۴۶۵/۳۳±۹/۵۰^{b}
$C_{700}A_0L_6$	۷۴۵/۴۷±۱۰۱/۱۱^{abc}	۱/۹۲±۰/۱۰^{cd}	۳/۳۱±۰/۲۹^{bc}	۱۳۲۱/۶۶±۲۴/۰۰^{c}
$C_0A_{100}L_9$	۸۸۱/۶۳±۲۵/۶۰^{a}	۳/۴۵±۰/۲۲^{a}	۵/۳۹±۰/۲۷^{a}	۱۴۸۴±۷/۲۱^{b}
$C_{300}A_0L_9$	۸۳۴/۷۲±۲۶/۷۰^{ab}	۲/۲۲±۰/۰۹^{cd}	۴/۲۱±۰/۱۵^{b}	۱۳۱۳±۷/۲۱^{c}
$C_{700}A_{50}L_9$	۷۷۵/۰۵±۷۳/۸۹^{abc}	۲/۹۴±۰/۰۸^{b}	۳/۹۱±۰/۰۲^{b}	۱۶۵۶±۳۵/۹۳^{a}

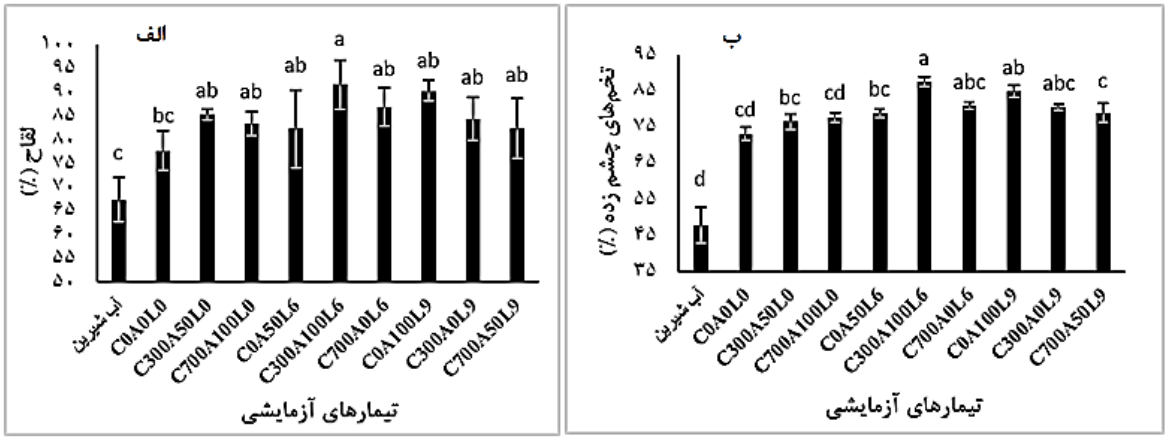
بیشترین میزان میانگین هماوری نسبی در تیمار $C_0A_{100}L_9$ (۲۵±۸۸۱ تعداد تخمک در کیلوگرم وزن مولد) به‌دست آمد که تنها با تیمارهای $C_0A_0L_0$ (۳۸±۶۴۰ تعداد تخمک در کیلوگرم وزن مولد) و $C_{300}A_{50}L_0$ (۲۳±۷۰۲ تعداد تخمک در کیلوگرم وزن مولد) اختلاف معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$).

درصد لقاح و تخم‌های چشم‌زده

نتایج نشان داد که پایین‌ترین درصد لقاح در تیمار آب شیرین (۴/۷۲±۶۷/۳۳ درصد) بود که با مایع تخمدانی ماهیان تغذیه شده با ویتامین C، آستازانتین و لسیتین سویا اختلاف معنی‌داری داشت. همچنین ماهیان گروه $C_{300}A_{100}L_6$ (۶۶/۱۳±۹۱/۵ درصد) دارای بالاترین درصد لقاح بودند که با تیمارهای آب شیرین و $C_0A_0L_0$ (۶۶/۱۶±۷۷/۴ درصد) اختلاف معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$؛ شکل ۱-الف). بالاترین و پایین‌ترین درصد تخم‌های چشم‌زده به‌ترتیب در تیمارهای $C_{300}A_{100}L_6$ (۶۳/۳±۸۷/۱ درصد) و آب شیرین (۵/۱±۴۷/۸۶ درصد) مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با یکدیگر داشتند ($p<۰/۰۵$؛ شکل ۱-ب).

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.10.6]



شکل ۱: درصد لقاح تخمک‌ها (الف) و درصد چشم‌زدگی تخم‌های (ب) ماهی آزاد دریای خزر تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی
Figure 1: Fertilization (a) and Eyed- egg rates (b) of Caspian trout fed with experimental diets

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (AAE) مایع تخمدانی ماهی آزاد دریای خزر

نتایج سنجش AAE مایع تخمدانی در جدول ۳ ارائه شده است. با توجه به نتایج به‌دست آمده، بیشترین فعالیت میزان آنزیم SOD در تیمار $C_{700}A_{50}L_9$ (۱۶۵۶/۹۳±۳۵ واحد در میلی‌لیتر) به‌دست آمد و با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). بیشترین فعالیت آنزیم‌های CAT و GPx در ماهیان گروه $C_{300}A_{100}L_6$ (به‌ترتیب ۶/۰۶±۰/۰۶ نانومول در دقیقه در میلی‌لیتر و ۳/۷۵±۰/۱۵ نانومول در دقیقه در میلی‌لیتر) و $C_0A_{100}L_9$ (به‌ترتیب ۳۹/۲۷±۵/۰ نانومول در دقیقه در میلی‌لیتر و ۴۵/۲۲±۳/۰ نانومول در دقیقه در میلی‌لیتر) به‌دست آمد که با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند ($p>۰/۰۵$). همچنین کمترین مقادیر فعالیت آنزیم‌های CAT و GPx در تیمار $C_0A_0L_0$ (به‌ترتیب ۱/۲۹±۰/۴۰ نانومول در دقیقه در میلی‌لیتر و ۱/۰۶±۰/۰۸ نانومول در دقیقه در میلی‌لیتر) مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشتند ($p<۰/۰۵$).

بحث

از شاخص‌های موفقیت تولید مثل در ماهیان می‌توان به میزان هماوری، درصد لقاح و درصد تخم‌های چشم‌زده اشاره کرد. فسفولیپیدها (لسیتین سویا) از سویی، جزو اعضاء تشکیل‌دهنده غشاء سلولی است و از سوی دیگر موجب افزایش زرده سازی و انتقال مواد از کبد به تخمدان و تخمک‌های در حال رشد، می‌شوند (Jamali *et al.*, 2019; Maneii *et al.*, 2019; Lin *et al.*, 2020; Martins *et al.*, 2020). همچنین ویتامین C و آستازانتین از ژنوم و غشاء سلولی در مقابل ROS ها و پراکسیداسیون چربی‌ها، محافظت می‌کنند (Dawood and Koshio, 2016; Lim *et al.*, 2017). در آبزیان، مطالعات بسیاری به بررسی اثر تغذیه ویتامین C، آستازانتین و لسیتین سویا بر میزان هماوری پرداخته است. برای مثال، مولدین ماده *Pseudotropheus acei*، *Scylla tranquebarica*، *Astacus leptodactylus*، *Gadus morhua*، *Penaeus monodon* و *Carassius auratus* که با آستازانتین تغذیه شده بودند، هماوری بیشتری داشتند (Lim *et al.*, 2017). به‌علاوه، مکمل‌سازی جیره‌غذایی با ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C در *Oreochromis niloricus* افزایش هماوری را به‌همراه داشت (Suloma *et al.*, 2017). همانند آستازانتین و ویتامین C، افزودن فسفولیپید 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)،

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-01]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.10.6]

Fundulus heteroclitus (Blickley *et al.*, 2014) و *Eriocheir sinensis* (Wu *et al.*, 2007; Sui *et al.*, 2009) افزایش دهد. نتایج این تحقیق نشان داد مولدین ماده ماهی آزاد دریای خزر تغذیه شده با تیمارهای حاوی ویتامین C، آستازانتین و لسیتین سویا، هماوری نسبی بالاتری نسبت به تیمار شاهد داشتند که با نتایج تحقیقات مذکور مطابقت دارد.

در این تحقیق، درصد لقاح و چشم‌زدگی تخم‌های لقاح یافته با مایع تخمدانی تمامی تیمارها، بیشتر از آب شیرین بود که با نتایج مطالعات انجام شده بر *Salmo trutta caspius* (Hatef *et al.*, 2009)، *Salmo gairdneri* (Billard, 1983)، *Gadus morhua* (Litvak and Turner and Trippel, 1998) *Salvelinus alpinus* (Montgomerie, 2002) و *Ictalurus punctatus* (Myers *et al.*, 2020a) هم‌خوانی دارد. مشخص شده است که مایع تخمدانی ماهیان می‌تواند اثرات مثبتی بر درصد، سرعت، نوع حرکت و مسیریابی اسپرم‌ها به سمت سوراخ میکروپیل تخمک‌ها داشته باشد، هرچند مکانیسم آن کامل مشخص نشده است (Johnson *et al.*, 2020; Myers *et al.*, 2020b; Zadmajid *et al.*, 2019).

مقدار معینی از تولید ROS برای بیان ژن، سیگنال دهی سلولی و هموستاز ردوکس ضروری است. تعادل بین تولید ROS ها و AAE یک عامل کلیدی برای هر عملکرد متابولیک در مهره‌داران است. حفظ این تعادل پیچیده یک فرآیند سازنده مهم است و تأثیر خاصی بر تکثیر، تمایز، آپوپتوز و مرگ سلولی دارد (Wang *et al.*, 2017: Ribeiro *et al.*, 2021). نتایج این مطالعه نشان داد که تغذیه مولدین ماده با ویتامین C، آستازانتین و لسیتین سویا موجب افزایش AAE مایع تخمدانی آنها می‌شود. مطالعات متعددی به بررسی اثر تغذیه بر AAE سرم و بافت‌های آبزیان پرداخته است، اما اطلاعاتی درباره AAE مایع تخمدانی ماهیان وجود ندارد. از سویی، افزایش هماوری نسبی در این تحقیق می‌تواند یکی از عوامل افزایش AAE مایع تخمدانی باشد. از سوی دیگر، به‌نظر می‌رسد منشأ پروتئین‌های مایع تخمدانی از سرم خونی ماهی بوده و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نیز از جنس پروتئین هستند (Zadmajid *et al.*, 2019). نقش تغذیه با آستازانتین (Lim *et al.*, 2017) و ویتامین C (Dawood and Koshio, 2016) بر افزایش AAE سرم خونی ماهیان به‌خوبی مورد مطالعه قرار گرفته است. همچنین لسیتین سویا حاوی اسیدهای چرب غیر اشباع است که عملاً می‌تواند موجب افزایش پراکسیداسیون چربی‌ها و تولید ROS ها گردد که متعاقباً موجب افزایش AAE در سرم خونی ماهی می‌شود. به‌تازگی نیز مشخص شده است که تغذیه با لسیتین سویا منجر به افزایش فعالیت و بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در آبزیان مختلف می‌شود (Jenabi Haghparast *et al.*, 2019; Ciji *et al.*, 2021; Saleh *et al.*, 2021). همچنین Ribeiro و همکاران (۲۰۲۱) احتمال دادند که افزایش AAE به‌خصوص SOD و GPx، در مایع تخمدانی به منظور محافظت از اسپرم‌ها باشد، زیرا با رقیق شدن اسپرم، مقادیر آنتی‌اکسیدان‌های محافظتی سمینال پلاسما کاهش می‌یابد.

طی مراحل مختلف فرایند تولیدمثل، ROS ها و AAE افزایش می‌یابند. برای مثال، در مرحله اوولاسیون، افزایش ROS ها از عوامل اصلی پارگی فولیکول و انتقال تخمک (ها) به حفره شکمی است (Wang *et al.*, 2017). همچنین افزایش AAE درون تخمک در حال رشد از سویی، مانع پیشرفت فرایند میوز I و از سوی دیگر بعد از لقاح، سبب افزایش AAE برای از سرگیری فرایند میوز II در تخمک لقاح‌یافته می‌گردد (Ribeiro *et al.*, 2021). طبق اطلاعات نویسنده تا کنون تحقیقی بر AAE مایع تخمدانی بر موفقیت تولید مثلی ماهیان صورت نگرفته اما در پستانداران مشخص شده است که افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مایع فولیکولار اثرات مثبتی بر لقاح، قابلیت تفریخ و تکامل جنین دارد (Mohammed *et al.*, 2019; Seyfettinoglu *et al.*, 2022). همچنین مشخص شده است که افزایش اندازه تخمک با افزایش AAE مایع فولیکولار همراه است که احتمالاً به دلیل حفظ یکپارچگی غشاء تخمک است. به‌علاوه، فعالیت GPx در مایع فولیکولار فولیکول‌هایی که توانایی لقاح داشتند، بیشتر بود (Wang *et al.*, 2017). محققان یک همبستگی مثبت

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.10.6]

قوی بین فعالیت آنزیم SOD مایع فولیکولار و سطوح استرادیول داخل فولیکولی یافتند که با قابلیت لقاح و تکامل جنینی مرتبط بود (Ribeiro *et al.*, 2021). همچنین در زمان تخمک‌گذاری، تولید ROSها در کمپلکس‌های سلول-اووسیت افزایش می‌یابد و ممکن است که کمپلکس‌های سلول-اووسیت ایزوفرم‌های مختلف SOD را برای رویدادهای آتی مانند لقاح و رشد اولیه جنینی ذخیره کنند (Wang *et al.*, 2017). این تحقیق نشان داد که درصد لقاح و چشم‌زدگی تخم‌ها در مایع تخمدانی که AAE بیشتری داشتند، بالاتر بود به‌طوری‌که تیمارهای $C_{300}A_{100}L_6$ و $C_0A_{100}L_9$ دارای بالاترین درصد لقاح و چشم‌زدگی تخم بودند که با نتایج به‌دست آمده در مطالعات مذکور هم‌سو می‌باشد.

افزایش هماوری نسبی در این تحقیق می‌تواند نشان از افزایش متابولیسم تولید مثلی و دلیلی برای افزایش AAE مایع تخمدانی باشد که حاصل تغذیه مولدین ماده ماهی آزاد دریای خزر با ویتامین C، آستازانتین و لسیتین سویا می‌باشد. افزایش AAE مایع تخمدانی با کاهش پروکسیداسیون چربی‌ها می‌تواند موجب افزایش پایداری غشاء تخمک‌ها گردد و نقش مثبتی در موفقیت لقاح (محافظت از اسپرم‌ها و بهبود مسیریابی آنها به سمت سوراخ میکروپیل) و تکامل جنینی داشته باشد. طبق مطالعات صورت گرفته، AAE (به‌خصوص SOD و GPx) مایع فولیکولار نقش مهمی در قابلیت لقاح و تکامل جنینی دارند که با نتایج این تحقیق هم‌سو می‌باشد. به طور کلی، می‌توان بیان کرد که حفظ پایداری و تعادل در سیستم آنتی‌اکسیدانی عامل مهمی در موفقیت تولید مثلی است. مطابق نتایج این تحقیق افزودن ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آستازانتین به همراه حداقل ۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C و حداقل ۶ درصد لسیتین سویا می‌تواند موجب افزایش هماوری نسبی و افزایش AAE و قابلیت لقاح‌پذیری مایع تخمدانی ماهی آزاد دریای خزر شود. به‌نظر میرسد، سنجش AAE مایع تخمدانی می‌تواند نشانگر مناسبی برای سنجش کیفیت تخمک‌های تولیدی در ماهیان باشد که البته تحقیقات بیشتری برای تأیید این فرضیه لازم است. همچنین تحقیقات بیشتری برای درک رابطه بین تغذیه و AAE مایع تخمدانی و تکامل جنین در سنین مختلف ماده‌ها و فصول تخم‌ریزی مختلف، ضروری است.

منابع

آق، ن. و ایرانی، ع.، ۱۳۹۹. بررسی اثرات رژیم‌های نوری مختلف بر رشد و رسیدگی جنسی آزادماهی دریای خزر(*Salmo caspius*). مجله علمی شیلات ایران. ۲۹ (۶):۱-۱۰. URL: http://isfj.ir/article-1-2058-fa.html

صیادبورانی، م.، مقصودیه کهن، ح.، صیادبورانی، م.، زحمتکش کومله، ع.، ولی پور، ع.، دقیق روحی، ج. و عموزاده عمرانی، م.، ۱۳۹۱. بررسی امکان پرورش ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)در تراکم‌های مختلف با استفاده از آب دریای خزر. نشریه توسعه آبزی پروری، ۶ (۲): ۵۵-۴۷. URL: https://aqudev.liau.ac.ir/article-1-104-fa.html

قادری فهلیانی، ز.، فلاحتکار، ب.، علاف نویریان، ح. و شفائی پور، آ. ۱۳۹۴. اثرات ال-اسکوربیل-۲-پلی فسفات به عنوان منبع ویتامین C بر شاخص‌های تولید مثلی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). پژوهش‌های جانوری، ۲۸ (۴): ۵۱۳-۵۰۸. URL:https://animal.ijbio.ir/article_827.html

Agh, N. and Irani, A., 2021. Effects of Artemia powder in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) broodstock diet on the egg quality. *Journal of Aquaculture Development*, 15, 1-13. Doi: 10.52547/aqudev.15.2.1

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.10.6]

Ahmadi, M., Bazyar, A., Safi, S., Ytrestøyl, T. and Bjerkeng, B., 2006. Effects of dietary astaxanthin supplementation on reproductive characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Ichthyology*, 22, 388-394. Doi: 10.1111/j.1439-0426.2006.00770.x

Billard, R., 1983. Effects of coelomic and seminal fluids and various saline diluents on the fertilizing ability of spermatozoa in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Reproduction*, 68, 77-84. Doi: 10.1530/jrf.0.0680077

Billard, R. and Cosson, M.P., 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *Journal of Experimental Zoology*, 261, 122-131. DOI: 10.1002/jez.1402610203

Billard, R., 1992. Reproduction in rainbow trout: sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. *Aquaculture*, 100, 263-298. Doi: 10.1016/0044-8486(92)90385-X

Blickley, T.M., Matson, C.W., Vreeland, W.N., Rittschof, D., Di Giulio, R.T. and 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. Doi: 10.1016/j.aquatox.2013.12.021

Chen, Y.J., Yuan, R.M., Liu, Y.J., Yang, H.J., Liang, G.Y. and Tian, L.X., 2015. Dietary vitamin C requirement and its effects on tissue antioxidant capacity of juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *Aquaculture*, 435, 431-436. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.10.013

Ciji, A., Akhtar, M., Tripathi, P.H., Pandey, A., Rajesh, M. and Kamalam, B.S., 2021 . Dietary soy lecithin augments antioxidative defense and thermal tolerance but fails to modulate non-specific immune genes in endangered golden mahseer (*Tor putitora*) fry. *Fish & shellfish immunology*, 109, 34-40. Doi: 10.1016/j.fsi.2020.11.031

Coffman ,M.A. and Goetz, F.W., 1998. Trout ovulatory proteins are partially responsible for the anti-proteolytic activity found in trout coelomic fluid. *Biology of Reproduction*, 59, 497-502. Doi: 10.1095/biolreprod59.3.497

Dabrowski, K., Ciereszko, R., Blom, J. and Ottobre, J., 1995. Relationship between vitamin C and plasma concentrations of testosterone in female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish physiology biochemistry*, 14, 409-414. Doi: 10.1007/BF00003378

Dawood, M.A. and Koshio, S., 2016. Vitamin C supplementation to optimize growth, health and stress resistance in aquatic animals. *Reviews in Aquaculture*, Doi: 10, 334-350. DOI: 10.1111/raq.12163

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

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.10.6]

Ichthyology, 31, 3-9. Doi: 10.1111/jai.12733

Dong, J., Li, C., Dai, D., Zhang, M., Gao, Y., Li, X., Li, M., Zhang, J., Wang, X. and Zhou, C., 2021. Protective effects of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* on the survival and oxidative stress of zebrafish embryos induced by microcystin-LR. *Journal of Applied Phycology*, 33**,** 2261-2271. Doi: 10.1007/s10811-021-02448-6

Geffen, A. and Evans, J., 2000. Sperm traits and fertilization success of male and sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 182, 61-72. Doi: 10.1016/S0044-8486(99)00248-3

Goth, L., 1991. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*, 196**,** 143-151. Doi: 10.1016/0009-8981(91)90067-M

Hatef, A., Niksirat, H. and Alavi, S.M.H., 2009. Composition of ovarian fluid in endangered Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius*, and its effects on spermatozoa motility and fertilizing ability compared to freshwater and a saline medium. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35, 695-700. Doi: 10.1007/s10695-008-9302-6

Hossen, M.S., Reza, A., Rakhi, S.F., Takahashi, K. and Hossain, Z., 2014. Effect of phospholipids in broodstock diets on serum calcium level, gamete quality and spawning of threatened Bagrid catfish gulsha, *Mystus cavasius*. *International Journal of Research in Fisheries Aquaculture*, 4, 70-76. Doi: 10.37745/ijfar.15

Ibiyo, L.M.O., Atteh, L.J.O., Omotosho, J.O. & Madu, C.T. 2007. Profitability of an economic diet in practical fish farming: a case study of vitamin C inclusion in the diet of Heterobranchus longifilis fingerlings. 21st Annual Conference of the Fisheries Society of Nigeria (FISON). Calabar, Nigeria: Fisheries Society of Nigeria. URL: http://hdl.handle.net/1834/37775

Izquierdo, M., Fernandez-Palacios, H. and Tacon, A., 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, 197, 25-42. Doi: 10.1016/S0044-8486(01)00581-6

Jamali, H., Ahmadifard, N., Noori, F., Gisbert, E., Estevez, A. and Agh, N., 2019. Lecithin-enriched Artemia combined with inert diet and its effects on reproduction and digestive enzymes of *Aequidens rivulatus*. *Aquaculture*, 511, 734253. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734253

Jenabi Haghparast, R., Sarvi Moghanlou, K., Mohseni, M. and 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*

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.10.6]

immunology, 91, 50-57. Doi: 10.1016/j.fsi.2019.05.022

Johnson, S.L., Borziak, K., Kleffmann, T., Rosengrave, P., Dorus, S. and Gemmell, N.J., 2020. Ovarian fluid proteome variation associates with sperm swimming speed in an externally fertilizing fish. *Journal of Evolutionary Biology*, 33, 1783-1794. Doi: 10.1111/jeb.13717

Kazemi, E., Nazari, S., Sourinejad, I., Pourkazemi, M., Paknejad, H. and 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*, 1-20. Doi: 10.1007/s10499-021-00778-3

Khara, H., Sayyadborani, M. and Sayyadborani, M., 2016. Effects of α-tocopherol (vitamin E) and ascorbic acid (vitamin C) and their combination on growth, survival and some haematological and immunological parameters of Caspian brown trout, *Salmo Trutta Caspius* juveniles. *Turkish Journal of Fisheries Aquatic Sciences*, 16, 385-393. Doi: 10.4194/1303-2712-v16_2_18

Lim, K.C., Yusoff, F.M., Shariff, M. and Kamarudin, M.S., 2017. Astaxanthin as feed supplement in aquatic animals. *Reviews in Aquaculture*, 10**,** 738-773. Doi: 10.1111/raq.12200

Lin, Z., Qi, C., Han ,F., Chen, X., Qin, C., Wang, C., Wang, X., Qin, J. and Chen, L., 2020. Selecting suitable phospholipid source for female *Eriocheir sinensis* in pre-reproductive phase. *Aquaculture*, 528, 735610. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735610

Litvak, M.K. and Trippel, E.A., 1998. Sperm motility patterns of Atlantic cod (*Gadus morhua*) in relation to salinity: effects of ovarian fluid and egg presence. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences*, 55, 1871-1877. Doi: 10.1139/f98-093

Maneii, K., Oujifard, A., Ghasemi, A. and 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. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2019.106228

Marklund, S. and Marklund, G., 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European journal of biochemistry*, 47, 469-474. Doi: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x

Martins, G., Diogo, P., Santos, T., Cabrita, E., Pinto, W., Dias, J. and Gavaia, P.J., 2020. Microdiet formulation with phospholipid modulate zebrafish skeletal development and reproduction. *Zebrafish*, 17**,** 27-37. Doi.org/10.1089/zeb.2019.1794

Mohammed, A., Al-Suwaiegh, S. and Al-Shaheen, T., 2019. Effects of follicular fluid components on oocyte maturation and embryo development in vivo and in vitro. *Advances in Animal and Veterinary*

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.10.6]

Sciences, 7, 346-355. Doi: 10.17582/journal.aavs/2019/7.5.346.355

Mohebbi, A., Nematollahi, A., Dorcheh, E.E. and Asad, F.G., 2012. Influence of dietary garlic (*Allium sativum*) on the antioxidative status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*, 43, 1184-1193. Doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.02922.x

Myers, J., Bradford, A., Hallas, V., Lawson, L., Pitcher, T., Dunham, R. and Butts, I., 2020a. Channel catfish ovarian fluid differentially enhances blue catfish sperm performance. *Theriogenology*, 149, 62-71. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.03.022

Myers, J.N., Senior, A., Zadmajid, V., Sørensen, S.R. and Butts, I.A.E., 2020b. Associations between ovarian fluid and sperm swimming trajectories in marine and freshwater teleosts: a meta-analysis. *Reviews in Fisheries Science Aquaculture*. 28, 322-339. Doi: 10.1080/23308249.2020.1739623

Paglia, D.E. and Valentine, W.N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory Clinical Medicine*, 70, 158-169. Doi: 10.5555/uri:pii:0022214367900765

Palma, J., Andrade, J.P. and Bureau, D., 2017. The impact of dietary supplementation with astaxanthin on egg quality and growth of long snout seahorse (*Hippocampus guttulatus*) juveniles. *Aquaculture Nutrition*, 23, 304-312 .Doi: 10.1111/anu.12394

Poston, H.A., 1991. Response of Atlantic salmon fry to feed-grade lecithin and choline. *The Progressive Fish-Culturist*, 53, 224-228. Doi: 10.1577/1548-8640(1991)053<0224:ROASFT>2.3.CO;2

Ramsden, C.S., Smith, T.J., Shaw, B.J. and Handy, 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, 939-951. Doi: 10.1007/s10646-009-0357-7

Rashidian, G., Rainis, S., Prokić, M.D. and Faggio, C., 2021. Effects of different levels of carotenoids and light sources on swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) growth, survival rate and reproductive parameters. *Natural Product Research*, 35, 3675-3686. Doi: 10.1080/14786419.2020.1723091

Ribeiro, J.C., Braga, P.C., Martins, A.D., Silva, B.M., Alves, M.G. and Oliveira, P.F., 2021. Antioxidants present in reproductive tract fluids and their relevance for fertility. *Antioxidants*, 10, 1441. Doi: 10.3390/antiox10091441

Saleh, N.E., Wassef, E.A., Kamel, M.A., El-Haroun, E.R. and El-Tahan, R.A., 2021. Beneficial effects of soybean lecithin and vitamin C combination in fingerlings gilthead seabream (*Sparus aurata*) diets on; fish performance, oxidation status and genes expression responses. *Aquaculture*, 546, 737345. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737345

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.10.6]

Seyfettinoglu, S., Sahin, G., Akdogan, A., Tavmergen, E.N., Akcay, Y., Sozmen, E. and Tavmergen, E., 2022. Total antioxidant capacity and oxidative stress in follicular fluid and embryo cell culture media, their role in fertilization and embryo selection in IVF cycles. *Authorea Preprints*. Doi: 10.22541/au.164864722.23396384/v1

Sui, L.Y., Wu, X., Wille, M., Cheng, Y. and Sorgeloos, P., 2009. Effect of dietary soybean lecithin on reproductive performance of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards) Broodstock. *Aquaculture International*, 17, 45-56. Doi: 10.1007/s10499-008-9178-6

Suloma, A., Tahoun, A. and 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*, 2, 2. Doi: 10.4172/2155-9546.S2-010

Thompson, K ,.Muzinic, L., Christian, T., Webster, C., Manomaitis, L. and Rouse, D., 2003. Lecithin requirements of juvenile Australian red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture Nutrition*, 9, 223-230. Doi: 10.1046/j.1365-2095.2003.00246.x

Tizkar, B., Kazemi ,R., Alipour, A., Seidavi, A., Naseralavi, G. and Ponce-Palafox, J.T., 2015. Effects of dietary supplementation with astaxanthin and β-carotene on the semen quality of goldfish (*Carassius auratus*). *Theriogenology*, 84, 1111-1117. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.06.011

Tizkar, B., Soudagar, M., Bahmani, M., Hosseini, S.A., Chamani, M., Seidavi, A., Sühnel, S. and Ponce-Palafox, J.T., 2016. Effects of dietary astaxanthin and β-carotene on gonadosomatic and hepatosomatic indices, gonad and liver composition in goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) broodstocks. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44, 363-370. Doi: 10.3856/vol44-issue2-fulltext-17

Tocher, D.R., Bendiksen, E.Å., Campbell, P.J. and Bell, J.G., 2008. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture*, 280, 21-34. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.04.034

Turner, E. and Montgomerie, R., 2002. Ovarian fluid enhances sperm movement in Arctic charr. *Journal of Fish Biology*, 60, 1570-1579. Doi: 10.1111/j.1095-8649.2002.tb02449.x

Wang, S., He, G., Chen, M., Zuo, T., Xu, W. and Liu, X., 2017. The role of antioxidant enzymes in the ovaries. *Oxidative medicine cellular longevity*, 2017. Doi: 10.1155/2017/4371714

Wu, X., Cheng, Y., Sui, L., Zeng, C., Southgate, P.C. and 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),

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.10.6]

female broodstock. *Aquaculture*, 273, 602-613. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.09.030

Yong, A.S.K., Seoka, M., Takaoka, O., Ji, S.C., Biswas, A.K., Takii, K. and 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, 449-458. Doi: 10.11233/aquaculturesci1953.55.449

Zadmajid, V., Myers, J.N., Sørensen, S.R. and Butts, I.A.E., 2019. Ovarian fluid and its impacts on spermatozoa performance in fish: a review. *Theriogenology*, 132, 144-152. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.03.021.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.10.6]

Effects of dietary adding vitamin C, astaxanthin, and soybean lecithin on fertilization ability and antioxidant indices in the ovarian fluids of Caspian trout (*Salmo caspius*) female broodstock

Panjvini F.[1]; Sarvi Moghanlou K.[1*]; Tahmasebi R.[2]; Imani A.[1]

[*]k.sarvimoghanlou@urmia.ac.ir

1- Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.
2- Research and Department of Chromatography, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Urmia, Iran.

Abstract

In this study, the effects of dietary addition of vitamin C, astaxanthin, and lecithin on the fertility ability (percentage of fertilization and eyed-eggs) and activity of SOD, CAT and GPx in the ovarian fluids of Caspian trout (*Salmo caspius*) were investigated. For this purpose, nine different experimental diets: $C_0A_0L_0$ (0 mg kg^{-1} vitamin C, 0 mg kg^{-1} astaxanthin and 0% soybean lecithin), $C_{300}A_{50}L_0$, $C_{700}A_{100}L_0$, $C_0A_{50}L_6$, $C_{300}A_{100}L_6$, $C_{700}A_0L_6$, $C_0A_{100}L_9$, $C_{300}A_0L_9$, and $C_{700}A_{50}L_9$ were formulated and the broodstocks (2.51±0.05 kg) were fed for four months. After sexual maturation and spawning, the ovarian fluids were isolated to measure the activity of antioxidant enzymes (AAE) and to evaluate its fertilization ability. The sperm mixture of 9 male broodstocks was used to measure fertilization ability. The results showed an increase in the relative fecundity and AAE in ovarian fluid. The lowest relative fecundity (680±38 eggs per Kg of broodstock weight) and SOD, CAT, and GPx (816.33±67.60 u/ml, 1.29±0.40 nmol/min/ml and 1.06±0.08 nmol/min/ml, respectively) were observed in C0A0L0 which significantly different from other treatments (p<0.05). The highest percentage of fertilization and eyed-eggs were obtained in C300A100L6 (91.66±5.13% and 87.63±1.3%, respectively) which significantly different from the freshwater treatment (77.66±4.16% and 47.86±5.1%, respectively; p<0.05). According to the results of this research, adding of 300 mg kg^{-1} vitamin C with 100 mg kg^{-1} astaxanthin and 6% lecithin can increase the relative fecundity, fertilization ability and AAE in ovarian fluids of Caspian brown trout.

Keywords: Antioxidant enzyme, Astaxanthin, Eyed-eggs, Fertilization, Ovarian fluids, Soybean lecithin, Vitamin C

[*]Corresponding author

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.10.6]