

تاثیر جیره‌های تکمیلی حاوی آستازانتین و بتاکاروتن بر شاخص‌های تولیدمثلی ماهی طلایی (*Carassius auratus*) و استرس ناشی از تراکم در مرحله انکوباسیون

- بابک تیزکار*: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۹۱۳۸-۱۵۷۳۹
- محمد سوداگر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۹۱۳۸-۱۵۷۳۹
- محمود بهمنی: موسسه تحقیقات شیلات ایران، انیستیتو بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان رشت، صندوق پستی: ۴۱۶۳۵-۳۴۶۶
- سید عباس حسینی: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۹۱۳۸-۱۵۷۳۹
- محمد چمنی: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه علوم دامی، صندوق پستی: ۴۹۳۳-۱۴۱۵۵

تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۱

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۱

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی اثرات کاروتنوئیدهای آستازانتین و بتاکاروتن بر شاخص‌های تولیدمثلی و تنش ناشی از تراکم بالا در مراحل رشد و نمو جنینی ماهی طلایی (*Carassius auratus*) انجام شد. هفت تیمار شامل شش جیره حاوی کاروتنوئیدهای آستازانتین (A) و بتاکاروتن (B) با مقادیر ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره به همراه یک جیره شاهد بدون کاروتنوئید اضافی (C) تهیه و به مدت چهار ماه به ماهیان داده شد. در پایان آزمایش، مولدین ماده با نرهای مولد یکسان (تغذیه شده با جیره شاهد) مورد تکثیر مصنوعی قرار گرفتند. مشخصات تکثیر در تیمارهای مختلف مورد مقایسه قرار گرفتند. در مرحله انکوباسیون، تخم‌های لقاح یافته، در تیمارهای مختلف در انکوباتورهای با تراکم‌های ده هزار و بیست هزار تخم در لیتر، انکوبه شدند. نتایج نشان داد که نرخ لقاح تخم‌های مولدین در تیمارهای مختلف، با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند ($P \leq 0/05$). نرخ بازماندگی تخم‌ها در فاصله لقاح تا شروع گاسترولاسیون، بین تیمارهای تراکم طبیعی و تراکم دو برابر، دارای اختلاف معنی‌داری بود ($P \leq 0/05$). در این مرحله نرخ بازماندگی تخم در تمامی تیمارهای با تراکم طبیعی، بالاتر از تیمارهای با تراکم دو برابر بود. در زمان شکوفایی تخم‌ها، درصد آستازانتین از کاروتنوئید کل تخم، در انکوباتورهای با تراکم طبیعی، به‌طور معنی‌داری بیشتر از انکوباتورهای با تراکم دو برابر بود.

کلمات کلیدی: تولیدمثل، آستازانتین، بتاکاروتن، ماهی طلایی، تنش، انکوباسیون



مقدمه

کاروتنوئیدها مولکول‌های رنگدانه‌ای هستند که عمدتاً به‌وسیله گیاهان و بعضی از باکتری‌ها و قارچ‌ها تولید می‌شوند (۱۳)؛ ولی به‌شدت به‌وسیله طیف وسیعی از جانوران در زنجیره غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳۰). در گیاهان و باکتری‌ها و قارچ‌ها، کاروتنوئیدها جایگاه مرکزی جمع‌آوری نور هستند. آن‌ها با ترکیبات پیچیده‌شان محل اتصال سودمند و انتقال انرژی با کلروفیل و دیگر رنگدانه‌های فتوسنتزی محسوب می‌شوند. خواص ترکیبات کلروفیل، کاروتنوئید، پروتئین در فتوسنتز بسیار حائز اهمیت بوده و عملکرد آن به‌خوبی شناخته شده است (۱۸)؛ اما در همین گیاهان در ترکیبات کاروتنوئید، پروتئین دیگری نیز وجود دارد که درگیر فتوسنتز نیستند و این مسأله نشان می‌دهد که کاروتنوئیدها مسوولیت‌ها و عملکردهای اختصاصی دیگری، حتی در گیاهان دارند (۱۸). فرایندهای بنیادی چگونگی جذب، ذخیره شدن و متابولیسم کاروتنوئیدها در مهره‌داران هنوز به‌خوبی درک نشده است (۳۰). عملکرد کاروتنوئیدها به‌شدت تابع ساختار مولکولی‌شان و نوع ترکیبات جانبی است که با سایر مولکول‌های بدن جاندار مثل پروتئین‌ها و چربی‌ها می‌سازند (۱۳). این مواد از مهم‌ترین مواد تشکیل دهنده تخم در موجوداتی هستند که مواد زرده را در تخم خود ذخیره می‌سازند (۷). کاروتنوئیدها در اندام‌های تولیدمثلی بسیاری از موجودات از جمله ماهی‌ها تجمع می‌یابند. در گذشته وجود این مواد در رشد و نمو طبیعی جنین ماهی‌ها؛ زیاد ضروری به نظر نمی‌رسید (۳۰). اما تحقیقات سال‌های اخیر نشان داده است که کیفیت لارو و تخم گروه‌های شاهد در مقابل تیمارهای حاوی کاروتنوئیدها از کیفیت پایین‌تری برخوردار بوده‌اند. هم‌چنین گزارش‌های متعددی درخصوص رابطه مثبت پیگمان‌های تخم و درصد لقاح و نرخ بقاء بالاتر لاروها در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به‌دست آمده است (۳). تحقیقات مختلفی نشان داده است که برخی از کاروتنوئیدهای اکسیژنی داخل تخم ماهیان و سایر موجودات جانوری جهت انجام فعالیت‌های اکسیداسیونی مصرف می‌شود (۱۶). این مسأله درخصوص آزاد ماهیان مولدی که به لحاظ رسیدگی جنسی وضعیت رسیده دارند، ولی نمی‌توانند تخم‌ریزی به‌موقع داشته باشند، کاملاً مشهود است.

Hrvey و Craik در سال ۱۹۸۴ ثابت کردند کاروتنوئیدهای موجود در تخم می‌توانند در این زمان نقش تنفسی داشته باشند. آن‌ها پی بردند که در شرایط مشابه در

مولدینی که با جیره غذایی حاوی کاروتنوئید تغذیه شده‌اند و دارای تخمک‌های با مقادیر بیشتری از کاروتنوئید هستند، نسبت به گروه شاهد، حالت فوق رسیدگی دیرتر اتفاق می‌افتد. ماهی طلائی (*Carassius auratus*) یکی از بارزترین ماهیان زینتی دنیاست که در ایران نیز به‌علت ارزش زینتی، دارای جایگاه ویژه‌ای است. تکثیر و پرورش مصنوعی این ماهی در بسیاری از نقاط دنیا با اهداف تجاری انجام می‌شود. افزایش تراکم لارو در انکوباتورها باعث کاهش راندمان تولید در مراحل تکثیر این ماهی می‌شود.

در این تحقیق علاوه بر تعیین میزان تاثیر کاروتنوئیدهای آستازانتین و بتاکاروتن بر فرایند تکثیر مصنوعی مولدین ماهی طلائی، نقش کاروتنوئیدها در شرایط استرس‌زای تراکم بالاتر در مرحله رشد و نمو جنینی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مراحل مولدسازی و تغذیه آن‌ها و هم‌چنین عملیات تکثیر و انکوباسیون تخم‌ها از آذر ۱۳۸۹ لغایت اردیبهشت ۱۳۹۱ در مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان استخوانی رشت به انجام رسید. در این تحقیق به‌منظور مقایسه جیره‌های حاوی آستازانتین و بتاکاروتن با یکدیگر و با جیره شاهد؛ هفت تیمار و سه تکرار در نظر گرفته شد، به‌منظور پرورش مولدین با جیره‌های آماده شده، تعداد ۲۱ حوضچه فایبرگلاس ۴ مترمکعبی با قطر ۲ متر و ارتفاع آبگیری ۱/۲ متر جهت پرورش مولدین تهیه و آماده گردید. تعداد ۱۰۵۰ قطعه ماهی مولد ماده یک‌ساله با میانگین وزن $47/21 \pm 2/19$ گرم و طول $14/71 \pm 0/31$ سانتی‌متر انتخاب شدند. قبل از توزیع مولدین در مخازن، بچه ماهیان در حوضچه فایبرگلاسی ۲ مترمکعبی ذخیره‌سازی شده و با آب نمک ۵ درصد ضدعفونی شدند. به‌منظور سازگاری ماهیان با جیره غذایی دست‌ساز، به‌مدت یک هفته مولدین با غذای آماده شده شاهد، روزانه دو مرحله (ساعت ۱۰ صبح و ۱۵ عصر) در حد سیری مورد تغذیه قرار گرفتند. سپس بچه‌ماهیان به‌طور تصادفی در ۲۱ مخزن با تراکم ۱۵۰ قطعه در هر مخزن توزیع شدند. میانگین درجه حرارت، پی‌اچ، اکسیژن محلول، نیتريت و آمونیاک غیریونیزه در طول مراحل پرورش مولدین، به‌طور روزانه اندازه‌گیری شد که به‌ترتیب برابر $12/64 \pm 0/29$ ، $7/43 \pm 0/28$ ، $7/08 \pm 0/44$ میلی‌گرم در لیتر، $0/01 \pm 0/01$ میلی‌لیتر در لیتر بود و در طی مراحل پرورش اختلاف معنی‌داری بین تیمارها



شدند (۲۶). جیره‌ها به کمک روغن ماهی و آب به خمیر تبدیل شده و در دستگاه پلتزن نوع کالیفرنایی (California Pelleting Machine) به پلت‌های با قطر ۳×۲ میلی‌متر تبدیل شدند. پلت‌های آماده شده در دستگاه خشک‌کن به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. غذاهای آماده شده در بسته‌های پلاستیکی مشکی قرار داده شد و در یخچال ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. عملیات ساخت غذا ماهیانه یک‌بار انجام می‌شد (جدول ۱). مقدار پروتئین خام، چربی کل، هیدرات کربن، خاکستر و رطوبت به روش شرح داده شده توسط AOAC (۱۹۹۵) اندازه‌گیری شد (جدول ۲).

مشاهده نشد. روزانه مقدار ۱۰ درصد آب مخازن جهت بهبود کیفیت آب از کف تعویض گردید.

جیره‌های غذایی

سه جیره غذایی شامل مقادیر ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم استازانتین و سه جیره غذایی شامل مقادیر ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بتاکاروتن و یک جیره شاهد بدون کاروتنوئید افزودنی مطابق جدول ۱ تهیه و آماده گردید و سپس کاروتنوئیدهای استازانتین و بتاکاروتن به مقدار مشخص پس از حل شدن در آب ۳۵ درجه سانتی‌گراد به جیره‌ها اضافه

جدول ۱- ترکیب جیره‌های غذایی مختلف (گرم در کیلوگرم)

جیره	A _{۵۰}	A _{۱۰۰}	A _{۱۵۰}	شاهد	B _{۵۰}	B _{۱۰۰}	B _{۱۵۰}
اقلام غذایی							
پودر ماهی	۲۹۰	۲۹۰	۲۹۰	۲۹۰	۲۹۰	۲۹۰	۲۹۰
کنجاله سویا	۲۹۰	۲۹۰	۲۹۰	۲۹۰	۲۹۰	۲۹۰	۲۹۰
پودر ذرت	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰
روغن ماهی کیلکا	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰
آرد گندم	۱۶۴	۱۶۴	۱۶۴	۱۶۴	۱۶۴	۱۶۴	۱۶۴
آهک	۴/۵	۴	۴/۵	۵	۴/۵	۴	۴/۵
میتونین	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲
لیزین	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲
کاویلامایسین ^a	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲
دی کلسیم فسفات	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵
پرمیکس ویتامینه ^b	۷/۵	۷/۵	۷/۵	۷/۵	۷/۵	۷/۵	۷/۵
پرمیکس معدنی ^c	۷/۵	۷/۵	۷/۵	۷/۵	۷/۵	۷/۵	۷/۵
استازانتین ^d	۰/۵	۱	۱/۵	-	-	-	-
بتاکاروتن ^e	-	-	-	-	۰/۵	۱	۱/۵
جمع	۱۰۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰

a. کاویلامایسین: حاوی ۱۰۰۰۰ میلی‌گرم آویلامایسین

b. پرمیکس ویتامینه: $K_2HPO_4 2.0g, Ca_3(PO_3)_2 2.720g, MgSO_4 7g, H_2O 3.041g$

c. پرمیکس معدنی: ۱۰ میلی‌گرم اسید p آمینوبنزوئیک؛ ۰/۴۰ میلی‌گرم بیوتین؛ ۴۰۰ میلی‌گرم اینوزیتول؛ ۴۰ میلی‌گرم اسید نیکوتینیک؛ ۶۰ میلی‌گرم Ca-pantothenate؛ ۱۲ میلی‌گرم پیریدوکسین HCL؛ ۸ میلی‌گرم ریبوفلاوین؛ ۴ میلی‌گرم تیامین HCL؛ ۴ میلی‌گرم منادیون؛ ۰/۰۸ میلی‌گرم سیانو کوبالامین؛ ۱/۲۰ میلی‌گرم کلسیفرول؛ ۰/۸۰ میلی‌گرم اسید فولیک؛ ۱۲۰ میلی‌گرم کلرید کولین.

d. استازانتین: Carophyll pink 10% DSM

e. بتاکاروتن: بتاکاروتن ۱۰٪ CWS



جدول ۲ - مشخصات کیفی جیره‌های آزمایشی

B _{۱۵۰}	B _{۱۰۰}	B _{۵۰}	شاهد	A _{۱۵۰}	A _{۱۰۰}	A _{۵۰}	جیره
۳۳/۸۴ ± ۰/۱۶	۳۳/۹۷ ± ۰/۵۰	۳۴/۵۰ ± ۰/۴۸	۳۳/۸۱ ± ۰/۷۰	۳۴/۱۱ ± ۰/۳۴	۳۳/۱۶ ± ۰/۵۰	۳۳/۱۶ ± ۰/۲۶	پروتئین خام (درصد)
۸/۵۷ ± ۰/۳۴	۸/۶۲ ± ۰/۳۱	۸/۰۴ ± ۰/۴۳	۷/۰۳ ± ۰/۵۲	۸/۷۵ ± ۰/۴۳	۷/۶۷ ± ۰/۶۸	۷/۹۸ ± ۰/۷۰	چربی خام (درصد)
۸/۹۸ ± ۰/۱۲	۹/۲۶ ± ۰/۰۹	۹/۲۴ ± ۰/۰۶	۹/۰۳ ± ۰/۳۱	۹/۳۱ ± ۰/۰۴	۹/۲۹ ± ۰/۰۸	۹/۰۵ ± ۰/۳۲	خاکستر (درصد)
۲/۹۹ ± ۰/۰۶	۲/۷۸ ± ۰/۲۱	۲/۷۲ ± ۰/۱۶	۳/۰۵ ± ۰/۰۳	۲/۸۴ ± ۰/۲۸	۲/۹۴ ± ۰/۱۴	۲/۳۲ ± ۰/۲۴	فیبر (درصد)
۵/۶۹ ± ۰/۰۴	۵/۷۱ ± ۰/۰۴	۵/۶۰ ± ۰/۱۸	۵/۷۷ ± ۰/۰۲	۵/۷۳ ± ۰/۰۷	۵/۷۱ ± ۰/۰۳	۵/۷۰ ± ۰/۰۳	رطوبت (درصد)
۱۵/۱۵۲ ± ۱/۷۶	۱۰/۱۳۰ ± ۱/۱۴	۴۹/۶۱ ± ۱/۴۵	۳/۴۴ ± ۱/۹۲	۱۴۹/۵۶ ± ۱/۲۶	۹۹/۵۳ ± ۳/۰۶	۵۲/۲۶ ± ۱/۵۸	کروتونید کل (میلی‌گرم در کیلوگرم)

انکوباسیون، در مراحل پس از لقاح، شروع مرحله گاسترولاسیون و شروع زمان شکوفایی نوزادان از تخم‌ها نمونه‌برداری انجام شد و جهت سنجش کاروتنوئیدهای اختصاصی در نیتروژن مایع منجمد و سپس در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نرخ بازماندگی تخم‌ها از زمان انکوبه شدن تا پایان مرحله گاسترولاسیون و از این مرحله تا زمان شکوفایی تخم در انکوباتورهای با ترکم طبیعی و دو برابر به شرح رابطه ۱ محاسبه گردید:

رابطه ۱: $۱۰۰ \times (\text{تعداد کل تخم‌های شمرده شده} / \text{تعداد کل تخم‌های سالم}) = \text{نرخ بازماندگی تخم}$

در پایان مرحله انکوباسیون، پس از جمع‌آوری لاروهای هر انکوباتور، میزان نرخ شکوفایی کل در هر انکوباتور به شرح رابطه ۲ محاسبه گردید:

رابطه ۲: $۱۰۰ \times (\text{تعداد تخم سالم ریخته شده در هر انکوباتور} / \text{تعداد لارو حاصل از هر انکوباتور}) = \text{نرخ شکوفایی تخم}$

در طی مراحل انکوباسیون، مقدار کاروتنوئید کل، آستازانتین و بتاکاروتن تخم‌ها در انکوباتورهای با تراکم طبیعی و دو برابر، محاسبه و میزان کاهش کاروتنوئیدها در تیمارهای مختلف محاسبه شد.

اندازه‌گیری کاروتنوئید کل

نمونه‌های تخم ماهی که در مراحل مختلف نمونه‌برداری شده بود، پس از انجماد در نیتروژن مایع در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. ۱/۵ گرم از نمونه پس از خروج از فریزر در دستگاه Christ Freeze Dryer مدل

همان‌طوری که پیش از این اشاره شد، با توجه به وجود ۷ تیمار و ۳ تکرار به‌ازای هر تیمار، در مجموع تعداد ۲۱ حوضچه مورد استفاده قرار گرفت. در هر حوضچه نیز تعداد ۵۰ قطعه ماهی و در مجموع ۱۰۵۰ ماهی در این آزمایش استفاده شد. ماهیان هر حوضچه به‌مدت ۴ ماه و به‌میزان ۲ درصد زی‌توده تغذیه شدند. در روزهایی که دمای آب به زیر ۶ درجه سانتی‌گراد می‌رسید، غذادهی قطع گردید. در اوایل اردیبهشت، در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد، پس از اطمینان از رسیدگی جنسی کامل مولدین با آزمایش‌های بافت‌شناسی، مولدین ماده با هورمون اوپرایم (Ovaprime) به مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر در کیلوگرم وزن مولد، تزریق شدند. جهت یکسان شدن عملیات تکثیر و عدم تأثیرگذاری مولدین نر در نتایج به‌دست آمده، یک ماه قبل از شروع عملیات تکثیر تعداد ۳۰۰ مولد نر با میانگین وزنی $۵۱ \pm ۲/۲۱$ گرم تهیه و با جیره شاهد مورد تغذیه قرار گرفتند. هم‌زمان با تزریق مولدین ماده، مولدین نر نیز به مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر در کیلوگرم مورد تزریق هورمون قرار گرفتند. تزریق در ماده‌ها و نرها، زیر باله‌ی سینه‌ای انجام گرفت. مولدین نر و ماده با نسبت جنسیت ۱:۲ مورد استفاده قرار گرفتند. در هر مرحله، تعداد چهار مولد از هر تکرار انتخاب و جمعاً ۱۲ مولد از هر تیمار مورد تکثیر مصنوعی قرار گرفت. متوسط دمای آب در زمان تکثیر مولدین ۱۹ درجه سانتی‌گراد بود. در زمان تکثیر مولدین، تعداد در گرم تخمک، در تیمارهای مختلف تعیین شد. دو ساعت پس از تکثیر، در زمان شروع تقسیم‌های چهارتایی برای سنجش تعداد در گرم تخم و نرخ لقاح، از تخم‌ها نمونه‌برداری شد. میزان قطر تخم‌های لقاح یافته در محور قطب جانوری به گیاهی، بلافاصله پس از لقاح اندازه‌گیری شد.

جهت تعیین میزان مقاومت تخم‌های مولدین تیمارهای مختلف، در تراکم بالا پس از تکثیر تخم‌های مولدین هر تیمار و تکرارهای آن‌ها در تراکم‌های ۱۰۰۰۰ و ۲۰۰۰۰ قطعه تخم در لیتر در ۴۲ انکوباسیون ویس، انکوبه شدند. در طی مراحل



ساخت استانداردها و استخراج نمونه‌ها، در محیط کم نور و دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. جهت استخراج کاروتنوئیدها از تخم ماهی، ابتدا ۵۰ میلی‌گرم از نمونه تر در ۳ میلی‌لیتر استون سرد، هموژنیزه و سپس به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شد. پس از آن نمونه به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰rpm، سانتریفوژ شده و ۲/۵ میلی‌لیتر از قسمت بالایی نمونه سانتریفوژ شده، جدا و با ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۲ میلی‌لیتر هگزان سرد شده، مخلوط شده و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس و مجدداً به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰rpm سانتریفوژ شده و در یک لوله تمیز تحت گاز ازت خشک شد. پس از آن ۲۵۰ میکرولیتر متانول به لوله اضافه شده و پس از ورتکس کردن ۷۰ میکرولیتر آن به دستگاه HPLC تزریق شد. در این تحقیق از دستگاه HPLC مدل Younglin HPLC system با پمپ مدل SP930D، و دکتکتور (UV detector (730D)، استفاده شد. فاز متحرک اول از متانول و آب به نسبت ۳ به ۹۷ و فاز متحرک دوم از متانول، THF و آب با نسبت‌های (۳: ۶۰: ۳۷) بود. شدت جریان معادل ۱/۴ میلی‌لیتر بر دقیقه و نوع ستون مورد استفاده از نوع C18 بود. نمونه‌ها در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شدند (۲۹).

روش‌های تجزیه و تحلیل آماری

مقایسه داده‌های حاصل از نتایج به دست آمده، بر اساس میانگین تکرارها با محاسبه میزان خطای استاندارد (Means \pm SE) گزارش شده است (۱۹). به منظور بررسی وضعیت نرمال بودن داده‌ها، از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف استفاده شد. جهت بررسی یکنواختی واریانس داده‌ها، از آزمون لون استفاده گردید. جهت مقایسه داده‌های حاصله از پارامترهای تکثیر (قطر تخمک و نرخ لقاح) از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way Analyses of Variance) استفاده شد. به منظور تعیین اختلاف معنی‌دار (در صورت موجود بودن) بین میانگین‌ها، از آزمون تفکیکی دانکن (Duncan) استفاده شد. سطوح معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ بررسی شدند. جهت مقایسه شاخص‌های مرحله انکوباسیون در تیمارهای با تراکم بالا و تراکم طبیعی، از آزمون تی‌استودنت (t-test: two-Sample Assuming Equal Variance) غیرجفتی با واریانس‌های برابر استفاده شد. در این تحقیق جهت تجزیه آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS 19 استفاده شد.

Alpha-LD Plus -۲- در دمای ۵۵- درجه سانتی‌گراد خشک شدند. نمونه‌ها در فلاسک‌های مخصوص تحت گاز نیتروژن (N₂) در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج کاروتنوئید از نمونه به کمک استون خالص مخصوص HPLC و ان‌هگزان با درجه انالیتیک با نسب حجمی (۱:۳) (استون به هگزان) انجام شد. به این منظور ۵۰ میلی‌گرم از نمونه خشک شده در داخل ظرف شیشه‌ای که با کاغذ آلومینیوم پوشیده شده بود، ریخته شده و مقدار ۵ میلی‌لیتر محلول (استون-هگزان) به آن افزوده شد. پس از آن نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دستگاه هم‌زن مغناطیسی مخلوط شدند. در زمان استخراج نمونه، اتاق محل کار، کم نور و دمای محیط ۲۲ درجه سانتی‌گراد بود.

محلول استخراج شده به کمک پمپ خلاء و با استفاده از کاغذ صافی سلولزی ۰/۴ میکرون فیلتر شده و ۳ میلی‌لیتر از محلول فیلتر شده به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ در دقیقه (PRM) سانتریفوژ شدند. عصاره جدا شده بالایی باافاصله با استفاده از اسپکتروفوتومتری UV مدل HITACHI-U-1800 در طول موج ۳۸۰ تا ۷۵۰ نانومتر خوانده شده و بالاترین مقدار جذب آن ثبت شد. دستگاه با محلول استون-هگزان (۳ به ۱) کالیبره شده بود. مقدار کاروتنوئید کل براساس قانون لامبرت-بیر (Lambert-beer) و براساس رابطه ۳ تعیین گردید.

رابطه ۳:

[وزن نمونه خشک شده (میلی‌گرم)] / [حجم محلول (میلی‌لیتر) × ضریب جذب مولکولی (ε) × حداکثر مقدار جذب] = کاروتنوئید کل (میکروگرم بر گرم)

مقدار ضریب جذب نوری $1 \times 1 \text{ cm}$ برابر (Asthaxanthin) 124000 در طول موج ۴۶۰ نانومتر است. مقدار جذب برای هر نمونه در سه تکرار ثبت شد.

اندازه‌گیری کاروتنوئیدهای اختصاصی

به منظور اندازه‌گیری مقدار آستازانتین و بتاکاروتن، از استانداردهای Astaxanthin Standard Powder ساخت شرکت Sigma (A9335) و β -Caroten Standard Powder ساخت شرکت Fulka (32993) استفاده شد. استانداردها در محدوده غلظتی ۲/۵-۵۴۰ میکروگرم بر لیتر آماده و منحنی استاندارد هر یک از کاروتنوئیدها رسم گردید. کلیه مراحل



نتایج

(جدول ۳). این نتایج نشان داد میانگین وزن انفرادی تخم‌های تیمارهای A_5 ، شاهد و B_{100} نسبت به دیگر تیمارها کم‌تر بود (جدول ۳). نتایج نرخ لقاح تخم‌های مولدین تیمارهای مختلف نشان داد اختلاف معنی‌داری به لحاظ نرخ لقاح بین تیمارها وجود دارد ($P \leq 0.05$) (جدول ۳). این نتایج بیانگر آن است که بیش‌ترین نرخ لقاح در تیمار B_{100} و کم‌ترین آن در تیمار شاهد است. نتایج آزمون‌های آماری، اختلاف معنی‌داری بین تیمار شاهد با تیمارهای دیگر به لحاظ نرخ لقاح نشان داد ($P \leq 0.05$). در زمان تکثیر، میانگین قطر تخم (میلی‌متر) مولدین در تیمارهای مختلف، اختلاف معنی‌داری نشان دادند ($P \leq 0.05$). این نتایج بیانگر آن بود قطر تخم در مولدین شاهد نسبت به مولدین در تیمارهای دیگر، اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۳).

در بین تیمارهای مختلف بیش‌ترین تعداد در گرم تخمک، در تیمار شاهد و کم‌ترین آن در تیمار B_{100} مشاهده گردید ($P \leq 0.05$). آزمون آماری اختلاف معنی‌داری را به لحاظ اندازه میزان تخمک‌های مولدین در تیمارهای مختلف نشان داد ($P \leq 0.05$). به عبارت دیگر تخمک‌های حاصله از مولدین شاهد نسبت به تخمک‌های حاصله از مولدین تیمارهای B_5 ، B_{100} ، B_{150} و A_{150} کوچک‌تر بوده و اختلاف معنی‌داری به لحاظ وزن با این تیمارها نشان داد ($P \leq 0.05$) (جدول ۳). نتایج حاصله از مراحل پس از تکثیر نشان داد میانگین تعداد در گرم تخم‌های مولدین تیمارهای مختلف (دو ساعت پس از لقاح)، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر داشتند ($P \leq 0.05$). بیش‌ترین تعداد تخم در گرم، در تیمار A_5 و کم‌ترین آن متعلق به تیمار B_{150} بود.

جدول ۳- میانگین شاخص‌های مرحله تکثیر مولدین در تیمارهای مختلف

تیمار شاخص	A_5	A_{100}	A_{150}	شاهد	B_5	B_{100}	B_{150}	کل
تعداد تخمک در گرم	$987/68 \pm 55/48^{ab}$	$966/53 \pm 62/69^b$	$937/48 \pm 30/66^b$	$1111/87 \pm 54/96^a$	$916/222 \pm 41/80^b$	$920/96 \pm 44/73^b$	$877/31 \pm 41/76^b$	$959/99 \pm 19/24$
تعداد در گرم (زمان لقاح)	$488/76 \pm 6/9^a$	$452/40 \pm 21/09^b$	$463/29 \pm 10/67^b$	$487/94 \pm 4/69^a$	$457/65 \pm 6/31^b$	$469/52 \pm 9/36^{ab}$	$444/95 \pm 11/05^b$	$466/50 \pm 2/23$
نرخ لقاح (درصد)	$94/63 \pm 0/27^b$	$96/94 \pm 0/49^a$	$96/52 \pm 0/31^a$	$87/70 \pm 0/13^c$	$96/98 \pm 0/37^a$	$97/75 \pm 0/33^a$	$97/21 \pm 0/59^a$	$95/39 \pm 0/41$
قطر تخم (میلی‌متر)	$1/28 \pm 0/02^a$	$1/31 \pm 0/01^a$	$1/28 \pm 0/03^a$	$1/21 \pm 0/02^b$	$1/28 \pm 0/03^a$	$1/27 \pm 0/01^a$	$1/28 \pm 0/01^a$	$1/27 \pm 0/01$

وجود حداقل یک حرف مشترک بین تیمارهای یک سطر، نشانه عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی در سطح $\alpha = 0.05$ است.

است که نرخ بازماندگی تخم در فاصله بین گاسترولاسیون و شکوفایی تخم‌ها در تراکم‌های طبیعی و دو برابر به استثنای تیمارهای B_{100} و B_{150} با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند (جدول ۴). در پایان مرحله انکوباسیون، اختلاف معنی‌داری در تیمارهای A_{150} ، B_{100} و B_{150} برای میزان بازماندگی کل تخم در تیمارهای تراکم طبیعی و متراکم مشاهده نشد ($P \leq 0.05$) (جدول ۴ و شکل ۱).

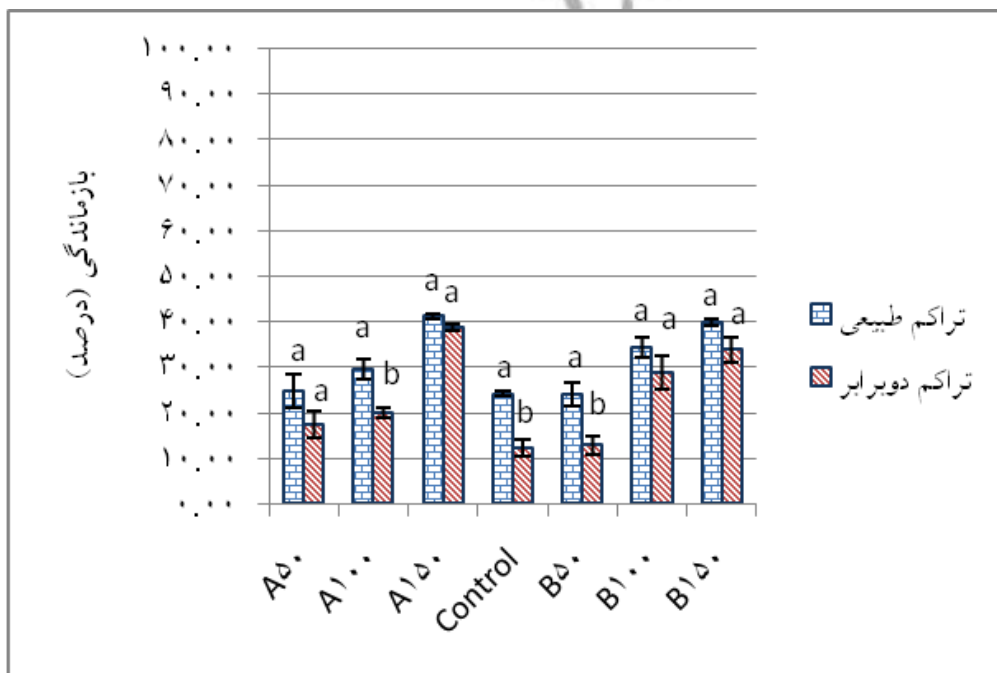
مقایسه نرخ بازماندگی تخم‌ها در فاصله لقاح تا شروع گاسترولاسیون، گاسترولاسیون تا زمان شکوفایی تخم‌ها، و بازماندگی کل در تیمارهای با تراکم‌های طبیعی و دو برابر نشان داد که نرخ بازماندگی تخم‌ها در فاصله لقاح تا شروع گاسترولاسیون بین تیمارهای طبیعی و تراکم دو برابر دارای اختلاف معنی‌داری است ($P \leq 0.05$). در این مرحله نرخ بازماندگی تخم در تمامی تیمارهای با تراکم طبیعی بالاتر از تیمارهای با تراکم دو برابر بود. هم‌چنین این نتایج حاکی از آن



جدول ۴- میانگین نرخ بازماندگی تخم در مراحل مختلف جنینی در انکوباتورهای تراکم طبیعی و دو برابر

مرحله انکوباسیون	تیمار	A _{۵۰}	A _{۱۰۰}	A _{۱۵۰}	شاهد	B _{۵۰}	B _{۱۰۰}	B _{۱۵۰}	کل
گاسترولاسیون	تراکم طبیعی	^a ۱/۳۸ ± ۷۱/۹۴	^a ۰/۵۲ ± ۸۷/۶۶	^a ۵/۸۹ ± ۶۰/۰۶	^a ۵/۸۹ ± ۶۰/۰۶	^a ۵/۵۵ ± ۵۵/۸۳	^a ۲/۰۶ ± ۷۷/۳۹	^a ۸۸/۴۴ ± ۰/۵۹	۷۳/۰۲ ± ۲/۸۱
	تراکم دو برابر	^b ۲/۲۶ ± ۶۲/۹۶	^b ۱/۰۸ ± ۷۹/۸۸	^b ۰/۹۷ ± ۴۱/۰۱	^b ۰/۹۷ ± ۴۱/۰۱	^b ۲/۵۳ ± ۳۷/۰۹	^b ۲/۹۳ ± ۶۵/۴۷	^b ۰/۳۷ ± ۸۱/۷۰	۶۰/۹۵ ± ۳/۶۱
گاسترولاسیون تا هج	تراکم طبیعی	^a ۴/۱۷ ± ۳۵/۳۹	^a ۳/۰۵ ± ۴۱/۲۵	^a ۰/۷۹ ± ۴۷/۲۰	^a ۴/۹۶ ± ۴۱/۲۶	^a ۷/۳۸ ± ۴۴/۳۸	^a ۳/۴۲ ± ۴۴/۵۰	^a ۰/۵۸ ± ۴۵/۲۰	۴۲/۷۴ ± ۱/۵۳
	تراکم دو برابر	^a ۵/۱۷ ± ۳۰/۶۵	^a ۲/۷۰ ± ۳۲/۵۱	^a ۱/۱۷ ± ۴۴/۸۱	^b ۲/۴۷ ± ۲۸/۸۶	^b ۳/۷۰ ± ۳۴/۴۸	^b ۱/۶۹ ± ۳۱/۷۴	^b ۲/۲۹ ± ۳۷/۷۶	۳۴/۴۰ ± ۱/۴۷
کل	تراکم طبیعی	^a ۳/۷۸ ± ۲۴/۸۸	^a ۲/۰۶ ± ۲۹/۶۴	^a ۰/۵۲ ± ۴۱/۳۷	^a ۰/۴۸ ± ۲۴/۲۱	^a ۲/۶۰ ± ۲۴/۱۵	^a ۲/۲۶ ± ۳۴/۳۶	^a ۰/۷۶ ± ۳۹/۹۸	۳۱/۲۳ ± ۱/۶۸
	تراکم دو برابر	^b ۲/۷۸ ± ۱۷/۴۸	^b ۱/۰۶ ± ۲۰/۱۶	^b ۰/۶۶ ± ۳۸/۹۱	^b ۱/۸۳ ± ۱۲/۴۹	^b ۲/۱۷ ± ۱۲/۹۲	^b ۳/۷۰ ± ۲۸/۸۴	^b ۲/۷۶ ± ۳۳/۹۰	۲۳/۵۳ ± ۲/۲۹

وجود حداقل یک حرف مشترک بین تیمارهای یک ستون، نشانه عدم اختلاف معنی دار بین تیمارهای آزمایشی در سطح $\alpha=0/05$ است.



شکل ۱- میانگین درصد بازماندگی کل تخم در انکوباتورهای طبیعی و متراکم

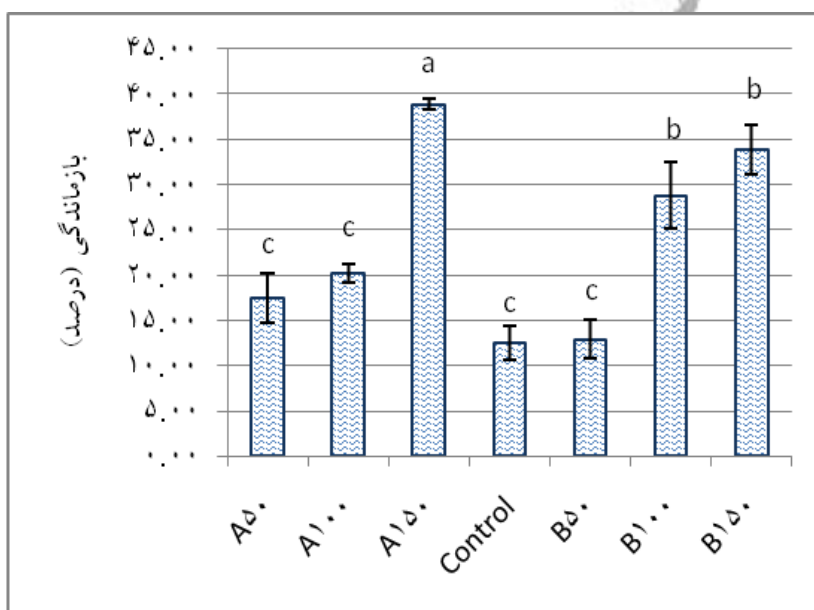
در بین تیمارهای متراکم بیشترین نرخ بازماندگی کل در تیمار A_{۱۵۰} و کمترین بازماندگی در تیمار شاهد مشاهده شد (جدول ۵ و شکل ۲).



جدول ۵- مقایسه میانگین نرخ بازماندگی در انکوباتورهای با تراکم دو برابر

مرحله انکوباسیون	تیمار	A _{۱۵۰}	A _{۱۰۰}	A _{۵۰}	شاهد	B _{۵۰}	B _{۱۰۰}	B _{۱۵۰}	کل
گاسترولاسیون		۷۹/۸۸ ± ۱/۰۸ ^a	۶۲/۹۶ ± ۲/۲۶ ^{bc}	۵۵/۲۹ ± ۶/۱۹ ^c	۴۱/۰۱ ± ۰/۹۷ ^d	۳۷/۰۹ ± ۲/۵۳ ^d	۶۵/۴۷ ± ۲/۹۳ ^b	۸۱/۷ ± ۰/۳۷ ^a	۶۰/۹۴ ± ۳/۶۱
گاسترولاسیون تا هج		۴۴/۸۱ ± ۱/۱۷ ^a	۳۲/۵۱ ± ۲/۷۰ ^b	۳۰/۶۵ ± ۵/۱۷ ^b	۲۸/۸۶ ± ۲/۴۷ ^b	۲۴/۴۸ ± ۳/۷۰ ^b	۳۱/۷۴ ± ۱/۶۹ ^b	۳۷/۷۶ ± ۲/۲۹ ^{ab}	۳۴/۴۰ ± ۱/۴۷
کل		۳۸/۹۱ ± ۰/۶۶ ^a	۲۰/۱۶ ± ۱/۰۶ ^c	۱۷/۴۸ ± ۲/۷۸ ^c	۱۲/۴۹ ± ۱/۸۳ ^c	۱۲/۹۱ ± ۲/۱۷ ^c	۲۸/۸۳ ± ۳/۷۰ ^c	۳۳/۹۰ ± ۲/۷۶ ^{ab}	۲۳/۵۳ ± ۲/۲۹

وجود حداقل یک حرف مشترک بین تیمارهای یک سطر، نشانه عدم اختلاف معنی دار بین تیمارهای آزمایشی در سطح $\alpha=0/05$ است.



شکل ۲- میانگین درصد بازماندگی کل تخم در انکوباتورهای متراکم

تراکم طبیعی و دو برابر، در تیمارهایی که دارای مقدار آستازانتین پایین‌تری بودند، بیش‌تر بود ($P \leq 0/05$). تیمار شاهد کم‌ترین افت کاروتنوئید کل، آستازانتین و بتاکاروتن را در انکوباتورهای با تراکم طبیعی و دو برابر نسبت به سایر تیمارها نشان داد ($P \leq 0/05$). در هر دو گروه از انکوباتورهای با تراکم معمولی و دو برابر، مقدار افت بتاکاروتن در تیمارهایی که از غلظت پایین‌تری از آستازانتین بودند، بیش‌تر بود (جدول ۶).

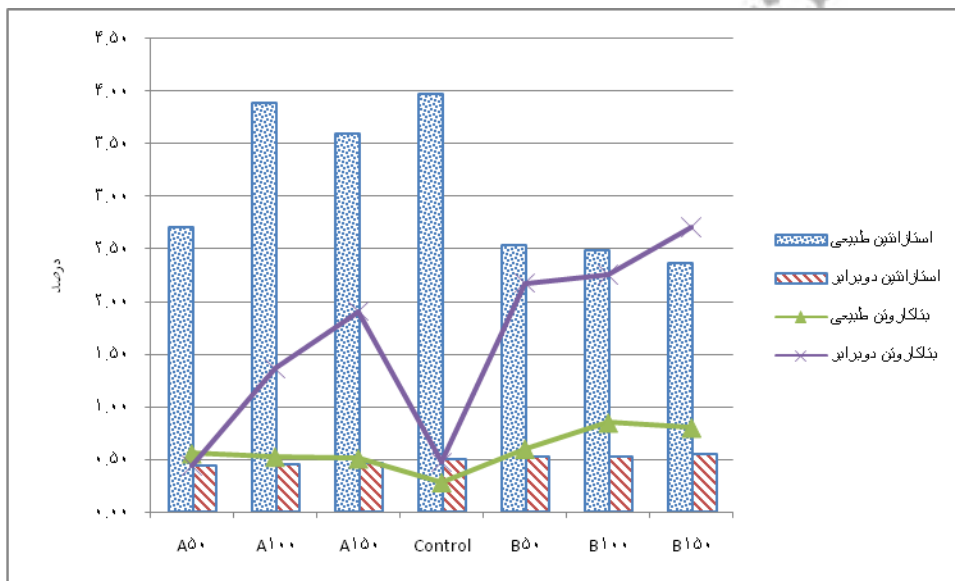
در پایان مرحله انکوباسیون، درصد آستازانتین از کاروتنوئید کل تخم، در انکوباتورهای با تراکم طبیعی بیش‌تر از انکوباتورهای با تراکم دو برابر بود. این درحالی است که در پایان مرحله انکوباسیون و زمان شکوفایی نوزادان، مقدار بتاکاروتن تخم‌ها در انکوباتورهای دو برابر درصد بالاتری را از کل کاروتنوئید تخم به‌خود اختصاص داده بود (شکل ۳).

میانگین کاروتنوئید کل، آستازانتین و بتاکاروتن در فاصله بین لقاح تا زمان شکوفایی نوزادان در هر دو گروه از انکوباتورهای با تراکم طبیعی و دو برابر کاهش یافت. نحوه افت کاروتنوئید کل، آستازانتین و بتاکاروتن در انکوباتورهای با تراکم طبیعی و دو برابر یکسان بود، ولی مقدار کاهش تمامی کاروتنوئیدها در انکوباتورهای با تراکم دو برابر بیش‌تر از تیمارهای با تراکم معمولی بود. نتایج بیانگر آن بوده است که در هر دو گروه از انکوباتورهای طبیعی و دو برابر؛ تیمارهایی که از غلظت‌های بالاتری از کاروتنوئید برخوردار بودند (A_{150} و B_{150})، در طی مراحل رشد و نمو جنینی، دارای مقدار کاهش بیش‌تری بودند. ضمناً مقدار کاهش آستازانتین در تیمارهای حاوی آستازانتین بیش‌تر از تیمارهای حاوی بتاکاروتن و شاهد بود. مقدار کاهش بتاکاروتن در هر دو گروه از انکوباتورهای با

جدول ۶ - میانگین کاهش میزان کاروتنوئیدهای آستازانتین (میکروگرم بر گرم) و بتاکاروتن (نانوگرم بر گرم) در وزن تر در فاصله لقاح تا شکوفایی تخم در انکوباتورهای تراکم طبیعی و دو برابر

تیمار	A _{۵۰}	A _{۱۰۰}	A _{۱۵۰}	شاهد	B _{۵۰}	B _{۱۰۰}	B _{۱۵۰}
کاروتنوئید کل	۴/۶۹۰±۰/۶۴ ^b	۶/۲۹±۰/۵۹ ^b	۷/۳۴±۰/۴۹ ^a	۳/۴۷±۰/۷۷ ^c	۶/۰۹±۱/۰۸ ^b	۵/۱۹±۰/۵۸ ^b	۶/۶۶±۰/۳۰ ^a
آستازانتین	۴/۰۸±۰/۶۴ ^b	۵/۱۳±۰/۷۰ ^a	۵/۹۲±۰/۹۴ ^a	۰/۹۷±۰/۷۹ ^c	۱/۹۹±۱/۱۲ ^c	۲/۹۶±۰/۵۹ ^b	۴/۲۴±۰/۳۳ ^b
بتاکاروتن	۹/۱۹±۰/۱۶ ^b	۱۰/۴۷±۰/۱۴ ^a	۵/۰۰±۰/۰۹ ^d	۸/۱۲±۰/۱۰ ^c	۸/۹۸±۰/۱۷ ^c	۶/۵۸±۰/۰۹ ^{ab}	۸/۹۹±۰/۰۵ ^b
کاروتنوئید کل	۷/۶۰±۰/۶۰ ^b	۹/۴۹±۰/۵۷ ^b	۱۳/۵۵±۰/۵۳ ^a	۵/۴۹±۰/۶۷ ^c	۸/۹۰±۰/۹۳ ^b	۹/۳۲±۰/۷۲ ^b	۱۲/۴۲±۰/۶۰ ^a
آستازانتین	۴/۲۲±۰/۵۱ ^b	۵/۳۳±۰/۵۵ ^a	۶/۲۱±۰/۶۸ ^a	۱/۰۱±۰/۸۴ ^c	۲/۱۱±۰/۹۱ ^c	۳/۱۰±۰/۶۰ ^b	۴/۴۱±۰/۸۰ ^b
بتاکاروتن	۱۳/۲۳±۰/۱۶ ^{ab}	۱۴/۲۶±۰/۱۳ ^a	۶/۵۴±۰/۰۸ ^d	۹/۶۲±۰/۰۹ ^c	۱۰/۴۸±۰/۱۶ ^c	۱۳/۹۹±۰/۱۱ ^{ab}	۱۲/۸۴±۰/۱۱ ^b

وجود حداقل یک حرف مشترک بین تیمارهای یک سطر، نشانه عدم اختلاف معنی دار بین تیمارهای آزمایشی در سطح $\alpha=0/05$ است.



شکل ۳- درصد کاروتنوئیدهای اختصاصی از کاروتنوئید کل در انکوباتورهای بتاکرم معمولی و دوبرابر

محسوب می‌شوند (۳۵).

نتایج این تحقیق نشان داد که متوسط تعداد در گرم تخمک‌های تیمار شاهد نسبت به تیمارهای حاوی کاروتنوئید بالاتر بوده و اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۳). به عبارت دیگر متوسط وزن انفرادی تخمک‌های تیمار شاهد نسبت به تیمارهای دیگر کوچک‌تر بود. علاوه بر این در بین تیمارهای حاوی کاروتنوئید، تیمارهایی که از غلظت کاروتنوئید بیشتری برخوردار بودند، نسبت به تیمارهای با غلظت پایین‌تر دارای تخمک‌های بزرگ‌تری بودند. این مسأله در مطالعات انجام شده توسط Choubert و همکاران در سال ۲۰۰۶ نیز مورد تأیید قرار گرفت. در مقایسه بین تیمارهای حاوی آستازانتین و بتاکاروتن مولدین تیمارهای بتاکاروتن دارای اندازه تخمک بزرگ‌تری بودند. اگرچه اختلاف بین آن‌ها معنی‌دار نبود

بحث

کاروتنوئیدهای موجود در جیره‌های غذایی پس از خورده شدن توسط آبزیان، به صورت‌های مختلف در کبد و هیپاتوپانکراس ماهیان و سخت‌پوستان تجمع یافته و در مراحل رسیدگی جنسی از کبد به تخمدان و سپس به تخمک‌ها منتقل می‌شوند. این فرایند در بسیاری از آزاد ماهیان (۶) میگوها (۱۹)؛ (۲۷) و ماهی طلائی (۵) به اثبات رسیده است. در ماهی طلائی ثابت شده است که بتاکاروتن خورده شده توسط مولدین ماده پس از ذخیره شدن در کبد در اثر متابولیسم‌های کبدی، به ویتامین A_۱ و سپس ویتامین A_۲ تبدیل شده و در طی مراحل زرده‌سازی به تخمک‌ها منتقل می‌شود (۶). ویتامین A و رتینول یکی از اصلی‌ترین مواد برای دید بهتر لاروهای ماهیان آب شیرین و در نتیجه دریافت بهتر غذا از محیط



تراکم بیش‌تر در مرحله انکوباسیون نشان داد که میانگین نرخ بازماندگی تخم‌ها در فاصله بین لقاح تا شروع گاسترولاسیون، در تمامی تیمارها، بین تراکم معمولی و تراکم دو برابر اختلاف معنی‌داری دارد. به عبارت دیگر نرخ بازماندگی تیمارهای با تراکم دو برابر، در فاصله بین لقاح تا شروع گاسترولاسیون، نسبت به تیمارهای با تراکم معمولی خود پایین‌تر بود ($P \leq 0.05$) (جدول ۴). استرس‌های ناشی از کمبود اکسیژن در فاصله زمانی بین لقاح تا شروع گاسترولاسیون، در مرحله انکوباسیون تخم‌ها می‌تواند باعث وجود این اختلاف بین انکوباتورهای با تراکم معمولی و دو برابر باشد و علی‌رغم اختلاف بالاتر نرخ بازماندگی تراکم طبیعی و دو برابر در تیمار شاهد و B₅ نسبت به تیمارهای دیگر، کاروتنوئیدهای موجود در تخم تیمارهای حاوی کاروتنوئید در انکوباتورهای دو برابر، نتوانسته بودند استرس‌های ناشی از کمبود اکسیژن و استرس‌های ناشی از دفع مواد متابولیکی تخم‌ها را جبران نمایند. وجود اختلاف معنی‌دار نرخ بازماندگی بین تیمارهای با تراکم معمولی و دو برابر در تمامی تیمارهای کاروتنوئیدی و شاهد در این مرحله مغایر با تحقیقات انجام شده توسط Craik و همکاران در سال ۱۹۸۵ و Mikulin در سال ۲۰۰۰ بود که به نقش و عملکرد تنفسی کاروتنوئیدها و هم‌چنین محافظت تخم‌ها در مقابل اشعه ماورای بنفش قایل بودند. در فاصله بین مرحله گاسترولاسیون و شکوفایی تخم‌ها نتایج بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار میزان نرخ بازماندگی تیمارهای با تراکم معمولی و دو برابر در تیمارهای حاوی آستازانتین و شاهد بود ولی در تیمارهای B₁₅ و B₁₀₀ میانگین نرخ بازماندگی در انکوباتورهای با تراکم معمولی بیش‌تر از انکوباتورهای با تراکم دو برابر بود ($P \leq 0.05$) (جدول ۴).

علت وجود عدم اختلاف معنی‌دار بین بیش‌تر انکوباتورهای با تراکم دو برابر با تراکم‌های معمولی در این مرحله، کم شدن تعداد تخم در مرحله ابتدایی انکوباسیون (مرحله لقاح تا گاسترولاسیون) بود. لذا با کم شدن تعداد تخم در انکوباتورهای با تراکم دو برابر در مرحله ابتدایی، تیمارهایی مثل تیمار شاهد، A₅، A₁₀₀ و B₅ تراکم تخم در این انکوباتورها کاهش یافته لذا اختلاف چندانی را با انکوباتورهای تراکم معمولی خود در این مرحله نشان ندادند. این عامل باعث شد که در فاصله بین گاسترولاسیون تا مرحله شکوفایی لاروها، نرخ شکوفایی در انکوباتورهای تراکم معمولی و دو برابر اختلاف معنی‌داری را نشان ندهد (جدول ۲).

در پایان مرحله انکوباسیون و مقایسه تیمارهای با

(جدول ۳). وزن کم‌تر تخم‌های مولدین پس از لقاح می‌تواند ناشی از ذخیره کم‌تر منابع غذایی در تخم باشد (۱۵) و این امر می‌تواند در میزان نرخ لقاح و نرخ بازماندگی بالاتر تخم‌های مولدین در مراحل بعدی موثر باشد (۱۵). کوچک‌تر بودن وزن انفرادی تخم‌های تیمار شاهد و A₅ با وزن تخمک‌های مولدین این تیمارها در قبل از لقاح ارتباط دارد. به نحوی که تخمک‌های مولدین این تیمارها در قبل از لقاح از تیمارهای دیگر کوچک‌تر بودند (جدول ۳). Murray و Beacham در سال ۱۹۸۵ و Ojanguren و همکاران در سال ۱۹۹۶ گزارش دادند بین اندازه تخم و میزان زرده تجمع یافته در تخم گونه آزاد اقیانوس اطلس ارتباط معنی‌داری وجود دارد. تغییرات اندازه تخم می‌تواند در مراحل رشد و نمو جنینی و بازماندگی لاروها تاثیر مستقیمی داشته باشد. در این زمینه نتایج بدست آمده در خصوص قطر تخم‌ها پس از لقاح نیز نشان دهنده کوچک‌تر بودن قطر تخم‌های مولدین تیمار شاهد نسبت به دیگر تیمارها بود ($P \leq 0.05$) (شکل ۳). شواهد زیادی مبنی بر اثر جیره‌های حاوی کاروتنوئید بر میزان نرخ لقاح در مولدین ماهی و دیگر آزیان موجود است (۱۰). در تحقیق حاضر میانگین نرخ لقاح در تخم‌های حاوی کاروتنوئید نسبت به دیگر تیمارها بالاتر بود (جدول ۳). این نتیجه با نتایج به دست آمده قبلی، مبنی بر افزایش نرخ لقاح در تخم‌های مولدین ماهی قزل‌آلایی که حاوی کاروتنوئیدهای بیش‌تر بودند، مطابقت دارد (۱). محققین دیگری نیز مثل Tsushima و Matsuno در سال ۱۹۹۷ در گونه قزل‌آلا این مساله را تایید کرده‌اند. بعضی از محققین نرخ بالاتر لقاح تخم‌های حاوی منابع کاروتنوئیدی را به علت جذب بودن این دسته از تخم‌ها در مقابل با اسپرماتوزئید می‌دانند و معتقدند که تخم‌ها رنگی‌تر زودتر مورد جذب اسپرم قرار گرفته و این امر می‌تواند نرخ لقاح را بالاتر ببرد (۲۸، ۱۴). البته Vassallo-Agius و همکاران در سال ۲۰۰۱ چنین نظری را در گونه ماهی استرپیت‌جک (*Pseudocaranx dentex*) نداشتند. مواد حاصل از متابولیسم سلولی جنین‌ها در طی مراحل رشد و نمو جنینی از طریق دیواره سلول به خارج دفع می‌گردد. تحمل تخم‌ها در برابر مواد سمی ناشی از متابولیت‌های سلولی می‌تواند متفاوت باشد. بسیاری از محققان نشان دادند که تخم‌های گونه‌هایی از آزاد ماهیان مثل قزل‌آلای رنگین‌کمان و کوهو (*O. Kisut*) که از مقادیر بالاتر کاروتنوئید برخوردار بوده‌اند، می‌توانند مقاومت بیش‌تری در مقابل سمیت آمونیاک داشته باشند (۳۶).

در این تحقیق نتایج حاصل از آزمایش مقاومت تخم‌ها به

سال ۱۹۸۳ نشان داد در مقایسه با آستازانتین، جیره‌های حاوی بتاکاروتن تاثیر چندانی در بهبود نرخ شکوفایی و بازماندگی تخم‌های ماهی قزل‌آلای رنگین کمان ندارد. در آزمایش اخیر، میزان کاهش کاروتنوئید کل، آستازانتین و بتاکاروتن در طول دوره رشد و نمو جنینی با مطالعات انجام شده در ماهی قزل‌آلا (۳۴؛ ۱۷؛ Craick, 1985) همخوانی داشت.

در بسیاری از تحقیقات انجام شده در خصوص ماهی طلایی ثابت شده است که در طی مراحل رشد و نمو جنینی، کاروتنوئیدها مسیرهای تبدیلی را طی می‌کنند و از شکلی به شکل دیگر تبدیل شده و مورد مصرف قرار می‌گیرند (۵). در تحقیق حاضر مشخص شد، تخم‌هایی که حاوی مقادیر بیش‌تری کاروتنوئید در زمان لقاح بودند، مقاومت بیش‌تری در برابر تراکم بالاتر در زمان انکوباسیون از خود نشان دادند. به‌عبارت دیگر نرخ بازماندگی تخم در انکوباتورهای با تراکم بالایی که حاوی کاروتنوئید بیش‌تری بودند، نسبت به تیمارهای دارای غلظت کاروتنوئید پایین‌تر، بیش‌تر بود و آستازانتین موجود در تخم، در غلظت‌های بالاتر باعث افزایش مقاومت تخم‌ها در برابر تنش ناشی از تراکم بالاتر شد (شکل ۳).

در تیمار شاهد و تیمارهای با غلظت کاروتنوئید پایین (A_{50} و B_{50})، نرخ بازماندگی کل انکوباتورهای طبیعی و دو برابر اختلاف معنی‌داری را نشان داد. Karnakhov در سال‌های ۱۹۷۱ و ۱۹۷۳ نتایج مشابهی را بر روی نرم‌تنان دوکفه‌ای که دارای مقادیر بالاتر کاروتنوئید در بدنشان بودند، در شرایط کمبود اکسیژن محیط؛ به‌دست آوردند. هم‌چنین Craik و Harvy در سال ۱۹۸۴ با مطالعاتی که روی مولدین رسیده قزل‌آلا انجام دادند، نتیجه گرفتند که تخم‌هایی که حاوی مقادیر بالاتر آستازانتین بوده‌اند، در صورت عدم تکثیر به‌موقع مولدین، آستازانتین در آن‌ها نقش تنفسی داشته و از تخریب تخم در بدن مولدین جلوگیری می‌کند. در این تحقیق، در طی مراحل رشد و نمو جنینی تخم، مقدار کاروتنوئید کل و آستازانتین کاهش محسوسی را در همه تیمارها نشان داد؛ ولی مقدار این کاهش در تیمارهایی که دارای غلظت‌های بیش‌تر از کاروتنوئید کل و آستازانتین بوده‌اند بیش‌تر بود. کاهش میزان کاروتنوئید در انکوباتورهای با تراکم بالاتر، بیش‌تر بود و با شدت بالاتری دیده شد. مصرف بیشتر کاروتنوئیدها در انکوباتورهای با تراکم بالاتر، می‌تواند ناشی از تاثیر و عملکرد کاروتنوئیدها و به‌خصوص آستازانتین در برابر تنش ناشی از کاهش اکسیژن محلول و مواد دفعی ناشی از متابولیسم سلولی تخم‌ها در طی مراحل رشد و نمو جنینی آن‌ها باشد. این نتیجه با نتایج

تراکم معمولی و تراکم دو برابر مشاهده شد که میانگین نرخ بازماندگی کل تیمارهای A_{50} ، A_{100} و B_{50} در انکوباتورهای با تراکم معمولی و دو برابر اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ($P \leq 0.05$) (جدول ۳). لذا می‌توان نتیجه گرفت که کاروتنوئیدهای آستازانتین و بتاکاروتن موجود در جیره در سطوح بالاتر خود توانسته‌اند با انتقال به تخم‌ها باعث جلوگیری از تنش‌های ناشی از کمبود اکسیژن در شرایط استرس‌زایی تراکم بالا در طی مراحل رشد و نمو جنینی شوند. چنین نتیجه‌ای در ماهی قزل‌آلا توسط Ormsrud و همکاران در سال ۲۰۰۴ به اثبات رسیده است وی معتقد است که کاروتنوئیدهای مثل آستازانتین، بتاکاروتن و زی‌زانتین از طریق از دست دادن اکسیژن و شکافت سلولی در طی مراحل رشد و نمو جنینی ماهی قزل‌آلا، به ویتامین A تبدیل شده و این اکسیژن آزاد شده در فعالیت‌های حیاتی جنین می‌تواند نقش مهمی داشته باشد. اگرچه Torrissen در سال ۱۹۹۰ گزارش کرده‌اند که بر خلاف آستازانتین، بتاکاروتن تاثیر مثبتی روی پارامترهای تولیدمثلی ماهی قزل‌آلا نداشته است. ولی شواهد دیگری نشان می‌دهد که بتاکاروتن موجود در تخم ماهی طلایی در طی یک فرآیند شیمیایی می‌تواند به آستازانتین تبدیل شده و مورد مصرف قرار گیرد (۱۲؛ ۲۰؛ ۲۳) و ویتامین A به همراه بتاکاروتن می‌توانند با حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژنی نقش حفاظتی برای سلول‌های تخم ماهیان داشته باشند (۳۷). این نتایج نشان می‌دهد که کاروتنوئیدهای آستازانتین و بتاکاروتن در سطوح بالای خود در ماهی طلایی توانسته‌اند نقش حفاظتی را برای تخم‌ها در شرایط استرس‌زای ناشی از تراکم دو برابر بازی کنند و سلول‌های تخم را در مقابله با اثرات ناشی از کمبود اکسیژن و دفع مواد غذایی متابولیکی سلولی مقاوم‌تر نمایند.

در بین انکوباتورهای دارای تراکم دو برابر، بیش‌ترین نرخ بازماندگی کل را تیمار A_{150} و سپس تیمارهای B_{100} و B_{150} نشان دادند. این مساله نشان می‌دهد که در مقایسه بین تیمارها، تیمار A_{150} بیش‌ترین نقش استرس‌زایی را برای تخم‌ها در طی مراحل رشد و نمو جنینی داشته است و این تیمار در مقایسه با تیمار شاهد و تیمارهای حاوی مقادیر کم‌تر آستازانتین و تیمارهای بتاکاروتن دارای عملکرد بهتری در شرایط تراکم بالای مرحله انکوباسیون بوده است (شکل ۳). Chien و Shiau در سال ۲۰۰۵ نیز ثابت کردند که جیره‌های حاوی آستازانتین می‌توانند مقاومت پست‌لاروهای میگوی ژاپنی (*M. japonicus*) را در مقابل تنش‌های کمبود اکسیژنی افزایش دهند. مطالعات Miki و همکاران در



2. **AOAC. 1995.** Official Methods for Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 14th edition. Arlington, VA, 1141 pp.
 3. **Bazyar, A.; Ahmadi, M.R.; Safi, S.; Ytresta, T. and Bjerkeng, B., 2009.** Growth performance, mortality and carotenoid pigmentation of fry offspring as affected by dietary supplementation of astaxanthin to female rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* broodstock. Journal of Applied Ichthyology. 286 pp.
 4. **Beacham, T.D. and Murray, C.B., 1990.** Temperature, egg size, and development of embryos and alevins of five species of Pacific salmon: a comparative analysis. Transactions of the American Fisheries Society. Vol. 119, 927-944.
 5. **Benjamin, J. and Del Tito, J.R., 1988.** Role of Beta-carotene and Lutein in the Synthesis of Vitamin A in Goldfish. The Progressive Fish-Culturist Vol. 45: 94-97.
 6. **Bjerkeng, B. and Berge, G.M., 2000.** Apparent digestibility coefficients and accumulation of astaxanthin E: Z isomers in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus L.*). Comp Biochem Physiol B, Biochem Mol Biol, Vol. 127:423-432.
 7. **Blount, J.D.; Surai, P.F.; Houston, D.C. and Moller, A.P., 2002.** Patterns of yolk enrichment with dietary carotenoids in gulls: the roles of pigment acquisition and utilization, Funct. Ecol., Vol. 16, 445.
 8. **Chient, Y. and Shiau, W., 2005.** The effects of dietary supplementation of algae and synthetic astaxanthin on body astaxanthin, survival, growth, and low dissolved oxygen stress resistance of kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus Bate.* Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. Vol. 318: 201-211
 9. **Choubert, G.; Manuel, M.; Pinto, M. and Morais, R.M., 2006.** Pigmenting efficacy of Astaxanthin fed to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: Effect of dietary Astaxanthin and lipid sources. Aquaculture. P, 28-30.
 10. **Craik, J.C.A., 1985.** Egg quality and egg pigment content in salmonid fishes. Aquaculture Vol. 47, 61-88.
 11. **Craik, J.C.A. and Harvey, S.M., 1984.** Egg quality in rainbow trout: the relation between egg viability, selected aspects of egg composition, and time of stripping.
- به دست آمده توسط یارزامیک در سال ۱۹۷۰ در ماهی قزل‌آلای کتا (*O. kisuta*) و قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mikkis*) و میگوی ژاپنی (*M. japonicus*) (۸) و در پُست‌لاروهای میگوی منودون (*P. monodon*) (۳۲؛ ۸) نیز مطابقت داشت.
- ### نتیجه‌گیری
- این تحقیق نشان داده است که رژیم‌های حاوی کاروتنوئید در مقادیر بالای خود می‌توانند باعث بهبود فرایند لقاح و تولیدمثل مولدین ماهی طلایی شده و تخم‌های حاصله از این مولدین، در تنش ناشی از تراکم بالاتر، مقاوم‌تر بوده و نرخ بازماندگی بالایی را نسبت به تیمارهای دارای غلظت کاروتنوئید پایین نشان دهند. در این تحقیق مشخص گردید که در شرایط استرس‌زای ناشی از تنش افزایش تراکم، تخم‌های دارای غلظت بالاتر کاروتنوئید، مقدار بیش‌تری از کاروتنوئید خود را صرف جبران تنش ایجاد شده و نیز کاهش اکسیژن ایجاد شده در اثر افزایش تراکم می‌کنند و در این بین، تیمارهای حاوی آستازانتین، عملکرد بهتری نسبت به بتاکاروتن داشتند.
- در خاتمه با توجه به یافته‌های تحقیق، پیشنهاد می‌گردد ضمن استفاده از کاروتنوئیدهای آستازانتین در جیره مولدین کپورماهیان، فرایند تغییر و تحول مقادیر مختلف از کاروتنوئیدها در طی مراحل رشد و نمو جنینی و تنش‌های مختلف محیطی، فیزیکی و پاتوزنیک مشخص گردد.
- ### تشکر و قدردانی
- بدین‌وسیله نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی و تشکر خود را از گروه شیلات و محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، موسسه علمی کاربردی وزارت جهاد کشاورزی، مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان استخوانی شهید انصاری رشت و انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان اعلام می‌دارند.
- ### منابع
1. **Ahmadi, M. R.; Bazyar, A.; Safi, S.; Ytrestoyl, T. and Bjerkeng, B., 2006.** Effects of dietary astaxanthin supplementation on reproductive characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Appl. Ichthyol. , Vol. 22, 388.



- metabolism in the goldfish *Carassius auratus*(*Hibuna*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B Vol. 124: 333-340.
24. **Ojanguren, A.F.; Reyes-Gavilan, F.G. and Brana, F., 1996.** Effects of egg size on offspring development and fitness in brown trout, *Salmo trutta L.* Aquaculture. Vol. 147: 9-20.
 25. **Ornsrud, R.; Wargelius, A.; Sale, O.; Pittman, K. and Waagbo, R.J., 2004.** Influence of egg vitamin A status and egg incubation temperature on subsequent development of the early vertebral column in Atlantic salmon fry. Fish Biol. Vol. 64, 399.
 26. **Page, G.I. and Davies, S.J., 2003.** Hepatic carotenoid uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using an isolated organ perfusion model. Aquaculture. Vol. 225: 405-419.
 27. **Paibulkichakul, C.; Piyatiratitivorakul, P.; Sorgeloos, P. and Menasveta, P., 2008.** Improved maturation of pond-reared, black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Using fish oil and Astaxanthin feed supplements. Aquaculture. Vol. 282: 83-89.
 28. **Quantz, G., 1980.** Über den Einfluss von Carotinoidreicherung Trockenfutter auf die Eibefruchtung der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri R.*). Arch. Fischwiss. Vol. 31: 29-40.
 29. **Suhnel, S.; Lagreze, F.; Ferreira, J.F.; Campestrini, L.H. and Maraschin, M., 2009.** Carotenoid extraction from the gonad of the scallop *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia: Pectinidae). Braz. J. Biol. Vol. 69: 209-215.
 30. **Torrissen, O.J., 1990.** Biological activities of carotenoids in fishes. The current status of fish nutrients in aquaculture. Tokyo University of Fisheries, Tokyo, Japan. , 387-399.
 31. **Tsushima, M. and Matsuno, T., 1998.** The role of b-carotene on growth and survival of juvenile Japanese abalone *Haliotis discus*. Fish. Sci. Vol. 64: 660-661.
 32. **Tveranger, B., 1986.** Effect of pigment content in broodstock diet on subsequent fertilization rate, survival and growth rate of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) offspring. Aquaculture. Vol. 53: 85-93.
 33. **Vassallo-Agius, R.; Watanabe, T.; Imaizumi, H.; Yamazaki, T.; Satoh, S. and Kiron, V., 2001.** Effects of dry pellets containing astaxanthin and squid meal on the spawning performance of striped jack *Pseudocaranx dentex* Fish. Sci., Vol. 67: 260.
 - Aquaculture, Vol. 40, 115-134.
 12. **Delia, B.; Roderiguez, K.L.; Simpson, C.O. and Chichester, A., 1974.** The biosynthesis of astaxanthin. XVIII. The incorporation and transformation of carotenoids in the Goldfish. Int. 7. Biochem. , Vol. 5, 157-166.
 13. **Demmig-Adams, B.; Gilmore, A.M. and Adams, W.W., 1996.** Carotenoids 3: in vivo function of carotenoids in higher plants. FASEB J, Vol. 10: 403-412.
 14. **Hartmann, M.; Medem, F.G.; Kuhn, R. and Bielig, H.J., 1947.** Untersuchungen über die Befruchtungsstoffe der Regenbogenforelle. Z. Naturforsch. Vol. 2b, 330-349.
 15. **Heinimaa, S. and Heinimaa, P., 2004.** Effect of the female size on egg quality and fecundity of the wild Atlanti Salmon in the sub-arctic River tendo, Boreal environment Research. Vol. 9: 55-62
 16. **Karnaikhov, V.N., 1971.** Carotenoids in oxidative metabolism of mollusoid neurons. Exp. Cell Res., Vol. 64: 301-306.
 17. **Kawakami, Y.; Raya, A.; Raya, R.M.; Rodríguez-Esteban, C. and Belmonte, J.C.I., 2005.** Retinoic acid signalling links left-right asymmetric patterning and bilaterally symmetric somitogenesis in the zebrafish embryo. Nature. Vol. 435: 165-171.
 18. **Kerfeld, C.A.; Sawaya, M.R.; Brahmandam, V.; Cascio, D.; Ho, K.K.; Trevithick-Sutton, C.C.; Krogmann, D.W. and Yeates, T.O., 2003.** The Crystal Structure of a Cyanobacterial Water-Soluble Carotenoid-Binding Protein. Structure. Vol. 11: 55-65.
 19. **Linan-Cabello, M.A.; Medina-Zendejas, R.; Sanchez-Barajas, M. and Herrera, A.M., 2004.** Effects of carotenoids and retinol in oocyte maturation of crayfish *Cherax quadricarinatus*. Aquacult. Res. Vol. 35: 905-911.
 20. **Maugle, P.; Kamata, T.; McLean, S.; Simpson, K.L. and Katayama, T., 1980.** The influence of eyestalk ablation on carotenoid composition of juvenile *Macrobrachium rosenbergii*, Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. Vol. 46: 901-904
 21. **Miki, W.; Yamaguchi, K. and Konosu, S., 1983.** Carotenoid composition of Alaskapoflack roe at different stages of maturation. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. , Vol. 49: 1615.
 22. **Mikulín, A.E., 2000.** Functional role of pigments and pigmentation in fish ontogeny. VNIRO, Moscow, p. 432 (In Russian).
 23. **Ohkubo, M.; Tsushima, M.; Maoka, T. and Matsuno, T., 1999.** Carotenoids and their



34. **Vermot, J. and Pourqui'e, O., 2005.** Retinoic acid coordinates somitogenesis and left-right patterning in vertebrate embryos. *Nature*. Vol. 435: 215-220.
35. **West, E.S.; Todd, W.R.; Mason, H.J. and Van Bruggen, J.T., 1966.** Textbook of biochemistry, 4th Ed. The Macmillan Co., New York. 1595 pp.
36. **Yarzhombek, A.A., 1970.** The carotenoids of salmonids and their connection with reproduction in these fishes. *Tr. VNIRO*, Vol. 69: 234-267 (In Russian).
37. **Zhang, P. and Omaye, S.T., 2001.** β -carotene: interactions with α -tocopherol and ascorbic acid in micellar lipid peroxidation. *J. Nutr. Biochem.* Vol. 12: 38-45.

پژوهش‌های علمی - پژوهشی
مطالعات محیط زیست جانوری



The effects of dietary astaxanthin and β -carotene supplementation on the reproductive indices of goldfish (*Carassius auratus*) based on density-dependent stress in incubation stage

- **Babak Tizkar ***: Department of Fishery, Faculty of Fisheries and Environment, Agricultural sciences and natural resources of Gorgan University, P.O.Box: 487-49175 Gorgan, Iran
- **Mohammad Soudagar**: Department of Fishery, Faculty of Fisheries and Environment, Agricultural sciences and natural resources of Gorgan University, P.O.Box: 487-49175 Gorgan, Iran
- **Mahmoud Bahmani**: Dadman International Sturgeon Research Institute, Iranian Fisheries Research Organization, P.O.Box:41635-3464 Rasht, Iran
- **Seyyed Abbas Hosseini**: Department of Fishery, Faculty of Fisheries and Environment, Agricultural sciences and natural resources of Gorgan University, P.O.Box: 487-49175 Gorgan, Iran
- **Mohammad Chamani**: Islamic Azad University, Science and Research Branch, P.O.Box: 14155-4933 Tehran, Iran

Received: June 2012

Accepted: October 2012

Keywords: reproduction, astaxanthine, β -carotenoid, goldfish, tension, incubation

Abstract

The present research was carried out in order to examination of the effects of astaxanthine and β -carotene supplementation on reproductive indices and the tensions induced by high density in the early development stage of goldfish embryos (*Carassius auratus*). The study was included seven treatments based six diets containing astaxanthine (A) and β -carotene (B) with three different levels of 50, 100, and 150 mg kg⁻¹ of the diet, as well as a control diet which was devoid of any added carotenoid. The fish were fed using these diets for a period of 4 months. At the end of the experiment, the female fish were artificially bred with identical male fish (which were fed with the control diet). The various propagation indices in different treatments were compared. In the incubation phase, the fertilized eggs were incubated in batches containing 10000 eggs and 20000 eggs per liter. The result showed a significantly difference for egg fertilization rate between different treatments ($P \leq 0.05$). The egg survivability rate from fertilization up to the onset of gastrulation stage turned out to be significantly different between treatments with normal density and treatment with double density ($P \leq 0.05$). In this stage, the egg survivability rate in the normal density treatment had higher than those treatments which had two times greater density than the normal one. In the egg development stage, and in the normal density treatments, the astaxanthine percentage out of the total carotenoid showed significant different rather than double density treatments.

