

بهبود کارایی تولیدمثلی ماهی گورخری ماده (*Danio rerio*) تغذیه شده با جیره حاوی لاکتوفرین و یا پودر جلبک اسپیرولینا

ساناز صادقی گوغری، فاطمه پیکان حیرتی، سالار درافشان*
گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۳/۰۲ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۶/۳۰

چکیده

در این پژوهش تلاش شد تا اثر لاکتوفرین و پودر جلبک اسپیرولینا به تنهایی و به صورت توأم بر عملکرد تولیدمثلی ماهی ماده گورخری بررسی شود. ماهیان گورخری ماده نابالغ با میانگین وزن 0.27 g به مدت ۳ هفته با جیره غذایی شاهد بدون اسپیرولینا (SP) و لاکتوفرین (Lf)، غنی شده با پودر جلبک اسپیرولینا (100 g/kg SP)، لاکتوفرین (400 mg/kg Lf) و ترکیب این دو (100 g/kg SP و 400 mg/kg LF) تغذیه شدند. در پایان آزمایش برخی از شاخص‌های تولیدمثلی از جمله همآوری، قطر تخم، درصد تفریح، درصد لقاح، درازا و وزن نوزاد بررسی شدند. بیشترین درصد تخم‌ریزی به‌طور معنی‌دار در مولدین تغذیه شده با تیمار حاوی لاکتوفرین و تیمار لاکتوفرین + پودر جلبک اسپیرولینا؛ اما بیشترین درصد لقاح و درصد تفریح به‌طور معنی‌دار در تیمار تغذیه شده با لاکتوفرین + پودر جلبک اسپیرولینا مشاهده شد. همچنین، قطر تخم، وزن و درصد بازماندگی نوزادان در تیمار تلفیقی لاکتوفرین و پودر جلبک اسپیرولینا به‌طور معنی‌دار افزایش یافت ($p < 0.05$). در مولدینی که قادر به تخم‌ریزی نبودند، شاخص گنادوسوماتیک و همآوری نسبی در تیمار حاوی لاکتوفرین افزایش معنی‌داری نسبت به دیگر تیمارها نشان داد، در حالی که همآوری مطلق، تعداد کل تخمک، قطر و وزن تخمک نیز در تیمار تلفیقی لاکتوفرین و جلبک اسپیرولینا به‌طور معنی‌دار افزایش یافت ($p < 0.05$). بهبود شاخص‌های تولیدمثلی در استفاده تلفیقی از لاکتوفرین و اسپیرولینا در جیره غذایی ماهی گورخری می‌تواند بیانگر اثر هم‌افزایی این دو ترکیب باشد.

کلمات کلیدی: لاکتوفرین، اسپیرولینا، تولیدمثل، همآوری، تفریح، ماهی گورخری.

مقدمه

تغذیه برای عملکرد باروری همه مهره‌داران از جمله ماهیان، حیاتی است. تولیدمثل موفقیت‌آمیز، مستلزم منابع کافی برای حفظ نیازهای انرژی برای تولید گامت و رفتارهای تولیدمثلی است. ارتباط بین تغذیه و تولیدمثل مهم است تا اطمینان حاصل شود که رویداد باروری با مواد مغذی موجود برای تضمین بقای نسل جدید هماهنگ می‌شود. تغذیه مناسب، باعث افزایش رشد ماهی شده و به مولد اجازه می‌دهد سریع‌تر به اندازه‌های بزرگ‌تر برسد و ماهیان بزرگ‌تر نیز تخم‌های درشت‌تری تولید می‌کنند. در نتیجه، شانس بیشتری برای زنده‌مانی دارند. از طرفی، بخش عمده تولیدات ماهیان زینتی در ایران، به پرورش گونه‌های آب شیرین اختصاص دارد. یکی از با اهمیت‌ترین گونه‌های ماهیان آب شیرین در صنعت تجارت ماهیان آکواریومی، ماهی گورخری (*Danio rerio*) است که ماهی کوچک و گرمسیری، متعلق به رودخانه‌های جنوب آسیا است. همچنین، به عنوان یک مدل مهره‌دار در تحقیقات علمی به‌طور گسترده‌ای استفاده شده است (Nowik et al. 2015). ماهی گورخری به عنوان یک مدل برای مطالعات تغذیه ماهی نیز پیشنهاد شده است. دلایل اولیه مانند نگهداری بسیار ارزان‌تر ماهی گورخری نسبت به موش و نیاز به فضای کمتر، سبب گسترش این مدل شده است که مدلی محبوب در بین آبزیان است. این ماهی به دلیل همآوری نسبی زیاد، اندازه کوچک نوزاد و جنین (۱ تا ۵ میلی‌متر با توجه به مراحل رشد)، دوره جنینی شفاف (راحتی دیدن اندام‌های داخلی ماهی گورخری) و دوره زندگی کوتاه در مطالعات زیست‌پزشکی کاربرد زیاد دارد. با وجود این، به‌رغم محبوبیت آن، مطالعات به‌نسبت کمی در مورد ترکیبات غذایی مؤثر بر عملکرد تولیدمثلی ماهی گورخری وجود دارد (Carnevali et al. 2013).

لاکتوفرین یک نوع گلیکوپروتئین با وزن مولکولی ۸۰ کیلو دالتون با جایگاه‌هایی برای پیوند با آهن است و کارکردهای زیستی فراوانی از قبیل تنظیم، جذب و انتقال آهن در روده، بهبود فلور طبیعی روده و فعالیت‌های ضدباکتریایی دارد (Cutone et al. 2020). در واقع، لاکتوفرین آهن آزاد محیط را جذب می‌کند و در نتیجه، باکتری‌ها و عوامل آسیب‌زایی که برای رشد و تکثیر خود به آهن نیاز دارند، از آن

محروم می‌مانند. به این ترتیب، می‌تواند روی فعالیت آنزیم‌های گوارشی و فلور باکتریایی روده تأثیر بگذارد. لاکتوفرین مقاوم به حرارت، و همچنین تا حدودی مقاوم به تجزیه پروتئولیتیک است و می‌تواند بر شرایط تولید غذا، مایعات اسیدی معده و شرایط تجزیه پروتئین در روده غلبه کند (Kumari et al. 2003).

اسپیرولینا ریزجلبکی متعلق به جلبک‌های سبز-آبی و حاوی اسیدهای آمینه، رنگدانه‌ها، ویتامین‌ها، قندها و پروتئین‌هاست (Seghiri et al. 2019). این جلبک دارای کاروتنوئیدهایی شامل بتاکاروتن است که افزودن آن به جیره غذایی ماهیان آب شیرین، نقش مؤثری در بهبود رشد، توسعه گنادها و بهبود بلوغ دارد. به‌علاوه، اسپیرولینا مکمل خوبی برای رشد بهتر و کاهش ضایعات تغذیه‌ای و مقاومت در برابر بیماری‌هاست (Gowsalya, 2015). همچنین، نقش کاروتنوئیدها در تولیدمثل ماهی و مراحل مختلف آن از قبیل بلوغ اووسیت‌ها، لقاح تخمک‌ها، تنفس تخم و رشد جنین مشخص شده است (Pavlov et al. 2004). با توجه به مطالعات انجام شده درباره جلبک اسپیرولینا به‌عنوان غذای ماهی و تأثیر این جلبک بر تولیدمثل و محدود بودن اطلاعات درخصوص اثر رژیم غذایی حاوی لاکتوفرین گاوی بر فیزیولوژی و تولیدمثل ماهیان، در این پژوهش تلاش شد که اثر لاکتوفرین و پودر جلبک اسپیرولینا به‌تنهایی یا به صورت توأم بر عملکرد تولیدمثلی ماهی مولد ماده گورخری بررسی شود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان در قالب طرح کاملاً تصادفی برنامه‌ریزی و اجرا شد. برای انجام آزمایش، ۲۲۸ عدد ماهی گورخری با میانگین وزن اولیه ۰/۲۷ گرم و سن ۲ ماهگی درون آکواریوم با حجم آبگیری ۶۰ لیتر توزیع شدند. در هر آکواریوم از یک سنگ هوا، هوادهی و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در زمان انجام تحقیق استفاده شد (Geffroy and Simon, 2013). آب هر آکواریوم دو نوبت در هفته با آب تازه و هم‌دما تعویض شد. در طی دوره آزمایش، شرایط کیفی آب کنترل شد. دمای آب ۲۸ درجه سانتی‌گراد، مقدار pH آب ۷/۳۸، سختی آب

کنار هم چیده شد. سپس، برای از بین بردن رطوبت اضافی در معرض هوا قرار داده شد. زمانی که رطوبت اضافی جیره تبخیر شد، روغن آفتابگردان به سطح جیره افزوده شد. میزان انرژی جیره تقریباً ۳۰۰۰ کیلوژول بر کیلوگرم بود. آزمایش در چهار گروه شامل شاهد (تغذیه شده با جیره پایه)، تیمار لاکتوفرین (جیره پایه غنی شده با ۴۰۰ mg/kg لاکتوفرین)، تیمار اسپیرولینا (جیره پایه غنی شده با ۱۰۰ g/kg پودر جلبک اسپیرولینا) و تیمار تلفیقی لاکتوفرین + اسپیرولینا (جیره پایه غنی شده با ۴۰۰ mg/kg لاکتوفرین و ۱۰۰ g/kg پودر جلبک اسپیرولینا) برنامه‌ریزی و اجرا شد. هر تیمار شامل سه تکرار و هر تکرار نیز شامل ۱۹ عدد ماهی بود.

۱۰۴ mg/L کربنات کلسیم (با استفاده از روش تیتراسیون) و مقدار اکسیژن ۶/۴۸ mg/L بود. غذاهای به‌صورت دستی در سه نوبت در شبانه‌روز (۹:۰۰، ۱۳:۰۰ و ۱۷:۰۰) و به میزان ۵٪ وزن بدن انجام شد. نوع و مقدار اقلام غذایی در جیره آزمایشی مطابق با جدول ۱ تهیه شد و بعد از مخلوط شدن با ترازو توزین شد. برای هر تیمار ۵۰۰ گرم جداسازی و لاکتوفرین و پودر جلبک اسپیرولینا به جیره اضافه شد و برای توزیع شدن یکنواخت این مکمل‌های غذایی در کل سطوح جیره، مواد با یکدیگر مخلوط شدند. پس از اینکه غذا حالت خمیری به خود گرفت، داخل چرخ گوشت دستی قرار داده شد و به‌صورت رشته‌های باریک و هم اندازه با فاصله مناسب در

جدول ۱ اجزای جیره‌های آزمایشی (برحسب درصد) تهیه شده برای تغذیه ماهی مولد ماده گورخری

اجزای جیره	گروه شاهد	اسپیرولینا	لاکتوفرین	اسپیرولینا + لاکتوفرین
پودر ماهی	۵۲/۰۸	۴۷/۰۹	۵۰/۰۲	۴۶/۰۹
آرد گندم	۱۹/۸۲	۱۷/۶۵	۱۸/۸۳	۱۶/۷۶
پودر سویا	۲۲/۹۰	۲۰/۰۶	۲۱/۹۵	۱۷/۱۷۹۵
روغن آفتابگردان	۴/۶	۴/۶	۴/۶	۴/۶
مکمل معدنی	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱
مکمل ویتامینه	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
اسپیرولینا	۰	۱۰	۰	۱۰
لاکتوفرین	۰	۰	۰/۰۴	۰/۰۴

مکمل معدنی ساخت شرکت خوراک دام و آبزیان مازندران، ایران (آهن ۲۱/۶۲٪، روی ۳۶/۰۵٪، سلنیوم ۰/۰۷٪، کیلک ۰/۳۶٪، مس ۲۱/۶۳٪، منگنز ۱۸/۰۲٪، ید ۲/۱۶٪ و کولین کلراید ۰/۰۴٪).

مکمل ویتامینه ساخت شرکت ارس بازار، ایران محتوی ویتامین‌های A ۱۵/۲۴٪، D₃ ۳/۰۴٪، K₃ ۰/۶۰٪، E ۳/۰۴٪، B₁ ۶/۰۹٪، B₂ ۰/۰۹۱٪، B₆ ۰/۰۹۱٪، C ۲۰/۴۸٪، کلسیم پنتوتنات ۹/۱۴٪، متیونین ۱۸/۲۹٪ و سیستئین ۹/۱۴٪.

شاخص‌های تولیدمثلی

داده شد. این پژوهش با ۳ تکرار انجام شد، به طوری که ماهی - های مولد به‌صورت تصادفی انتخاب و به درون محیط‌های تکثیر منتقل شدند. ۲۴ ساعت بعد از وارد شدن ماهیان به محیط تکثیر، پس از روشن شدن هوا، محیط‌های تکثیر زیر نور لامپ برای مشخص شدن اینکه تخم‌ریزی انجام شده، بررسی شدند. ماهیانی که تخم‌ریزی نکرده بودند، به مدت یک هفته به آنها فرصت داده شد. بعد از یک هفته باز به محیط تکثیر منتقل شدند و ماهیانی که تخم‌ریزی کرده بودند، از محیط تکثیر خارج شدند. روز بعد از تخم‌ریزی مولدین، با سیفون کردن تخم‌ها، بدون اینکه به تخم‌ها آسیبی وارد شود،

بعد از سه هفته غذاهای، ماهیان ماده که از روی شکل ظاهری آماده تخم‌ریزی بودند، با رعایت نسبت ۱ به ۲ (۱ ماهی ماده و ۲ نر) وارد محیط تکثیر شدند. محیط‌های تکثیر سطل‌های ۱ لیتری بودند و برای جلوگیری از مصرف تخم‌ها توسط ماهیان مولد و بررسی شاخص‌های تولیدمثلی آن‌ها، به دو قسمت توسط توری با چشمه‌های ریز تقسیم شدند. در قسمت بالا، ماهیان مولد با رعایت نسبت جنسی و در قسمت پایین تخم‌ها نگهداری شدند. درون هر کدام یک هواده و یک داماسنج برای تنظیم دما (دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد) قرار

تخم‌ها به داخل پتری دیش منتقل و زیر میکروسکوپ با دقت شمارش شدند. برای محاسبه قطر تخم‌ها در هر گروه، تعدادی تخم به‌عنوان نمونه به صورت انتخابی با پیپت جدا و قطر آنها با استفاده از میکرومتر چشمی میکروسکوپ (Nikon, Japan) (با دقت ۰/۰۰۱ میکرون) به‌دست آمد. همچنین، درصد لقاح بر اساس تقسیمات سلولی تخم در زیر میکروسکوپ بررسی و یادداشت شد. بعد از بررسی لقاح، تخم-های لقاح‌یافته دوباره به محیط تکثیر منتقل، تا میزان تفریح، میزان بازماندگی لارو، قطر و وزن لاروها اندازه‌گیری شوند. برای به‌دست آوردن میزان تفریح، ۴۸ ساعت بعد دوباره تخم-های لقاح یافته زیر میکروسکوپ بررسی شدند. همچنین،

برای بررسی بازماندگی لاروها، روز هفتم بعد از تخم‌ریزی تعداد لاروها را شمارش و یادداشت برداری انجام شد. برای محاسبه وزن و طول لاروها، تعدادی لارو به عنوان نمونه انتخاب، و وزن و درازای آن‌ها به ترتیب با ترازو دیجیتالی (با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم) و میکروسکوپ اندازه‌گیری شد. موفقیت تولیدمثل، درصد لقاح، درصد تفریح، درصد زنده-مانی لارو تا زمان شنای فعال، هم‌آوری کاری و هم‌آوری کاری-نسبی از طریق روابط زیر به‌دست آمد (Qin et al. 2014):

$100 \times (\text{تعداد کل ماهیان در محیط تکثیر} / \text{تعداد ماهیان تخم‌ریزی کرده}) = \text{موفقیت تولیدمثل}$

$100 \times (\text{تعداد کل تخم‌ها} / \text{تعداد تخم‌های لقاح یافته}) = \text{درصد لقاح}$

$100 \times (\text{تعداد تخم‌های لقاح یافته} / \text{تعداد تخم‌های تفریح شده}) = \text{درصد تفریح}$

$100 \times (\text{تعداد کل تخم‌های تفریح شده} / \text{تعداد کل لاروهای زنده}) = \text{زنده‌مانی لاروها}$

تعداد کل تخم ریخته شده به ازای هر مولد = هم‌آوری کاری

وزن مولد / هم‌آوری کاری = هم‌آوری کاری - نسبی

میکرون مشاهده و ثبت شد. برای اندازه‌گیری وزن تخمک‌ها

از ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم استفاده شد. شاخص

گنادوسوماتیک، هم‌آوری نسبی و متوسط وزن تخمک‌ها از

طریق روابط زیر به‌دست آمد (James et al. 2009; Qin et al. 2014):

$100 \times (\text{وزن ماهی} / \text{وزن تخمدان}) = \text{شاخص گنادوسوماتیک (GSI)}$

تعداد کل تخمک‌های تولید شده به ازای هر مولد = هم‌آوری مطلق

وزن مولد / هم‌آوری مطلق = هم‌آوری نسبی

مجموع وزن تخمک‌ها / تعداد تخمک‌ها = متوسط وزن تخمک‌ها (mg)

در پایان دوره آزمایش، شکم ماهیان ماده‌ای که تخم‌ریزی نکرده بودند، توسط تیغ جراحی ضدعفونی شده با الکل ۷۵٪ از ناحیه منفذ تناسلی به طرف سر برش و تخمدان با دقت از محوطه شکمی خارج شد و تعداد کل تخمک‌ها و همچنین، قطر تخمک‌ها توسط میکروسکوپ مدرج با دقت ۰/۰۰۱

استفاده شد و در نتایج، داده‌ها به صورت (میانگین \pm خطای استاندارد) بیان شد.

نتایج

شاخص‌های تولیدمثلی در ماهیان موفق به تخم‌ریزی

در بررسی درصد تخم‌ریزی در بین تیمارهای آزمایشی

اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$). بیشترین مقدار

تحلیل آماری

تحلیل نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS 24 انجام شد. قبل

از تحلیل، نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-

اسمیرنوف ارزیابی شد و برای مشخص شدن معنی‌داری

تفاوت‌ها از آزمون واریانس یک‌طرفه استفاده شد. برای مقایسه

میانگین‌ها نیز از آزمون آماری دانکن در سطح احتمال ۵٪

اختلاف معنی‌دار نشان داد، به طوری که بیشترین درصد در تیمار اسپیرولینا و تیمار لاکتوفرین + اسپیرولینا به دست آمد ($p < 0.05$). در بررسی درصد تفریح در بین تیمارهای مختلف آزمایشی تفاوت معنی‌دار مشاهده شد، به طوری که بیشترین درصد تفریح در تیمار لاکتوفرین + پودر جلبک اسپیرولینا ($82/33 \pm 5/37$) و کمترین درصد تفریح در گروه شاهد ($41/18 \pm 5/16$) دیده شد ($p < 0.05$)، جدول ۲).

شاخص هم‌آوری کاری در تیمار لاکتوفرین + اسپیرولینا ($95 \pm 1/24$) و کمترین مقدار در گروه شاهد ($34 \pm 1/65$) مشاهده شد ($p < 0.05$). نتایج حاصل از هم‌آوری کاری - نسبی در بین تیمارهای مختلف آزمایشی در ماهیان مولد ماده گورخری اختلاف معنی‌دار نشان داد، به طوری که کمترین مقدار در گروه شاهد مشاهده شد ($p < 0.05$)، جدول ۲). درصد لقاح تخم‌های مشاهده شده در بین تیمارهای آزمایشی

جدول ۲ شاخص‌های تولیدمثلی (میانگین \pm خطای استاندارد) ماهی مولد ماده گورخری در تیمارهای مختلف آزمایشی

تیمار	درصد تخم‌ریزی	هم‌آوری کاری	هم‌آوری کاری نسبی	درصد لقاح	درصد تفریح
شاهد	$18/88 \pm 2/64$	$34/00 \pm 1/65^d$	$102/1 \pm 12/16^b$	$44/99 \pm 3/08^b$	$58/6 \pm 4/18^b$
اسپیرولینا	$35/55 \pm 5/89$	$65/66 \pm 1/18^c$	$203/8 \pm 27/07^a$	$92/30 \pm 2/46^a$	$71/45 \pm 5/69^{ab}$
لاکتوفرین	$37/77 \pm 4/15$	$77/66 \pm 1/22^b$	$236/5 \pm 23/74^a$	$51/77 \pm 5/46^b$	$69/15 \pm 5/46^{ab}$
لاکتوفرین+اسپیرولینا	$37/77 \pm 4/15$	$95/00 \pm 1/24^a$	$261/3 \pm 11/68^a$	$90/98 \pm 2/47^a$	$82/33 \pm 5/37^a$

در هر ستون، گروه‌های دارای حداقل یک حرف مشابه، فاقد تفاوت معنی‌دار هستند ($p > 0.05$).

داد، بیشترین وزن لارو نیز مربوط به تیمار لاکتوفرین + پودر جلبک اسپیرولینا بود، اما کمترین مقدار در لاروهای مربوط به گروه شاهد مشاهده شد ($p < 0.05$)، جدول ۳). بالاترین درصد زنده‌مانی ($95/71 \pm 4/09$) در لاروهای مربوط به تیمار لاکتوفرین + پودر جلبک اسپیرولینا به دست آمد، اما کمترین درصد در گروه شاهد ($61/44 \pm 4/31$) دیده شد ($p < 0.05$)، جدول ۳).

نتایج حاصل از قطر تخم در ماهی مولد ماده گورخری در بین تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌دار نشان داد و بیشترین قطر تخم در تیمار لاکتوفرین + پودر جلبک اسپیرولینا ($107 \pm 1/17$ میلی‌متر) دیده شد. بین تیمار اسپیرولینا ($102 \pm 1/08$ میلی‌متر) و گروه شاهد ($106 \pm 1/04$ میلی‌متر) اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$)، جدول ۳). بیشترین درازا در لارو حاصل از تیمار اسپیرولینا مشاهده شد. وزن لاروها در بین تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌دار نشان

جدول ۳ شاخص‌های تولیدمثلی (میانگین \pm خطای استاندارد) ماهی مولد ماده گورخری در تیمارهای مختلف آزمایشی

تیمار	قطر تخم (mm)	طول لارو (mm)	وزن لارو (mg)	درصد زنده ماننی لارو تا شنای فعال
شاهد	106 ± 0.04^b	$3/55 \pm 0.05^b$	0.002 ± 0.001^c	$61/44 \pm 4/31^c$
اسپیرولینا	108 ± 0.02^b	$3/91 \pm 0.09^a$	0.004 ± 0.001^{bc}	$88/33 \pm 4/8^a$
لاکتوفرین	112 ± 0.03^{ab}	$3/66 \pm 0.06^{ab}$	0.002 ± 0.001^{ab}	$76/08 \pm 5/53^b$
لاکتوفرین+اسپیرولینا	117 ± 0.05^a	$3/84 \pm 0.09^{ab}$	0.006 ± 0.001^a	$95/71 \pm 4/09^a$

در هر ستون، گروه‌های دارای حداقل یک حرف مشابه، فاقد تفاوت معنی‌دار هستند ($p > 0.05$).

($13/47$) و کمترین مقدار در تیمار اسپیرولینا ($6/55 \pm 0/82$) و گروه شاهد ($6/57 \pm 0/38$) دیده شد ($p < 0.05$)، جدول ۴). تأثیر جیره‌های آزمایشی بر هم‌آوری مطلق در ماهی مولد ماده گورخری تفاوت معنی‌دار نشان داد ($p < 0.05$). میانگین تیمار

شاخص‌های تولیدمثلی در ماهیان ناموفق به تخم‌ریزی در بررسی درصد شاخص GSI، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف آزمایشی مشاهده شد، به طوری که بیشترین درصد شاخص GSI در تیمار لاکتوفرین ($0.32 \pm$

گورخری در بین تیمارهای مورد آزمایش تفاوت معنی دار نشان داد ($p < 0/05$)، جدول ۴). بیشترین تفاوت در تیمار لاکتوفرین + اسپیرولینا و کمترین مقدار در گروه شاهد دیده شد. همچنین، تیمار اسپیرولینا تفاوت معنی داری با تیمار لاکتوفرین + اسپیرولینا و تیمار لاکتوفرین نشان نداد ($p > 0/05$)، جدول ۴). در بررسی وزن انفرادی تخمک در بین تیمارهای آزمایشی در ماهی مولد ماده گورخری اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($p > 0/05$)، جدول ۴).

لاکتوفرین + اسپیرولینا بیشترین میزان را در مقایسه با دیگر تیمارها داشت، در حالی که گروه شاهد کمترین میزان را نشان داد. با وجود این، تفاوت معنی داری بین تیمار لاکتوفرین و تیمار اسپیرولینا دیده نشد. میزان همآوری نسبی در ماهیان مولد ماده گورخری در پایان دوره آزمایشی تفاوت معنی دار نشان داد ($p < 0/05$)، جدول ۴). به طوری که بیشترین مقدار به ترتیب مربوط به تیمار لاکتوفرین ($24/11 \pm 540/34$) و کمترین آن ($18/53 \pm 243/62$) در گروه شاهد دیده شد ($p < 0/05$)، جدول ۴). میانگین قطر تخمک ماهیان مولد

جدول ۴ شاخص های تولیدمثلی (میانگین \pm خطای استاندارد) ماهی مولد ماده گورخری ناموفق در تخمیزی در تیمارهای مختلف آزمایشی

تیمار	شاخص گنادوسوماتیک	همآوری مطلق	همآوری نسبی	قطر تخمک (mm)	وزن تخمک (mg)
شاهد	$6/57 \pm 0/38^c$	$70/2 \pm 8/62^c$	$243/6 \pm 18/53^d$	$0/67 \pm 0/05^c$	$0/00023 \pm 0/00$
اسپیرولینا	$6/55 \pm 0/82^c$	$136/4 \pm 5/54^b$	$322/8 \pm 22/19^c$	$0/76 \pm 0/05^{ab}$	$0/00024 \pm 0/00$
لاکتوفرین	$13/47 \pm 0/32^a$	$150/25 \pm 4/28^b$	$540/3 \pm 24/11^a$	$0/74 \pm 0/04^b$	$0/00027 \pm 0/00$
لاکتوفرین+اسپیرولینا	$10/77 \pm 0/25^a$	$203 \pm 3/86^a$	$428/6 \pm 19/25^b$	$0/80 \pm 0/03^a$	$0/00026 \pm 0/00$

در هر ستون، گروه های دارای حداقل یک حرف مشابه، فاقد تفاوت معنی دار هستند ($p > 0/05$).

و کیفیت گامت های تولیدی اثرگذار خواهند بود (Sullivan and Yilmaz, 2018).

یکی از نقش های اساسی لاکتوفرین، هموستاز آهن در بدن است و به این منظور، آهن آزاد را از سلول های روده ای جذب و از طریق خون وارد کبد می کند (Adlerova et al. 2008). در مطالعه Eslamloo و همکاران (2012) بیشترین سطح آهن موجود در بافت عضله تاسماهی سبیری *Acipenser baeri* مربوط به گروه شاهد بود. اگرچه در تحقیق حاضر، میزان آهن در کبد و عضله ارزیابی نشد، ولی با توجه به مطالعات انجام شده می توان نتیجه گرفت که در شرایط بحرانی، میزان آهن آزاد در بافت عضله و خون افزایش، ولی ظرفیت اتصال کل آهن کاهش می یابد. همچنین، ثابت شده است که لاکتوفرین مخاط روده را پس از جذب بیش از حد آهن، با اتصال به آهن محافظت می کند و در نتیجه، آهن را از دسترس خارج می کند. اضافه کردن لاکتوفرین به جیره غذایی، مقدار آهن در بافت های حساس مانند خون یا عضلات را کاهش، ولی ظرفیت اتصال کل آهن پلاسما را افزایش می-

بحث

در پژوهش حاضر، جیره غذایی حاوی لاکتوفرین + پودر جلبک اسپیرولینا به طور معنی دار روی شاخص های تولیدمثلی ماهی ماده گورخری مؤثر بود. کیفیت تخم ماهی ممکن است تحت تأثیر سن مولد ماده، شرایط محیطی، زمان چرخه تخم گذاری، عوامل ژنتیکی، فرایندهای پیش از بلوغ، استرس، شرایط فیزیولوژیک و محیطی (استرس و بیماری)، وضعیت سلامت و تغذیه قرار گیرد (Swain and Nayak, 2009; Coban et al. 2011). با وجود این، یافته های اخیر ثابت کرده است که کیفیت لارو و تخم ماهی در درجه اول تحت تأثیر شرایط تغذیه ای مولدین قرار دارد (ناکاگوا و همکاران، 2007).

تولیدمثل، فرایندی بسیار پیچیده است که محورها و ترکیبات هورمونی و آنزیمی متعددی در آن دخیل هستند. بنابراین، تأمین مواد مغذی و یا ترکیباتی که در سوخت و ساز یا ساختار آنزیم ها و هورمون ها دخالت دارند و می توانند بر سطح سلامتی و آسایش آبی تأثیرگذار باشند، بر فرآیند تولیدمثل

حین آن افزایش می‌یابد، ولی زمانی که ماده تمایل به جفت-گیری ندارد، قابل شناسایی نیست. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که لاکتوفیرین در ایجاد تمایل به جفت‌گیری و افزایش تعداد ماده‌های بارور تأثیرگذار است.

از طرف دیگر، کمبود ویتامین C موجب کاهش مصرف چربی برای تأمین انرژی و در نتیجه، باعث افزایش تجمع چربی‌های اکسید شده در بدن می‌شود. ناکاگاوا و همکاران (۲۰۰۷) اثر عصاره کلرلا بر سوخت و ساز چربی را بررسی و گزارش کردند که میزان تجزیه چربی در ماهیان تغذیه شده با عصاره کلرلا بالاتر است. این امر نشان‌دهنده تأثیر مثبت عصاره کلرلا در فعال کردن ذخایر چربی به‌عنوان منبع انرژی است. به عبارتی، تحریک تجزیه چربی را می‌توان با بهبود جذب ویتامین C توسط جلبک اسپیرولینا توضیح داد (ناکاگاوا و همکاران ۲۰۰۷). شواهد نشان می‌دهند که مقادیر بالاتر پروتئین و چربی جیره، باعث افزایش عملکرد تولیدمثلی در ماهیان می‌شوند. گزارش شده است که در ماهی سیم دریایی قرمز *Pagrus major* اثری تلفیقی بین اسپیرولینا و ویتامین C وجود دارد که باعث افزایش وزن بدن، بازده خوراک و هضم غذا می‌شود، به طوری که اسپیرولینا از تخریب ویتامین C در رژیم غذایی محافظت می‌کند و باعث افزایش این ویتامین در سرم و کبد می‌شود. فعالیت آنزیم تجزیه‌کننده اسیدهای آمینه، با همزیستی اسپیرولینا و ویتامین C به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد (Mustafa et al. 1997). همچنین، مطالعات نشان می‌دهند که برخی از کاروتنوئیدها فعالیت‌های زیستی متعددی را در پستانداران انجام می‌دهند. آن‌ها می‌توانند واکنش‌های ایمنی اختصاصی و غیراختصاصی را افزایش دهند. کاروتنوئیدها و حتی گزانتوفیل‌ها به عنوان پیش‌ماده ویتامین A برای تحریک رشد و بهبود کیفیت تخم و تکثیر در ماهی عمل می‌کنند (ناکاگاوا و همکاران، ۲۰۰۷). کاروتنوئید موجود در غذا پس از جذب در روده، وارد خون شده و در عضله، کبد و پوست تجمع می‌یابد. سپس طی مراحل تشکیل تخم یا رشد گنادی، از عضله و کبد به سمت تخمدان‌های در حال رشد، انتقال، و در تخم‌ها تجمع می‌یابد (علیزاده و همکاران، ۱۳۹۴). بررسی روی ماهیان مولد کاد (*Gadus morhua*) نشان داد که حضور آستاگزانتین در جیره غذایی باعث بهبود کیفیت تخم و افزایش میزان همآوری

دهد. بنابراین، این اثرات لاکتوفیرین باعث کاهش آهن آزاد خون و بازگشت آن به بدن در شرایط بحرانی مانند کم‌خونی در ماهیان می‌شود. از طرف دیگر، آهن در فرآیندهای بیوشیمیایی مختلف، از جمله انتقال اکسیژن، سنتز DNA، انتقال الکترون و تنظیم ژن شرکت می‌کند (Mohanty and Samanta, 2018) و همچنین، باعث افزایش باروری می‌شود. در مطالعاتی که روی حیوانات مختلف انجام شده است، دریافته‌اند که کمبود آهن باعث تولید نسل‌های کوچک و ناقص می‌شود. احتمالاً افزایش شاخص‌های تولیدمثلی (تعداد کل تخم، قطر تخم و همآوری نسبی)، مربوط به افزایش میزان آهن در جیره حاوی لاکتوفیرین + پودر جلبک اسپیرولینا باشد. Gao و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه خود روی تأثیر میکروجلبک‌ها بر کمبود آهن در موش گزارش کردند که جلبک اسپیرولینا باعث افزایش میزان آهن در موش می‌شود. به نظر می‌رسد که پودر جلبک اسپیرولینا باعث افزایش میزان آهن در خون شده است و لاکتوفیرین با تنظیم جذب آهن، مانع تجمع سطوح آهن در کبد ماهیان مولد ماده گورخری شده است. در نتیجه، شاید آهن در فرآیند تولیدمثلی استفاده شده باشد. بهبود عملکرد کبد، نقشی اساسی در فرآیند تولیدمثلی در ماهیان ماده دارد.

در مطالعات متفاوت، بهبود عملکرد کبد با در نظر گرفتن زمان بهبودی حاصل از بیهوشی القا شده با فنوکسی اتانول گزارش شده و مشخص شده است که استفاده از جیره‌های غنی شده با جلبک‌ها می‌تواند مدت زمان بازگشت از بیهوشی الکلی را در ماهیان کاهش دهد که خود، بیانگر بهبود عملکرد کبد در این دسته از ماهیان است (ناکاگاوا و همکاران، ۲۰۰۷). Teng و همکاران (۲۰۰۲) به بیان ژن لاکتوفیرین و پاسخ آن به تحریک استروژن در دستگاه تولیدمثلی چندین سویه موش و همستر نابالغ ماده پرداختند. آنها به این نتیجه رسیدند که لاکتوفیرین و هورمون استروژن دارای خاصیت هم‌افزایی هستند، به گونه‌ای که با افزایش استروژن، میزان لاکتوفیرین افزایش می‌یابد. نتایج آنها نشان داد که ژن لاکتوفیرین در رحم دستگاه تناسلی نیز وجود دارد و به تحریک هورمون استروژن حساس است. با اینکه به طور معمول و فارغ از تأثیر هورمون، مقدار قابل توجهی از لاکتوفیرین در قسمت لوله رحمی وجود دارد و میزان آن در موش در زمان تمایل به جفت‌گیری و در

جلبک اسپیرولینا بر افزایش عملکرد تولیدمثلی ماهی *Pseudotropheus acei* گزارش شد. دلیل این بهبود عملکرد به طور کامل مشخص نشده است. به طور کلی، دلایل قطعی فیزیولوژیک برای نتایج حاصل از افزایش شاخص‌های تولیدمثلی ناشی از استفاده از جلبک اسپیرولینا وجود ندارد. با وجود این، مطالعات گذشته به نقش رنگدانه‌ها، پیش‌سازهای ویتامین A و اسید چرب اشاره داشتند. شواهد نشان می‌دهد که میکروجلبک‌های *Scenedrsmus actus* و *Spirulina maxima* در شیرین ماهی (*Plecoglossus altivelis*) موجب بهبود کیفیت تخم در زمان تشکیل آن می‌شود. افزودن جلبک‌ها به جیره ماهی باعث بهبود قابل ملاحظه شرایط فیزیولوژیک، بقا، مقاومت در برابر بیماری‌ها، ترکیب دلخواه بدن و کیفیت لاشه می‌شود (Radhakrishnan et al. 2014). مطالعات قابل مقایسه در مورد اثر ترکیب لاکتوفیرین و پودر جلبک اسپیرولینا در تولیدمثلی ماهی در دسترس نیست و نیاز به مطالعات تکمیلی دارد.

نتیجه این مطالعه نشان داد جیره غذایی حاوی ۴۰۰ mg/kg لاکتوفیرین و ۱۰۰ g/kg پودر جلبک اسپیرولینا باعث بهبود مشخصه‌های تولیدمثلی ماهی ماده گورخری مؤثر می‌شود.

منابع

علیزاده، م.، انصاری، ر.، دادگر، ش.، حافظیه، م. ۱۳۹۴. تاثیر سطوح مختلف آستاگزانتین مصنوعی و جلبکی (*Haematococcus pluvialis*) بر ذخیره آستاگزانتین تخم مولدین قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران ۲۵: ۱۶۰-۱۴۹.

ناکاگاوا، اچ.، ساتو، ام.، گاتلین، دی. ۲۰۰۷. مکمل‌های غذایی برای سلامتی و کیفیت ماهیان پرورشی. ترجمه: عابدیان کناری، ع.، ستوده، ا. ۱۳۹۱. انتشارات دانشگاه تربیت مدرس. ۳۹۶ ص.

می‌شود (Sawanboonchun et al. 2008). هنگامی که آزاد ماهیان با جیره‌های حاوی مقادیر زیاد آستاگزانتین تغذیه می‌شوند، میزان رشد و بازماندگی افزایش می‌یابد (ناکاگاوا و همکاران، ۲۰۰۷). مقادیر بالای آستاگزانتین در تخم‌های آزاد ماهیان، ذخیره بالقوه‌ای برای تولید ویتامین A در طی دوره اولیه رشد است و همچنین، باعث بهبود تخم‌ریزی و میزان تفریح در ماهیان مولد می‌شود. بنابراین، کاروتنوئیدها علاوه بر خاصیت رنگ‌دهی به ماهیان، باعث افزایش کیفیت تخم هم می‌شوند.

Ahmadian و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعات خود روی تأثیر لاکتوفیرین بر تولیدمثلی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان گزارش کردند که لاکتوفیرین گاو سبب افزایش میزان بقا و همآوری، بازماندگی تخم، میزان تفریح تخم، بازماندگی لارو، میزان پروتئین و چربی خام موجود در تخم و همچنین، اسیدهای چرب موجود در تخم می‌شود. همچنین، Ahmadnia-Motlagh و همکاران (۲۰۱۷) لاکتوفیرین را به جیره غذایی ماهی طلایی *Carassius auratus* اضافه کردند و افزایش میزان لقاح را گزارش دادند. آنها لاکتوفیرین را عامل افزایش کارایی تولیدمثلی معرفی کردند. اثر تغذیه‌ای کلرلا بر ماهی *Plecoglossus altivelis* در یک آزمایش چالشی با ویبریو آنگوئیلاروم بررسی شد. آنها ماهیان را به مدت ۵ دقیقه در سوسپانسیون باکتریایی غوطه‌ور کردند و سپس، میزان بازماندگی در طول هفت روز پس از غوطه‌وری ثبت شد. بازماندگی تیمار تغذیه شده با عصاره کلرلا ۷۵٪ و گروه شاهد ۵۵٪ بود. اثر مثبت مکمل پودر کلرلا و اسپیرولینا (۵-۱٪) روی ماهیان *Girella punctata* و *Pseudocaranx dentex* به اثبات رسیده است، به طوری که مصرف مکمل اسپیرولینا در سطوح ۲ تا ۵٪ باعث اثر قابل ملاحظه بر رشد و کارایی غذایی سیم دریایی قرمز شد. همچنین، استفاده از اسپیرولینا با مقادیر بالاتر از ۵ تا ۲۰٪ در جیره میگوی بزرگ آب شیرین (*Macrobrachium rosenbergii*) موجب افزایش عملکرد رشد و مصرف غذا شد (ناکاگاوا و همکاران، ۲۰۰۷). همچنین، در مطالعه Güroy و همکاران (۲۰۱۲) تأثیر Ahmadian, E., Agh, N., Tokmechi, A., Jalili, R. 2013. Effect of dietary bovine lactoferrin on rainbow trout

Adlerova, L., Bartoskova, A., Faldyna, M. 2008. Lactoferrin: a review. Veterinarni Medicina 53: 457-468.

- (*Oncorhynchus mykiss*) fecundity and larval quality. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 78: 6-9.
- Ahmadnia-Motlagh, H., Hajimoradlo, A., Ghorbani, R., Agh, N., Safari, O., Lashkarizadeh-Bami, M. 2017. Reproductive performance and intestinal bacterial changes of *Carassius auratus* fed supplemented lactoferrin and *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637 diet. *Iranian Journal of Ichthyology* 4: 150-161.
- Carnevali, O., Avella, M.A., Gioacchini, G. 2013. Effects of probiotic administration on zebrafish development and reproduction. *General & Comparative Endocrinology* 188: 297-302.
- Coban, D., Kamaci, H.O., Suzer, C., Yildirim, S., Arda, G., Korkut, A.Y., Saka, S., Firat, K. 2011. Effect of some morphometric characteristics on egg quality in common Dentex, *Dentex dentex* (Linnaeus, 1758). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 11: 425-431.
- Cutone, A., Rosa, L., Ianiro, G., Lepanto, M.S., Bonaccorsi di Patti, M.C., Valenti, P., Musci, G. 2020. Lactoferrin's anti-cancer properties: Safety, selectivity, and wide range of action. *Biomolecules* 10: 456-482.
- Eslamloo, K., Falahatkar, B., Yokoyama, S. 2012. Effects of dietary bovine lactoferrin on growth, physiological performance, iron metabolism and non-specific immune responses of Siberian sturgeon *Acipenser baeri*. *Fish & Shellfish Immunology* 32: 976-985.
- Gao, F., Guo, W., Zeng, M., Feng, Y., Feng, G. 2019. Effect of microalgae as iron supplements on iron-deficiency anemia in rats. *Food & Function* 10: 723-732.
- Geffroy, B., Simon, O. 2013. Effects of a *Spirulina platensis*-based diet on zebrafish female reproductive performance and larval survival rate. *Société Française D'ichtyologie* 37: 31-38.
- Gowsalya, T. 2015. Role of natural feed items such as spirulina, earthworm, shrimp head meal in the maturation enhancement of goldfish, *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758). Fisheries College and Research Institute Tamil Nadu Fisheries University, 109 p.
- Güroy, B., Sahin, I., Mantoglu, S., Kayalı, S. 2012. *Spirulina* as a natural carotenoid source on growth, pigmentation and reproductive performance of yellow tail cichlid *Pseudotropheus acei*. *Aquaculture International* 20: 869-878.
- James, R., Vasudhevan, L., Sampath, K. 2009. Interaction of *Spirulina* with Different Levels of Vitamin E on growth, reproduction, and Coloration in goldfish (*Carassius auratus*). *Israeili Journal of Aquaculture, Bamidgeh* 61: 330-338.
- Kumari, J., Swain, T., Sahoo, P.K. 2003. Dietary bovine lactoferrin induces changes in immunity level and disease resistance in Asian catfish *Clarias batrachus*. *Veterinary Immunology & Immunopathology* 94: 1-9.
- Mohanty, D., Samanta, L. 2018. Dietary supplementation of *Spirulina* ameliorates iron-induced oxidative stress in Indian knife fish *Notopterus notopterus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 61: 71-78.
- Mustafa, M.G., Umino, T., Nakagawa, H. 1997. Limited synergistic effect of dietary spirulina on vitamin C nutrition of red sea bream *Pagrus majorr*. *Journal of Marine Biotechnology* 5: 129-132.
- Nowik, N., Podlasz, P., Jakimiuk, A., Kasica, N., Sienkiewicz, W., Kaleczyc, J. 2015. Zebrafish: an animal model for research in veterinary medicine. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 18: 663-674.
- Pavlov, D., Kjorsvik, E., Refsti, T., Andersen, O. 2004. Brood Stock and Egg Production. in Moksness, E., Kjørsvik, E.,

- Olsen, E. 2004. Culture of cold-water marine fish. Blackwell Publishing, London, 129-203.
- Qin, C., Xu, L., Yang, Y., He, S., Dai, Y., Zhao, H., Zhou, Z. 2014. Comparison of fecundity and offspring immunity in zebrafish fed *Lactobacillus rhamnosus* CICC 6141 and *Lactobacillus casei* BL23. *Reproduction* 147: 53-64.
- Radhakrishnan, S., Saravana Bhavan, P., Seenivasan, C., Shanthi, R., Muralisankar, T. 2014. Replacement of fishmeal with *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* and *Azolla pinnata* on non-enzymatic and enzymatic antioxidant activities of *Macrobrachium rosenbergii*. *The Journal of Basic & Applied Zoology* 67: 25-33.
- Sawanboonchun, J., Roy, W.J., Robertson, D.A., Bell, J.G. 2008. The impact of dietary supplementation with astaxanthin on egg quality in Atlantic cod broodstock (*Gadus morhua*, L.). *Aquaculture* 283: 97-101.
- Seghiri, R., Kharbach, M., Essamri, A. 2019. Functional composition, nutritional Properties, and biological activities of Moroccan Spirulina microalga. *Journal of Food Quality* 32: 1-11.
- Sullivan, C., Yilmaz, O. 2018. Vitellogenesis and Yolk Proteins, *Fish. Encyclopedia of Reproduction* 2-6.
- Swain, P., Nayak, S.K. 2009. Role of maternally derived immunity in fish. *Fish & Shellfish Immunology* 27: 89-99.
- Teng, C.T., Beard, C., Gladwell, W. 2002. Differential expression and estrogen response of lactoferrin gene in the female reproductive tract of mouse, rat, and hamster. *Biology of Reproduction* 67: 1439-1449.

Reproductive performance improvement of female Zebrafish (*Danio rerio*) fed with diet contacting lactoferrin and/or spirulina powder

Sanaz Sadeghi Goghari, Fatemeh Paykan Heyrati, Salar Dorafshan*

Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

Received 23 May 2019; accepted 21 September 2019

Abstract

In this study, the effects of lactoferrin (Lf) and spirulina powder (SP) alone or in combination on reproductive performance of female zebrafish *Danio rerio* were investigated. The fish with average initial weight of 0.27 g were fed with the basal diet (control, C) or diet enriched with Spirulina powder (SP 100 g/kg, T_{SP100}) or lactoferrin (Lf 400 mg/kg, T_{LF400}) or their combination (100 g/kg spirulina and 400 mg/kg lactoferrin, T_{SP100 + LF400}) for 3 weeks. At the end of the experiment, some reproductive indices were determined including fecundity, egg diameter, hatching and fertilization rates, individual larval length and weight. The highest spawning rate was observed in T_{LF400} and T_{SP100 + LF400}. Some reproductive indices such as fertilization and hatching rates were enhanced in T_{SP100 + LF400} ($p < 0.05$). Egg diameters, larval survival and weight were also enhanced in T_{SP100 + LF400} ($p < 0.05$). In case of the brood fish, which failed to spawn, significant enhancement in gonadosomatic index and relative fecundity were observed only in T_{LF400}, while absolute fecundity, oocyte diameter and weight were significantly enhanced in T_{SP100 + LF400} ($p < 0.05$). Raised reproductive performance in fish fed with lactoferrin and spirulina in this study, indicated their synergism effects on zebrafish diet.

Keywords: Lactoferrin, Spirulina, Reproduction, Fecundity, Hatching, Zebrafish.

Corresponding author: sdorafshan@iut.ac.ir