

اثرات تغذیه با منابع مختلف مکمل روی بر تغییرات آنزیمی و یونی پلاسمای سمینال مولدین قزل آلابی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

اسماعیل کاظمی^۱، ایمان سوری نژاد^{۱*}، علیرضا قائدی^۲، سید علی جوهری^۳، زهرا قاسمی^۱

*Sourinejad@hormozgan.ac.ir

- ۱- گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
- ۲- مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج، ایران
- ۳- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۸

تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۸

چکیده

در پژوهش حاضر اثر تغذیه با منابع مختلف روی شامل فرم معدنی، آلی و نانو بر تغییرات آنزیمی و یونی پلاسمای سمینال مولدین قزل آلابی رنگین کمان بررسی گردید. تعداد ۱۰۸ قطعه مولد نر با میانگین وزنی $2138 \pm 93/45$ گرم، طی ۱۶ هفته در قالب چهار تیمار با افزودن ۴۰ میلی گرم در کیلوگرم روی معدنی (تیمار یک)، نانو ذره روی (تیمار دو)، روی آلی (تیمار سه) به جیره و در تیمار کنترل بدون افزودن مکمل روی به جیره تغذیه شدند. بر اساس یافته‌های مربوط به تأثیر جیره‌های مختلف بر آنزیم‌های پلاسمای سمینال، کمترین میزان آنزیم ALT، AST، LDH و SOD در تیمار تغذیه شده با مکمل معدنی روی بدست آمد که با تیمار کنترل که دارای بیشترین مقدار بود، اختلاف معنی‌داری داشت ($p < 0/05$). اختلاف معنی‌داری در میزان آنزیم ALP بین تیمارهای مختلف مشاهده نگردید ($p > 0/05$). میزان آنزیم‌های کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری نداشت ($p > 0/05$). در مورد تأثیر مکمل‌های مختلف روی بر ترکیبات غیر آلی پلاسمای سمینال نیز مشاهده شد که یون فسفر تحت تأثیر مکمل‌های مختلف روی قرار نگرفت ($p > 0/05$) اما مقایسه میانگین مقادیر منیزیم ($2/63 \pm 0/37$ mg/dl) و کلسیم ($7/23 \pm 0/15$ mg/dl) نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار مقادیر این یون‌ها در تیمار تغذیه شده با مکمل معدنی روی، نسبت به تیمار کنترل بود ($p < 0/05$). در مجموع، با توجه به نقش کاهشی روی معدنی در مقادیر ترانس آمینازها و نقش افزایشی آن در مقادیر ترکیبات غیرآلی منیزیم و کلسیم در پلاسمای سمینال، این ریز مغذی ضروری می‌تواند به عنوان کاندیدای مناسبی برای تحقیقات بیشتر در جهت بهبود کیفیت اسپرم مولدین نر قزل آلابی رنگین کمان از طریق افزودن به جیره غذایی در نظر گرفته شود.

واژگان کلیدی: مولد قزل آلابی رنگین کمان، جیره غذایی، روی معدنی، آنزیم‌های پلاسمای سمینال

*نویسنده مسئول

مقدمه

مواد معدنی به عنوان یکی از مهمترین اجزاء جیره غذایی آبزیان، در فعالیتهای حیاتی از جمله شکل‌گیری استخوان، نگهداری سیستم کلونیدی، تنظیم تعادل اسید-باز، عملکرد ترکیبات فعال زیستی از جمله هورمون‌ها و آنزیم‌ها و عملکرد تولید مثلی و سلامت مهم می‌باشند (محمدی و رجبی اسلامی، ۱۳۹۵؛ نظری و همکاران، ۱۳۹۶؛ Swain et al., 2016). عنصر روی، نقش مهمی در بسیاری از فعالیتهای زیستی موجودات زنده ایفاء می‌کند و به عنوان عنصر کمیاب ضروری (ریز مغذی) تعریف می‌شود. این عنصر معدنی برای رشد و متابولیسم، بهبود زخم‌ها و عملکرد سیستم ایمنی، تولید مثل و مهار رادیکال‌های آزاد اکسیژن از جمله ROS¹ در حیوانات ضروری می‌باشد (Zhao et al., 2014). نقش روی در ساختمان پروتئین‌ها نیز شناخته شده است و تعداد زیادی آنزیم جهت انجام فعالیتهای خود به این عنصر نیاز دارند. عنصر روی همچنین به عنوان ریز مغذی ضروری در تغذیه ماهیان مورد توجه قرار گرفته است و می‌تواند جهت تأمین نیازهای غذایی ماهیان به جیره اضافه گردد (Tan and Mai, 2001). Oginio (۱۹۷۸)، Watanabe و همکاران (۱۹۹۷)، NRC (۲۰۱۱) و Shahpar و Johari (۲۰۱۸)، میزان نیاز روی در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان را ۳۰-۱۵ میلی‌گرم و تا حداکثر ۱۵۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم غذا بیان کرده‌اند. ROS ها اصولاً توسط سوخت و ساز طبیعی اکسیژن سلول‌ها تولید می‌شوند و شایع‌ترین آنها که اثرات بالقوه در زیست‌شناسی تولیدمثل دارند شامل سوپراکسید آنیون، پراکسید هیدروژن، رادیکال‌های پراکسید و هیدروکسیل، رادیکال‌های آزاد نیتریک اکسید و آنیون پراکسی نیتريت می‌باشند. ROS ها می‌توانند اثرات مضر و مفیدی بر عملکرد اسپرم داشته باشند. مقدار کمی ROS توسط اسپرم‌ها در شرایط فیزیولوژیک ایجاد می‌شود که برای واکنش آکروزومی اسپرم مورد نیاز است. از سوی دیگر، ROS تولیدی توسط اسپرم‌ها و گلبول‌های سفید می‌تواند از طریق واکنش با ماکرومولکول‌های سلولی، موجب آسیب سلولی اسپرم گردد و مشخص شده که مقادیر بالای آن، رابطه منفی با حرکت و تعداد اسپرم دارد (Agarwal et al., 2006). برای حفظ هموستاز اکسیداتیو و مقابله با استرس اکسیداتیو، مولکول‌هایی به نام آنتی‌اکسیدان (از نوع آنزیمی و غیر آنزیمی) وجود دارند

¹ Reactive Oxygen Species

(Khosrowbeygi & Zarghami, 2007). وجود آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از قبیل سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوکاتایون پراکسیداز (GPx) در سلول‌های اسپرم به اثبات رسیده است (Cocchia et al., 2011). کاتالاز همراه با سوپر اکسید دیسموتاز باعث تبدیل سوپراکسید به آب و اکسیژن می‌شوند و مانع از تشکیل ROS ها از جمله رادیکال‌های فوق‌العاده سمی هیدروکسیل می‌گردند و از اسپرم در برابر اثرات مخرب رادیکال هیدروکسیل محافظت می‌نمایند (Khosrowbeygi & Zarghami, 2007).

عنصر روی در جایگاه فعال سوپر اکسید دیسموتاز، نقش ویژه‌ای بر عهده دارد و برای عملکرد مناسب این آنزیم و نقش آنتی‌اکسیدانی آن، در پلاسمای مایع سمینال در برابر ROS ها از جمله آنیون‌های سوپراکسید تولید شده توسط اسپرم‌ها و گلبول‌های سفید مورد نیاز می‌باشد. روی از میان عناصر کمیاب، ارتباط مستقیم با پارامترهای مایع سمینال دارد و در پلاسمای مایع سمینال، غشا و کروماتین اسپرم را پایدار می‌سازد و از تجزیه آنها جلوگیری می‌نماید (Thompson et al., 2002). سایر آنزیم‌ها برای ارزیابی کیفیت پلاسمای سمینال، آنزیم‌هایی نظیر گلوکاتامیک اکسلاواستیک ترانس آمیناز (AST (GOT)، گلوکاتامیک پیرووات ترانس آمیناز (ALT (GPT)، لاکتات دهیدروژناز (LDH) و آلکالین فسفاتاز (ALP) می‌باشند. آسیب به اسپرم می‌تواند باعث افزایش ورود این آنزیم‌ها به مایع اسپرمی شود که این افزایش نشان‌دهنده کاهش کیفیت پلاسمای سمینال می‌باشد (Jiang et al., 2016). مواجهه ماهی با استرس‌های زیاد در طی دوره پرورش طبیعی است و در این حالت یک آنتی‌اکسیدان مناسب می‌تواند استرس‌های اکسیداتیو را کاهش دهد و از غشای اسپرمی در برابر پراکسیداسیون چربی محافظت کند یا حتی آزاد شدن آنزیم‌هایی همچون AST، ALP و LDH را به درون پلاسمای سمینال کاهش دهد. این ترانس‌آمینازهای مایع اسپرمی، به عنوان شاخصی برای اندازه‌گیری آسیب‌های متحمل شده توسط اسپرم طی شرایط مختلف ارزیابی می‌شوند (Cocchia et al., 2011).

با توجه به مرور منابع داخلی و خارجی بنظر می‌رسد تاکنون تاثیر منابع مختلف روی بر تغییرات آنزیمی و یونی پلاسمای سمینال مولدین گونه‌های مختلف ماهیان از جمله قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار نگرفته است. در مطالعات مشابه، Jiang و همکاران (۲۰۱۶) عنوان نمودند که با افزودن روی معدنی (ZnSO₄) به جیره غذایی مولدین گونه‌ای از ماهیان

از شرکت Alltech Inc., Lexington, KY, USA (از طریق شرکت دارویی وتاک سیرجان) و روی معدنی (ZnSO₄.7H₂O) از شرکت Merck and Co., USA (از طریق شرکت دارویی وتاک سیرجان) تهیه شدند و پس از آماده‌سازی مورد استفاده قرار گرفتند. تیمارهای تحقیق حاضر عبارت بودند از مولدین نر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان که بر اساس میزان نیاز روی طبق منابع معتبر (Watanabe *et al.*, 1997; NRC, 2011)، در قالب چهار تیمار با افزودن ۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی معدنی (تیمار یک)، نانو ذره روی (تیمار دو)، روی آلی (تیمار سه) به جیره و در تیمار کنترل بدون افزودن مکمل روی به جیره تغذیه شدند.

مراحل آماده سازی غذا

فرمول جیره‌های مورد استفاده در پژوهش، بر اساس جداول ۱ و ۲ تنظیم شد. مواد اولیه جیره از شرکت فیدار پاتیرا واقع در شهرکرد تهیه شد و جیره با قطر ۸ میلی‌متر و طی مراحل استاندارد تولید شد. بدین صورت که مواد اولیه به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه Single shaft Mixer شرکت آتیه سازان نگین فراژ در دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد به صورت یکنواخت مخلوط شدند. سپس وارد مرحله پخت و خشک شدن گردیدند و در نهایت به صورت اکستروود درآمدند. میزان نهایی روی در جیره‌های غذایی ساخته شده از طریق روش طیف سنجی جذب اتمی تعیین شد (جدول ۳). ترکیب تقریبی جیره پایه نیز بر اساس درصد ماده خشک به صورت پروتئین خام ۴۵/۱±۰/۵ درصد، چربی خام ۱۲±۰/۲ درصد، خاکستر ۹/۶±۰/۱ درصد و رطوبت ۱۲/۸±۰/۲ درصد بدست آمد.

جمع‌آوری اسپرم

نمونه‌گیری اسپرم از ماهیان مولد نر قزل‌آلای رنگین‌کمان در پایان دوره ۱۶ هفته‌ای آزمایش انجام شد. ابتدا از هر تیمار شش ماهی به صورت تصادفی صید و به صورت جداگانه در محلول پودر گل میخک (۱۵۰ ppm) بیهوش شدند و در مجموع از هر کدام از ماهیان صید شده حدود ۱۵ میلی‌لیتر اسپرم جمع‌آوری گردید. اسپرم‌های جمع‌آوری شده در سانتریفیوژ با دور ۱۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند تا مایع سمینال آن‌ها جداسازی شود (Lahnsteiner *et al.*, 1998). مایع سمینال به فریزر ۸۰- منتقل شد و پس از انجماد به منظور انجام آنالیزهای مورد نظر به آزمایشگاه فرستاده شد.

سیم (*Megalobrama amblycephal*)، پارامترهای مربوط به تحرک اسپرم به طور مثبتی تحت تأثیر قرار گرفت. در ماهی تیلاپپای نیل (*Oreochromis niloticus*) افزودن ۱۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم سولفات روی به جیره مولدین باعث بهبود پارامترهای تولیدمثلی از جمله میزان همآوری، میزان تفریح لارو و تحرک اسپرم شد (Gammanpila *et al.*, 2007). بررسی نقش روی طی اسپرماتوژنز مارماهی ژاپنی (*Anguilla japonica*) نیز نشان داد که روی برای نگهداری سلول‌های جنسی، تکمیل اسپرماتوژنز و تنظیم تحرک اسپرم ضروری است (Yamaguchi *et al.*, 2009). با توجه به نقش عنصر روی در تولید مثل ماهیان و محدود بودن مطالعات در این زمینه و تفاوت در ماهیت و دسترسی زیستی به منابع مختلف روی (معدنی، نانو و آلی) که دارای عملکردهای مختلفی می‌باشند، در پژوهش حاضر سعی شد تا تأثیر مصرف فرم‌های مختلف روی معدنی، نانو و آلی به همراه جیره غذایی بر تغییرات آنزیمی و یونی پلاسمای سمینال مولدین ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش کار

تهیه مولدین و آماده سازی استخرها

به منظور انجام این پژوهش، تعداد ۱۰۸ قطعه مولد نر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج با میانگین وزنی ۲۱۳۸±۹۳/۴۵ گرم و طولی ۴۹/۲۷±۶/۸ سانتی‌متر تهیه شد. مولدین در قالب ۴ تیمار و هر تیمار با ۳ تکرار در ۱۲ استخر به تعداد ۹ قطعه در هر استخر ذخیره‌سازی شدند. آزمایش به مدت ۱۶ هفته و غذایی به صورت روزانه به میزان یک درصد وزن بدن در دو نوبت در ساعات ۸ و ۱۶ انجام گرفت. آب مورد استفاده با دمای حدود ۱۱±۰/۶ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۸±۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و pH ۷/۵۷±۰/۳ با دی ۶ لیتر در ثانیه از چشمه تأمین گردید. قبل از شروع آزمایش، تغذیه ماهیان به مدت یک هفته با جیره اکستروود ساخت کارخانه "کیمیاگران تغذیه" به منظور سازش‌پذیری انجام شد.

تیماربندی مولدین

نانوذرات اکسید روی (ZnO-NPs) با اندازه ۱۰-۳۰ نانومتر و خلوص بیش از ۹۹ درصد از شرکت Research Nanomaterials Co., USA (از طریق شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان)، روی آلی (Zn-proteinate, BioPlex Zinc)

جدول ۱: اجزای تشکیل دهنده جیره مولدین قزل آلابی رنگین کمان در پژوهش حاضر

Table 1: Ingredients of feed for rainbow trout broodstocks in the present study.

اجزای جیره (درصد)	تیمار (۱) تغذیه شده با روی معدنی	تیمار (۲) تغذیه شده با نانو ذره روی	تیمار (۳) تغذیه شده با روی آلی	تیمار (۴) تغذیه شده با غذای فاقد روی (کنترل)
آرد ماهی	۳۸/۶	۳۸/۶	۳۸/۶	۳۸/۶
کنجاله سویا	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵
آرد گندم	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵
روغن گیاهی	۸	۸	۸	۸
توکسین بایندر	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱
مخمر	۲	۲	۲	۲
نمک	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۳
پرمیکس	۱	۱	۱	۱

جدول ۲: پرمیکس استفاده شده در جیره مولدین قزل آلابی رنگین کمان ساخت شرکت داروسازی وتاک (سیرجان، ایران) شامل مکمل معدنی و ویتامینه: (در هر یک کیلوگرم) به نسبت یک درصد جیره

Table 2: The premix used in the ration of rainbow trout broodstocks produced by Vetac pharmaceutical Co. (Sirjan, Iran) including mineral and vitamin supplement: (per kg equal to 1% of ration).

اجزای مکمل معدنی و ویتامینه	تیمار (۱) تغذیه شده با روی معدنی افزودنی	تیمار (۲) تغذیه شده با نانو ذره روی افزودنی	تیمار (۳) تغذیه شده با روی آلی افزودنی	تیمار (۴) تغذیه شده با غذای فاقد روی افزودنی (کنترل)
ویتامین A	۱۲۰۰۰۰۰ IU	۱۲۰۰۰۰۰ IU	۱۲۰۰۰۰۰ IU	۱۲۰۰۰۰۰ IU
ویتامین D	۴۰۰۰۰۰ IU	۴۰۰۰۰۰ IU	۴۰۰۰۰۰ IU	۴۰۰۰۰۰ IU
ویتامین K	۰/۸ گرم	۰/۸ گرم	۰/۸ گرم	۰/۸ گرم
ویتامین E	۵۰ گرم	۵۰ گرم	۵۰ گرم	۵۰ گرم
ویتامین C	۳۰ گرم	۳۰ گرم	۳۰ گرم	۳۰ گرم
تیامین	۲/۵ گرم	۲/۵ گرم	۲/۵ گرم	۲/۵ گرم
ریبوفلاوین	۴ گرم	۴ گرم	۴ گرم	۴ گرم
پیروکسیدین	۲/۵ گرم	۲/۵ گرم	۲/۵ گرم	۲/۵ گرم
اسید فولیک	۱/۶ گرم	۱/۶ گرم	۱/۶ گرم	۱/۶ گرم
پانتوتنیک اسید	۹ گرم	۹ گرم	۹ گرم	۹ گرم
نیاسین	۴۰ گرم	۴۰ گرم	۴۰ گرم	۴۰ گرم
سولفات منگنز	۲/۶ گرم	۲/۶ گرم	۲/۶ گرم	۲/۶ گرم
یدید پتاسیم	۰/۲ گرم	۰/۲ گرم	۰/۲ گرم	۰/۲ گرم
سولفات آهن	۴ گرم	۴ گرم	۴ گرم	۴ گرم
سولفات روی ZnSO ₄	۸/۶۷ گرم	-	-	-
نانو اکسید روی ZnO- NP	-	۵ گرم	-	-
روی آلی BioPlex Zinc	-	-	۲۰ گرم	-
سولفات مس	۰/۶ گرم	۰/۶ گرم	۰/۶ گرم	۰/۶ گرم
سولفات کبالت	۵۰ میلی گرم	۵۰ میلی گرم	۵۰ میلی گرم	۵۰ میلی گرم
آنتی اکسیدانت	۵ گرم	۵ گرم	۵ گرم	۵ گرم
سلنیوم	۵۰ میلی گرم	۵۰ میلی گرم	۵۰ میلی گرم	۵۰ میلی گرم

جدول ۳: میزان نهایی روی در جیره های غذایی ساخته شده برای مولدین قزل آلاهی رنگین کمان

Table 3: Final amount of zinc in produced rations for rainbow trout broodstocks.

میزان نهایی روی در جیره (میلی گرم/کیلوگرم)	میزان افزودن روی به جیره (میلی گرم/کیلوگرم)	تیمار/منبع روی
۶۵/۳۹±۰/۲۷	-	کنترل
۹۹/۵۲±۰/۸۴	۴۰	سولفات روی
۸۱/۴۷±۲/۱۷	۴۰	نانوذرات اکسید روی
۹۶/۲۳±۰/۷۵	۴۰	روی آلی BioPlex Zinc

سنجش آنزیم‌های پلاسمای سمینال

برای سنجش آنزیم لاکتات دهیدروژناز از روش Babson و Babson (۱۹۷۳) و تبدیل پیرووات به لاکتات استفاده شد. این آزمایش با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون (کرج، ایران) انجام شد و مقدار آنزیم در نمونه‌ها با دستگاه اتوآنالایزر و در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای سنجش آنزیم آلکالین فسفاتاز از روش King و Kind (۱۹۵۴) بر اساس تبدیل نیتروفیل فسفات به فسفات استفاده شد. برای سنجش آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از روش Marklund و Marklund (۱۹۷۴)، سنجش آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز (بر اساس تبدیل آسپارات به گلوتامات و در نهایت به مالات) و آلانین آمینوترانسفراز از روش Frankel و Reitman (۱۹۵۷) با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون (کرج، ایران) انجام شد و نمونه‌ها با دستگاه اتوآنالایزر و در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شدند و برای اندازه‌گیری کاتالاز از روش Goth (۱۹۹۱) استفاده شد.

اندازه‌گیری ترکیبات غیر آلی پلاسمای سمینال

اندازه‌گیری منیزیم به صورت Endpoint و به روش فتومتری با استفاده از Xylidyl Blue انجام شد (Ehrhardt and Paschen, 1992). فسفر بوسیله دستگاه بیوشیمی آنالایزر با استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی پارس آزمون به روش فتومتری UV-test در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید (Burtis et al., 2012). برای سنجش کلسیم از روش Endpoint /Cresolphthalein complexone استفاده شد. بر اساس این روش یون‌های کلسیم در محیط قلیایی با کروزل فتالین کمپلکسون رنگ ارغوانی ایجاد می‌کنند. شدت رنگ حاصله متناسب با مقدار کلسیم موجود در نمونه است که در طول موج ۵۵۰-۵۸۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری است. این آنالیز با استفاده از کیت شرکت زیست شیمی (تهران، ایران) انجام شد.

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت. قبل از تجزیه و تحلیل، نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov و همگنی واریانس با آزمون Leven ارزیابی شد. نتایج حاصل از تیمارهای مختلف پس از اطمینان از برقراری پیش شرط‌های لازم، با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه بررسی شد و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون Duncan در سطح اعتماد ۹۵ درصد استفاده گردید. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شد.

نتایج

اثر تیمارهای مختلف غذایی بر آنزیم‌های پلاسمای سمینال

با توجه به نتایج، آنزیم‌های ALT و AST در پلاسمای مایع اسپرمی تیمارهای مختلف اختلاف معنی داری را نشان داده‌اند ($p < 0.05$) (جدول ۴). کمترین میزان ALT در تیمار تغذیه شده با مکمل معدنی روی مشاهده شد که با تیمار نانو و کنترل اختلاف معنی‌داری نشان داد. بیشترین میزان آنزیم AST در تیمار کنترل با میزان $9/4 \pm 1/60$ بود که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت ($p < 0.05$). اختلاف معنی‌داری در میزان آنزیم ALP بین تیمارهای مختلف مشاهده نگردید ($p > 0.05$). مقادیر آنزیم LDH در بین تیمارها اختلاف معنی داری را نشان داد بطوریکه تیمار تغذیه شده با مکمل معدنی روی با میزان $55/96 \pm 5/96$ کمترین و تیمار کنترل با میزان $86/26 \pm 8/61$ دارای بیشترین مقدار بودند. اختلاف معنی‌داری در میزان آنزیم‌های CAT (کاتالاز) و GSH (گلوکوتاتیون پراکسیداز) در بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد ($p > 0.05$). اختلاف مقادیر آنزیم SOD در بین تیمارهای مختلف معنی‌دار بود ($p < 0.05$) (جدول ۴).

جدول ۴: مقایسه میانگین و انحراف معیار مقادیر آنزیم‌های پلاسمای سمینال مولدین قزل آلاهی رنگین کمان در تیمارهای مختلف

Table 4: Comparison of mean±SD amounts of seminal plasma enzymes of rainbow trout broodstocks in different treatments.

تیمار (۱) تغذیه	تیمار (۲) تغذیه	تیمار (۳) تغذیه	تیمار (۴) تغذیه شده	آنزیم‌ها
شده با روی	شده با نانو ذره	شده با روی آلی	با غذای فاقد روی	
معدنی افزودنی	روی افزودنی	افزودنی	افزودنی (کنترل)	
۱/۶۶±۰/۳ ^a	۵/۴۶±۱/۷۲ ^b	۱/۷۰±۰/۱ ^a	۱۲/۱۰±۲/۳۶ ^c	ALT (U/l)
۱/۶۶±۰/۳ ^a	۴/۸۳±۱/۰۵ ^b	۱/۷۶±۰/۱۵ ^a	۹/۴±۱/۶۰ ^c	AST (U/l)
۱۲/۵±۴/۳۰ ^a	۱۰/۷±۵/۰۲ ^a	۹/۶۰±۲/۰۸ ^a	۹/۱۳±۰/۹۵ ^a	ALP (U/l)
۵۵/۹۶±۵/۹۶ ^a	۶۵/۸۶±۷/۳۸ ^a	۵۶/۹۰±۶/۳۵ ^a	۸۶/۲۶±۸/۶۱ ^b	LDH (U/l)
۰/۷۸±۰/۰۰۵ ^a	۰/۷۹±۰/۰۰۵ ^a	۰/۷۹±۰/۰۱ ^a	۰/۷۹±۰/۰۲ ^a	CAT (mmol/mp)
۱۲/۰۶±۰/۷۰ ^a	۱۲/۳۳±۰/۴۱ ^a	۱۲/۱۰±۰/۲۶ ^a	۱۲/۷۳±۰/۶۶ ^a	GSH (mmol/mp)
۱/۳۰±۰/۱۷ ^a	۱/۵۳±۰/۰۵ ^{ab}	۱/۵۱±۰/۱۸ ^{ab}	۱/۶۰±۰/۱۴ ^b	SOD (mmol/mp)

حروف غیرهمسان در هر سطر نشانه اختلاف معنی‌دار است ($p < 0.05$).

اثر تیمارهای مختلف غذایی بر یون‌های پلاسمای سمینال

مقادیر پارامترهای ترکیبات غیر آلی پلاسمای مایع اسپرمی در جدول ۵ ارائه شده است. یون فسفر تحت تأثیر مکمل‌های مختلف روی قرار نگرفت و اختلاف معنی‌داری بین هیچ یک از

تیمارها مشاهده نگردید ($p > 0.05$). مقایسه میانگین مقادیر منیزیم و کلسیم در بین تیمارهای مختلف نشان دهنده افزایش معنی‌دار مقادیر یون‌های مذکور در تیمار تغذیه شده با مکمل معدنی روی نسبت به سایر تیمارها بود ($p < 0.05$).

جدول ۵. مقایسه میانگین و انحراف معیار مقادیر یون‌های پلاسمای سمینال مولدین قزل آلاهی رنگین کمان در تیمارهای مختلف

Table 5: Comparison of mean±SD amounts of seminal plasma ions of rainbow trout broodstocks in different treatments.

تیمار (۱) تغذیه	تیمار (۲) تغذیه	تیمار (۳) تغذیه	تیمار (۴) تغذیه شده	یون‌ها
شده با روی	شده با نانو ذره	شده با روی آلی	با غذای فاقد روی	
معدنی افزودنی	روی افزودنی	افزودنی	افزودنی (کنترل)	
۲/۶۳±۰/۳۷ ^b	۲/۲۶±۰/۳۷ ^{ab}	۲/۴۳±۰/۱۵ ^{ab}	۱/۹۰±۰/۱۰ ^a	منیزیم (mg/dl)
۲/۳۰±۰/۶۹ ^a	۱/۸۳±۰/۷۳ ^a	۲/۱۰±۱/۰۵ ^a	۲/۰۳±۱/۳۰ ^a	فسفر (mg/dl)
۷/۲۳±۰/۱۵ ^b	۶/۳۰±۰/۴۵ ^a	۶/۰۳±۰/۳۲ ^a	۵/۷۳±۰/۱۵ ^a	کلسیم (mg/dl)

حروف غیرهمسان در هر سطر نشانه اختلاف معنی‌دار است ($p < 0.05$).

بحث

فاکتورهای زیستی و غیر زیستی که در مزارع تکثیر و پرورش ماهی بر کیفیت اسپرم اثر می‌گذارند، متنوع هستند و این کیفیت بستگی به اثر متقابل بین ژنتیک، فاکتورهای فیزیولوژیک و محیطی دارد (Rurangwa et al., 2004). با توجه به مقدار و فرم شیمیایی، عنصر روی می‌تواند به عنوان ماده مغذی، آنتی اکسیدان و حتی به عنوان ماده سمی عمل نماید. بنابراین، منابع مختلف روی دارای عملکردهای مختلفی می‌باشند (Lin et al., 2013). منابع روی غیر آلی یا معدنی شامل انواع نمک‌های شیمیایی حاوی این عنصر همچون اکسید

روی (ZnO)، کلرید روی (ZnCl₂) و سولفات روی (ZnSO₄) می‌باشند که همگی در ساخت جیره‌های غذایی آبزیان قابل استفاده‌اند. منابع مختلفی از روی آلی نیز در مطالعات مختلف به عنوان ماده افزودنی به جیره آبزیان مورد بررسی قرار گرفته‌اند که شامل مخلوطی از آمینو اسیدکیلات یا کمپلکس با روی (Zn-AA)، روی متیونین، روی لایزین، روی کلوکونات، روی استات، روی پیکولینات، روی پروپیونات و روی پروتئیناز می‌باشند (Maage et al., 2001; Apines et al., 2001; Kucukbay et al., 2006). در مطالعات مختلف نشان داده شده است که اثرات منابع آلی و معدنی روی بر عملکرد رشد

موجودات متفاوت است (Zhao et al., 2014). اگرچه نتایج بیشتر این پژوهش‌ها نشان داده است که میزان دسترسی زیستی به روی آلی بیش از روی معدنی است. اما کاربرد روی آلی در جیره حیوانات به علت بالا بودن هزینه آن محدود است. از آنجایی که قابلیت استفاده از روی غیر آلی کم است، به منظور پاسخ‌گویی به نیاز حیوانات، غلظت افزوده شده آن ۳۰-۲۰ برابر بیش از نیاز طبیعی حیوانات است (Bratz et al., 2013).

بر اساس مطالعات گذشته، روی یک عنصر حیاتی آنتی‌اکسیدانی جهت حفظ خصوصیات اسپرم است و نقش مهم و محافظت‌کننده‌ای در برابر رادیکال‌های آزاد دارد و در دستگاه تولید مثل سبب تقویت اسپرماتوزنز، بلوغ اسپرم و حفظ اپی‌تلیوم زاینده می‌گردد (Thompson et al., 2002; Yamaguchi et al., 2009). نتایج پژوهش حاضر بیشترین تأثیر مکمل‌های روی بر آنزیم‌های پلاسمای سمینال مولدین نر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را در تیمار تغذیه شده با مکمل معدنی روی نشان داد. مقادیر آنزیم‌های ALT، AST، LDH و SOD در پلاسمای اسپرمی ماهیان تغذیه شده با مکمل معدنی نسبت به تیمار کنترل کاهش یافت. این امر می‌تواند به نقش آنتی‌اکسیدانی روی جهت افزایش کیفیت اسپرم از طریق کاهش خطرات ناشی از رادیکال‌های آزاد و ممانعت آن از پراکسیداسیون غشاء فسفولیپیدی تحت شرایط مختلف پراکسیداسیون از طریق مکانیسم تولید نیتریک اکساید، اشاره نماید. این مکانیزم از تمامیت ساختار و عملکرد اسپرم‌ها محافظت می‌کند و با کاهش پراکسیداسیون لیپیدی، منجر به کاهش اسپرم‌های غیرطبیعی در طول ذخیره سازی می‌شود و بقا و سلامتی اسپرم را طولانی می‌کند (Roca et al., 2005). آنزیم‌های AST و LDH به عنوان آنزیم‌هایی که از سلول‌های آسیب دیده خارج می‌شوند، در نظر گرفته می‌شوند. بنابراین، افزایش سطح آنها در مایع اسپرمی می‌تواند کاهش کیفیت پلاسمای سمینال را نشان دهد. فعالیت خارج سلولی این ترانس آمینازها به دلیل نشت آنها به درون مایع اسپرمی ناشی از آسیب به اسپرم است. بنابراین، ترانس آمینازهای مایع اسپرمی به عنوان شاخصی برای اندازه گیری آسیب‌های متحمل شده توسط اسپرم طی شرایط مختلف ارزیابی می‌شوند (Cocchia et al., 2011). آسیب اسپرم از طریق استرس اکسیداتیوی، منجر به نفوذپذیری غشاء نسبت به آنزیم‌ها و سایر مواد، تخریب غشا و غیر فعال شدن آن در نتیجه خروج مواد از آن می‌شود. بنابراین، فعالیت متابولیک اسپرم کاهش می‌یابد (Lahnsteiner

- Agarwal, A., Gupta, S. and Sikka, S., 2006.** The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 18: 325-332. DOI: 10.1097/01.gco.0000193003.58158.4e.
- Apines, M.J., Satoh, S., Kiron, V., Watanabe, T., Nasu, N. and Fujita, S., 2001.** Bioavailability of amino acids chelated and glass embedded zinc to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Aquaculture Nutrition*, 7: 221-228. DOI: 10.1046/j.1365-2095.2001.00178.x.
- Babson, A.L. and Babson, S.R., 1973.** Kinetic colorimetric measurement of serum lactate dehydrogenase activity. *Clinical Chemistry*, 19: 766-769.
- Bratz, K., Gözl, G., Riedel, C., Janczyk, P., Nöckler, K. and Alter, T., 2013.** Inhibitory effect of high-dosage zinc oxide dietary supplementation on *Campylobacter coli* excretion in weaned piglets. *Journal of Applied Microbiology*, 115(5): 1194-1202. DOI: 10.1111/am.12307.
- Burtis, C., Ashwood, E. and Bruns, D., 2012.** Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 5th Edition ed. Elsevier.
- Cocchia, N., Pasolini, M.P., Mancini, R., Petrazzuolo, O., Cristofaro, I., Rosapane, I., Sica, A., Tortora, G., Lorizio, R., Paraggio, G. and Mancini, A., 2011.** Effect of sod (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 75: 1201-1210. DOI: 10.1016/j.theriogenology.
- Ehrhardt, V., Appel, W. and Paschen, K., 1992.** Evakuierung eines Xylidyl-Blau- Reagenz zur Bestimmung von Magnesium. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 104: 5-11.
- بازگوکننده نقش مهم و کلیدی یون منیزیم در شروع فعالیت حرکت اسپرم ماهیان استخوانی است.
- با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، به خصوص افزایش میزان کاتیون‌های منیزیم و کلسیم در پلاسماهای سمینال ماهیان تیمار تغذیه شده با فرم معدنی مکمل روی که نقش موثری در مهار اثر بازدارندگی پتاسیم دارد و می‌تواند تأثیر مهمی بر شروع تحرک، مدت زمان تحرک، سرعت حرکت و درصد اسپرم‌های متحرک داشته باشد، افزودن این فرم از مکمل روی به جیره غذایی ماهیان مولد قزل آلا رنگین کمان جهت اثر بخشی بر کیفیت اسپرم و در نتیجه بهبود راندمان تکثیر قابل پیشنهاد می‌باشد. در مجموع، بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر می‌توان عنوان نمود که مکمل‌های حاوی ماده روی در جیره غذایی مولدین نر ماهی قزل آلا رنگین کمان می‌توانند پارامترهای آنزیمی و یونی پلاسماهای سمینال را در این ماهی تحت تأثیر قرار دهند. در این میان بنظر می‌رسد مکمل‌های حاوی فرم معدنی عنصر روی قادرند با دارا بودن خواص آنتی اکسیدانی، سلامت سلول‌های اسپرم را بالا ببرند و سبب افزایش کارایی اسپرم شوند که البته با توجه به جدید بودن موضوع، اثبات کامل این فرضیه نیازمند ادامه تحقیقات در مطالعات آینده می‌باشد.
- ### تشکر و قدردانی
- از ریاست و کارشناسان محترم مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج و شرکت داروسازی و تاک سیرجان کرمان به دلیل فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی و مشارکت‌های فکری و فنی سپاسگزاری می‌گردد.
- ### منابع
- محمدی، ز. و رجبی اسلامی، ه. ۱۳۹۵. تاثیر مکمل معدنی نانوذره اکسید منگنز بر عملکرد رشد و یاخته های خونی بچه ماهی انگشت قد قزل آلا رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792). مجله علمی شیلات ایران، ۲۵ (۳): ۱۹۹-۲۱۵.
- نظری، ک.، شمسایی مهرجان، م.، ایلا، ن.، شریف پور، ع. و کمالی، ا. ۱۳۹۶. اثرات سلنیوم آلی و معدنی بر عوامل رشد، پارامترهای خونی و ایمنی شناسی بچه ماهیان قزل آلا رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۶ (۳): ۱۳۸-۱۲۹.

- Gammanpila, M., Yakupitiyage, A. and Bart, A., 2007.** Evaluation of the effects of dietary vitamin C, E and Zinc supplementation on reproductive performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Sri Lanka Journal of Aquatic Sciences*, 12: 39-60. DOI: 10.4038/sljas.v12i0.2213.
- Goth, L., 1991.** A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*, 196(2-3): 143-151.
- He, S. and Jenkins, K., 2004.** Activation of sperm motility in striped bass via a CAMP-independent pathway. *Theriogenology*, 61: 1487-1498. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2003.8.015.
- Jiang, M., Wu, F., Huang, F., Wen, H., Liu, W., Tian, J., Yang, C. and Wang, W., 2016.** Effects of dietary Zn on growth performance, antioxidant responses, and sperm motility of adult blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*. *Aquaculture*, 464: 121-128. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2016.06.025.
- Khosrowbeygi, A. and Zarghami, N., 2007.** Levels of oxidative stress biomarkers in seminal plasma and their relationship with seminal parameters. *BMC Clinical Pathology*, 7: 6. DOI: 10.1186/1472-6890-7-6.
- Kind, P. and King, E., 1954.** Estimation of plasma phosphatase by determination of hydrolysed phenol with amino-antipyrine. *Journal of Clinical Pathology*, 7: 322.
- Kucukbay, Z., Yazlak, H., Sahin, N. and Tuzcu, M., 2006.** Zinc picolinate supplementation decreases oxidative stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 257: 465-469. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2006.03.005.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T. and Patzner, R.A., 1998.** Evaluation of semen quality of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by sperm motility, seminal plasma parameters and spermatozoa metabolism. *Aquaculture*, 163(1-2): 163-181. DOI: 10.1016/S0044-8486(98)00243-9.
- Lin, S., Lin, X., Yang, Y., Li, F. and Luo, L., 2013.** Comparison of chelated zinc and zinc sulfate as zinc sources for growth and immune response of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 406-407: 79-84. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2013.04.026.
- Maage, A., Julshamn, K. and Berge, G.E., 2001.** Zinc gluconate and zinc sulphate as dietary zinc sources for Atlantic salmon. *Aquaculture Nutrition*, 7: 183-187. DOI: 10.1046/j.1365-2095.2001.00170.x.
- 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.
- Morita, M., Fujinoki, M. and Okuno, M., 2005.** K⁺-independent initiation of motility in chum salmon sperm treated with an organic alcohol, glycerol. *Journal of Experimental Biology*, 208: 4549-4556. DOI: 10.1242/jeb.01921.
- NRC, 2011.** Nutrient Requirement of Fish and Shrimp, National Research Council, Washington, DC, USA, 77.
- Ogino, C. and GY, Y., 1978.** Requirement of rainbow trout for dietary zinc. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, 44: 1015-1018.
- Reitman, S. and Frankel, S., 1957.** A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *American Journal of Clinical Pathology*, 28: 56-63.

- Roca, J., Rodri'Guez, M.J., Gil, M.A., Carvajal, G., Garcia, E.M., Cuello, C., Vazquez, J.M. and Martinez, E.A., 2005.** Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *Journal of Andrology*, 26(1): 15-24.
- Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollevier, F. and Nash, J.P., 2004.** The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 234: 1-28. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2003.12.006.
- Shahpar, Z. and Johari, S.A., 2018.** Effects of Dietary Organic, Inorganic, and Nanoparticulate Zinc on Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* Larvae. *Biological Trace Element Research*, DOI: 10.1007/s12011-018-1563-z.
- Swain, P.S., Rao, S.B.N., Rajendran, D., Dominic, G. and Selvaraju, S., 2016.** Nano zinc, an alternative to conventional zinc as animal feed supplement: A review. *Animal Nutrition*, 2(3): 134-141. DOI: 10.1016/j.aninu.2016.06.003.
- Tabares, J., Rufz, T., Arboleda, L. and Olivera, M., 2007.** Effect of some ions on sperm activation in Brycon henni (Eigenmann 1913). *Acta Biológica Colombiana*, 12(1): 87-98.
- Tan, B. and Mai, K., 2001.** Zinc methionine and zinc sulfate as sources of dietary zinc for juvenile abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. *Aquaculture*, 192(1): 67-84. DOI: 10.1016/S0044-8486(00)00435-X.
- Thompson, E.D., Mayer, G.D., Walsh, P.J. and Hogstrand, C., 2002.** Sexual maturation and reproductive zinc physiology in the female squirrelfish. *The Journal of Experimental Biology*, 205: 3367-3376.
- Watanabe, T., Kiron, V. and Satoh, S., 1997.** Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture*, 151(1-4): 185-207. DOI: 10.1016/S0044-8486(96)01503-7.
- Yamaguchi, S., Miura, C., Kikuchi, K., Celino, F.T., Agusa, T., Tanabe, S. and Miura, T., 2009.** Zinc is an essential trace element for spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(26): 10859-10864. DOI: 10.1073/pnas.0900602106.
- Zhao, C.Y., Tan, S.X., Xiao, X.Y., Qiu, X.S., Pan, J.Q. and Tang, Z.X., 2014.** Effects of dietary zinc oxide nanoparticles on growth performance and antioxidative status in broilers. *Biological Trace Element Research*, 160(3): 361-367. DOI: 10.1007/s12011-014-0052-2.

Effects of feeding with different sources of zinc supplements on seminal plasma enzymatic and ionic changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) broodstock males

Kazemi E.¹; Sourinejad I.^{1*}; Ghaedi A.R.²; Johar S.A.³; Ghasemi Z.¹

*sourinejad@hormozgan.ac.ir

1-Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

2 Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran

3 -Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

Abstract

In the present study, the effects of feeding with different sources of zinc supplements including mineral, nanoparticulate, and organic forms on the enzymatic and ionic changes of seminal plasma in rainbow trout broodstocks were investigated. A total of 108 broodstock males with mean weight of 2138 ± 93.45 g were fed during 16 weeks in four treatments with adding 40 mg. kg^{-1} of 1. Mineral zinc supplement, 2. Zinc nanoparticles supplement, 3. Organic zinc supplement, 4. Broodstocks fed with control diet with no adding of zinc supplement. According to the findings related to the effect of different rations on seminal plasma enzymes, the lowest levels of ALT, AST, LDH and SOD enzymes were recorded in fish fed with mineral zinc supplement. These values were significantly different compared to the control with the highest levels ($p < 0.05$). There was no significant difference in ALP value between different treatments ($p > 0.05$). Catalase and glutathione peroxidase enzyme values were not significantly different between treatments ($p > 0.05$). Regarding the effect of different zinc supplements on inorganic compounds of seminal plasma, it was observed that the phosphor ion was not affected by these supplements ($p > 0.05$) but a comparison between magnesium and calcium mean values (2.63 ± 0.37 mg/dl and 7.23 ± 0.15 mg/dl, respectively) in different treatments indicated a significant increase of these ion values in fish fed with mineral zinc supplement compared to the control ($p < 0.05$). In conclusion, regarding the decreasing effect of mineral zinc on the transaminases values and its increasing effect on the inorganic compounds values of magnesium and calcium in seminal plasma, this essential micronutrient could be considered and further investigated as an appropriate dietary supplement for improving the sperm quality of rainbow trout male broodstock.

Keywords: Rainbow trout broodstock, Food ration, Mineral zinc, Seminal plasma enzymes

*Corresponding author