دوره شانزدهم ـ شماره ۳ ـ پاییز ۱۳۹۹
DOI: 10.22055/ivj.2019.188278.2164

اثرات استفاده از غذای غنی شده با نانوذرات سلنیوم بر کیفیت اسپرم و لقاح مولدین نر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

جواد مهدوی‌جهان‌آباد[۱]، سعید ضیائی‌نژاد[۲]*، علیرضا قایدی[۳]، سید حسین مرادیان[۴] و مصیب سیدی‌آب‌الوان[۵]

[۱] دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیاء (ص) بهبهان، بهبهان، ایران

[۲] استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیاء (ص) بهبهان، بهبهان، ایران

[۳] استادیار مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج، ایران

[۴] کارشناس مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج، ایران

[۵] دانشجوی دکترای بهداشت آبزیان، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، کارشناس آزمایشگاه گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی ، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء (ص) بهبهان، بهبهان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۴/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۸/۷/۱۴

چکیده

در این مطالعه اثرات نانوذرات سلنیوم جیره بر کیفیت اسپرم و عملکرد تولید مثلی مولدین نر قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بررسی شد. تعداد ۸۴ قطعه ماهی مولد نر از بین گله‌ی مولدین مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج انتخاب شد. پس از سازگاری، ماهیان به ۴ گروه آزمایشی با ۳ تکرار تقسیم شدند. گروه شاهد با غذای تجاری (فاقد نانوذرات سلنیوم) و سه گروه دیگر با جیره‌ی حاوی ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم نانوذرات سلنیوم در کیلوگرم جیره، به مدت ۲ ماه تغذیه شدند. بعد از ارزیابی کمیت و کیفیت اسپرم، عملیات تکثیر و لقاح برای گروه‌های مختلف با استفاده از تخمک‌های ماده شاهد انجام شد. بیش‌ترین میزان حجم اسپرم و بیش‌ترین تراکم اسپرم در مولدین قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با ۲ میلی‌گرم نانوذرات سلنیوم در کیلوگرم جیره مشاهده شد. کم‌ترین میزان حجم اسپرم در گروه‌های شاهد و ۰/۵ میلی‌گرم نانوذرات سلنیوم و کم‌ترین تراکم اسپرم در مولدین گروه شاهد مشاهده شد. مدت زمان تحرک اسپرم در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی نانوذرات سلنیوم (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم) به طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه شاهد بود. بین درصد اسپرم‌های متحرک و اسپرماتوکریت میان گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. بیش‌ترین درصد لقاح، چشم‌زدگی و تفریخ تخم مربوط به مولدین نر قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با ۲ میلی‌گرم نانوذرات سلنیوم در کیلوگرم جیره بود. در این پژوهش، جیره حاوی نانوذرات سلنیوم، اثر معنی‌داری بر بازماندگی نتاج در مرحله‌ی شروع تغذیه فعال نداشت. به نظر می‌رسد نانوذرات سلنیوم تا مرحله‌ی تفریخ تخم بر جنین و لارو اثرات مثبت دارد ولی در مرحله‌ی شروع تغذیه فعال اثرات معنی‌داری بر بازماندگی لارو ندارد. بر اساس نتایج این پژوهش، نانوذرات سلنیوم موجب بهبهود عملکرد تولیدمثلی مولدین نر قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود.

کلمات کلیدی: نانوذرات سلنیوم، کیفیت اسپرم، لقاح، تولید مثل، قزل‌آلای رنگین‌کمان

*نویسنده مسئول : سعید ضیائی‌نژاد، استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیاء (ص) بهبهان، بهبهان، ایران

E-mail: zbsaeed@yahoo.com

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

مقدمه

امروزه بهره‌گیری از مکمل‌های غذایی از جمله راهکارهایی است که علاوه بر تأمین مواد مغذی جهت رشد و تکامل موجودات آبزی، می‌تواند افزایش سلامت و مقاومت نسبت به استرس و عوامل بیماری‌زا را به همراه داشته باشد. عملکرد تولیدمثلی حیوانات به فاکتورهای مختلف از جمله ژنتیک، تغذیه، مدیریت و محیط زیست وابسته است (Hedaoo et al, 2008). در دهه‌های اخیر، کشور ما در زمینه‌ی نانوتکنولوژی و کاربردهای آن در پزشکی و محیط زیست پیشرفت چشم‌گیری داشته است (Cheraghi et al, 2004). در سال‌های اخیر نانوذره‌ی سلنیوم توجه گسترده‌ای را با توجه به دسترسی زیستی بالا و سمیت کم‌تر نسبت به دیگر ترکیبات سلنیوم به خود جلب کرده است (Rezvanfar et al, 2013). از طرف دیگر نانوذرات سلنیوم نسبت به ترکیبات دیگر آن را دارد که از آن جمله می‌توان نسبت سطح به حجم بالا، افزایش فعالیت سطحی، ضریب بالای کاتالیزوری و میزان جذب بیش‌تر را نام برد. سلنیوم به عنوان جزئی از آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و سلنوپروتئین‌ها نقش‌های متعددی از جمله دفاع آنتی‌اکسیدانی، باروری در هر دو جنس نر و ماده، متابولیسم تیروئید، سیستم ایمنی، سرطان، عملکرد غدد درون‌ریز بیماری‌های قلبی عروقی و تکامل و عملکرد عضلات ایفا می‌کند (Ahsan et al, 2014). تغییر جزئی در سطوح سلنیوم ممکن است اثرات شدیدی به همراه داشته باشد. سلنیوم مورد نیاز بدن موجودات زنده طریق مواد غذایی تأمین می‌شود. Rotruck و همکاران در سال ۱۹۷۳ گزارش کردند که سلنیوم موجب ساخت پروتیینی به نام سلنوسیستئین می‌شود (SeCys) که برای فرآیندهای طبیعی زندگی، ضروری می‌باشد (Brown & Burk, 1973). از آن‌جا که مدت زمان تحرک اسپرم در ماهیان بسیار کوتاه است، در نتیجه لقاح باید در کوتاه‌ترین زمان ممکن صورت گیرد و در نتیجه فاکتورهای خارجی ممکن است بر توانایی تولیدمثلی تأثیرگذار شوند (Johari, 2014). در میان اندام‌های تولیدمثلی، بیضه دارای بالاترین غلظت سلنیوم است که مقدار آن حتی از کبد نیز بیش‌تر است. غلظت سلنیوم نشان‌دهنده‌ی نقش محافظتی این عنصر کمیاب و آنزیم‌های مرتبط با آن در طی اسپرماتوژنز است (Behne et al, 1982). بافت بیضه دارای غلظت‌های بالای سلنیوم به ویژه به شکل GPx4 است و از آن‌جا که GPx4 عامل اساسی تعیین کننده‌ی ساختار قسمت میانی اسپرماتوزآ است (Beckett & Bruce, 2005) در نتیجه این مسئله ارتباطی میان سلنیوم، کیفیت اسپرم و قابلیت بارورسازی ایجاد می‌کند و از اسپرم‌های در حال تکامل در برابر آسیب‌های DNA ناشی از استرس اکسیداتیو حفاظت می‌کند (Ursini et al, 1999). با توجه به این که در زمینه‌ی اثرات سلنیوم در ماهیان مختلف مطالعاتی انجام شده ولی در مولدین قزل آلای رنگین کمان مطالعه‌ای صورت نگرفته است، در پژوهش حاضر، اثر استفاده از جیره‌ی غذایی غنی شده با نانو ذرات سلنیوم بر کیفیت اسپرم و بازدهی تکثیر مولدین نر ماهی قزل آلای رنگین کمان مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

تهیه مولدین و شرایط پرورشی

این پژوهش در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج اجرا شده است. تعداد ۱۲۰ عدد مولد نر ۴ ساله با میانگین طول ۵۶/۴۳ سانتی‌متر و میانگین وزن ۲۳۷۶/۲۵ گرم با علائم ظاهری مناسب از بین گله مولدین بهگزینی شده مرکز انتخاب شدند. پس از سازگاری کامل ماهی‌ها، غذادهی به مدت ۲ ماه به طور روزانه در دو نوبت طی ساعت ۹ صبح و ۶ عصر بر اساس جیره‌ی غذایی غنی شده با سلنیوم در چهار تیمار مختلف به میزان یک درصد وزن بدن صورت گرفت. تیمارهای مختلف شامل تیمار شاهد بدون افزودن نانوذرات سلنیوم (میزان سلنیوم در جیره‌ی تجاری، ۰/۴ میلی‌گرم در کیلوگرم

غذا)، به علاوه سه تیمار آزمایش که به ترتیب حاوی ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات سلنیوم در کیلوگرم غذا (علاوه بر میزان سلنیوم موجود در جیره تجاری به میزان ۰/۴ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا) بود. نانوذرات مورد استفاده، از شرکت فناوران نانو مقیاس خریداری گردید. برای اثبات بودن نانو، نمونه‌ای از نانوذرات را جهت آنالیز به شرکت دی پترونیک تهران ارسال نمودیم و تست‌های مربوطه من جمله تست SEM انجام گرفت.

شاخص‌های کیفیت آب طی دوره‌ی پرورش ماهیان به صورت منظم ثبت گردید. آب چشمه با دمای ۰/۵±۱۱ درجه‌ی سانتی‌گراد، اکسیژن ۰/۶±۷/۹ میلی‌گرم بر لیتر و pH، ۰/۳ ± ۷/۶ تأمین شد. مقدار خطرناکی برای غلظت آمونیاک ثبت نشد (میزان آمونیاک کم‌تر از ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر بود و با استفاده از کیت سنجش آمونیاک Insta-Test® Analytic اندازه‌گیری گردید). دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی استفاده شد.

مراحل آماده‌سازی غذا

در هر تیمار، مقدار محاسبه شده سلنیوم برای دست‌یابی به دوزهای مورد نظر، ابتدا با آب مقطر به حجم مورد نظر رسانده شد و سپس به صورت جداگانه بر روی غذاها اسپری گردید (در ضمن مقدار سلنیوم پایه در غذای تجاری مورد استفاده ۴/ میلی‌گرم در کیلوگرم می‌باشد). به منظور یکسان‌سازی شرایط، در مورد تیمار شاهد (فاقد نانو منابع سلنیوم) مقدار مساوی آب مقطر (فاقد سلنیوم) بر روی غذا اسپری گردید. دلیل استفاده نکردن از روغن به جای آب مقطر، حساسیت مولدین از نظر بالانس بودن جیره بوده و این که با آب مقطر به راحتی مخلوط همگن نانوذرات تهیه می‌گردد. غذاهای آماده شده به روش فوق به مدت سه ساعت در دمای ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد خشک شدند. به منظور محافظت غذاها و جلوگیری از رها شدن نانو ذرات و ورود آن‌ها به محیط آب، غذاهای آماده شده به روش فوق، توسط لایه‌ای از ژلاتین گاوی پوشانده شدند (Ramsden et al, 2009)؛ بدین منظور ابتدا محلول ۱۰ درصد ژلاتین گاوی در آب مقطر تهیه و بر روی هر یک از انواع غذاها به میزان ۵۰ میلی‌لیتر از محلول ژلاتین به صورت یکنواخت اسپری گردید. در پایان غذاها به مدت ۳ ساعت دیگر در دمای ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد خشک شدند. فرایند آماده‌سازی غذا به منظور جلوگیری از فساد و در دسترس بودن مواد افزودنی دو بار در هفته انجام گرفت.

فاکتورهای کمی و کیفی اسپرم

اسپرم‌گیری

مولدین نر پس از معاینه و بیهوشی توسط پودر گل میخک (۱۵۰ ppm) ، ابتدا بیومتری شده و پس از تعیین طول و وزن با یک پارچه تمیز به خوبی خشک شده و با ماساژ شکمی اقدام به اسپرم‌کشی گردید. اسپرم‌ها، تا زمان استفاده، در یخچال و یا بر روی یخ نگهداری شد. جهت ممانعت از بروز هر گونه آلودگی ناحیه‌ی شکمی توسط عواملی از قبیل آب، موکوس و ادرار، هر ماهی به دقت توسط حوله‌ی خشک شد (Dreanno et al, 1998). برای بررسی فاکتورهای مختلف کمی و کیفی اسپرم ماهیان مورد مطالعه، در هر تیمار از ۱۲ مولد نمونه‌برداری صورت گرفت و برای بالابردن دقت کار فاکتورهایی از جمله تراکم، مدت زمان تحرک، درصد اسپرم‌های متحرک و قابلیت بارورسازی اسپرم (آزمون لقاح) در سه تکرار اندازه‌گیری و ثبت شد.

حجم اسپرم

با توجه به این که مولدین مورد استفاده در این پروژه، از جمعیت پایه و ذخیره‌ی ژنتیکی به حساب می‌آمد و تعدادشان کم بود، امکان کشتن مولدین وجود نداشت که با تهیه‌ی برش گناد این روش را انجام داد. از این رو از روش حجمی استفاده گردید. برای این منظور، مقدار اسپرم به دست آمده از هر مولدین در مرحله‌ی اسپرم‌گیری را در داخل فالکن‌های مدرج ریخته و حجم آن بر حسب میلی-لیتر محاسبه گردید (Billard & Gillet, 1981).

تراکم (غلظت) اسپرم

برای شمارش اسپرماتوزوئیدهای جمع‌آوری شده از مولدین ابتدا آن‌ها را با نسبت ۱ به ۴۰۰ با سرم فیزیولوژی رقیق نموده و سپس در لام مخصوص هموسیتومتر و میکروسکوپ فازکنتراست زمینه سیاه عمل شمارش را انجام داده و تراکم اسپرماتوزوئید بر اساس فاکتورهایی از جمله میزان رقت، عمق لام، تعداد خانه‌های شمارش شده و تبدیل واحد حجم لام از میکرولیتر به میلی‌لیتر محاسبه و ثبت گردید.

میزان اسپرماتوکریت

به منظور اندازه‌گیری میزان اسپرماتوکریت از اسپرم مولدین هر گروه سنی قبل از مخلوط نمودن آن‌ها نمونه-برداری انجام گرفت. نمونه‌ها به لوله‌ی میکروهماتوکریت انتقال داده شدند (Aas et al, 1991). سپس نمونه‌ها به وسیله‌ی دستگاه میکروسانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه و با دور ۷۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ گردید و به وسیله‌ی خط‌کش مخصوص سنجش درصد اسپرماتوکریت، میزان اسپرماتوکریت هر نمونه خوانده شد. به دلیل کمبود امکانات ،گستردگی فاکتورهای مورد سنجش، امکان عکس‌برداری و بررسی مورفولوژی و تعیین اندازه‌ی اسپرم فراهم نبود.

درصد اسپرم‌های متحرک

درصد اسپرم‌های فعال از طریق مشاهده نسبت اسپرم-هایی که ۱۰ ثانیه پس از فعال شدن دارای حرکت رو به جلو باشند، تخمین زده شدند (Aas et al, 1991). برای این منظور مقدار ۲ میکرولیتر اسپرم بر روی لام قرار داده شده و فعال کننده‌ی آب به آن اضافه شد.

مدت زمان تحرک اسپرم

زمانی است که پس از فعال‌سازی، ۹۵ درصد اسپرم‌ها حرکت رو به جلو داشته باشند. به منظور ارزیابی تحرک اسپرم، پس از اسپرم‌گیری ۱۰ میکرولیتر اسپرم را بر روی لام قرار داده و توسط فعال کننده (آب)، فعال شد و مدت زمان تحرک تا زمانی که تمام اسپرم‌ها غیرفعال شوند، توسط کرنومتر ثبت شد. در این بررسی اسپرم‌هایی به عنوان اسپرم‌های متحرک در نظر گرفته شدند که دارای حرکت رو به جلو باشند و آن‌هایی که دارای حرکت لرزشی بودند یا این که دور محور خود می‌چرخیدند به عنوان اسپرم‌های غیرمتحرک در نظر گرفته شدند. مدت زمانی که ۹۵ درصد اسپرم‌ها تحرک خود را از دست دادند ثبت گردید (Nagler et al, 2000).

آزمون لقاح

برای تعیین قدرت بارورسازی اسپرم از آزمون لقاح استفاده شد (Geffen & Evans, 2000; Nagler et al, 2000). برای این منظور از یک مولد ماده تخم‌گیری صورت گرفت و بر اساس Table 1 انواع لقاح میان این مولد ماده و نرهای تغذیه شده با سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم در سه تکرار اجرا شد. غلظت‌ها بر اساس مطالعه Seyyedi و Kalbasi (2017) با کمی تغییرات، انتخاب گردید.

Table 1. Fertilization test to determine the fertility of sperm of male broodstock fishes fed diets containing different amounts of selenium nanoparticles

Treatments	Description of fertilization
Control	Female (control)*male (control)
1	Female (control)* Males fed a diet containing 0.5 mg of selenium nanoparticles
2	Female (control)* Males fed a diet containing 1 mg of selenium nanoparticles
3	Female (control)* Males fed a diet containing 2 mg of selenium nanoparticles

تجزیه و تحلیل آماری

درصد لقاح به صورت نسبت میان تعداد تخم‌های لقاح یافته و تعداد کل تخم‌های استفاده شده بیان شده است. میزان چشم زدگی به صورت درصد تخم‌های چشم زده نسبت به کل تخم‌های لقاح یافته محاسبه و ثبت گردید درصد تخم‌گشایی نیز از طریق نسبت میان تعداد لاروهای زنده پس از تفریخ و تعداد کل تخم لقاح یافته می‌باشد. تمام آنالیزهای مربوط به لقاح، چشم‌زدگی و تخم‌گشایی به صورت درصد محاسبه شده و به صورت (متوسط ± انحراف معیار استاندارد) گزارش شد (Ottesen et al, 2009). اطلاعات جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای نرمال کردن داده‌ها از آزمون کومولوگروف- سمیرنوف و جهت مشخص نمودن وجود اختلاف از نظر آماری از آنالیز واریانس[1] (ANOVA) استفاده گردید. از آزمون Tuckey به عنوان Post-hoc برای معنی‌دار بودن اختلاف میانگین‌ها و سطح معنی‌داری استفاده شد. همچنین از نرم‌افزار آماری Excel به منظور رسم نمودارها استفاده شد.

نتایج

پارامترهای کیفیت اسپرم مولدین نر

نتایج ارزیابی پارامترهای کیفیت اسپرم مولدین نر قزل‌آلای رنگین‌کمان شامل حجم اسپرم، درصد اسپرم‌های متحرک، مدت زمان تحرک اسپرم، اسپرماتوکریت و تراکم اسپرم در تیمارهای تغذیه شده با سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم جیره در Table 2 آمده است.

بیش‌ترین میزان حجم اسپرم مربوط به گروه تغذیه شده با ۲ میلی‌گرم نانوذرات سلنیوم در جیره‌ی غذایی (۳۶/۵±۴۰/۳۲ میلی‌لیتر) و کم‌ترین میزان حجم اسپرم در تیمارهای شاهد و ۰/۵ میلی‌گرم نانوذرات سلنیوم (به ترتیب ۲۲/۷±۲۵/۱۴ و ۲۳/۶۷±۸/۳۲ میلی‌لیتر) مشاهده شد (P<۰/۰۵). حجم اسپرم در تیمار چهارم به طور معنی‌داری بیش‌تر از تیمار شاهد و اول بود (P<۰/۰۵)، ولی اختلاف معنی‌داری با تیمار سوم نشان نداد (P > ۰/۰۵). نتایج پس آزمون آماری دانکن اختلاف معنی‌داری را میان حجم اسپرم در تیمارهای شاهد، اول و دوم نشان نداد (P > ۰/۰۵).

Table 2. Values of sperm quality parameters (Mean±SD) of male rainbow trout, fed with different levels of dietary selenium nanoparticles

Treatments	Sperm volume (ml)	Mobile sperm (%)	Sperm motility duration (seconds)	Spermatocrit (%)	Sperm density (cells × 10^9/ml)
control	22.25±7.14[b]	86.80±7.56[a]	49.83±19.72[b]	19.80±6.14[a]	3.92±.44[b]
0.5 mg selenium nanoparticles	23.67±8.32[b]	88.60±8.05[a]	107.60±38.84[a]	19.40±2.30[a]	4.70±1.44[ab]
1 mg selenium nanoparticles	30.20±6.37[ab]	89.40±7.67[a]	129±52.60[a]	22.80±6.72[a]	5.30±.39[ab]
2 mg of selenium nanoparticles	36.40±5.32[a]	95.60±2.61[a]	145.80±27.84[a]	36.20±10.76[a]	6.49±1.53[a]

* Common letters in each column indicate no significant difference and non-common letters indicate a significant difference (P <0.05) between experimental treatments.

در ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم روند افزایشی در درصد اسپرم‌های متحرک همراه با افزایش غلظت نانوذرات سلنیوم در جیره مشاهده شد (Table 2) و میانگین درصد اسپرم‌های متحرک در ماهیان نر تیمار تغذیه شده با ۲ میلی‌گرم نانوذرات سلنیوم بیش‌تر از سایر تیمارها بود (۹۵/۶۰±۲/۶۱ درصد)، اما اختلاف بین تیمارها معنی‌دار نبود (P > ۰/۰۵). مدت زمان تحرک اسپرم در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم) به طور معنی‌داری بیش‌تر از مدت زمان تحرک اسپرم در گروه شاهد بود که

1- Analysis of Variance

با جیره فاقد نانوذرات سلنیوم تغذیه شده بودند (P<۰/۰۵). همچنین با توجه به جدول نتایج مقادیر پارامترهای کیفیت اسپرم ماهیان مورد بررسی (Table 2)، در ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم روند افزایشی در مدت زمان تحرک اسپرم همراه با افزایش غلظت نانوذرات سلنیوم مشاهده شد، به طوری که بیش‌ترین مدت زمان تحرک اسپرم مربوط به ماهیان تغذیه شده با ۲ میلی‌گرم نانوذرات سلنیوم بود (۱۴۵/۸۰±۲۷/۸۴ ثانیه)، اما این اختلاف معنی‌دار نبود (P > ۰/۰۵). بیش‌ترین میزان اسپرماتوکریت در ماهیان تغذیه شده با ۲ میلی‌گرم نانوذرات سلنیوم مشاهده شد (۲۶/۲۰±۱۰/۷۶ درصد) که اختلاف معنی‌داری را با تیمارهای شاهد، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم نانوسلنیوم نشان نداد (P > ۰/۰۵) (Table 2). بیش‌ترین تراکم اسپرم مربوط به گروه تغذیه شده با ۲ میلی‌گرم نانوذرات سلنیوم در کیلوگرم جیره بود ($۶/۴۹±۱/۵۳×۱۰^{۹}$ اسپرم در میلی‌لیتر منی) و کم‌ترین میزان تراکم اسپرم در مولدین تیمار شاهد مشاهده شد ($۳/۹۲±۰/۴۴×۱۰^{۹}$ اسپرم در میلی‌لیتر منی) که اختلاف معنی‌داری میان این دو تیمار مشاهده شد (P<۰/۰۵). نتایج پس آزمون آماری دانکن اختلاف معنی‌داری را میان تراکم اسپرم در تیمارهای ۰/۵ میلی‌گرم، ۱ میلی‌گرم و ۲ میلی‌گرم نانوسلنیوم نشان نداد (P > ۰/۰۵)

.

میزان لقاح، چشم‌زدگی، تفریخ و بازماندگی نتاج

نتایج میزان لقاح، چشم‌زدگی، تفریخ و بازماندگی نتاج حاصل از مولدین نر قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره‌ی حاوی سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم در Fig 1 & 2 آمده است.

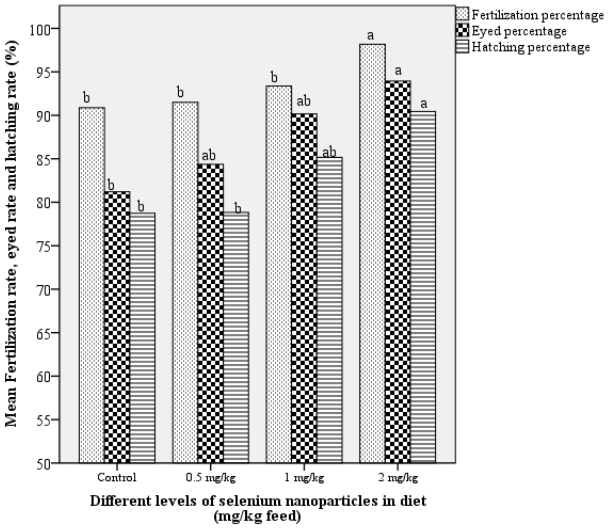

Figure 1. Fertilization percentage, Eyed percentage and Hatching percentage in offspring from male Rainbow trout fed with different levels of selenium nanoparticles in diet. Different letters indicate significant differences (one-way ANOVA, P<0.05) between treatments.

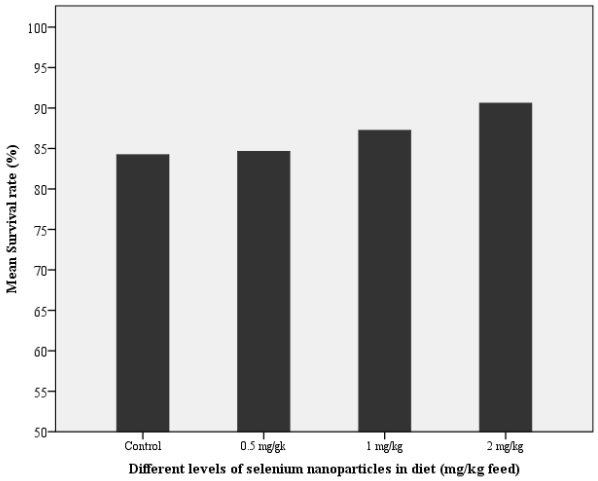

Figure 2. Survival rate (%) in offspring from male Rainbow trout fed with different levels of selenium nanoparticles in diet.

نتایج این تحقیق نشان داد که درصد لقاح در ماهیان تغذیه شده با ۲ میلی‌گرم نانوسلنیوم با ۱/۶۰±۹۸/۱۷ درصد بیش‌ترین بود و اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت (P<۰/۰۵). میزان لقاح در ماهیان تغذیه شده با سطوح ۰/۵ میلی‌گرم و ۱ میلی‌گرم نانوذرات سلنیوم جیره نسبت به گروه شاهد (فاقد نانوذرات سلنیوم) تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (P > ۰/۰۵). بیش‌ترین میزان درصد چشم‌زدگی

تخم مربوط به مولدین تیمار ۲ میلی‌گرم نانوسلنیوم در کیلوگرم جیره بود (۹۳/۹۳±۳/۰۰، Table 2) و کم‌ترین درصد چشم‌زدگی در گروه شاهد مشاهده شد (۸۱/۴±۲۰/۵۷) که با جیره فاقد نانوذرات سلنیوم تغذیه شده بودند و اختلاف معنی‌داری میان این دو تیمار مشاهده شد (P<۰/۰۵). با این وجود سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری را با هم نشان ندادند (P > ۰/۰۵). بیش‌ترین میزان درصد تفریخ تخم در ماهیان تغذیه شده با ۲ میلی‌گرم نانوذرات سلنیوم مشاهده شد (۹۰/۴۳±۰/۷۵ درصد) که اختلاف معنی‌داری با درصد تفریخ در تیمار ۱ میلی‌گرم نانوسلنیوم نداشت (P > ۰/۰۵) ولی نسبت به میزان تفریخ تخم در تیمارهای شاهد و ۰/۵ میلی‌گرم نانوسلنیوم دارای اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). نتایج میزان بازماندگی نتاج حاصل از مولدین (Fig 2) نشان داد که در ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم یک روند افزایشی در میزان بازماندگی نتاج همراه با افزایش غلظت نانوذرات سلنیوم در جیره‌ی غذایی وجود دارد. بیش‌ترین میزان بازماندگی مربوط به ماهیان تغذیه شده با ۲ میلی‌گرم نانوذرات سلنیوم بود (۹۰/۶۰±۵/۱۰) که اختلاف معنی‌داری را نسبت به سایر تیمارها (شاهد، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم نانوسلنیوم) نشان نداد (P > ۰/۰۵). در این پژوهش، درصد بازماندگی نتاج حاصل از مولدین نر قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم جیره تا مرحله‌ی شروع تغذیه فعال، اختلاف معنی‌داری را میان تیمارهای مورد بررسی نشان نداد (P > ۰/۰۵).

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که افزودن نانوذرات سلنیوم به جیره، موجب افزایش تولید اسپرم در مولدین نر قزل آلای رنگین کمان شده و حجم اسپرم را در فصل تکثیر این گونه افزایش می‌دهد. این نتایج با نتایج مطالعه Horky در سال ۲۰۱۲ بر روی خوک نر مطابقت دارد ولی با مطالعه‌ی Lovercamp و همکاران در سال۲۰۱۳، در گراز نر مغایرت داشت.

در پژوهش‌های مختلفی از جمله مطالعه Olson و همکاران در سال ۲۰۰۴ در موش، مطالعه Agarwal و همکاران در سال ۲۰۰۴، اثرات مثبت سلنیوم بر افزایش تعداد اسپرم را نشان داده‌اند که با نتایج پژوهش حاضر که نشان می‌دهد با افزایش سلنیوم جیره از ۰/۵ به ۲ میلی‌گرم در جیره‌ی غذایی تراکم اسپرم افزایش می‌یابد، مطابقت و با نتایج تحقیقات Shi و همکاران در سال ۲۰۱۰ در بزهای نر نژاد بوئر (Boer)، مغایرت دارد. این می‌تواند به دلیل استفاده از دوز خیلی کم سلنیوم یا دوره‌ی کوتاه درمان باشد (Agarwal et al, 2004).

نتایج مطالعه‌ی حاضر با مطالعه‌ی Olson و همکاران در سال ۲۰۰۴، در موش و مطالعه‌ی Sánchez-Gutiérrez و همکاران در سال ۲۰۰۸ در موش مغایرت دارد.

در ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم روند افزایشی در مدت زمان تحرک اسپرم همراه با افزایش غلظت نانوذرات سلنیوم مشاهده شد که با مطالعه‌ی Scott و همکاران در سال ۱۹۹۸، مطابقت دارد.

در مطالعه‌ی حاضر تمامی فاکتورهای نرخ لقاح، چشم‌زدگی، تفریخ و بازماندگی با افزایش سطوح سلنیوم جیره روند افزایشی نشان دادند. شاید این امر به دلیل نقش آنتی‌اکسیدانی سلنیوم باشد. نتایج با مطالعه‌ی Surai و همکاران در سال ۲۰۱۶ مطابقت دارد. تغذیه‌ی مولدین، عملکرد و سلامت نتایج را تحت تأثیر قرار می‌دهد، به طوری که تکمیل جیره‌ی والدین با سلنیوم سیستم آنتی‌اکسیدانی مؤثری را در زمان تولد فراهم می‌کند (Pappas et al, 2008). تکمیل جیره‌های مصنوعی با سلنیوم، رشد و تکامل قزل‌آلای رنگین‌کمان (Hilton et al, 1980) و ماهی هامور (Lin & Shiau, 2005) را افزایش می‌دهد. علاوه بر این، روتیفر غنی‌شده با سلنیوم رشد و تکامل سیم دریایی سر طلایی (Pagrus major) را سرعت بخشید (Kim et al, 2014).

تأثیر مثبت سلنیوم بر بهبود عملکرد تولیدمثلی شامل درصد لقاح، تفریخ و بازماندگی در مطالعات Penglase و همکاران، در سال ۲۰۱۴، در ماهی گورخری ماده و Pappas و همکاران، در سال ۲۰۰۸ به اصبات رسیده است. این نتایج با نتایج مطالعه‌ی حاضر مطابقت دارد.

در مطالعه‌ی حاضر، تکمیل جیره‌ی مولدین نر قزل‌آلای رنگین‌کمان با نانوذرات سلنیوم اثر معنی‌داری بر بازماندگی نتاج حاصل در مرحله‌ی شروع تغذیه فعال نداشت. این نتایج با نتایج مطالعات Jaramillo و همکاران، در سال ۲۰۰۹ در ماهیان باس راه راه هیبرید، Naderi و همکاران در سال ۲۰۱۷ در ماهیان پرواری قزل آلای رنگین کمان مطابقت دارد. به نظر می‌رسد که نانوذرات سلنیوم جیره‌ی مولدین نر تا مرحله‌ی تفریخ تخم بر جنین و لارو اثرات مثبت دارد ولی در مرحله شروع تغذیه فعال اثرات معنی‌داری بر بازماندگی لارو ندارد. Pappas و همکاران، در سال ۲۰۰۸ بیان نموده‌اند که تغذیه‌ی مولدین عملکرد و سلامت نتاج را تحت تأثیر قرار می‌دهد، اما برای محافظت آنتی‌اکسیدانی نتاج تکمیل جیره‌ی مولدین و نتاج با سلنیوم هر دو ضروری است.

نتیجه‌گیری کلی این که در مطالعه‌ی حاضر، بیش‌ترین میزان حجم اسپرم و بیش‌ترین تراکم اسپرم در مولدین قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با ۲ میلی‌گرم نانوذرات سلنیوم در کیلوگرم جیره‌ی غذایی مشاهده شد. نانوذرات سلنیوم جیره موجب بهبود کیفیت اسپرم و افزایش میزان حجم اسپرم، مدت زمان تحرک اسپرم و تراکم اسپرم در مولدین نر قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود. بیش‌ترین درصد لقاح، چشم‌زدگی و تفریخ تخم مربوط به مولدین نر قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با ۲ میلی‌گرم نانوسلنیوم در کیلوگرم جیره بود. به نظر می‌رسد، برای نشان دادن این که نانوذرات سلنیوم جیره چگونه کیفیت گامت و نتاج را در ماهیان تحت تأثیر قرار می‌دهد، به مطالعات بیش‌تری نیاز می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نگارندگان از مدیریت محترم و پرسنل مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج به خاطر همکاری در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع

بدین وسیله نگارندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی ندارند.

منابع مالی

منابع مالی این پژوهش در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد توسط دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء (ص) بهبهان و با همکاری مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج تأمین گردیده است.

منابع

Aas, G. H., Refstie, T. and Gjerde, B. (1991). Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. *Aquaculture 95*: 125 – 132.

Agarwal, A., Nallella, K. P., Allamaneni, S. S. and Said, T. M. (2004). Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reproductive Biomedicine online 8*: 616-627.

Ahsan, U., Kamran, Z., Raza, I., Ahmad, S., Babar, W., Riaz, M. H. and Iqbal, Z. (2014). Role of selenium in male reproduction—A review. *Animal Reproduction Science 146*: 55-62.

Beckett, K. and Bruce, H. (2005). Challenging Medicine: Law, Resistance, and the Cultural Politics of Childbirth. *Law and Society Review 39*(5): 125-169.

Behne, D., Hofer, T., von Berswordt-Wallrabe, R. and Elger, W. (1982). Selenium in the testis of the rat: studies on its regulation and its importance for the organism. *Nutrition 112*(9): 1682–1687.

Billard, R. and Gillet, C. (1981). Ageing of eggs and temperature potentialization of micropolluant effects of the Aquaculturetic medium on trout gametes. *Cahier du Laboratoire de Montereau 12*: 35-42.

Brown, D. G and Burk, R. F. 1973. Selenium Retention in Tissues and Sperm of Rats Fed α Torula Yeast Diet. *Nutrition 103*(1): 102–108.

Cheraghi, A., Bahrani, N. and Malekfar, R. 2004. Investigating the Impact of Nanotechnology on Medical and Environmental Sciences from the Perspective of Nanometric Instruments. *Life Quarterly 22*: 85-94. (In Persion)

Dreanno, C., Suquet, M., Desbruyeres, E., Cosson, J., Delliou, H. and Billard, R. (1998). Effect of urine on semen quality in turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture 169*: 247 – 262.

Geffen, A. J. and Evans, J. P. (2000). Sperm traits and fertilisation success of male and sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture 182*: 61 – 72.

Hedaoo, M., Khllare, K., Meshram, M., Sahatpure, S. and Patil, M. (2008). Study of some serum trace minerals in cyclic and non-cyclic surti buffaloes. *Veterinary World 1*(3): 71-72.

Hilton, J., Hodson, P. and Slinger, S. (1980). The requirement and toxicity of selenium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Nutrition 110*: 2527-2535.

Horky, P. (2012). The effect of various forms (organic, inorganic) and levels of selenium on the laboratory values of the ejaculate of breeding boars in summer season. *Research in Pig Breeding 6*: 24–32.

Jaramillo Jr, F., Peng, L. I. and Gatlin Iii, D. M. (2009). Selenium nutrition of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) bioavailability, toxicity and interaction with vitamin E. *Aquaculture Nutrition 15*: 160-165.

Johari, S. (2014). Toxicity effect of colloidal silver nanoparticles on fertilization capacity and reproduction success of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Nanomedicine Research 1*: 00001.

Kim, H. J., Sakakura, Y., Maruyama, I., Nakamura, T., Takiyama, K., Fujiki, H. et al. 2014. Feeding effect of selenium enriched rotifers on larval growth and development in red sea bream Pagrus major. *Aquaculture 432*: 273-277.

Lin, Y. H. and Shiau, S. Y. (2005). Dietary selenium requirements of juvenile grouper, Epinephelus malabaricus. *Aquaculture 250*: 356-363.

Lovercamp, K. W., Stewart, K. R., Lin, X. and Flowers, W. L. (2013). Effect of dietary selenium on boar sperm quality. *Animal Reproduction Science 138*: 268-275.

Naderi, M., Keyvanshokooh, S., Salati, A. P. and Ghaedi, A. (2017). Combined or individual effects of dietary vitamin E and selenium nanoparticles on humoral immune status and serum parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under high stocking density. *Aquaculture 474*: 40-47.

Nagler, J. J., Parsons, J. E. and Cloud, J. (2000). Single pair mating indicates maternal effects on embryo survival in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture 184*: 177-183.

Olson, G. E., Winfrey, V. P., Hill, K. E. and Burk, R. F. (2004). Sequential development of flagellar defects in spermatids and epididymal spermatozoa of selenium-deficient rats. *Reproduction 127*: 335-342.

Pappas, A., Zoidis, E., Surai, P. and Zervas, G. (2008). Selenoproteins and maternal nutrition. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: *Biochemistry and Molecular Biology 151*: 361-372.

Penglase, S., Hamre, K., Rasinger, J. D. and Ellingsen, S. (2014). Selenium status affects selenoprotein expression, reproduction, and F 1 generation locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*). *British Journal of Nutrition 111*: 1918-1931.

Rezvanfar, M. A., Rezvanfar, M. A., Shahverdi, A. R., Ahmadi, A., Baeeri, M., Mohammadirad, A. and Abdollahi, M. (2013). Protection of cisplatin-induced spermatotoxicity, DNA damage and chromatin abnormality by selenium nano-particles. *Toxicology and Applied Pharmacology 266*(3): 356-365.

Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G. and Hoekstra, W. G. (1973). Selenium: Biochemical Role as a Component of Glutathione Peroxidase. *Science. 179*(4073): 588-590.

Sánchez-Gutiérrez, M., García-Montalvo, E., Izquierdo-Vega, J. and Del Razo, L. (2008). Effect of dietary selenium deficiency on the in vitro fertilizing ability of mice spermatozoa. *Cell Biology and Toxicology 24*: 321-329.

Scott, R., MacPherson, A., Yates, R., Hussain, B. and Dixon, J. (1998). The eVect of oral selenium supplementation on human sperm motility. *British Journal of Urology 82*: 76-80.

Seyyedi, J and Kalbasi, M. 2017. The effect of different levels of dietary nano-selenium on growth indices, gonad quality and antioxidant activity of male Golden Caras (Carassius auratus gibelio) seminal plasma. *Aquatic Physiology and Biotechnology 5*(2): 67-70. (In Persion)

Shi, L. G., Yang, R. J., Yue, W. B., Xun, W. J., Zhang, C. X., Ren, Y. S. et al. (2010). Effect of elemental nano-selenium on semen quality, glutathione peroxidase activity, and testis ultrastructure in male Boer goats. Animal *Reproduction Science 118*: 248-254.

Surai, P. F., Fisinin, V. I. and Karadas, F. (2016). Antioxidant systems in chick embryo development. Part 1. Vitamin E, carotenoids and selenium. *Animal Nutrition 2*: 1-11.

Ursini, F., Heim, S., Keiss, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J. et al. (1999). Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science 285*: 1393–1396.

Vol. 16, No. 3, Autumn, 2020
DOI: 10.22055/ivj.2019.188278.2164

The Effects of Selenium Nanoparticles Enriched food on Sperm Quality and Fertilization of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Male Breeders

Javad Mahdavi Jahanabad[1], Saeed Ziaei-nejad[2*], Alireza Ghaedi[3], Seyyed Hosein Moradian[4] and Mosayeb Seyyedi Abalvan[5]

[1] MSc Graduated of Fisheries, Faculity of Natural Resource, Behbahan Khatam alanbia University of Technology, Behbahan, Iran
[2] Assistant Professor, Department of fisheries, Faculity of Natural Resource, Behbahan Khatam alanbia University of Technology, Behbahan, Iran
[3] Assistant Professor, Coldwater Fisheries Genetic and Breeding Research Center, Iranian Fisheries Research Organization, Yasuj, Iran
[4] Expert of Coldwater Fishes Genetic and Breeding Research Center, Iranian Fisheries Research Organization, Yasuj, Iran
[5] Ph.D Student of Aquatic Health, Faculity of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, Expert, Department of Fisheries, Faculity of Natural Resource, Behbahan Khatam alanbia University of Technology, Behbahan, Iran

Received: 09.07.2019 Accepted: 06.10.2019

Abstract

In this study, the effects of selenium nanoparticles on the reproductive performance of rainbow trout breeders (Oncorhynchus mykiss) were investigated. A total of 84 male reproductive strains were selected from among the breeders of the Genetic and Genetic Research Center of Shahid Motahari Yasouj. After adaptation, the fish were divided into 4 experimental groups with 3 replications. Male broilers fed with commercial foods (without selenium nanoparticles) (control group) and male brooders fed diets containing 0.5, 1 and 2 milligrams of selenium nanoparticles per kilogram of diet. After evaluating the quantity and quality of sperm, replication and fertilization were performed for different groups using female oocytes. The results showed that the highest volume of sperm and the highest sperm density were observed in rainbow trout fed with 2 mg selenium nanoparticles per kilogram of diet. The lowest sperm volume was observed in the control and 0.5 mg selenium nanoparticles and the lowest sperm density was observed in the control group. The duration of sperm motility in fish fed diets containing selenium nanoparticles (0.5, 1 and 2 mg) was significantly higher than that of the control group fed with selenium nanoparticle diet. No significant difference was found between the percentage of sperm motility and spermatocrit between experimental groups. The highest percentage of fertilization, laceration and hatching of eggs were from rainbow trout breeders fed with 2 mg nano-selenium per kilogram of diet. In this study, the supplementation of the male breeder diet with selenium nanoparticles did not have a significant effect on progeny survival at the onset of active feeding. Selenium nanoparticles seem to have a positive effect on hatching eggs ob n embryos and larvae, but in the onset of active nutrition, there is no significant effect on the survival of larvae. selenium nanoparticles of diet improve the reproductive performance in male rainbow trout.

Key words: Selenium nanoparticles, Sperm quality, Fertilization, Reproduction, Rainbow trout

* **Corresponding Author**: Saeed Ziaei-nejad, Assistant Professor, Department of fisheries, Faculity of Natural Resource, Behbahan Khatam alanbia University of Technology, Behbahan, Iran

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).