بررسی ذخیره ویتامین‌های A و E در تخم مولدین قزل‌آلای‌رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) تحت تأثیر سطوح مختلف آستاگزانتین مصنوعی و جلبکی (*Haematococcus pluvialis*)

مرتضی علیزاده[1*]، محمد حسین خانجانی[2]، راضیه انصاری[3]، احمد رفیعی‌پور[2]

[*] alizadeh47@yahoo.com

۱- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران ،صندوق پستی ١٤٩٦٥/١٤٩

۲- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، کرمان، ایران

۳- مزرعه پرورش قزل آلای نگین زاگرس، یاسوج

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۵

چکیده

در تحقیق حاضر، ذخیره ویتامین‌های A و E موجود در تخم مولدین قزل‌آلای رنگین‌کمان از طریق افزودن سطوح مختلف آستاگزانتین با دو منبع مصنوعی و طبیعی (*Haematococcus pluvialis*) به جیره غذایی مولدین به مدت ۱۲۰ روز مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، آستاگزانتین مصنوعی در سه سطح ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم غذا و آستاگزانتین طبیعی با خلوص ۱/۵٪ آستاگزانتین در وزن خشک، هم سطح با منبع مصنوعی به ترتیب به مقدار ۲/۶۷، ۵/۳۳ و ۸ گرم بر کیلوگرم غذا مورد استفاده قرار گرفت. بدین ترتیب هفت جیره آزمایشی شامل شش تیمار سطوح و منابع مختلف آستاگزانتین (T1-T6) و یک گروه شاهد (بدون آستاگزانتین، T۰) در نظر گرفته شد. تخم استحصالی از مولدین از نظر محتوی ویتامین‌های A و E مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت. بیشترین مقدار ویتامین A (۲۲/۵۱ ng ±۲۸۰/۸۸) مربوط به تیمار ۲ (۸۰٪ آستاگزانتین طبیعی) و کمترین مقدار (۱۲/۷۱ ng ±۱۴۷/۸۲) در تیمار شاهد (بدون آستاگزانتین) به دست آمد. بیشترین مقدار ویتامین E (۲/۹۲ µg ±۱۹/۷۱) مربوط به تیمار ۳ (۱۲۰٪ آستاگزانتین جلبکی) و کمترین مقدار (۰/۵۱ µg ±۵/۲۷) در تیمار شاهد (بدون آستاگزانتین) مشاهده شد. با افزایش سطح آستاگزانتین از هر دو منبع جلبکی و مصنوعی، میزان ویتامین E ذخیره شده در تخم استحصالی افزایش یافت که نشان دهنده تأثیر مثبت آستاگرانتین بر مقدار ویتامین E ذخیره شده بر تخم می‌باشد. نتایج همچنین نشان داد که آستاگزانتین جلبکی در هر سه سطح مورد آزمایش، عملکرد بهتری نسبت به آستاگزانتین مصنوعی با سطوح مشابه داشته است. در مجموع مطالعه حاضر نشان داد که تغذیه مولدین بر کیفیت ذخیره تخم تأثیر می‌گذارد بطوری که افزودن آستاگزانتین (طبیعی و مصنوعی) به جیره سبب بهبود ذخیره ویتامین‌های A و E در تخم می‌شود و آستاگزانتین طبیعی به دلیل دارا بودن سایر مکمل‌های غذایی، از برتری قابل توجهی نسبت به آستاگزانتین مصنوعی برخوردار می‌باشد.

کلمات کلیدی: قزل‌آلای‌رنگین‌کمان، آستاگزانتین، جلبک هماتوکوکوس(*Haematococcus pluvialis*)، ویتامین‌های A و E

* نویسنده مسئول

مقدمه

کنترل تولیدمثل یکی از کلیدهای مهم آبزی‌پروری است وکیفیت تخم ماهیان یکی از فاکتورهای مهم در تولیدمثل می‌باشد (Laevens *et al.*, 1999). کیفیت تخم و هماوری مولدین برای هچری‌ها و تفریخ‌گاه‌های آبزی پروری بسیار مهم است. کیفیت پایین تخم بر کیفیت لارو تأثیر می‌گذارد و حتی منجر به مشکلاتی از جمله سرعت رشد پایین، مرگ و میر بالا و تغیر شکل در لاروها می‌شود که در نهایت بر هزینه‌های تولید و سودآوری تأثیر گذار است. رشد و توسعه اولیه لارو به مواد مغذی ضروری که در تخم حضور دارند بستگی دارد که این مواد مغذی به تغذیه مولدین در طول مرحله اووژنز وابسته است (Laevens *et al.*, 1999). آنتی اکسیدان‌های غیرآنزیمی اولیه در تخم ماهیان ویتامین‌های A و E و همچنین پرو ویتامین A می‌باشند. میزان ویتامین‌های محلول در چربی در تخم ماهیان سایز اولیه تخم ماهیان را تحت تأثیر قرار داده که در نهایت بر اندازه، کیفیت و بقای لارو تاثیر می گذارند (Laevens *et al.*, 1999). ویتامین E یکی از آنتی اکسیدان‌های محلول در چربی است که در رشد و توسعه طبیعی تخم و لارو ماهیان مهم می‌باشد، وظیفه اصلی این ویتامین عمل به عنوان یک آنتی‌اکسیدان است که از غشاءهای بیولوژیکی، ذخیره‌های چربی و لیپوپروتئین در برابر اکسید شدن محافظت می‌کند (Hamre *et al.*, 1998). ویتامین E وظایف دیگری از جمله کنترل تولیدمثل، بهبود عملکرد بیضه‌ها، فعالیت ماکروفاژها و تأثیر مثبت روی تفریخ تخم‌ها و بقای بهتر لاروها دارد (Pavlov *et al.*, 2004). بنابراین هماوری کمتر، تفریخ ناقص و بقای کم لاروها به سطح ویتامین E در جیره غذایی مولدین نسبت داده شده است (Watanabe, 1991). برعکس ویتامین E، ویتامین A و کاروتنوئیدها توسط ماهی ساخته نمی‌شوند و مقداری از آنها بایستی در تخم ذخیره باشد تا قابلیت تولیدمثل را افزایش دهد به همین دلیل کارتنوئیدها بابسیتی به جیره غذایی ماهی‌ها اضافه گردد. ویتامین A و کاروتنوئیدها نیز به عنوان آنتی اکسیدانت عمل می‌کنند که وظیفه اولیه آنها نمی‌باشد. ویتامین A نقش مهمی در فرآیندهای فیزیولوژی شامل بینایی، تولیدمثل، توسعه جنین، رشد، تمایز و نگهداری سلول‌های اپیتلیال دارد. ویتامین A در فرم‌های متعددی وجود دارند که برخی از آنها در رشد و توسعه جنین نقش دارند. کارتنوئیدها رنگدانه‌های محلول در چربی هستند که محدوده‌ای از رنگ‌های مختلف زرد تا قرمز را سبب می‌شوند. آنها توسط پلانکتون‌ها، گیاهان و شمار کوچکی از باکتری‌ها و اسفنج‌ها بیوسنتز می‌شوند و توسط برخی حیوانات مثل ماهی‌ها جذب و متابولیسم می شوند (Shahidi, 2007). کارتنوئیدها بطور خاص آستاگزانتین پیش‌ساز ویتامین A هستند که در سال‌های اخیر بدلیل اثرات مثبت بر سلامتی انسان مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Capelli *et al.*, 2013). کارتنوئیدها سبب بهبود بقاء و رشد لارو (Amar *et al.*, 2004)، بهبود عملکرد مولدین (Watanabe *et al.*, 1991)، کیفیت لارو (Wyban, 1997)، افزایش مقاومت به بیماری‌ها (Tachibana *et al.*, 1997)، فعالیت ایمنی (Hynes *et al.*, 2009) و همچنین نقش مهمی در سلامت انسان و حیوانات بازی می‌کنند (Yuan *et al.*, 2011). آستاگزانتین در ماهیان وظایف متعددی از جمله در تولیدمثل، تنفس تخم (ذخیره اکسیژن تحت شرایط بی هوازی)، تکثیر و رشد سلول، بلوغ، بعنوان پیش‌ساز ویتامین A، در بینایی، منبعی از رنگدانه و بعنوان یک آنتی‌اکسیدانت برعهده دارند (Torrissen, 1990; Pavlov *et al.*, 2004). غلظت آستاگزانتین در منابع مورد استفاده برای تولید تجاری آن، شامل کریل نروژی (*Euphausia superba*) (۰/۱۲گرم)، میگوی قطبی (*Pandalus borealis*) (۱/۲ گرم)، مخمر فافیا روزیدیما (*Phaffia rhozydima*) (۱۰ گرم) و میکروجلبک سبز هماتوکوکوس پلوویالیس (*Haematococcus pluvialis*) (۴۰ گرم) از یک کیلوگرم بیوماس خشک آنها مشاهده شده است (Capelli & Cysewski, 2007). معمول‌ترین شکل فروش آستاگزانتین برای مصرف حیوانات، آستاگزانتین مصنوعی می‌باشد، در شکل تجاری آستاگزانتین مصنوعی نسبت به طبیعی درصد تغلیظی

بیشتری دارد (مصنوعی ۸ تا ۱۰٪ و طبیعی ۲ تا ۱/۵٪) اما آستاگزانتین طبیعی از نظر کیفیت رنگ‌دهی در انواع گونه های ماهی و غذا بهتر عمل می‌کند. میکروجلبک سبز *H. pluvialis* توانایی سنتز و ذخیره آستاگزانتین را در طول مرحله رشد خود دارد. کل کارتنوئید موجود در این جلبک ۱ تا ۳٪ وزن خشک می‌باشد (Lorenz & Cysewshi, 2000). این جلبک به دلیل محتوای بالای کارتنوئید بعنوان منبع مهم رنگدانه در خوراک آبزیان مورد توجه قرار گرفته است (Choubert *et al*., 2006). در جلبک *H. pluvialis* علاوه بر آستاگزانتین، کاروتنوئیدهای دیگری نظیر بتاکاروتن، کانتاگزانتین و لوتئین نیز وجود دارند. حضور این کاروتنوئیدها در کنار آستاگزانتین باعث شده که این جلبک به عنوان یک منبع طبیعی آستاگزانتین به مراتب به عنوان آنتی اکسیدانت بهتری نسبت به آستاگزانتین مصنوعی عمل کند. مطالعات نشان داده که *H. pluvialis* تجمع رنگ در بافت ماهی قزل آلای رنگین‌کمان (Mendes-pinto *et al*., 2004) سیم سر طلایی (*Gilthead seabream*) (Gomes *et al*., 2002) و ماهیان تزئینی (Gouveia *et al*., 2003) را بهبود می‌دهد. ماهی قزل‌آلای رنگین کمان به دلیل سرعت رشد و تطبیق‌پذیری آسان به شرایط محیطی یکی از گونه‌های مهم تجاری است که در ایران پرورش داده می شود. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی مقایسه سطوح مختلف رنگدانه‌های طبیعی (*H. pluvialis*) و مصنوعی بر میزان ویتامین E و ویتامین A تخم مولدین ماهی قزل آلای رنگین کمان طراحی و انجام شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر در کارگاه تکثیر و پرورش قزل آلای کوخدان سی‌سخت در استان کهکلویه و بویراحمد انجام شد. به منظور اجرای این تحقیق، تعداد ۲۱ (هفت تیمار با سه تکرار) حوضچه سیمانی به ابعاد ۱×۱× ۴ متر با شرایط یکسان برای استقرار گروه‌های آزمایشی آماده‌سازی گردید. برای هر تیمار تعداد ۲۱ مولد ماده ۳ تا ۴ ساله ماهی قزل آلای رنگین کمان با میانگین وزن ۲۰۰±۲۸۰۰ گرم در نظر گرفته شد و در سه تکرار توزیع گردید. در این آزمایش تعداد ۶ تیمار جیره غذایی حاوی آستاگزانتین با دو منبع طبیعی (جلبک سبز *H. pluvialis*) و مصنوعی آماده شد. تیمارهای منبع طبیعی (جلبکی) در سه سطح ۲/۶۷، ۵/۳۳، ۸ گرم بر کیلوگرم غذا (T_1، T_2، T_3) و تیمارهای مصنوعی در سه سطح ۴۰، ۸۰، ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم غذا (T_4، T_5، T_6)، تنظیم شدند. بدین ترتیب با توجه به عیار ۱/۵ درصدی آستاگزانتین در جلبک هماتوکوکوس، هر شش تیمار به نسبت مساوی آستاگزانتین دریافت کردند (جدول ۱) و تیمار (T_0) به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. جلبک هماتوکوکوس مورد نیاز از شرکت Naturose در هاوایی و آستاگزانتین مصنوعی مورد نیاز نیز از شرکت خوراک آبزیان رزدانه خریداری شد. برای تغذیه مولدین از خوراک BFT شرکت فرادانه استفاده شد. غذادهی به مولدین دو مرتبه در روز (۸ صبح و ۱۵ بعد از ظهر) انجام شد. میزان غذا از ابتدای دوره تا قبل از شروع فصل تکثیر، ۰/۷-۰/۶ درصد وزن بدن و در طول فصل تکثیر حدود ۰/۴-۰/۳ درصد وزن بدن (در مجموع ۱۲۰ روز) درنظر گرفته شد. به دلیل انحلال بهتر کاروتنوئیدها در روغن، از روغن سویا به عنوان حلال جلبک هماتوکوکوس و آستاگزانتین مصنوعی استفاده شد. برای این منظور به ازای هر کیلوگرم خوراک، بیست میلی‌لیتر روغن سویا در نظر گرفته شد و پس از افزودن مقدار در نظر گرفته شده جلبک و آستاگزانتین، به آرامی روی غذا اسپری گردید. در زمان اسپری کردن روغن، خوراک مرتب به هم زده شده تا امکان آغشته شدن تمام پلت‌ها امکان پذیر گردید. در طی اجرای آزمایش تغییرات فاکتورهای محیطی نظیر اکسیژن محلول، دما و pH آب در طول مدت پرورش در حوضچه‌های پرورشی به ترتیب ۸/۸ - ۸/۱ میلی‌گرم در لیتر، ۱۱/۳- ۱۰/۱ درجه سانتی‌گراد و ۸/۱-۷/۹ اندازه‌گیری و ثبت شدند.

آماده‌سازی استانداردها برای اندازه گیری میزان ویتامین: ۵۰ میلی‌گرم استانداردهای ویتامین A و E توزین گردید و در یک بالون حجمی ۵۰ میلی‌لیتری در

۱۰ میلی‌لیتر استون حل شده و به حجم رسانده شد. غلظت استاندارد در هریک از این بالن‌ها ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. ۱۰۰۰ میکرولیتر از استاندارد ویتامین A به یک بالن ژوژه ۱۰ میلی‌لیتری منتقل و با اتانول به حجم رسانده شد، به طوری که غلظت ویتامین در این محلول ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد و ۱۰۰ میکرولیتر از استاندارد ویتامین A به یک بالن ژوژه ۱۰ میلی‌لیتری منتقل و با اتانول به حجم رسانده شد و غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. به همین ترتیب استاندارد ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای ویتامین E تهیه شد. برای ویتامین A از استاندارد ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ۴ لوله مختلف (۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ میکرولیتر) و استاندارد ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ۵ لوله مختلف (۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ میکرولیتر) تهیه گردید. برای ویتامین E از استاندارد ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ۵ لوله مختلف (۲، ۴، ۸، ۱۲ و ۱۶ میکرولیتر) تهیه شد. سپس به هر لوله مطابق روش زیر برای استخراج نمونه مورد استفاده قرار گرفت (Browne & Armstrong, 1998; Lee & New, 2003).

آماده‌سازی نمونه‌های تخم برای اندازه گیری ویتامین

به هر لوله شیشه‌ای مخصوص هیدرولیز ۲ میلی‌لیتر اتانول و ۱ میلی‌لیتر آسکوربیک اسید ۲٪ ریخته و یک عدد تخم ماهی به آن منتقل و توسط یک همزن شیشه‌ای هموژنیزه شد. سپس به آن ۱ میلی‌لیتر محلول ۱۰۰ گرم بر لیتر KOH اضافه و بهم زده شد و به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری ۸۰ درجه انکوبه گردید. بطوری که پس از ۱۰ دقیقه اول یکبار دیگر هم زده شد. پس از آن نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در یک حمام آب و یخ خنک شد و به آن ۲ میلی لیتر NaCl ۱۰٪ افزوده و مخلوط گردید. جهت استخراج، به لوله ۲ میلی‌لیتر از محلول ۸۰/۲۰ اتیل استات/هگزان اضافه و به مدت ۲ دقیقه بهم زده شد. پس از دو لایه شدن، لایه بالایی (آلی) به یک لوله تمیز منتقل و مرحله استخراج یکبار دیگر تکرار شد. سپس با ۲ میلی‌لیتر محلول NaCl ۵٪ قسمت استخراج شده شستشو داده شد. لایه آلی بالایی به یک لوله دیگر منتقل و تحت گاز نیتروژن (ازت) خشک و به آن ۲۵۰ میکرولیتر اتانول اضافه و بهم زده شد. در نهایت ۲۰ میکرولیتر از نمونه بدست آمده جهت سنجش ویتامین‌ها به دستگاه HPLC با شرایط زیر تزریق گردید. همچنین نمونه‌های استخراجی استانداردهای یاد شده مانند نمونه به دستگاه HPLC تزریق و نتایج حاصله از آنها برای رسم منحنی کالیبراسیون مورد استفاده قرار گرفت (Palace & Brown, 1994).

شرایط کار با دستگاه HPLC:

فاز متحرک : متانول – آب (۹۸ – ۲)

سرعت جریان: ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه

دمای آنالیز: ۳۷ درجه سانتی‌گراد

طول موج دتکتور: از زمان ۰ تا ۷ دقیقه ۳۲۵ نانومتر و از ۷ دقیقه تا انتهای کروماتوگرام ۲۹۰ نانومتر

ستون: ستون C18, 150 × 3.9 mm, 5 µm

کلیه داده‌ها توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. در ابتدا برای تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون Kolmogorov-Smirnov استفاده شد و سپس برای مقایسه میانگین بین تیمارها از آنالیز واریانس یک طرفه (One- Way ANOVA) با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد و کلیه نمودارها و گراف‌ها نیز با برنامه Excel نسخه ۲۰۱۳ رسم شدند.

جدول ۱: تیمارهای استفاده شده در طول دوره آزمایش سطوح مختلف آستاگزانتین در دو منبع مختلف

Table 1: Treatments supplemented by different levels of astaxanthin in two sources during the experiment period.

تیمارها	منبع آستاگزانتین	غلظت
	طبیعی (*H. pluvialis*)	گرم بر کیلوگرم غذا
$T_۱$	"	۲/۶۷
$T_۲$	"	۵/۳۳
$T_۳$	"	۸
	آستاگزانتین مصنوعی	میلی‌گرم بر کیلوگرم غذا
$T_۴$	"	۴۰
$T_۵$	"	۸۰
$T_۶$	"	۱۲۰
شاهد (T۰)، کنترل(C)	بدون آستاگزانتین	-
ترکیبات جیره	**درصد**	
پروتئین خام	۳۸	
چربی خام	۱۲	
خاکستر	۱۰	
فیبر	۳/۵	
فسفر	۱	
رطوبت	۱۱	

نتایج

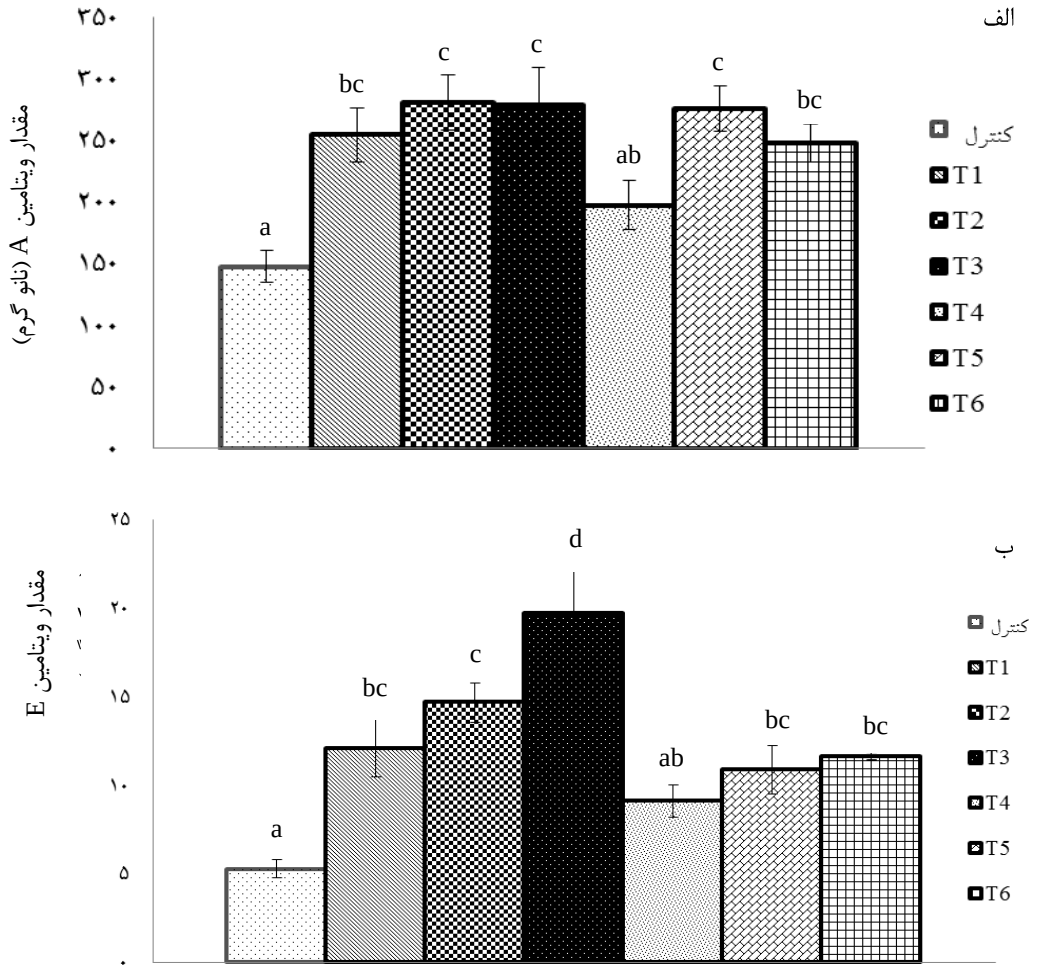
نتایج مربوط به مقدار ویتامین A و E ذخیره شده در تخم تغذیه شده از ۶ جیره آزمایشی با سه سطح آستاگزانتین طبیعی و سه سطح آستاگزانتین مصنوعی و مقایسه آن با گروه شاهد در جدول ۲ و نمودار ۱ ارائه شده است. بر اساس نتایج به دست آمده، اختلاف معنی‌داری در مقدار ویتامین A ذخیره شده در تخم استحصال شده از مولدین مورد آزمایش در طی دوره پرورش در بین تیمارها وجود دارد (p<۰/۰۵). بیشترین مقدار ویتامین A ذخیره شده (۲۲/۵۱± ۲۸۰/۸۸ نانوگرم در تخم) مربوط به تیمار ۲ و کمترین (۱۲/۷۱± ۱۴۷/۸۲ نانوگرم در تخم) مربوط به تیمار شاهد به دست آمد (نمودار ۱)، ضمن آنکه در رابطه با سطح ویتامین A در تخم، بین تیمارهای ۲، ۳ و ۵ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (p>۰/۰۵). این اختلاف بین همه تیمارهای حاوی آستاگزانتین با تیمار شاهد معنی‌دار بود (p<۰/۰۵). بیشترین میزان ویتامین E در تخم مربوط به تیمار ۳ و کمترین آن مربوط به تیمار شاهد بود. با افزایش سطح آستاگزانتین از هر دو منبع طبیعی و مصنوعی، میزان ویتامین E ذخیره شده در تخم استحصالی افزایش یافت که نشان دهنده تاثیر مثبت این رنگدانه بر مقدار ویتامین E ذخیره شده بر تخم در مولدین می‌باشد. آستاگزانتین طبیعی در هر ۳ سطح عملکرد بهتری نسبت به آستاگزانتین مصنوعی با سطوح مشابه داشت بطوری که بین تیمار ۱ و ۴، تیمار ۲ و ۵ و تیمارهای ۳ و ۶ با سطوح یکسان آستاگزانتین اما با منابع متفاوت طبیعی و مصنوعی اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (p<۰/۰۵). همچنین اختلاف بین همه تیمارهای حاوی آستاگزانتین با تیمار شاهد معنی‌دار بود (p<۰/۰۵).

جدول ۲: تأثیر روابط متقابل سطوح مختلف آستاگزانتین با دو منبع مصنوعی و طبیعی بر مقدار ویتامین A و E ذخیره شده در تخم استحصالی از مولدین قزل‌آلای رنگین‌کمان (X±SE)

Table 2: Effect of synthetic and algal astaxanthin different levels on amount of saved vitamins A and B in eggs of rainbow trout broodstock (Mean ± SE)

شاخص‌ها	شماره تیمار						
	شاهد	۱	۲	۳	۴	۵	۶
ویتامین A (ng/egg)	۱۴۷/۸۲ ±۱۲/۷۱[a]	۲۵۴/۸ ±۲۲/۰۹[bc]	۲۸۰/۸۸ ±۲۲/۵۱[c]	۲۷۹/۵ ±۲۹/۵۵[c]	۱۹۷/۹ ±۱۹/۵۷[ab]	۲۷۶/۱ ±۱۸/۶۹[c]	۲۴۸/۳ ±۱۵/۳۲[bc]
ویتامین E (µg/egg)	۵/۲۷ ±۰/۵۱[a]	۱۲/۰۹ ± ۱/۶۳[bc]	۱۴/۶۸ ± ۱/۱۱[c]	۱۹/۷۱ ± ۲/۹۲[d]	۹/۱۱±۰/۹۱[ab]	۱۰/۸۷ ± ۱/۳۸[bc]	۱۱/۶۳±۰/۲۰[bc]

* در هر ردیف میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه در سطح ۵ درصد با هم اختلاف معنی‌داری ندارند (p>۰/۰۵).



نمودار۱: الف) میزان تغییرات ویتامین A (بر حسب نانوگرم در تخم) و ب) میزان تغییرات ویتامین E (بر حسب میکروگرم در تخم)، در تیمارهای مختلف آزمایش (طبق جدول۱). داده‌ها میانگین ± انحراف معیار (SD) می‌باشد.

Figure 1: Mean (±SD, N=3) values of Vitamin A (ng/eeg) (A) Vitamin E (µg/egg) in different treatments of experiment.

بحث

شرایط محیطی و تغذیه مولدین از فاکتورهای مهم تأثیر گذار بر کیفیت تخم ماهی می‌باشند (Brown *et al.*, 2003). تنظیم جیره غذایی مولدین از طریق اضافه کردن ویتامین‌ها، اسیدهای چرب و کارتنوئیدها بر کیفیت تخم تولید شده تأثیر می‌گذارد (Palace & Werner, 2006). حضور کاروتنوئیدها در جیره غذایی مولدین ماهی قزل آلای رنگین‌کمان تأثیر مثبتی بر رنگدانه تخم، لقاح و همچنین بقای تخم‌ها می‌گذارد (Amar *et al.*, 2001). کاروتنوئید موجود در غذا پس از جذب در روده وارد خون شده و در عضله، کبد و پوست تجمع می‌یابد و در طی تشکیل تخم یا رشد گنادی از عضله و کبد به سمت تخمدان‌های در حال رشد انتقال و در تخم‌ها تجمع می یابند (Bromage *et al.*, 1992). ویتامین A برای رشد، تولید مثل، توسعه جنین ماهی نیاز هست. ماهی‌ها قادر به ساخت این ویتامین نیستند و بایستی به جیره غذایی آنها افزوده شود (Madden, 2001). کاروتنوئیدها بویژه (آستاگزانتین و کانتاگزانتین) به‌عنوان ترکیبات پروویتامین A عمل می‌کنند و توانایی تبدیل به فرم‌های ویتامین A (A_1 و A_2) را دارند (Lubzens *et al.*, 2003). مطالعات نشان داده در ماهیان زینتی گوپی و پلاتی رنگدانه‌های آستاگزانتین، کانتاگزانتین و زی‌زانتین توانایی تبدیل به ویتامین‌های A_1 و A_2 را دارند (Palace & Werner, 2006). در طول رشد و توسعه تخم‌های کوهو سالمون (*Oncorhynchus keta*) کاروتنوئیدها بویژه آستاگزانتین غالب هستند که توانایی تبدیل به پروویتامین‌های A را دارند، بعد از جذب کیسه زرده هشت نوع کاروتنوئید در تخم شناسایی شده است (Kitahara, 1984). در تخم ماهیان آب شیرین بیشتر ویتامین A_2 وجود دارد که اغلب بصورت زی‌زانتین و لوتئین پدیدار می‌شود (Hata & Hata, 1971). Lubzens و همکاران (۲۰۰۳) میزان غلظت کاروتنوئیدها را در تخم ماهیان بررسی و بیان کردند که ماهیان دریایی دارای ۱۰ تا ۲۵ میلی‌گرم و ماهیان آب شیرین کمتر از ۱ میلی‌گرم کاروتنوئید (در هر گرم وزن خشک تخم) هستند. در مطالعه حاضر بر اساس نتایج به دست آمده، اختلاف معنی‌داری در مقدار ویتامین A ذخیره شده در تخم استحصال شده از مولدین مورد آزمایش در طی دوره پرورش (۱۲۰ روز) در بین تیمارها مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). بیشترین مقدار ویتامین A ذخیره شده (۲۸۰/۸۸ نانوگرم) مربوط به تیمار ۲ از آستاگزانتین طبیعی و کمترین (۱۴۷/۸۲ نانوگرم) مربوط به تیمار شاهد به‌دست آمد که نشان دهنده این است که حضور آستاگزانتین طبیعی نقش مؤثرتری نسبت به آستاگزانتین مصنوعی در تبدیل به ترکیبات پروویتامین A دارد که با نتایج مطالعه Palace و Werner (۲۰۰۶) مطابقت دارد. علاوه بر کاروتنوئیدها فرم‌های متعددی از ویتامین A نیز در تخم ماهیان گزارش شده است، حضور ویتامین A_1 و آنالوگ‌هایی از ویتامین A_2 در تخم ماهی هرینگ (*Clupea herengus*) مشاهده شده است (Lubzens *et al.*, 2003). ماهیان استخوانی دریایی و آب شیرین حاوی ۲ تا ۱۴ میلی‌گرم ویتامین A_1 در هر گرم تخم خشک می‌باشند (Palace & Werner, 2006). میزان جذب ویتامین‌های A بویژه A_1 در تخم ماهیان پلاژیک بسیار حائز اهمیت می‌باشد به طوری که از تخم های پلاژیک در حال توسعه نور منعکس می‌شود و احتمال شکار آنها کاهش می‌یابد (Lubzens *et al.*, 2003). در تخم‌های دوزیستان و اغلب ماهیان ویتامین A بصورت رتینول (retinol)، بات‌رتینول (but retinol)، رتینیل استر (retinyl ester) و کاروتنوئیدها یافت شده است (Irie & Seki, 2002). تخم‌های که در محیط‌های کم اکسیژن وجود دارند نسبت به تخم‌های پلاژیک از تراکم رنگدانه کاروتنوئیدی بالاتری برخوردار هستند و به همین دلیل کاروتنوئیدها به تأمین اکسیژن و بهبود تنفس برای تخم کمک می‌کنند (Palace & Werner, 2006). میزان ویتامین A تخم‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نزدیک به ۳ تا ۴ میلی‌گرم بر گرم مشاهده شده است (Palace & Werner, 2006) که در مطالعه حاضر در محدوده ۱۴۷/۸۲ تا ۲۸۰/۸۸ نانوگرم به ترتیب در تیمار شاهد و تیمار دوم (با سطح متوسط از آستاگزانتین طبیعی) بدست آمد. میزان ویتامین A_1 و آستاگزانتین به

ترتیب ۱-۲ و ۲-۳ میلی‌گرم بر گرم در تخم‌های قزل آلای دریاچه‌ای گزارش شده است (Palace *et al.*, 1998). کاروتنوئیدها در بافت ماهیچه آزاد ماهیان ذخیره و در فصل تکثیر و تخم‌ریزی به سمت تخمدان و تخمک‌ها در مولدین ماده و پوست در مولدین نر انتقال داده می‌شود (Palace & Werner, 2006). خاصیت فعالیت آنتی اکسیدانی ویتامین A نیز مورد تأئید قرار گرفته و ویتامین A_1 بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی را در بین اشکال ویتامین A دارد (Furuita *et al.*, 2001). ویتامین A و ذخیره آن در تخم مولدین کفشک ماهی ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*) منجر به بهبود کیفیت تخم و توسعه مطلوب لارو می‌شود (Furuita *et al.*, 2001). تأثیر آستاگزانتین بر میزان رشد و بقای نوزادان ماهی آزاد آتلانتیک *Oncorhynchus keta* مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد در صورت عدم استفاده از آستاگزانتین تنها ۱۷٪ از نوزادان زنده و به ماهیان بالغ تبدیل شدند (Lorense, 2000). Lorense در سال ۲۰۰۰، بر اساس این گزارش، با افزایش میزان آستاگزانتین در رژیم غذایی از ۰/۴ میلی‌گرم به ۱ میلی‌گرم و در نهایت به ۱۳/۷ میلی گرم، میزان بقای نوزادان افزایش یافت بطوری که میزان بقاء از ۱۷٪ به ۸۷٪ در غلظت ۱ میلی‌گرم و به ۹۸٪ در غلظت ۱۳/۷ میلی‌گرم رسید. مطالعات نشان داده حیواناتی که از آستاگزانتین طبیعی مصرف می‌کنند از نظر بقاء، تولیدمثل و رشد بهتر عمل می‌کنند (Pham *et al.*, 2014). وجود آستاگزانتین در جیره سبب بهبود رشد و بقاء لاروهای آزاد ماهی اقیانوس اطلس می‌شود ولی افزودن تنها ویتامین A به جیره تأثیر چندانی ندارد که بیانگر این موضوع است که کاروتنوئیدها به ویژه آستاگزانتین به عنوان پروویتامین A در توسعه جنین ماهی سالمون ایفای نقش می‌کنند (Christiansen *et al.*, 1995). نیاز ماهیان به ویتامین E در جیره غذایی متفاوت است، فاکتورهایی از قبیل غلظت سلنیوم، اسیدهای آمینه حاوی سولفور، آهن، ویتامین A و C، کولین، فاکتورهای محیطی و آنتی اکسیدانت‌های دیگر بر میزان نیاز به ویتامین E در جیره غذایی تأثیر می‌گذارند (Hamre *et al.*, 1997). آزاد ماهیان به ۳۰ تا ۶۰ میلی گرم ویتامین E در هر کیلوگرم جیره خشک نیاز دارند (Baker & Davies, 1996). غلظت بالاتر ویتامین E در جیره غذایی درصد تخم‌های غیرطبیعی را کاهش و هماوری را افزایش می‌دهد (Izquierdo *et al.*, 2001). ویتامین E در ماهیان ماده بالغ در طول مرحله اووژنز از بافت‌های خارجی و ماهیچه‌ها به سمت اووسیت‌ها حرکت می‌کند (Palace *et al.*, 2006). در مطالعه حاضر بیشترین میزان ویتامین E در تخم در تیمار ۳ (با بیشترین سطح آستاگزانتین طبیعی) به میزان ۱۹/۷۱ میکروگرم و کمترین آن در تیمار شاهد (بدون آستاگزانتین) به میزان ۵/۲۷ میکروگرم بدست آمد. با افزایش سطح آستاگزانتین از هر دو منبع طبیعی و مصنوعی، میزان ویتامین E ذخیره شده در تخم استحصالی افزایش یافت که نشان دهنده تأثیر مثبت آستاگرانتین بر مقدار ویتامین E ذخیره شده بر تخم می باشد، ضمن آن‌که آستاگزانتین طبیعی در هر ۳ سطح عملکرد بهتری نسبت به آستاگزانتین مصنوعی با سطوح مشابه داشت که با نتایج Darachai و همکاران (۱۹۹۹) و Waagbo و همکاران (۲۰۰۳) مطابقت دارد. آستاگزانتین طبیعی به مراتب کارآیی بالاتری نسبت به آستاگزانتین مصنوعی به همراه دارد که به علت شکل استری آستاگزانتین طبیعی نسبت به آستاگزانتین مصنوعی می باشد و راحت‌تر توسط اعضای مختلف ارگانیسم مورد بهره برداری قرار می‌گیرد (Darachai *et al.*,1999). هنگامی که ماهی با سطوح بالایی از ویتامین E تغذیه می‌شود، ویتامین در همه بافت‌ها ذخیره می‌شود و قبل از تخم‌ریزی بخش زیادی از آن به سمت تخمدان حرکت می‌کند که برای رشد و توسعه جنین ماهی ضروری است (Palace & Werner, 2006). بررسی تاثیر افزودن ویتامین E (۸۸ تا ۹۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک) بر جیره غذایی مولدین قزل آلای رنگین کمان توسط King (۱۹۸۵) نشان داد که توکوفرول (tocopherol، نوعی ساختار مولکولی از ویتامین E) در پلاسما به هنگام شروع آزمایش در همه تیمارها بالا است و در انتهای تخم‌ریزی ماهی‌ها

در تیمارهایی که از ویتامین E در جیره تغذیه نشده بودند، به کمترین مقدار می‌رسد. بر اساس نتایج این تحقیق افزودن ویتامین E حداقل سه ماه قبل از تخم‌ریزی به جیره غذایی مولدین قزل‌آلای رنگین‌کمان ضروری است و افزایش سطح توکوفرول پلاسما را می‌توان به عنوان نشانه‌ای برای شروع بلوغ گنادی قزل آلای رنگین کمان دانست. با افزودن ویتامین E به جیره غذایی مولدین کفشک ماهی فلاندر ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*) توسط Tokuda و همکاران (۲۰۰۰)، آنالیز تخم‌ها تفاوت معنی‌داری را در میزان رطوبت، پروتئین و چربی خام بین تیمارهای حاوی ویتامین E و شاهد نشان نداد اما تفاوت در میزان ویتامین E تخم بین آنها معنی‌دار بود. در مطالعه Tokuda و همکاران (۲۰۰۰) مشخص شد که افزودن ویتامین E به جیره مولدین قزل آلای‌رنگین‌کمان تخم ریزی را ۱/۵ برابر می‌کنند بطوری که شاخص گنادوسوماتیک مولدین از دوره Peak تخم‌ریزی تا بعد از تخم‌ریزی حفظ می‌شود. در تحقیق دیگر مشخص گردید که میزان ویتامین E تخم مولدین قزل آلای تغذیه شده با جیره حاوی آستاگزانتین نسبت به تخم مولدین تغذیه شده با جیره بدون آستاگزانتین بالاتر می‌باشد (Vassalo-Aguis *et al*., 1998). در مطالعه حاضر بیشترین مقدار ویتامین E (µg ۱۹/۷۱±۲/۹۲) مربوط به تیمار ۳ و کمترین مقدار (µg ۵/۲۷±۰/۵۱) در تیمار شاهد مشاهده شد، نشان دهنده این است که افزودن آستاگزانتین (طبیعی و مصنوعی) به جیره مولدین قزل‌آلای‌رنگین‌کمان منجر به بهبود کیفیت تخم و افزایش میزان محتوای ویتامین E در تخم می‌شود. بین میزان ویتامین E جیره مولدین، عملکرد تولیدمثل، محتوای ویتامین E تخم و لارو رابطه مستقیم وجود دارد (Palace & Werner, 2006). میزان بقای تخم و لارو در ماهیان قزل‌آلا که ویتامین E به جیره آنها افزوده شده باشد بالاتر است (Fernández-Palacios *et al*., 1998; Palace *et al*., 2006). در بررسی میزان غلظت ویتامین E در تخم و لارو سی‌باس اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) توسط Ciarcia و همکاران (۲۰۰۰)، غلظت ویتامین E در تخم های زنده تازه تفریخ شده (۲۵ میلی‌گرم در گرم) بیشتر از تخم‌های مرده (۱۷ میلی‌گرم در گرم) بدست آمد. بیشترین کاهش در غلظت ویتامین E در ۴ روز بعد از لقاح و ۱۲ روز بعد از تفریخ حدود ۸ میلی‌گرم در گرم در تخم‌های زنده مشاهده شد. همچنین گزارش گردیده که کاهش میزان ویتامین E در تخم‌های زنده به دلیل استفاده از آن به عنوان آنتی‌اکسیدانت در طول مرحله اولیه توسعه جنین می‌باشد هنگامی که آنزیم‌های دفاعی در حال شکل‌گیری و توسعه هستند (Palace & Werner, 2006). افزودن حداقل ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم توکوفرول برای عملکرد مطلوب تولیدمثل ماهی به جیره غذایی ضروری است تا در فصل تکثیر ویتامین E به سمت گنادها انتقال داده شود (Palace & Werner, 2006). تأثیر افزودن ویتامین E، A و کاروتنوئید به جیره روی کیفیت تخم و رشد و توسعه لارو ماهی دم زرد ژاپنی مورد ارزیابی قرار گرفت و بیان شد که کاروتنوئیدها نقش مؤثرتری دارند ضمن آنکه میزان ویتامین A و E در تخم ها تناسبی با قابلیت دسترسی ویتامین در جیره نداشت (Vasallo-Aguis *et al*., 1998). پروویتامین کاروتنوئیدهای مثل آستاگزانتین قابلیت تبدیل به ویتامین A را دارند ولی برای ویتامین E که بعنوان آنتی‌اکسیدانت فعال عمل می‌کند ماهی توانایی سنتز آن را ندارد و افزودن آن به جیره الزامی است. در مجموع مطالعه حاضر نشان داد، تغذیه مولدین بر کیفیت تخم و توسعه اولیه آن تأثیر گذاشته و منجر به عملکرد مطلوب تولید مثل می شود. با حرکت مواد مغذی از مکان‌های ذخیره در ماهیچه به سمت گنادها کیفیت تخم بهبود می‌یابد. ماهیان دارای تخم‌های درشت‌تر مثل قزل‌آلای‌رنگین‌کمان (حاوی زرده و اسیدهای چرب غیراشباع) وابستگی بیشتری به ذخیره زرده برای توسعه ابتدایی و تغذیه درونی دارند، بنابراین ویتامین A و E بیشتری نیاز خواهد بود. افزودن آستاگزانتین (طبیعی و مصنوعی) به جیره سبب بهبود ذخیره ویتامین‌های A و E در تخم می‌شود، همچنین نتایج بیانگر این واقعیت است که آستاگزانتین طبیعی نسبت به آستاگزانتین مصنوعی از برتری فوق العاده‌ای

برخوردار بوده و محتوی ویتامین A و E در تخم را در سطح بالاتری بهبود می‌بخشد. این تحقیق می‌تواند زمینه استفاده مؤثرتر از منابع رنگدانه‌های طبیعی بجای مصنوعی را در صنعت آبزی‌پروری کشور گسترش داده و ضمن بهبود عملکرد تکثیر و پرورش، از عوارض جانبی احتمالی ترکیبات شیمیایی بکاهد.

تشکر و قدردانی

از مدیر کل و معاونت محترم تکثیر شیلات یاسوج و از مدیریت و کارکنان مرکز تکثیر و پرورش قزل‌آلای کوخدان سی‌سخت که در فراهم کردن امکانات این تحقیق نهایت همکاری را مبذول داشتند، قدردانی و سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

Amar, E.C., Kiron V., Satoh S. and Watanabe, T., 2001. Influence of various dietary synthetic carotenoids on bio-defence mechanisms in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture Research, 32, 162–173. DOI: 10.1046/j.1355-557x.2001.00051.

Amar, E.C., Kiron V., Satoh S. and Watanabe, T., 2004. Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. Fish & Shellfish Immunology, 16, 527-537. DOI: 10.1016/j.fsi.2003.09.004.

Baker, R.T.M. and Davies, S.J., 1996. Oxidative nutritional stress associated with feeding rancid oils to African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell) and the protective role of a-tocopherol. Aquaculture Research, 27, 795-803. DOI:10.1046/j.1365-2109.1996.t01-1-00814.

Bromage, N., Randall C.,Thrush M., Davis B., Springate J., Duston J. and Barker, G., 1992. Broodstock management, fecundity, egg quality and timing of egg production in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).Aquaculture, 100, 141-166. DOI: 10.1016/0044-8486(92)90355-O.

Brown, J.A., Minkoff G. and Puvanendran, V., 2003. Larva culture of Atlantic cod (*Gadus morhua*): progress, protocols and problems. Aquaculture, 227, 357-372. DOI: 10.1016/S0044-8486(03)00514-3.

Browne, R.W. and Armstrong, D., 1998. Simultaneous determination of serum retinol. tocopherols, and carotenoids by HPLC. Methods in molecular Biology, 108, 269-275. DOI: 10.1373/clinchem.2003.022681.

Capelli, B. and Cysewski, B., 2007. Natural Astaxanthin: King of the Carotenoids. Cyanotech Corporation Publication. Holualoa, Hawaii. 148 P.

Capelli, D., Bagchi A. and Cysewski, G., 2013. Synthetic Astaxanthin Is Significantly Inferior to Algal-Based Astaxanthin as an Antioxidant and May Not Be Suitable as a Human Nutritional Supplement. Nutrafoods, 12(4): 145–152. DOI: 10.1007/s13749-013-0051-5.

Choubert, G., Mendes-Pinto M.M. and Morais, R., 2006. Pigmenting efficacy of astaxanthin fed to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: effect of dietary astaxanthin and lipid sources. Aquaculture, 257, 429–436. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2006.02.055.

Christiansen, R., Lie, Ø. and Torrissen, O.J., 1995. Growth and survival of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed different dietary levels of astaxanthin. Aquaculture Nutrition, 1, 189-198. DOI: 10.1111/j.1365-2095.1996.tb00008.

Ciarcia, G., Paolucci, M., Guerriero, G., Cozzolino, G. and Abrescia, P., 2000. Determination of vitamin E in eggs and during the larval development of the sea bass, *Dicentrarchus labrax*, by high performance liquid chromatography. BioFactors, 11, 19-21. DOI: 10.1002/biof.5520110106.

Darachai, J., Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P., 1999. "Effect of Astaxanthin on Stress Resistance of *Penaeus monodon* Larvae."Proceedings of

DOI: 10.1016/0020-711X(71)90210-2.

Hynes, N., Egeland, E.S., Koppe, W., Baardsen, G. and Kiron, V., 2009. Calanus oil as a natural source for flesh pigmentation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture Nutrition, 15, 202–208.
DOI: 10.1111/j.1365-2095.2008.00584.

Irie T. and Seki T., 2002. Retinoid composition and retinal localization in the eggs of teleost fishes. Comparative Biochemistry and Physiology- Part B, 131, 209-219.
DOI: 10.1016/S1096-4959(01)00496-1.

Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H. and Tacon, A.G.J., 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. Aquaculture, 197, 25-42.
http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00581-6.

King, I.B., 1985. Influence of vitamin E in reproduction in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Ph.D. thesis, University. Washington.

Kitahra, T., 1984. Behaviour of carotenoids in the chum salmon, *Oncorhychus keta*, during development. Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish, 50, 531-536.

Laevens, P., Lebegue, E., Jaunet, H., Brunel, A., Dhert, P. and Sorgeloos, P., 1999. Effect of dietary essential fatty acids and vitamins on egg quality in turbot broodstocks. Aquaculture International, 7, 225-240.
DOI:10.1023/A:1009225028889.

Lee, B.L. and New, A.L., 2003. Simultaneous determination of tocotrienols, tocopherols, retinal, and major carotenoids in human plasma. Clinical chemistry, 49(12): 2056-2066.
DOI:10.1373/clinchem.2003.022681.

Lorense, T., 2000. Astaxanthin, Natures Super Carotenoid . Journal Of Technical Bulletin, pp: 1-19.

Lorenz, R.T. and Cysewski, G.R., 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. Trends in Biotechnology, 18, 160-167

the 37th Kasetsart University Annual Conference, Bangkok, Thailand. Text & Journal Publication Co. pp. 240-245.

Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M.S., Gonzalez, M., Robaina, L. and Valencia, A., 1998. ombined effect of dietary a-tocopherol and n-HUFA on egg quality of gilthead seabream (*Sparus auratus*) broodstock. Aquaculture, 161, 475-476.
DOI: 10.5251/abjna.2010.1.3.175.184.

Furuita, H., Tanaka, H., Yamamoto, T., Shiraishi, M. and Takeuchi, T., 2001. Effects of high dose of vitamin A on reproduction and egg quality of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fisheries Science, 67, 606-613.
DOI: 10.1046/j.1444-2906.2001.00296.

Gomes, E., Dias, J., Silva, P., Valente, L., Empis, J., Gouveia, L., Bowen, J. and Young, W., 2002. Utilization of natural and synthetic sources of carotenoids in the skin coloration of gilt head sea bream (*Sparus aurata*). European Food Research and Technology, 214, 283–293.
DOI:10.1007/s00217-001-0475-9.

Gouveia, L., Rema, P., Pereira, O. and Empis, J., 2003. Coloring ornamental fish (*Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*) with micro algal biomass. Aquaculture Nutrition, 9, 123–129.
DOI: 10.1046/j.1365-2095.2003.00233.

Hamre, K., Bege, R.K. and Lie, O., 1998. Turnover of tocopherol and distribution in subcellular and lipoprotein fractions indicate presence of an hepatic tocopherol binding protein in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Fish Physiology and Biochemitry, 18, 1573-1586.
DOI: 10.1023/A:1007798102002.

Hamre, K., Waagboo, R., Berge, R.K. and Lie, O., 1997. Vitamins C and E interact in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). Free Radical Biology & Medicine journal, 22, 137-149.
DOI: 10.1016/S0891-5849(96)00281.

Hata, M. and Hata, M., 1971. Carotenoid pigments in goldfish (*Carassius auratus*). I. composition and distribution of carotenoids. International Journal of Biochemistry, 2, 11-19.

DOI: 10.1016/S0167-7799(00)01433-5.

Lubzens, E., Lissauer, L.B., Levavi-Sivan, J., Avarre, C. and Sammar, M., 2003. Carotenoid and retinoid transport to fish oocytes and eggs: what is the role of retinol binding protein. Molecular Aspects of Medicine, 24, 441-457.
DOI: 10.1016/S0098-2997(03)00040-2.

Madden, M., 2001. Vitamin A and the developing embryo. Postgraduate Medical Journal, 77, 489-491.
DOI:10.1136/pmj.77.910.489.

Mendes-pinto, M.M., Choubert, G. and Morais, R., 2004. Effect of dietary bile extracts on serum response of astaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a preliminary study. Aquaculture Nutrition**,** 10, 353–357.
DOI*:* 10.1111/j.1365-2095.2004.00309.

Palace, V.P. and Brown, SB., 1994. HPLC determination of tocopherol, retinol, dehydroretinol and retinyl palmitate in tissues of lake char *(Salvelinus namaycush)* exposed to coplanar 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. Environmental Toxicology and Chemistry, 13, 473-476. DOI: 10.1002/etc.5620130315.

Palace, V.P. and Werner, J., 2006. Vitamins A and E in the maternal diet influence egg quality and early life stage development in fish: a review. Scientia marina, 70, 41-57. DOI:10.3989/scimar.2006.70s241.

Palace, V.P., Brown, S.B., Baron, C.L., Fitzsimons, J.D. and Klaverkamp, J.F., 1998. Relationships between induction of the phase I enzyme system and oxidative stress: relevance for lake trout from Lake Ontario and early mortality syndrome of their offspring. American Fisheries Society Symposium, 21, 146-153.

Palace, V.P., Wautier, K.G., Evans, R.E., Blanchfield, P., Mills, K., Chalanchuk, S., Godard, D., McMaster, M.E., Tetrault, G., Peters, L.E., Vandenbyllaardt, L. and Kidd, K.A., 2006. Biochemical and histopathological effects of ethynylestradiol in pearl dace (*Semotilus margarita*) exposed to a synthetic estrogen in a whole lake experiment. Environmental Toxicology and Chemistry, 25, 260-271.

Pavlov, D., Kjørsvik, E., Refsti, T. and Andersen, Ø., 2004. Brood stock and egg production, in Culture of cold-water marine fish, Moksness E., Kjørsvik E., Olsen Y edn, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp: 129-203.

Pham, M.A., Byun, H.G., Kim, K.D. and Lee, S.M., 2014. Effects of dietary carotenoid source and level on growth, skin pigmentation, antioxidant activity and chemical composition of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus.* Aquaculture, 431, 65–72.
DOI: 10.1016/j.aquaculture.2014.04.019.

Shahidi, F., 2007. Maximising the value of marine by-products. f, CRC Press. pp:413-422.

Tachibana, K., Yagi, M., Har,a K., Mishima, T. and Tsuchimoto, M., 1997. Effects of feeding b-carotene supplemented rotifers on survival and lymphocyte proliferation reaction of fish larvae of Japanese parrotfish (*Oplegnathus fasciatus*) and Spotted parrotfish (*Oplegnathus punctatus*): preliminary trials. Hydrobiologia, 358: 313-316.
DOI: 10.1023/A:1003189020623.

Tokuda, M., Yamaguchi, T., Wakui, K., Sato, T., Ito M. and Takeuchi, M., 2000. Tocopherol affinity for serum lipoproteins of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* during the reproduction period. Fisheries Science, 66: 619-624.
DOI*:* 10.1046/j.1444-2906.2000.00101.

Torrissen, O.J., 1990. Biological activities of carotenoids in fishes. In: Takeda M., Watanabe T., (esd) the current status of fish nutrition in aquaculture. Tokyo University of Fisheries, Tokyo Japan, pp: 387-399.

Vassalo-Aguis, R., Watanabe, T., Mushiake, K., Kawano, K. and Satoh, S., 1998. Chemical components of eggs and yolk sac larvae obtained from striped jack broodstock fed on a raw fish mix or dry pellets. Fisheries Science, 64, 759-765.

Waagbo, R., Hamre, K., Bjerkas, E., Berge, R., Wathne, E., Lie, O. and Torstensen, B., 2003."Cataract formation in Atlantic

salmon,*Salmo salar* L.,smolt relative to dietary pro- and antioxidants and lipid level."Journal of Fish Diseases, 26(4): 213-29.

Watanabe, T., Lee, M.J., Mizutani, J., Yamada, T., Satoh, S. and Takeuchi, T., 1991. Effective component of cuttlefish meal and raw krill for improvement of quality of red sea bream *Pagrus major* eggs. Nippon Suisan Gakkaishi, 57, 681-694.

Wyban, J., Martinez, G. and Sweeney, J., 1997. Adding paprika to *Penaeus vannamei* maturation diet improves nauplii quality. World Aquaculture, 28, 59-62.

Yuan, J.P., Peng, J., Yin, K. and Wang, J.H., 2011. Potential health-promoting effects of astaxanthin: A high value carotenoid mostly from microalgae. Molecular Nutrition & Food Research, 55, 150-165.
DOI: 10.1002/mnfr.201000414.

Evaluation of egg vitamins A and E content in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) broodstock affected by different levels of synthetic and natural (*Heamatococcus pluvialis*) astaxanthin

Alizadeh M.[1]*; Khanjani M.H.[2]; Ansari R.[3]; Rafieepour A.[2]

[*] m_alizadeh47@yahoo.com

1-Iranian Fisheries Research Organization, Tehran, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, POBox 14965/149

2- Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Jiroft, Jiroft, Kerman, Iran.

3- Negin Zagros trout farm, Yasuj

Abstract

In present research, effect of dietary astaxanthin levels in sources of synthetic and algal on vitamins A and E content of egg rainbow trout broodstock was investigated, totally for 120 days. It was considered seven groups consisting six treatments (T_1-T_6) in two different astaxanthin sources and control (C). According to experiment design, treatments were arranged as algal astaxanthin *(Haematococcus pluvialis)* in the three levels of 2.67, 3.55 and 8gr/kg food (T_1, T_2, T_3); and synthetic astaxanthin in three levels of 40, 80 and 120mg/kg food (T_4, T_5, T_6). Egg vitamins A and E content in obtained eggs from all treatments during spawning season was measured. The highest (280.88± 22.51 ng) and the lowest (147.82± 12.71ng) amount of vitamin A were observed in T2 and control group, respectively. The highest (19.71± 2.92µg) and the lowest (5.27± 0.51µg) amount of vitamin E were obtained in T3 and control group, respectively. By increasing level of astaxanthin in both sources of algal and synthetic, content of vitamin E in egg increased but the effect of algal source on these indices was more perfect. In general present study show that, feeding broodstock affected on quality content of egg, It also concluded that natural astaxanthin (*Haematococcus pluvialis*) for the reason that contains supplementary nutritious, is extraordinary preferable than synthetic astaxanthin to improve vitamins content of egg in rainbow trout.

Keywords: Rainbow trout, Astaxanthin, *Haematococcus pluvialis*, Vitamins A, E

*Corresponding author