



Interactive Effects of Dietary Ascorbic Acid and Density on Reproductive Performance of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Ghaderi Z.¹ MSc,
Falahatkar B.^{*1} PhD,
Allaf Noveirian H.¹ PhD,
Rahdari A.² PhD

How to cite this article

Ghaderi Z, Falahatkar B, Allaf Noveirian H, Rahdari A. Interactive Effects of Dietary Ascorbic Acid and Density on Reproductive Performance of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Fisheries Science and Technology. 2019;8(1):51-58.

ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate the effects of ascorbic acid and density on reproductive performance and steroid hormones in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In this regard, six treatments were considered included three diets containing 0, 100, and 1000mg ascorbic acid as L-ascorbyl-2-polyphosphate per kilogram of food in contrast to two densities 4.33kg/m³ and 2.16kg/m³. Triplicate groups of fish were fed one of the test diets for 16 weeks. A total of 81 females with an average weight of 812.1±1.5g were introduced to tanks (910 liters). At the end of the 16th week and when preparing fish for spawning, from each replication of high and low densities, 4 and 2 fish after bleeding of fish to measure the concentrations of progesterone, testosterone, and estradiol were spawned. After that, reproductive parameters such as work fecundity, ova per gram, and ova diameter were measured and then fertilized. During the incubation period, fertilization and mortality rates were recorded. The results showed the interaction between ascorbic acid and density and also the significance of this effect in reproductive parameters (number per gram of egg, oocyte diameter, coagulation, and fertilization percent; $p < 0.05$). In the case of steroid hormones, the effect of treatments on the amount of each of the three hormones and their interaction on the level of estradiol and testosterone were significant ($p < 0.05$), but the effect of density and diet on progesterone was not significant ($p > 0.05$). The results of this study confirm the use of higher levels of ascorbic acid in breeders compared to grow-out period and also the positive role of this vitamin in reproductive indices.

Keywords *Oncorhynchus mykiss*; Reproduction; Density; Ascorbic Acid; Sex Steroids

CITATION LINKS

[1] Characteristics of current international trade of live salmonid ... [2] Effect of broodstock nutrition on reproductive performance ... [3] Dietary ascorbic acid requirement for growth and health in ... [4] The effect of ascorbic acid supplementation in broodstock feed ... [5] Proteinase inhibitor (s) in seminal plasma of teleost ... [6] Effects of dietary vitamin C on survival, growth, and ... [7] Requirements of vitamin C (L-ascorbyl-2-monophosphate-Mg and L-ascorbyl-2-monophosphate-Na) and ... [8] Effect of dietary vitamin C on the growth performance and innate ... [9] Dietary vitamin C requirement and its effects on tissue ... [10] Alternative complement activity and resistance to heat stress in ... [11] Effects of stress on fish reproduction gamete quality ... [12] The effect of fish density and feeding regimes ... [13] The effect of stocking density on the ... [14] Effects of dietary vitamin C levels on tissue ascorbic acid ... [15] Official methods of analysis of AOAC ... [16] A preliminary study on the anesthetic effect of clove flower ... [17] Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing ... [18] Rainbow trout ... [19] Reproductive success of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to graded dietary ascorbyl ... [20] Ascorbic acid deposition in rainbow trout ... [21] Relationship between vitamin C and plasma ... [22] Dietary ascorbyl phosphate results in high ascorbic acid content in eggs ... [23] Effect of dietary vitamin C on the disease susceptibility ... [24] The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of ... [25] Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology ... [26] Dietary L-ascorbic acid affects growth, nonspecific ... [27] Vitamin C in fish nutrition- a ... [28] The effect of dietary vitamin C on the immune ... [29] Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on ... [30] Nutrient requirements of fish and ... [31] Methods in reproductive aquaculture: Marine ... [32] Role of dietary ascorbic acid in vitellogenesis in rainbow ... [33] Post-translational processing of oxytocin-neurophysin ... [34] Protection against oxidants in biological systems: The ... [35] The role of ascorbic acid in the function of the adrenal ... [36] Oxygen radicals and the control of ovarian corpus luteum ...

¹Fisheries Department, Natural Resources Faculty, University of Guilan, Sowmeh Sara, Guilan, Iran

²Fisheries Department, Hamoun International Wetland Research Institute, University of Zabol, Zabol, Sistan and Baluchistan, Iran

*Correspondence

Address: Fisheries Department, Natural Resources Faculty, University of Guilan, Sowmeh Sara, Guilan, Iran.
Postal Code: 4361996196
Phone: +98 (13) 44320895
Fax: +98 (13) 44323600
falahatkar@guilan.ac.ir

Article History

Received: January 7, 2018
Accepted: December 7, 2018
ePublished: March 19, 2019

اثرات متقابل آسکوربیک اسید و تراکم بر عملکرد تولیدمثلی قزل آلاي رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

زهره قادری فلهیانی MSc

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، گیلان، ایران

بهرام فلاحتکار* PhD

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، گیلان، ایران

حمید علاف نویریان PhD

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، گیلان، ایران

عبدالعلی راهمداری PhD

گروه شیلات، پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون، دانشگاه زابل، زابل، سیستان و بلوچستان، ایران

چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات متقابل آسکوربیک اسید و تراکم بر عملکرد تولیدمثلی و میزان هورمون‌های جنسی ماهی قزل آلاي رنگین کمان انجام شد. در این راستا، شش تیمار شامل سه جیره غذایی حاوی مقادیر صفر، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم آسکوربیک اسید از نوع ال-آسکوربیل-۲- پلی فسفات در هر کیلوگرم غذا در تقابل با دو تراکم ۴/۳۳ کیلوگرم بر متر مکعب و ۲۲/۱۶ کیلوگرم بر متر مکعب در سه تکرار و به مدت ۱۶ هفته به منظور پرورش مولدین در نظر گرفته شدند. تعداد ۸۱ عدد مولد ماده با وزن متوسط $812 \pm 1/5$ گرم به حوضچه‌های پرورش (حجم ۹۱۰ لیتر) معرفی شدند. در پایان هفته ۱۶ و هنگام آمادگی ماهی‌ها برای تخم‌ریزی، از هر تکرار تراکم‌های بالا و پایین به ترتیب ۴ و ۲ مولد پس از خون‌گیری ماهی‌ها برای سنجش غلظت هورمون‌های جنسی پروژسترون، تستوسترون و استرادیول تخم‌کشی شدند. سپس پارامترهای مربوط به تولیدمثلی شامل هم‌آوری کاری، تعداد تخمک در هر گرم و قطر تخمک اندازه‌گیری و سپس لقاح انجام شد. طی دوره انکوباسیون، درصد لقاح و تلفات ثبت شد. نتایج حاصل حاکی از وجود اثر متقابل بین آسکوربیک اسید و تراکم و همچنین معنی‌دار بودن این اثر در پارامترهای تولیدمثلی (تعداد در گرم تخمک، قطر تخمک، هم‌آوری کاری و درصد لقاح) بود ($p < 0/05$). در خصوص هورمون‌های جنسی، تأثیر تیمارها بر مقدار هر سه هورمون و اثر متقابل آنها بر مقدار هورمون‌های استرادیول و تستوسترون معنی‌دار ($p < 0/05$)، ولی اثر متقابل تراکم و جیره بر مقدار پروژسترون معنی‌دار نبود ($p > 0/05$). نتایج این مطالعه استفاده از مقادیر بالاتر آسکوربیک اسید در مولدین در مقایسه با دوران پرورشی و همچنین نقش مثبت این ویتامین را در شاخص‌های تولیدمثلی تأیید می‌کند.

کلیدواژه‌ها: قزل آلاي رنگین کمان، تولیدمثلی، تراکم، آسکوربیک اسید، استروئیدهای جنسی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۹/۱۶

*نویسنده مسئول: falahatkar@guilan.ac.ir

مقدمه

ماهی قزل آلاي رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) یکی از گونه‌های مهم تجاری آزادماهیان است که به‌طور گسترده در بسیاری از کشورهای جهان پرورش داده می‌شود^[1]. در این بین، موفقیت در سیستم‌های پرورشی به عوامل مختلفی از جمله تغذیه وابسته است. تغذیه به‌عنوان یک عامل خارجی با تأثیر بر کبد و به دنبال آن اثر بر فرآیند زرده‌سازی که یکی از پدیده‌های اساسی در روند بلوغ

تخمک‌ها در ماهی‌ها محسوب می‌شود، می‌تواند نقش غیر قابل انکاری در فرآیند تولیدمثلی داشته باشد^[2].

مطالعات نشان داده است که آسکوربیک اسید به‌عنوان یک فاکتور محرک و تغذیه‌ای می‌تواند تأثیرات مثبتی بر رشد و نمو ماهیان در مراحل مختلف زندگی و تولیدمثلی داشته باشد^[3, 4]. براساس این مطالعات، آسکوربیک اسید به چند دلیل مهم‌ترین ماده مغذی در عملکردهای بافت تولیدمثلی است: ۱) با داشتن اثر آنتی‌اکسیدانی روی گامت‌ها (اسپرم و تخمک) مانع آسیب دیدن DNA قبل و بعد از تخم‌ریزی می‌شود؛ ۲) برای زنده ماندن و ریکواری ماهیانی که چند بار تخم‌ریزی می‌کنند (multiple spawners) نیاز به وجود این ویتامین در جیره غذایی است؛ ۳) بخشی از سیستم تنظیم‌کننده درونی مسیر عصبی-هورمونی تولیدمثلی ماهی است؛ ۴) نقش احتمالی آسکوربات در تنظیم رسیدگی جنسی ماهی و یا ناباروری در حضور تابش شدید UV یا شرایط آبی‌پروری متراکم (کمبود اکسیژن، اشباعیت اکسیژن و نبود آنتی‌اکسیدان‌ها)^[5].

اکثر ماهیان استخوانی به‌دلیل نداشتن آنزیم ال-گلونولاکتون‌اکسیداز قادر به سنتز آسکوربیک اسید از ال-گلوکز نیستند^[6]. فاکتورهای متعددی از قبیل گونه، اندازه ماهی، فرمولاسیون جیره غذایی، شرایط محیطی، اشکال آسکوربیک اسید و ذخیره اولیه آسکوربیک اسید بافت بر میزان مورد نیاز این ویتامین در جیره یک موجود تأثیر می‌گذارند^[7, 8]. بنابراین ضروری است که مقدار مورد نیاز این ویتامین از راه تغذیه خارجی تأمین شود^[9]. رشد ضعیف، بقای پایین، بی‌اشتهایی، کم‌خونی، اگرزوفتالمی، خونریزی پوستی، تغییر شکل ستون فقرات، کاهش ایمنی و رنگ‌بندی نامتعارف از علائم کمبود آسکوربیک اسید هستند^[8, 10].

تراکم به‌عنوان یک فاکتور محیطی و استرس‌زا، رشد و تولیدمثلی ماهیان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در شرایط پرسترس، ممکن است تعادلی بین تلاش‌های تولیدمثلی، رشد بدنی و بقا به وجود آید^[11]. میان تراکم ذخیره و رشد ارتباط مثبت و منفی گزارش شده است و الگوی این روابط متقابل، خاص هر گونه است^[12]. براون و همکاران با بررسی اثر تراکم‌های مختلف بر رفتارهای اجتماعی چهار قطبی (*Salvelinus alpinus* L.) به این نتیجه رسیدند که با افزایش تراکم، چالش‌های رفتاری کمتر می‌شود و به دنبال آن مصرف انرژی کاهش و رشد افزایش می‌یابد^[13]. بلوغ جنسی در ماهی‌ها نیز مانند هر حیوان دیگری یکی از بحرانی‌ترین دوره‌های زندگی است و در این زمان بایستی حداکثر دقت و مواظبت در نگهداری آنها به عمل آید. به منظور به‌دست آوردن تخم با کیفیت خوب بایستی مولدین مورد تغذیه مناسب قرار بگیرند. از بین مواد ریزمغذی ضروری، آسکوربیک اسید به‌دلیل اهمیت ویژه در رابطه با تأثیر بر عملکرد سیستم ایمنی و مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا، بیشترین توجه را به خود جلب کرده است^[14]. با توجه به اثرات مختلف آسکوربیک اسید به‌عنوان یک ویتامین حساس و مهم در عملکردهای گوناگون، اهمیت گونه قزل آلاي رنگین کمان از نظر تجاری و قرارگرفتن در رتبه دوم جهانی پرورش آزادماهیان بعد از ماهی آزاد

فیبر و خاکستر به ترتیب با روش‌های کدال، سوکسله، هیدرولیز و روش کوره اندازه‌گیری شدند [15].

جدول ۱) ترکیبات جیره مورد استفاده و آنالیز تقریبی آن (n=۳)

اجزای جیره ^۱	درصد
پودر ماهی	۶۰
گلوتن گندم	۴/۹
آرد گندم	۱۸
آرد سویا	۱۰
مخلوط مکمل معدنی و ویتامینی ^۲	۵
روغن ماهی	۲
آسکوربیک اسید	۰/۱
آنالیز تقریبی ^۳	درصد
پروتئین	۴۶/۲±۰/۹
رطوبت	۹±۰/۲
چربی	۱۲/۱±۰/۲
فیبر	۳±۰/۱
خاکستر	۸/۵±۰/۱

^۱ مواد معدنی و سایر ویتامین‌های مورد نیاز قزل‌آلا، بدون آسکوربیک اسید (VDS؛ بلژیک)؛ ^۲ در جیره پایه (جیره فاقد آسکوربیک اسید) به جای آسکوربیک اسید، به مقدار گلوتن گندم ۰/۱٪ اضافه شد. در جیره‌های حاوی آسکوربیک اسید با توجه به مقدار در نظر گرفته شده، برای جیره حاوی ۱۰۰ میلی گرم حدود ۰/۱٪ و برای ۱۰۰۰ میلی گرم، ۰/۱٪ آسکوربیک اسید افزوده شد.

اندازه‌گیری غلظت هورمون‌های جنسی

به منظور اندازه‌گیری غلظت هورمون‌های جنسی، در پایان دوره آزمایش با مشاهده رفتارهای تولیدمثلی، معاینه ماهیان و آگاهی از آمادگی مولدین برای تخم‌کشی، پس از بیهوشی ماهی‌ها با عصاره پودر گل میخک (۱۰۰ppm)، خون‌گیری از ناحیه ساقه دم با سرنگ ۲ میلی‌لیتر هپارینه انجام شد. از تیمارهای با تراکم ۶ تایی، ۳ عدد و تیمارهای با تراکم ۳ تایی، ۲ عدد ماهی از هر تکرار خون‌گیری شدند. لازم به ذکر است که خون‌گیری دو روز بعد از معاینه انجام شد تا اثر استرس احتمالی ناشی از معاینه از بین رفته باشد. نمونه‌های خون درون لوله‌های آزمایشی و در مجاورت یخ با فاصله زمانی ۱۰ دقیقه به آزمایشگاه منتقل شدند. این نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰g سانتریفیوژ و پلاسماهای جدا شده تا زمان آنالیز در دمای ۲۰°C نگهداری شدند.

هورمون‌های جنسی استرادیول، تستوسترون و پروژسترون با روش الایزا و با استفاده از کیت‌های مخصوص (Monobind Inc؛ ایالات متحده) اندازه‌گیری شدند [15].

لقاح و اندازه‌گیری شاخص‌های تولیدمثلی

بعد از ۱۶ هفته پرورش و مشاهده رفتارهای تولیدمثلی در بین ماهیان و رسیدن به دمای مناسب در فصل تکثیر، ماهیان طبق روش‌های معمول مورد معاینه قرار گرفتند. ۲۴ ساعت قبل از معاینه غذادهی قطع شد. عمل معاینه پس از بیهوشی با عصاره گل میخک (۱۰۰ppm) انجام شد [16]. ماهیان آماده برای تکثیر، به سالن منتقل شدند و ۲۴ ساعت بعد از انتقال، تکثیر انجام شد. وزن کل تخمک‌های استحصال شده از ماهی اندازه‌گیری و سپس مقداری از

اطلس (*Salmo salar*) و سهولت در امر تکثیر و پرورش و اختصاص ۱۰۰ درصدی کارگاه‌های تکثیر و پرورش سردآبی در ایران، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر این ویتامین بر شاخص‌های تولیدمثلی از جمله همآوری، درصد لقاح، تعداد در گرم تخمک، قطر تخمک و میزان هورمون‌های جنسی که شاخص‌های مهمی در فرآیند تکثیر هستند، انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه و نگهداری ماهی

مطالعه حاضر در کارگاه تکثیر و پرورش قزل‌کمان فارس واقع در منطقه شش‌پیر استان فارس انجام شد. آب مورد نیاز این کارگاه از چشمه شش‌پیر با دبی ۲۰۰۰ لیتر در ثانیه در یک کیلومتری کارگاه تامین می‌شد. مجموعاً ۸۱ عدد مولد ماده قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن متوسط ۸۱۲±۱/۵ گرم و طول کل ۳۹/۷±۰/۸ سانتی‌متر و سن ۲/۵ سال، به مدت دو هفته با غذای دستی مورد استفاده در مطالعه حاضر که فاقد آسکوربیک اسید بود، عادت‌دهی شدند.

مولدین به ۱۸ حوضچه به ابعاد ۱/۵×۰/۷۵×۱ متر با حجم آبگیری ۱۱۰ لیتر معرفی شدند. سه جیره غذایی با سطوح صفر، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم آسکوربیک اسید به ازای هر کیلوگرم غذا در دو تراکم بالا و پایین (به ترتیب ۶ و ۳ عدد ماهی در هر متر مکعب)، به مدت ۱۶ هفته مورد استفاده قرار گرفت. در طول دوره آزمایش، دمای آب ۷/۳±۰/۸°C، pH آن ۷/۳±۰/۶، اکسیژن محلول ۷/۲±۰/۲ میلی‌گرم در لیتر، نیترات ۱۱/۶±۱/۲ میلی‌گرم در لیتر و نیتريت ۰/۲۷±۰/۰۰۳ میلی‌گرم در لیتر بود. دوره نوری در مخازن پرورشی طبیعی بود و از نور مصنوعی استفاده نشد.

ساخت جیره و غذادهی

آسکوربیک اسید مورد استفاده در این مطالعه از نوع ال-آسکوربیل-۲-پلی فسفات (EASF؛ بلژیک) با خلوص ۹۵٪ بود. ساخت غذا هر ۳ هفته یک‌بار انجام شد. مواد اولیه با توجه به فرمولاسیون تجاری غذای قزل‌آلای رنگین‌کمان به صورت خشک تهیه و به مدت ۱۰ دقیقه با همزن مخلوط و سپس توسط آسیاب برقی، آسیاب شد. بعد از آن روغن ماهی و آب (۲۵٪) به آنها اضافه و دوباره کاملاً مخلوط شدند. مخلوط تهیه شده توسط دستگاه چرخ گوشت با اندازه‌ای مناسب چرخ و به فرم رشته‌های ماکارونی به صورت لایه‌ای نازک روی سینی‌های مخصوص منتقل شد. غذای ساخته شده تحت شرایط سایه و بدون رطوبت در حضور فن با دمای ۲۵°C به مدت ۲۴ ساعت خشک شد. برای ساخت جیره‌های حاوی آسکوربیک اسید نیز بعد از مخلوط شدن کامل مواد اولیه خشک و قبل از اضافه شدن روغن ماهی و آب، حجم کمی از مواد مخلوط شده با میزان مورد نیاز آسکوربیک اسید و سپس با حجم کل مخلوط شد. غذای ساخته شده در کیسه‌های نایلونی تیره بسته‌بندی و درون یخچال نگهداری شد. جدول ۱ ترکیب اجزای جیره و آنالیز تقریبی آن را نشان می‌دهد. ماهیان به صورت دستی براساس اشتها و در دو وعده ۸ صبح و ۱۸ عصر غذادهی می‌شدند (جدول ۱). قابل ذکر است پروتئین، چربی،

(interaction) و آزمون توکی مقایسه میانگین‌ها انجام شد. اختلاف بین میانگین‌های تیمارهای مختلف با سطح اطمینان ۰/۰۵ تعیین شد.

یافته‌ها

بالاترین مقدار هماوری کاری در ماهیان تغذیه‌شده با ۱۰۰۰ میلی‌گرم آسکوربیک‌اسید در کیلوگرم جیره غذایی و در تراکم بالا و کمترین آن در تیمار صفر (فاقد آسکوربیک‌اسید) و تراکم پایین ملاحظه شد که این اختلاف معنی‌دار بود ($p < 0/05$; جدول ۲). همچنین درصد لقاح و تعداد تخم در گرم بیشترین مقدار خود را در تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم با تراکم ۶ تایی و کمترین را در تیمار صفر با تراکم پایین داشتند (جدول ۲). در خصوص هورمون‌های جنسی نیز نتایج نشانگر عدم وجود اثر متقابل ($p > 0/05$; جدول ۳) و وجود تفاوت معنی‌دار این اثر در هورمون پروژسترون ($p < 0/05$; نمودار ۱) و وجود اثر متقابل و تفاوت معنی‌دار این اثر در هورمون‌های استرادیول و تستوسترون بود ($p < 0/05$; نمودارهای ۲ و ۳). جدول‌های ۳ و ۴ نتایج حاصل از تجزیه واریانس دوطرفه را در شاخص‌های مورد نظر نشان می‌دهند.

تخمک برداشته و در چند تکرار وزن و شمارش شد. تعداد به‌دست‌آمده به کل تخمک‌ها تعمیم داده شد و براساس آن هماوری کاری تعیین شد [17]. تعداد تخمک‌ها در گرم توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ گرم اندازه‌گیری شد [17]. قطر تخمک توسط کولیس با دقت ۰/۱ میلی‌متر اندازه‌گیری و ثبت شد. برای انجام عمل لقاح، با توجه به هماوری به ازای هر مولد ماده از دو تا سه مولد نر استفاده شد. پس از اطمینان از کیفیت اسپرم، ابتدا اسپرم و تخمک با هم مخلوط شدند و سپس سرم نمکی به نسبت حجمی ۱:۱ (تخم به سرم نمکی) به آن افزوده و به دنبال آن برای جذب آب و سخت شدن تخم‌ها، آب افزوده شد و بعد از آن چند بار با آب شست‌وشو داده شدند. ۱۲ ساعت پس از لقاح با غوطه‌ورکردن نمونه‌های ۵۰ عددی از تخم در محلول شفاف آب و متانول و اسیداستیک با نسبت حجمی ۱:۱:۱، درصد لقاح تعیین شد [18]. شاخص‌های مورد نظر در ۴ ماهی از گروه با تراکم بالا و ۲ ماهی از گروه با تراکم پایین در هر تکرار مورد بررسی قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 16 انجام شد. ابتدا همگنی داده‌ها به کمک آزمون کولموگرو-اسمیرنوف بررسی شد. سپس با استفاده از آنالیز واریانس دوطرفه همراه با حالت اثر متقابل عوامل

جدول ۲) میانگین آماری تاثیر سطوح مختلف آسکوربیک‌اسید جیره و تراکم بر شاخص‌های تولیدمثلی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از ۱۶ هفته پرورش

جیره غذایی	تراکم ذخیره‌سازی	هماوری کاری	قطر تخمک (میلی‌متر)	تعداد تخمک در گرم	درصد لقاح
C-	بالا	۱۴۲۷/۶±۲۵۹/۹۲ ^{de}	۴/۰۵±۰/۰۰۹ ^a	۱۴/۸۳±۱/۲۶ ^e	۸۸/۶۴±۰/۹۷ ^c
C-	پایین	۱۱۹۸/۰±۱۱۰/۳۱ ^e	۴/۰۳±۰/۰۰۵ ^{ab}	۱۷/۰۰±۰/۸۹ ^d	۸۴/۸۳±۰/۷۵ ^d
C _{۱۰۰۰}	بالا	۲۹۰۶/۳۳±۱۵۴/۳۷ ^c	۴/۰۱±۰/۰۱۳ ^b	۲۵/۱۶±۱/۱۹ ^c	۹۳/۶۶±۱/۳۸ ^b
C _{۱۰۰۰}	پایین	۱۶۰۸/۵±۲۱۲/۳۳ ^d	۴/۰۴±۰/۰۱۰ ^a	۱۴/۶۶±۱/۷۵ ^e	۸۸/۵۰±۱/۰۴ ^c
C _{۱۰۰۰}	بالا	۳۸۰۴/۰۸±۱۴۷/۴۷ ^a	۳/۰۳±۰/۰۰۹ ^d	۳۰/۷۵±۰/۸۶ ^a	۹۷/۰۰±۰/۷۳ ^a
C _{۱۰۰۰}	پایین	۳۳۰۷/۰۰±۱۴۸/۶۳ ^b	۳/۲۱±۰/۰۵۴ ^c	۲۷/۳۳±۱/۲۱ ^b	۹۵/۰۰±۰/۸۹ ^b

داده‌های دارای حروف مشابه اختلاف معنی‌دار ندارند ($p > 0/05$) و داده‌هایی دارای حروف غیرمشابه اختلاف معنی‌دار دارند ($p < 0/05$): C معرف ویتامین C (آسکوربیک‌اسید) است.

جدول ۳) نتایج حاصل از تجزیه واریانس دوطرفه سطوح مختلف آسکوربیک‌اسید، تراکم و اثر متقابل آنها بر هورمون‌های جنسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از ۱۶ هفته پرورش

هورمون	جیره غذایی	تراکم ذخیره‌سازی	جیره غذایی × تراکم ذخیره‌سازی
پروژسترون	۰/۰۰۰ ⁺	۰/۰۰۰ ⁺	۰/۱۸۶ ^{ns}
تستوسترون	۰/۰۰۰ ⁺	۰/۰۲۷ ⁺	۰/۰۴۷ ⁺
پتا ۱۷- استرادیول	۰/۰۰۰ ⁺	۰/۰۰۰ ⁺	۰/۰۰۰ ⁺

* نشان از اثر معنی‌دار تیمارها و ns نشان از عدم وجود اثر معنی‌دار تیمارها بر شاخص‌های مورد نظر است.

جدول ۴) نتایج حاصل از تجزیه واریانس دوطرفه سطوح مختلف آسکوربیک‌اسید، تراکم و اثر متقابل آنها بر شاخص‌های تولیدمثلی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از ۱۶ هفته پرورش

شاخص	جیره غذایی	تراکم ذخیره‌سازی	جیره غذایی × تراکم ذخیره‌سازی
هماوری کاری	۰/۰۰۰ ⁺	۰/۰۰۰ ⁺	۰/۰۰۰ ⁺
قطر تخمک (میلی‌متر)	۰/۰۰۰ ⁺	۰/۰۰۰ ⁺	۰/۰۰۰ ⁺
تعداد تخم‌ها در گرم	۰/۰۰۰ ⁺	۰/۰۰۰ ⁺	۰/۰۰۰ ⁺
درصد لقاح	۰/۰۰۰ ⁺	۰/۰۰۰ ⁺	۰/۰۰۰ ⁺

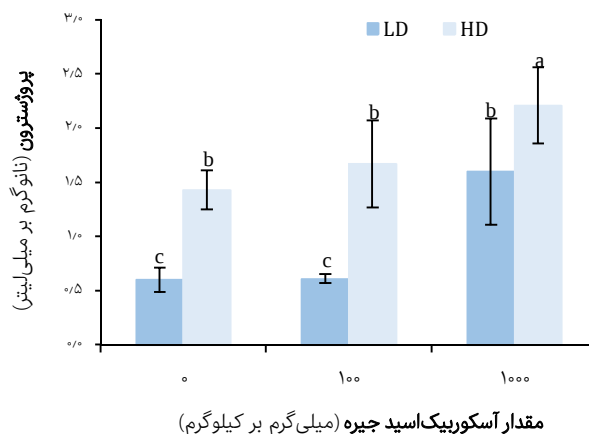
* نشان‌دهنده اثر معنی‌دار تیمارها بر شاخص‌های مورد نظر است.

بحث

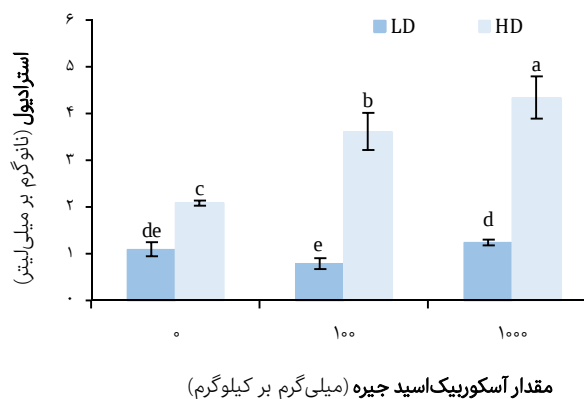
شاخص‌های تولیدمثلی

مطالعات نشان داده شده است که آسکوربیک اسید تاثیر مثبتی بر کارایی تولیدمثلی قزل‌آلای رنگین‌کمان دارد [19, 20]. در مطالعه حاضر اثر مثبت آسکوربیک اسید جیره بر پارامترهای تولیدمثلی مشاهده شد و پارامترهایی نظیر تعداد تخمک در هر گرم، درصد لقاح و همآوری کاری افزایش یافت، اگرچه مقدار متوسط قطر تخمک با افزایش میزان آسکوربیک اسید جیره کاهش پیدا کرد. یکی از دلایل تاثیر مثبت آسکوربیک اسید بر کارایی تولیدمثلی قزل‌آلای رنگین‌کمان نقشی است که در فرآیند زرده‌سازی ماهی ماده و حفظ کیفیت اسپرم نر دارد [21]. براساس مطالعات مختلف مطلوب‌ترین شاخص‌های تولیدمثلی قزل‌آلای رنگین‌کمان با جیره‌های غذایی حاوی ۸۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آسکوربیک اسید به دست می‌آید [21, 22]. در این مطالعه نیز مطلوب‌ترین شاخص‌ها با جیره حاوی ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آسکوربیک اسید حاصل شد که بالاتر از مقدار مورد نیاز برای رشد است. مطالعات متعدد ثابت کرده‌اند که افزودن ویتامین C در جیره غذایی ماهیان به مقداری بیشتر از حداقل نیاز موجود برای رشد معمولی، موجب افزایش مقاومت در برابر بیماری‌ها و از بین رفتن استرس می‌شود [23-26]. از طرف دیگر، تحت شرایط پرورشی، ماهی در معرض اعمال مختلفی مانند تورکشی، دست‌کاری، حمل و نقل، درجه‌بندی، غذادهی بیش از حد و ازدحام (تراکم بالا) قرار می‌گیرد که همگی استرس‌زا هستند [27]. در این شرایط مقاومت ماهی در مقابل عوامل بیماری‌زا و نیز تعادل بدن کاهش پیدا می‌کند. بنابراین برای مواجهه با این وضعیت، تغییرات ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی متعددی در ماهی اتفاق می‌افتد تا قادر باشد سازگاری لازم را کسب کند. برخی مطالعات نشان داده‌اند که وقتی ماهی در معرض استرس‌های مختلف قرار می‌گیرد میزان نیاز آن به آسکوربیک اسید افزایش پیدا می‌کند [28, 29]. بنابراین در مطالعه حاضر مقدار آسکوربیک اسید یکی از تیمارها ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (بیش از ۸۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم توصیه‌شده توسط سایر محققین) در نظر گرفته شد تا علاوه بر بهبود شاخص‌های تولیدمثلی، استرس احتمالی مولدین ناشی از تراکم بالا نیز از بین برود. بالا بودن درصد لقاح در گروه‌های تغذیه‌شده با جیره حاوی ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را می‌توان به افزایش کیفیت تخمک‌ها نسبت داد. این در حالی است که وجود تاثیر مثبت بین آسکوربیک اسید و کیفیت گامت‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان قبلاً به اثبات رسیده است [20, 22].

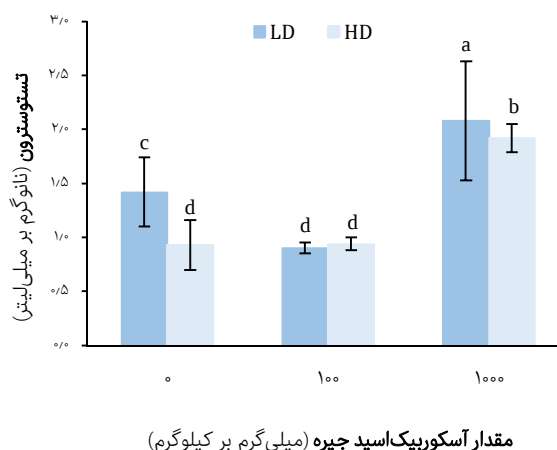
در رابطه با تقابل اثر جیره و تراکم در تمام شاخص‌ها، نتایج حاکی از معنی‌دار بودن اثر این تیمار بر شاخص‌های تولیدمثلی است. اما در اکثر پارامترها بین جیره‌های حاوی ۱۰۰ و صفر میلی‌گرم آسکوربیک اسید (C_0 و C_{100}) و تراکم‌های بالا و پایین تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. با در نظر گرفتن این موضوع که حداکثر ذخیره کبدی در امر رشد در شورای ملی تحقیقات (NRC) ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم غذا ذکر شده است [30]، می‌توان عنوان کرد که



نمودار ۱) میانگین آماری اثر متقابل آسکوربیک اسید و تراکم بر میزان پرورسترون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از ۱۶ هفته پرورش (n=۳): LD: تراکم پایین؛ HD: تراکم بالا؛ حروف مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار هستند ($p < 0.05$).



نمودار ۲) میانگین آماری اثر متقابل آسکوربیک اسید و تراکم بر میزان استرادیول ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از ۱۶ هفته پرورش (n=۳): LD: تراکم پایین؛ HD: تراکم بالا؛ حروف مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار هستند ($p < 0.05$).



نمودار ۳) میانگین آماری اثر متقابل آسکوربیک اسید و تراکم بر میزان تستوسترون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از ۱۶ هفته پرورش (n=۳): LD: تراکم پایین؛ HD: تراکم بالا؛ حروف مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار هستند ($p < 0.05$).

جیره‌هایی با سطوح پایین آسکوربیک‌اسید (صفر، ۳۰ و ۱۱۰ میلی‌گرم) به‌طور معنی‌داری پایین بود^[21]. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نیز با این موضوع را همخوانی دارد.

مطالعات مختلف و مطالعه حاضر موید این موضوع است که آسکوربیک‌اسید بر غلظت استروئیدهای پلازما در ماهی ماده قزل‌آلای رنگین‌کمان تاثیر می‌گذارد. مکانیزم دقیق نحوه تاثیر آسکوربیک‌اسید بر ساخت استروئیدها مشخص نیست. با این حال بررسی‌ها نشان داده‌اند که این ویتامین و دیگر آنتی‌اکسیدان‌ها با غلظت بالا در بافت‌های تولیدمثلی موجودات مختلف از جمله ماهی‌ها حضور دارند^[20, 33]. مهم‌ترین ویژگی شیمیایی آسکوربات این است که به‌عنوان یک ماده کاهش‌دهنده عمل می‌کند^[34] و رادیکال‌های اکسیژن و احتمالاً رادیکال‌های چربی که طی ساخت هورمون‌های استروئیدی تشکیل می‌شوند را از بین می‌برد. بنابراین ممکن است ویتامین C در بافت سازنده استروئیدها عملکرد ضداکسیدانی داشته باشد و باعث حفظ سیتوکروم P450 در مقابل اکسیژن فعال شود^[35, 36]. همچنین احتمالاً آسکوربیک‌اسید در تنظیم کاتابولیزم استروئیدها دخالت دارد، به‌طوری که فعالیت آنزیم‌های ۶-بتا‌هیدروکسیلاز که در کاتابولیزم استروئیدها نقش دارند با کمبود آسکوربیک‌اسید افزایش می‌یابد.

در این مطالعه تراکم به‌کاررفته نقش کم‌رنگ‌تری نسبت به آسکوربیک‌اسید در تاثیرگذاری بر پارامترهای اندازه‌گیری‌شده داشت. یکی از دلایل این امر محدودبودن تعداد تراکم‌های به‌کاررفته بود. همچنین تراکم‌های به‌کاررفته در سطح استرس‌زا نبودند تا گونه مورد نظر را از نظر پارامترهای اندازه‌گیری‌شده تحت تاثیر قرار دهند.

نتیجه‌گیری

در رابطه با فاکتورهای تولیدمثلی، اثر مثبت آسکوربیک‌اسید در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی به وضوح دیده شد و به نظر می‌رسد برای رسیدن به شاخص‌های تولیدمثلی کمی و کیفی مطلوب خصوصاً در شرایط استرس‌زایی نظیر تراکم و دستکاری‌ها باید میزان آسکوربیک‌اسید جیره غذایی بالاتر از حد مورد نیاز آن برای رشد (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و نیز حد توصیه‌شده برای تولیدمثل توسط NRC (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) باشد.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از آقایان مهندس عطاءالدین تقوی مدیریت کارگاه تکثیر و پرورش قزل‌کمان استان فارس، دکتر رضا امیری فهلپانی، دکتر مجدی، مهندس عبدالمجید مشتاقیان، مهندس شهرام اسدی، کاظم نجفی و سایر همکاران که در این مطالعه همکاری کردند تشکر و قدردانی می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: نویسندگان این مطالعه متعهد به رعایت کلیه اخلاق و قوانین نشر محتوای علمی هستند.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد.

برای داشتن پارامترهای تولیدمثلی مطلوب و بهتر نیاز است که مقدار آسکوربیک‌اسید از این مقدار بیشتر باشد که در مطالعه حاضر نیز این امر نشان داده شد.

هورمون‌های جنسی

هورمون‌های گنادوتروپین با تحریک ترشح هورمون‌های تخمدانی (استرادیول) روند زرده‌سازی را در سلول‌های کبدی تسریع می‌کنند. این هورمون‌ها از بخش قدامی هیپوفیز ترشح می‌شوند و عمدتاً شامل دو گروه FSH و LH هستند که گروه اول در فرآیند گامت‌سازی و گروه دوم در رسیدگی جنسی نهایی، اوولاسیون و اسپرم‌ریزی نقش دارند^[31]. به‌دلیل عملکردهای مهم این دسته از هورمون‌ها، عوامل تحریک‌کننده ترشح آنها بسیار مهم هستند که یکی از این عوامل حضور آسکوربیک‌اسید در جیره است. در تقابل بین جیره و تراکم نتایج به‌دست‌آمده نشان‌دهنده عدم وجود اثر معنی‌دار این تقابل در رابطه با پروژسترون است. در این هورمون بالاترین مقدار متوسط مربوط به جیره حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم آسکوربیک‌اسید با تراکم بالا (۶ قطعه مولد در حوضچه) بود. در مطالعه حاضر در رابطه با استرادیول و تستوسترون نیز بین جیره‌های حاوی صفر و ۱۰۰ میلی‌گرم آسکوربیک‌اسید تفاوت معنی‌داری وجود نداشت که این مساله به نیاز تولیدمثلی بالاتر از مقدار مورد نیاز رشد مربوط می‌شود. آسکوربیک‌اسید از ترکیبات مهم برای سنتز استروئیدها است^[20]. سنتز گنادوتروپین تحت تاثیر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز است که این محور خود متاثر از عوامل تغذیه‌ای (حضور آسکوربیک‌اسید در جیره) یکی از عوامل مهم خارجی موثر بر تولیدمثل به شمار می‌رود. دابروسکی و همکاران نشان دادند که مقدار آسکوربیک‌اسید جیره بر غلظت تستوسترون پلاسمای ماهی ماده قزل‌آلای رنگین‌کمان در هنگام تخم‌ریزی تاثیر می‌گذارد، به‌طوری که مقدار تستوسترون پلازما در ماهیانی که بیشتر از مقدار توصیه‌شده توسط NRC (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) آسکوربیک‌اسید دریافت کرده بودند بیشتر از ماهیانی بود که در جیره غذایی آنها کمتر از این مقدار آسکوربیک‌اسید وجود داشت^[21]. نتایج مطالعه حاضر نیز نشان‌دهنده بالا بودن غلظت تستوسترون در گروه تغذیه‌شده با جیره حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود.

در مطالعه‌ای نشان داده شد که افزودن آسکوربیک‌اسید مقدار استرادیول پلازما را در طول فرآیند زرده‌سازی ماهی ماده قزل‌آلای رنگین‌کمان افزایش می‌دهد، به‌طوری که در مولدین ماده قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه‌شده با جیره فاقد آسکوربیک‌اسید و همچنین آسکوربیک‌اسید پایین، مقدار استرادیول پلازما در طول فرآیند زرده‌سازی پایین‌تر از ماهیانی بوده است که با جیره حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آسکوربیک‌اسید تغذیه شده بودند^[32]. دابروسکی و همکاران به این نتیجه رسیدند که میانگین غلظت استرادیول و تستوسترون پلازما در گروه تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی ۲۰، ۴۰ و ۸۷ میلی‌گرم آسکوربیک‌اسید بالاتر از گروه‌های تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی ۳۰ و ۱۱۰ میلی‌گرم بود و غلظت تستوسترون در زمان اووله‌شدن در قزل‌آلای تغذیه‌شده با

response and gonad histology in broodstock Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*. 2015;438:115-21.

15- AOAC. Official methods of analysis of AOAC international. 17th Edition. Rockville: AOAC International; 2002.

16- Mehrabi Y. A preliminary study on the anesthetic effect of clove flower in rainbow trout. *PAJOUHESH & SAZANDEGI*. 2000;(40-2):160-2. [Persian].

17- Bromage N, Jones J, Randall C, Thrush M, Davies B, Springate J, et al. Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 1992;100(1-3):141-66.

18- Abdollahi H, Seyedi Ghomi M, Mehrabi K. Rainbow trout reproduction. Tehran: Naghshe-e Bayan; 2004. [Persian]

19- Blom JH, Dabrowski K. Reproductive success of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to graded dietary ascorbyl monophosphate levels. *Biol Reprod*. 1995;52(5):1073-80.

20- Dabrowski K, Blom JH. Ascorbic acid deposition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs and survival of embryos. *Comp Biochem Physiol Part A Physiol*. 1994;108(1):129-35.

21- Dabrowski K, Ciereszko RE, Blom JH, Ottobre JS. Relationship between vitamin C and plasma concentrations of testosterone in female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol Biochem*. 1995;14(5):409-14.

22- Blom JH, Dabrowski K. Dietary ascorbyl phosphate results in high ascorbic acid content in eggs of rainbow trout. *Comp Biochem Physiol Part A Physiol*. 1995;112(1):75-9.

23- Sobhana KS, Mohan CV, Shankar KM. Effect of dietary vitamin C on the disease susceptibility and inflammatory response of mrigal, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) to experimental infection of *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*. 2002;207(3-4):225-38.

24- Ortuño J, Esteban MA, Meseguer J. The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol*. 2003;14(2):145-56.

25- Chen R, Lochmann R, Goodwin A, Praveen K, Dabrowski K, Lee KJ. Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). *Aquaculture*. 2004;242(1-4):553-69.

26- Lin MF, Shiau SY. Dietary L-ascorbic acid affects growth, nonspecific immune responses and disease resistance in juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture*. 2005;244(1-4):215-21.

27- Sandens K. Vitamin C in fish nutrition- a review. *Fisk Dir Skr Ser Ernering*. 1991;4(1):3-32.

28- Hardie LJ, Fletcher TC, Secombes CJ. The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*. 1991;95(3-4):201-14.

29- Henrique MM, Gomes EF, Gouillou-Coustans MF, Oliva-Teles A, Davies SJ. Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture*. 1998;161(1-4):415-26.

30- National Research Council, Division on Earth and Life Studies, Board on Agriculture and Natural Resources, Committee on the Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. Nutrient requirements of fish and shrimp.

سهم نویسندگان: زهره قادری‌فهلپانی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی (۲۵٪)؛ بهرام فلاحتکار (نویسنده دوم)، پژوهشگر اصلی/روش‌شناس/نگارنده بحث، تحلیل‌گر آماری (۳۵٪)؛ حمید علاف‌نویریان (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۲۰٪)؛ عبدالعلی راهداری (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی/روش‌شناس/نگارنده بحث، تحلیل‌گر آماری (۲۰٪).

منابع مالی: این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه گیلان انجام شده است.

منابع

- 1- Jansen M, McLeary R. Characteristics of current international trade of live salmonid eggs. *Revue Scientifique et Technique*. 1996;15(2):423-33.
- 2- Izquierdo MS, Fernández-Palacios H, Tacon AG. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*. 2001;197(1-4):25-42.
- 3- Li MH, Robinson EH. Dietary ascorbic acid requirement for growth and health in fish. *J Appl Aquac*. 1999;9(2):53-80.
- 4- Sandnes K, Ulgenes Y, Braekkan OR, Utne F. The effect of ascorbic acid supplementation in broodstock feed on reproduction of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*. 1984;43(1-3):167-77.
- 5- Dabrowski K, Ciereszko A. Proteinase inhibitor (s) in seminal plasma of teleost fish. *J Fish Biol*. 1994;45(5):801-9.
- 6- Ai Q, Mai K, Tan B, Xu W, Zhang W, Ma H, et al. Effects of dietary vitamin C on survival, growth, and immunity of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Aquaculture*. 2006;261(1):327-36.
- 7- Lin MF, Shiau SY. Requirements of vitamin C (L-ascorbyl-2-monophosphate-Mg and L-ascorbyl-2-monophosphate-Na) and its effects on immune responses of grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquac Nutr*. 2004;10(5):327-33.
- 8- Zhou Q, Wang L, Wang H, Xie F, Wang T. Effect of dietary vitamin C on the growth performance and innate immunity of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Fish Shellfish Immunol*. 2012;32(6):969-75.
- 9- Chen YJ, Yuan RM, Liu YJ, Yang HJ, Liang GY, Tian LX. Dietary vitamin C requirement and its effects on tissue antioxidant capacity of juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *Aquaculture*. 2015;435:431-6.
- 10- Chen R, Lochmann R, Goodwin A, Praveen K, Dabrowski K, Lee KJ. Alternative complement activity and resistance to heat stress in golden shiners (*Notemigonus crysoleucas*) are increased by dietary vitamin C levels in excess of requirements for prevention of deficiency signs. *J Nutr*. 2003;133(7):2281-6.
- 11- Schreck CB, Contreras-Sánchez WM, Fitzpatrick MS. Effects of stress on fish reproduction gamete quality and progeny. *Aquaculture*. 2001;197(1):3-24.
- 12- Holm JC, Refstie T, Bø S. The effect of fish density and feeding regimes on individual growth rate and mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 1990;89(3-4):225-32.
- 13- Brown GE, Brown JA, Srivastava RK. The effect of stocking density on the behaviour of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *J Fish Biol*. 1992;41(6):955-63.
- 14- Shahkar E, Yun H, Kim DJ, Kim SK, Lee BI, Bai SC. Effects of dietary vitamin C levels on tissue ascorbic acid concentration, hematology, non-specific immune

- 34- Halliwell B, Gutteridge JMC. Protection against oxidants in biological systems: The superoxide theory of oxygen toxicity. In: Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 5th Edition. Oxford: Oxford University Press; 2015. pp. 86-187.
- 35- Hornsby PJ, Harris SE, Aldern KA. The role of ascorbic acid in the function of the adrenal cortex: studies in adrenocortical cells in culture. *Endocrinology*. 1985;117(3):1264-71.
- 36- Carlson JC, Wu XM, Sawada M. Oxygen radicals and the control of ovarian corpus luteum function. *Free Radic Biol Med*. 1993;14(1):79-84.

- Washington DC: National Academies Press; 2011.
- 31- Cabrita E, Robles V, Herráez P, editors. *Methods in reproductive aquaculture: Marine and freshwater species*. Boca Raton: CRC Press; 2009.
- 32- Waagbø R, Thorsen T, Sandnes K. Role of dietary ascorbic acid in vitellogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*. 1989;80(3-4):301-14.
- 33- Sheldrick EL, Flint AP. Post-translational processing of oxytocin-neurophysin prohormone in the ovine corpus luteum: Activity of peptidyl glycine α -amidating mono-oxygenase and concentrations of its cofactor, ascorbic acid. *J Endocrinol*. 1989;122(1):313-22.