بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی

گروه زیست شناسی دریا

پایان نامه کارشناسی ارشد زیست شناسی دریا

عنوان:

اثرات نوکلئوتید جیره بر ساختار، فرا ساختار و نقش تنظیم اسمزی روده (ساک های پیلوریک) در ماهی آزاد دریای خزر ***Salmo trutta caspius*** **(Kessler, 1877)**

نگارش:

صادق اولاد محمدرضا

استاد راهنما:

دکتر صابر خدابنده

استاد مشاور:

دکتر عبدالمحمد عابدیان

زمستان۱۳۸۷

دستورالعمل حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش‌های علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسان‌ها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران لازم است اعضای هیات علمی, دانشجویان, دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح, در مورد نتایج پژوهش‌های علمی که تحت عناوین پایان‌نامه, رساله و طرح‌های تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است, موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱: حقوق مادی و معنوی پایان‌نامه‌ها/ رساله‌های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هر گونه بهره‌برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین‌نامه‌ها و دستورالعمل‌های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲: انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی می‌باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما نویسنده مسئول مقاله باشد.
تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان-نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه ذکر شود.

ماده ۳: انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و بر اساس آیین‌نامه‌های مصوب انجام می‌شود.

ماده۴: ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره‌های ملی, منطقه‌ای و بین المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما با مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵: این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸۴/۴/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم الاجرا است و هر گونه تخلف از مفاد این دستورالعمل از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

شماره:.....

تاریخ:.....

پیوست:.....

آیین نامه چاپ پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱) در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله) های خود، مراتب را قبلاً به مرکز نشر دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲) در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

((کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده در رشته **زیست شناسی دریا** است که در سال **۱۳۸۷** در دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور به راهنمایی جناب آقای **صابر خدابنده** از آن دفاع شده است.))

ماده ۳) به منظور جبران بخشی از هزینه های نشریات دانشگاه تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به مرکز نشر دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴) در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰ ٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه نماید.

ماده ۵) دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

ماده ۶) اینجانب **صادق اولاد محمدرضا** دانشجوی رشته **زیست شناسی دریا** در مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

تقدیم به:

پدر بزرگوار و مادر عزیزم

که موفقیتهایم مرهون دعای خیر، شکیبایی و فداکاری آنهاست.

و تقدیم به همه دانشجویان و دانش پژوهان

تقدیر و تشکر

ستایش و سپاس مختص خداوند رحمان است که به بشر عقل عطا فرموده و علم را فرا راهش قرار داده تا به کمک عقل، راه معرفت و کمال در پیش گرفته و برتری خود را بر دیگر مخلوقات مسجل سازد تا بدین ترتیب به مقام شامخ خلیفه الهی نائل گردد. او را سپاس می گویم که مرا در ابتدای این راه قرار داده و توان گذر از فراز و نشیب آن را به من عنایت فرمود. شکر نعمتهای خداوند وقتی کامل می شود که شکر خدمتهای بندگانش به جا آورده شود. بر این اساس خود را موظف می دانم تا از زحمات و مساعدتهای کلیه کسانی که مرا در انجام موفقیت آمیز این تحقیق یاری نمودند به ویژه از افراد ذیل صمیمانه سپاسگزاری می نمایم:

– از اساتید محترم راهنما و مشاور آقایان دکتر صابر خدابنده و دکتر عبدالمحمد عابدیان کناری به خاطر راهنماییهای راه گشا و بسیار ارزنده آنها.

– از مدیر کل محترم حفاظت محیط زیست استان خوزستان جناب آقای مهندس هرمز محمودی راد.

– از مسؤولین محترم مؤسسه تحقیقات شیلات و مرکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی شهید باهنر کلاردشت.

– همچنین از آقای مهندس نعمت الله محمودی تشکر ویژه می نمایم.

– از مسؤولین و کارکنان صدیق دانشکدهٔ منابع طبیعی و علوم دریایی نور که همکاریهای صمیمانه شان راهگشای تحصیل و تحقیق بوده است.

چکیده

جهت بررسی اثرات نوکلئوتید جیره بر ساختار ساکهای پیلوریک و قابلیت تنظیم اسمزی، مکمل غذایی نوکلئوتید در تیمارهای ۰/۲۵٪، ۰/۵٪ و تیمار شاهد (۰٪) به مدت ۸ هفته به بچه آزاد ماهی خزر تغذیه گردید. آزمایش درون مخازن ۳۰۰ لیتری آب شیرین با تراکم ذخیره سازی ۳۵ قطعه بچه ماهی انجام شد. برای مطالعه تغییرات ساختاری ساکهای پیلوریک، در پایان دوره پرورش از هر تیمار ۶ قطعه ماهی در بوئن فیکس و پس از طی مراحل قالب گیری برشهای ۴ میکرومتری از آنها تهیه و سپس با هماتوکسیلین–ائوزین رنگ آمیزی و مطالعه شدند. نتایج بررسی بافت شناسی نشان داد که هر دو غلظت نوکلئوتید جیره بطور معنی داری ($p <$ ۰/۰۵)، ضخامت لایه پوششی، طول پرزها، تعداد سلولهای پوششی (انتروسیت) و ضخامت لایه عضلانی ساکهای پیلوریک را افزایش می دهد. بین دو تیمار نوکلئوتید تغییرات لایه پوششی و زیر موکوسی، طول و تعداد پرزها معنی دار نبود ($p >$ ۰/۰۵)، در حالیکه غلظت ۰/۲۵٪ اثرات مثبت بیشتری روی تعداد سلولهای انتروسیت و ضخامت لایه عضلانی نسبت به غلظت ۰/۵٪ نشان داد. جهت بررسی قابلیت تنظیم اسمزی، در پایان هفته هشتم تعداد ۱۲ قطعه بچه ماهی از هر تیمار با میانگین وزن ۲۶ گرم به شوری ۱۸ گرم در لیتر معرفی گردیدند. پس از ۷۲ ساعت جهت بررسی حضور و میزان فعالیت ایمنیایی آنزیم Na^+,K^+-ATPase از هر تیمار تعداد ۴ قطعه ماهی صید و بلافاصله در محلول بوئن به مدت ۲۴ ساعت فیکس گردید، و در ادامه مراحل قالب گیری و برش انجام شد. مکان یابی ایمنیایی آنزیم Na^+,K^+-ATPase نشان داد که این آنزیم در انترسیت های ساکهای پیلوریک حضور داشته و میزان این آنزیم در نمونه های جیرهٔ غذایی نوکلئوتید ۰/۵٪ افزایش معنی داری ($p <$ ۰/۰۵) نسبت به تیمار صفر و تیمار ۰/۲۵ درصد داشته است. حضور قابل توجه این آنزیم در ساکهای پیلوریک آزاد ماهی خزر دلالت بر نقش تنظیم اسمزی این ساک ها داشته و تفاوت حضور آن در تیمارهای مختلف نوکلئوتید نشان می دهد که این ماده افزودنی می تواند با افزایش توان تنظیم یونی بچه ماهیان، نقش مهمی در سازش آنها به شوری ۱۸ گرم در لیتر داشته باشد.

واژگان کلیدی: نوکلئوتید، ساک پیلوریک، تنظیم اسمزی، آزاد ماهی دریای خزر، *Salmo trutta caspius*، Na^+,K^+-ATPase

فهرست مطالب

	عنوان	صفحه
	فهرست مطالب	i
	فهرست جدول	iii
	فهرست شکل ها	iii
	فهرست نمودارها	iv
	چکیده فارسی	v
	فصل اول	
۱	مقدمه و کلیات	
۱-۱	**مقدمه**	۱
۱-۱-۱	سوالات مطرح شده در این تحقیق	۴
۱-۱-۲	جنبه جدید بودن و نوآوری	۴
۱-۱-۳	فرضیه‌ها / پیش فرض‌ها	۵
۱-۲	**کلیات**	۶
		۱۳
	فصل دوم	
۲	**سابقه تحقیق**	۱۱
۲-۱	تحقیقات صورت گرفته در خارج از ایران	۱۵
۲-۱-۱	اثرات افزودنی غذایی نوکلئوتید بر دستگاه گوارش	۱۵
۲-۱-۲	اثرات افزودنی غذایی نوکلئوتید بر تنظیم اسمزی	۱۵
۲-۲	تحقیقات صورت گرفته در ایران	۱۷
	فصل سوم	
۳	**مواد و روش ها**	
۳-۱	مواد و وسایل	۱۹
۳-۱-۱	مواد مصرفی	۱۹
۳-۱-۲	مواد غیر مصرفی	۱۹
۳-۲	روشها	۲۰
۳-۲-۱	ماهی ها، سازگاری و تثبیت نمونه ها	۲۰
۳-۲-۲	تغذیه ماهیان	۲۱
۳-۲-۳	بافت شناسی	۲۴

۳-۲-۴ ایمونوهیستوشیمی ۲۵
۳-۲-۵ Intensity آنزیم Na^+,K^+-ATPase ۲۶
۳-۲-۶ میکروسکوپ الکترونی نگاره ۲۶
۳-۲-۷ تجزیه و تحلیل آماری داده ها ۲۷

فصل چهارم

۴ **نتایج** ۲۸
۴-۱ ماندگاری بچه ماهیان در شوریهای مختلف ۲۸
۴-۲ مطالعات بافت شناسی ۲۹
۴-۲-۱ موقعیت ساکهای پیلوریک و ساختار بافتی آنها ۲۹
۴-۲-۲ اثر نوکلئوتید بر لایه پوششی ۲۹
۴-۲-۳ اثر نوکلئوتید بر تعداد سلولهای پوششی در هر مقطع عرضی ۳۰
۴-۲-۴ اثر نوکلئوتید بر لایه عضلانی و زیر موکوس ۳۱
۴-۲-۵ اثر نوکلئوتید بر طول پرزها ۳۱
۴-۲-۶ اثر نوکلئوتید بر مساحت فضای داخلی ۳۲
۴-۳ مطالعات ایمنوهیستوشیمی ۳۳
۴-۴ نتایج مطالعات فراساختار ۳۴

فصل پنجم

۵ **بحث و نتیجه گیری**
۵-۱ تأثیرات افزودنی غذایی نوکلئوتید در مقاومت به شوری ۴۳
۵-۲ تأثیرات بافتی نوکلئوتید ۴۳
۵-۳ تأثیرات نوکلئوتید در شرایط استرس زا (تنظیم اسمزی) ۴۷
۵-۴ نتیجه گیری کلی ۵۰
پیشنهادات پژوهشی ۵۱
منابع ۵۳
چکیده انگلیسی

فهرست جداول

	عنوان	صفحه
۳-۱	تجزیه تقریبی جیره پایه مورد استفاده برای تغذیه بچه ماهیان آزاد دریای خزر	۲۲
۳-۲	ترکیب جیره ساخته شده برای بچه ماهیان آزاد دریای خزر در تیمارهای مختلف	۲۳
۴-۱	میزان بقاء تیمارهای بچه ماهیان آزاد دریای خزر در شوری های مختلف ساخته شده از نمک دریاچه ارومیه	۲۸

فهرست نمودارها

	عنوان	صفحه
۴-۱	میانگین مساحت لایه پوششی (mm^2) در مقطع عرضی (۶۰ برش ساک های پیلوریک) از هر تیمار بر اساس درصد نوکلئوتید اضافه شده به جیرهٔ کنترل	۳۰
۴-۲	میانگین تعداد سلول پوششی در مقطع عرضی (۶۰ برش بررسی شده) از هر تیمار بر اساس درصد نوکلئوتید اضافه شده به جیرهٔ کنترل	۳۰
۴-۳	مساحت زیر موکوس و لایه عضلانی (mm^2) در مقطع عرضی (۶۰ برش بررسی شده) بر اساس درصد نوکلئوتید اضافه شده به جیرهٔ کنترل	۳۱
۴-۴	میانگین طول پرز در مقطع عرضی ۶۰ برش بررسی شده از هر تیمار بر حسب mm، بر اساس درصد نوکلئوتید اضافه شده به جیرهٔ کنترل	۳۲
۴-۵	مساحت فضای داخلی در مقطع عرضی (۶۰ برش بررسی شده) از هر تیمار بر حسب mm^2 بر اساس درصد نوکلئوتید اضافه شده به جیرهٔ کنترل	۳۳

فهرست شکل ها

	عنوان	صفحه
۱-۱	مکانیسم تنظیم اسمزی در ماهیان آب شور و شیرین	۷
۱-۲	مراحل فعالیت آنزیم Na^+-K^+-ATPase در ماهیان	۹
۱-۳	مدل سلولی مکانسیم انتقال یون در سلول های روده ماهیان دریایی و آب شیرین	۱۰
۴	موقعیت و بخشهای مختلف بافت ساکهای پیلوریک در بچه ماهی آزاد خزر	۳۵
۵	بافت شناسی مقطع عرضی ساکهای پیلوریک بچه آزاد ماهی دریای خزر در تیمار شاهد (صفر درصد نوکلئوتید)	۳۶
۶	بافت شناسی مقطع عرضی ساکهای پیلوریک بچه آزاد ماهی دریای خزر در تیمار ۰/۲۵ درصد نوکلئوتید جیره	۳۷
۷	بافت شناسی مقطع عرضی ساکهای پیلوریک بچه آزاد ماهی دریای خزر در تیمار ۰/۵ درصد نوکلئوتید جیره	۳۸
۸	مکان یابی ایمنیایی آنزیم Na^+,K^+-ATPase در ساکهای پیلوریک بچه آزاد ماهی دریای خزر در تیمار شاهد	۳۹
۹	مکان یابی ایمنیایی آنزیم Na^+,K^+-ATPase در ساکهای پیلوریک بچه آزاد ماهی دریای خزر در تیمار ۰/۲۵ درصد نوکلئوتید	۴۰
۱۰	مکان یابی ایمنیایی آنزیم Na^+,K^+-ATPase در ساکهای پیلوریک بچه آزاد ماهی دریای خزر در تیمار ۰/۵ درصد نوکلئوتید	۴۱
۱۱	تصاویر میکروسکوپ الکترونی ساکهای پیلوریک بچه آزاد ماهی دریای خزر (به روش نگاره)	۴۲

فصل اوّل:

مقدمه و کلیّات

۱-۱مقدمه

آزاد ماهیان (Salmonidae) خانواده کوچکی از ماهیان هستند که از نظر رفتاری و شکلی شباهت زیادی با همدیگر دارند. در آزاد ماهیان گروهی تمام دوره زندگی خود را درآب شیرین می گذرانند، اما گروه دیگر از دریا به آب شیرین مهاجرت می کنند. در بین این خانواده هیچ گونه ای وجود ندارد که کاملاً دریایی باشد، آنهایی که مهاجرت دارند تا زمانی که توانایی مهاجرت را بدست آورند در آب شیرین اند سپس به مصب رفته و در نهایت به دریا می روند و در پایان جهت تخمریزی از آب دریا به آب شیرین مهاجرت می کنند (Rankin و Jenson، ۱۹۹۳).

ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) با اسامی انگلیسی Caspian trout; Caspian salmon; Caspian brown trout یکی از ۹ زیرگونه قزل آلای قهوه ای[1] (*Salmo trutta*) در جهان است. این زیرگونه در بین زیرگونه های قزل آلای قهوه ای دارای بزرگترین اندازه و وزن بوده و از جمله ماهیان بومی و مهاجر (آنادرموس) دریای خزر می باشد که از ارزش غذایی و اقتصادی ویژه ای برخوردار است. این ماهی بطور عمده در جنوب دریای خزر در سواحل ایران وجود دارد.

با توجه به آلودگی دریاها و منابع آبی، از بین رفتن زیستگاهها و مناطق تخمریزی، موانع موجود بر سر راه مهاجرت به هنگام تخمریزی از دریا به رودخانه ها، بقای نسل برخی گونه های آبزی نظیر ماهی آزاد دریای خزر به خطر افتاده است (Kiabi و همکاران، 1999)، لذا به منظور بازسازی ذخایر ماهی آزاد دریای خزر، تکثیر و پرورش مصنوعی آن انجام شده و بچه ماهیان پس از گذراندن دوران پر خطر اولیه در رودخانه های منتهی به دریا رهاسازی می شوند. طی سالهای

[1] -. سایر زیرگونه های قزل آلای قهوه ای عبارتند از: *Salmo trutta trutta, S.t.fario, S.t.labrax, S.t.carpio, S.t.lacustris, S.t.macrostigma, S.t.lentica, S.t.marmoratus*.

۱۳۷۰ تا ۱۳۸۰ تعداد ۵۰۶۰۰۰۰ قطعه بچه ماهی آزاد دریای خزر رهاسازی شده و در همین مدت ۳۵/۸ تن ماهی آزاد صید شده است که با احتساب ۴۰ درصد صید قاچاق و ثبت نشده و نیز صید مولدین، کل میزان صید این ماهی به ۵۰/۱۲ تن می رسد که با در نظر گرفتن وزن متوسط ۲/۵ کیلوگرم، ضریب بقاء این ماهیان ۰/۴ درصد محاسبه گردید (صیاد بورانی، ۱۳۸۵). از طرف دیگر اخیراً در ایران پرورش ماهی آزاد دریای خزر در قفس ها و کانال های بتونی بسیار مورد توجه قرار گرفته است.

یکی از فاکتورهای مهم در امر پرورش، شوری آب می باشد که نقش مهمی در تنظیم اسمزی دارد. در بسیاری از ماهیان آب شور، آبششها، مثانه و روده همکاری زیادی جهت تنظیم یون و مایعات بدن دارند (Eldon، ۲۰۰۳). انتقال از آب شیرین به آب شور یا لب شور در سیکل زندگی سالمونیده ها یک دوره بسیار مهم و بحرانی است که در ماهی تغییرات اساسی در رفتار، فیزیولوژی و مرفولوژی ایجاد خواهد کرد (Evans، ۲۰۰۲). این روند در طبیعت در آزاد ماهیان وحشی با یکسری تغییرات محیطی همراه است که این انطباق و هماهنگی (طبیعت و تغییرات ماهی) در شرایط پرورشی وجود ندارد. از این رو ماهیان پرورشی در هنگام انتقال به آب شور میزان ظرفیت کمتری در هماهنگی با شرایط جدید دارند. به همین خاطر امروزه اکثر تحقیقات روی بهبود عوامل مؤثر بر فرآیند تنظیم اسمزی و ظرفیت انتقال یون، از جمله تغییر شرایط محیط پرورشی، تغییرات ژنتیکی و تغذیه مناسب و استفاده از ترکیبات حمایت کننده از پروسه تنظیم اسمزی شبیه بتائین، فین استیم، نمک، ویتامین ها و نوکلئوتید ها متمرکز شده است (Burrells و همکاران، ۲۰۰۱b; Castro، ۱۹۹۸).

اخیراً استفاده از نوکلئوتید در جیره غذایی به دلیل اثرات مثبت بیولوژیک متعدد آن، افزایش یافته است. از آنجائیکه یکی از عمده دلایل تلفات بچه ماهیان پرورشی موقع رهاسازی به دریا

قابلیت و توانایی کم آنها در سازگاری به شوری آب دریا می باشد، لذا بر آن شدیم تا سازگاری زودتر از موعد این ماهی را با شوریهای مختلف آب از طریق مطالعه اثرات نوکلئوتید جیره بر ساختار و نقش تنظیم اسمزی روده (ساک های پیلوریک)، مورد بررسی قرار داده، تا در صورت امکان اطلاعات و راهکارهایی جهت پرورش این گونه با ارزش بومی دریای خزر در منابع گوناگون آبهای لب شور داشته باشیم. نتایج این تحقیق به عنوان یک مطالعه بنیادی و پایه، برای انجام مطالعات تکمیلی و کاربردی از طریق مراکز علمی، دانشگاهی و تحقیقاتی مؤثر خواهد بود.

لذا با توجه به اثرات بسیار متنوع نوکلئوتید جیره غذایی بر سیستم فیزیولوژیک بدن موجودات و مشکلات ذکر شده در مورد ماهی آزاد دریای خزر، درک برخی از این اثرات نوکلئوتید جیره بر روی گونه مذکور و ایجاد ارتباط منطقی بین این تغییرات و سطوح متفاوت نوکلئوتید در جیره می تواند در بسیاری از مراحل پرورش این گونه که گونه ای در معرض خطر انقراض محسوب می گردد کمک شایان توجهی نماید. با توجه به ناشناخته های موجود، اهدافی به شرح زیر در این مطالعه مدنظر قرار گرفت تا با انجام این تحقیق بتوان به جواب سوالات زیر دست یافت.

۱-۱-۱ سوالات مطرح شده در این تحقیق

۱- آیا بچه ماهیان آزاد خزر در پایان دوره پرورش و با میانگین وزن ۳۰ – ۲۵ گرم قادر به تحمل شوری های ۱۵، ۱۸ و ۲۰ گرم در لیتر (مطابق شوری استخرهای ساحلی دریاچه ارومیه)، هستند؟

۲- آیا با تیمار مکمل غذایی نوکلئوتید می توان قدرت سازش این ماهیان را به شوریهای بالاتر افزایش داد؟

۳- از بین درصدهای متفاوت نوکلئوتید (۰، ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد)، چه درصدی از نوکلئوتید جیره بیشترین اثر مثبت را روی تحمل شوری بچه ماهیان دارد؟

۴- افزودن مکمل غذایی نوکلئوتید چه تأثیری بر ساختار، فراساختار و اپیتلیال روده (ساک های پیلوریک) دارد؟

۵- نوکلئوتید جیره چه تأثیری روی پراکنش و میزان حضور آنزیم Na^{+},K^{+}-ATPase در ساک های پیلوریک بچه ماهیان دارد؟

۱-۱-۲ جنبه جدید بودن و نوآوری

اگرچه در سه دهه اخیر مطالعاتی بر روی اثرات افزودنی غذایی نوکلئوتید بر آبزیان انجام شده، ولی بطور اختصاصی مطالعه ی اثرات آن بر ساختار، فراساختار و نقش تنظیم اسمزی روده (ساک های پیلوریک) در بچه ماهی آزاد خزر مورد بررسی قرار نگرفته است. با توجه به اثرات مثبت نوکلئوتید در شرایط استرس زا و با توجه به اینکه یکی از عوامل مرگ و میر بچه ماهیان آزاد خزر در موقع معرفی به آب خزر یا شوریهای دیگر قابلیت کم آنها در سازگاری به شوری می باشد، لذا ضرورت انجام این تحقیق بیش از پیش نمایان می گردد.

۱-۱-۳ فرضیه‌ها / پیش فرض‌ها

۱- بچه ماهیان آزاد خزر قابلیت تحمل شوری ۱۵ گرم در لیتر ساخته شده با نمک دریاچه ارومیه را دارند.

۲- در مقایسه با تیمار شاهد، حضور نوکلئوتید جیره قادر به افزایش توان تنظیم اسمزی بچه ماهیان آزاد ماهی بوده و درصد مرگ و میر در شوریهای ۱۵، ۱۸ و ۲۰ را به طور معنی داری کاهش می دهد.

۳- میزان افزایش مقاومت در برابر شوری در تیمار ۰/۵ درصد نوکلئوتید جیره بطور معنی داری بیشتر از تیمار ۰/۲۵ درصد می باشد.

٤- نوکلئوتید جیره قادر است با اثر روی ساختار و فراساختار ساک های پیلوریک روده، توان تبادلات یونی و در نتیجه تنظیم اسمزی بچه آزاد ماهیان را افزایش دهد.

۵- نوکلئوتید جیره به میزان ۰/۵ درصد بیشترین افزایش را در پـراکنش و میـزان حـضور آنـزیم Na^{+},K^{+}-ATPase دارد.

در نهایت این مطالعه با اثبات یا رد فرضیه های فوق در پی ارائه راهکار های مناسب علمی و مستدل در تغذیه بچه ماهی آزاد دریای خزر با اهداف اشاره شده می باشد.

۱-۲ کلیات

افزایش توجه جهانی به افزودن نوکلئوتید ها در جیره ماهیان، بوسیله گزارش های Burrells و همکاران (۲۰۰۱)، بوجود آمد که با گزارش این محققین تحقیقات در این زمینه شکل تازه ای به خود گرفت (Li و Gatlin، ۲۰۰۶). از این هنگام به بعد بود که تحقیقات در ارتباط با اثرات متنوع نوکلئوتید ها در زمینه های مختلف بر ماهیان گسترده تر شد. در این تحقیقات محدود، به طور خیلی مختصر به تأثیرات مثبت افزودنی غذایی نوکلئوتید در بهبود وضعیت تنظیم اسمزی اشاره شده است (Burrells و همکاران، 2001b). نوکلئوتیدها در گذشته به دلیل عدم مشاهده علائم نقص یا کمبود آنها، به عنوان ماده مغذی غیر ضروری در نظر گرفته می شدند. اما اکنون مشخص شده که بعضی از سلول ها ظرفیت بسیار محدودی برای سنتز نوکلئوتید ها دارند. در این سلولها تهیه نوکلئوتید از منبع خارجی برای انجام وظایف نرمال آنها بسیار مهم است (Boza، ۱۹۹۸؛ Li و همکاران، ۲۰۰۴). با وجود اینکه تلاش های اولیه در ارزیابی نقش نوکلئوتید در جیره ماهیان به

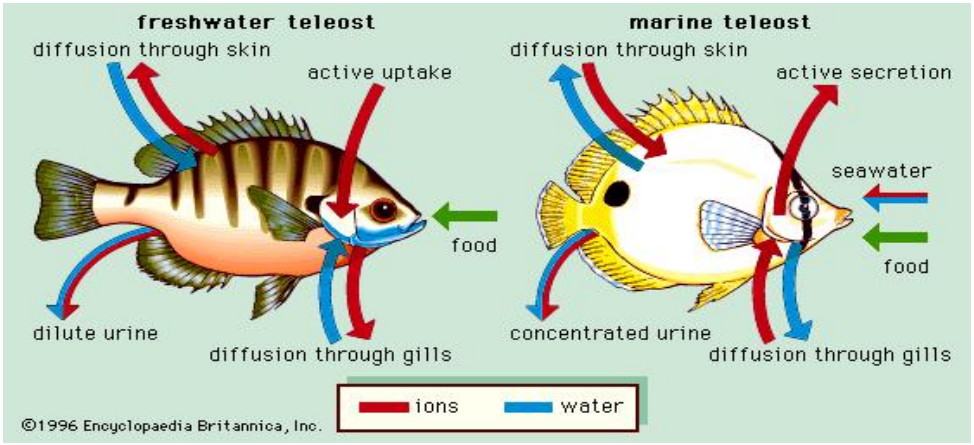
اوایل دهه ۱۹۷۰ برمی گردد ولی تحقیقات آن زمان اغلب روی اثرات احتمالی این مواد به عنوان جاذب های شیمیایی تأکید داشت.

تنظیم اسمزی، مکانیسم حفظ هموستازی مایعات درونی بدن است که مسئول حفظ کنترل اسمولاریته و یا فشار اسمزی پلاسما می باشد. حفظ اسمولاریته نسبی بالا و پایین پلاسما نسبت به محیط به ترتیب، hyperosmoregulation و hypoosmoregulation نامیده می شود. ماهیان در هنگام مواجه با تغییرات اسمزی مایعات خارج سلولی از سه استراتژی کلی استفاده می کنند:

۱- استراتژی تطبیق دهندگی اسمزی (اسموکانفورمر): ماهیانی که اسمولالیته مایعات خارج سلولی خود را با اسمولالیته محیط برابر می کنند.

۲- استراتژی تنظیم اسمزی در آب شیرین (هایپراسمورگولیشن): ماهیانی که ترکیب مایعات بدن را در سطحی بالاتر از محیط (رقیق) تنظیم می کنند.

۳- استراتژی تنظیم اسمزی در دریا (هیپواسمورگولیشن): ماهیانی که ترکیب مایعات بدن را پایین تر از آب دریا تنظیم می کنند (Marshall و Grosell، ۲۰۰۵)، (شکل ۱-۱).

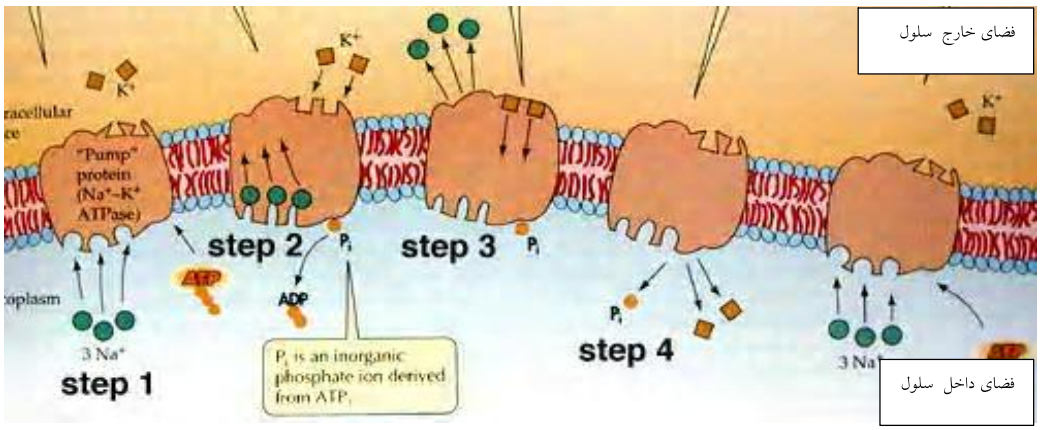


شکل ۱-۱ ، مکانیسم تنظیم اسمزی در ماهیان آب شور و شیرین www.junior.britannica.com

ماهیان تنظیم کننده اسمزی از لحاظ دامنه تحمل شوری آب به دو دسته قابل تقسیم هستند: ماهیان یوری هالین که توانایی زندگی در آب شور و شیرین را دارند، از جمله آنها می توان به خانواده آزاد ماهیان اشاره نمود و ماهیان استنوهالین که فقط در آب شیرین یا شور زندگی کرده و تحمل تغییرات شوری آب را ندارند (Beyenbach، ۱۹۸۲). اندام های تنظیم اسمزی شامل آبشش، روده و کلیه در ماهیان استخوانی یوری هالین در نگهداری هموستازی بدن نقش دارند و با توجه به شوری محیطی نقش های مختلفی دارند (McCormick و Saunders، ۱۹۸۷). مجرای گوارشی دارای یک نقش حیاتی در تنظیم آب و وضعیت الکترولیتها در ماهی می باشد (Linoetto و همکاران، ۲۰۰۱). در آزاد ماهیان، دستگاه گوارش محل هضم و جذب غذا، تنظیم یون و تعادل آب و همچنین سدی در مقابل هجوم عوامل بیماریزا می باشد (Jutfelt و همکاران، ۲۰۰۷).

ساکهای پیلوریک ماهیان در قسمت ابتدایی روده بلافاصله بعد از اسفنکتر پیلوریک واقع شده اند که تنوع زیادی از نظر اندازه، شکل و تعداد (۱ تا ۱۰۰۰ عدد) دارا بوده و در تعداد اندکی از ماهیان استخوانی دیده میشوند (Karasov و Hume، ۱۹۹۷)، که یکی از عمده محلهای جذب مواد غذایی و یون می باشند (Collie، ۱۹۸۵; Buddington و Diamond، ۱۹۸۷; Loretz و Pollina، ۲۰۰۰)، همچنین نوعی استراتژی تکاملی برای افزایش سطح جذب روده بدون افزایش طول یا ضخامت خود روده محسوب می گردند (Buddington و Diamond، ۱۹۸۷; Wilson و همکاران، ۱۹۹۶; Veillette، ۲۰۰۵). جابجایی یونها به کمک آنزیم های مختلفی انجام می شود که مهم ترین آنها آنزیم Na^+,K^+-ATPase است (Varsamos و همکاران، ۲۰۰۵). پمپ سدیم-پتاسیم نقش مهمی در تنظیم یونی سلولهای بدن دارد. این پمپ دارای آنزیمی معروف به Na^+,K^+-ATPase می باشد. که نقشی محوری در جابجایی یون ها در سلول های یونوسیت ایفا می کند (Shikano و Fujio، ۱۹۹۸). این آنزیم در غشای پایه ای- جانبی تمامی سلول های بدن وجود دارد ولی میزان آن در

سلول هایی کـه نقـش اساسـی در تنظـیم یـون دارنـد بطـور قابـل ملاحظـه ای بیـشتر مـی باشـد (Khodabandeh و همکاران، 2005a; Khodabandeh و همکاران، 2006). این آنـزیم کـه از دو زیر واحد α و β تشکیل شده، انرژی لازم برای ترشح و جذب یون از غشاهای اپیتلیـالی را توسـط جابجایی ۳ یون سدیم با ۲ یون پتاسیم بر خلاف شیب الکتروشیمیایی شان و به ازای هیدرولیز هـر مولکـــول ATP فـــراهم مـــی کنـــد (Hirose و همکـــاران، ۲۰۰۳)، (شـــکل ۱-۲).



شکل ۱-۲ مراحل فعالیت آنزیم Na^{+}-K^{+}-ATPase در ماهیان (www.academic.broolyn.Cuny.edu).

علاوه بر این آنزیم، انتقال دهنده های یونی و کانال های یونی مرتبط با پروتئین های انتقـال دهنـده غشایی نیز که در غشاء های قاعده ای- جانبی یا رأسی یونوسیت ها جای گرفتـه انـد در تبـادلات یونی نقش دارند (Varsamos و همکاران، ۲۰۰۵)، (شکل۱-۳).