Archive of SID

بررسی هیستولوژیک و هیستوشیمیایی لوله گوارش (روده و معده) ماهی قره برون (*Acipenser persicus*) در بازه زمانی ۲ هفته پس از تخم گشایی (Hatching)

خیاط زاده ج[۱]،خوش نگاه ث [۲]، فاطمی ف [۲]، سعادت فر ز[۳]،شاهسونی د[۳]

۱-استادیار گروه زیست‌سناسی ،دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد مشهد۲-کارشناس ارشد زیست‌شناسی ،دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد مشهد ۳-دانشیار دانشکده دامپزشکی ،دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

ماهی خاویاری قره برون(Acipenser.persicus)بعنوان گونه بومی حوضه جنوبی دریای خزر و دارا بودن بالاترین میزان صید و بهره برداری دارای اهمیت شیلاتی بسیاربوده،لذا مطالعه تغییرات هیستولوژیکی و هیستوشیمیایی دستگاه گوارش به منظور بکارگیری روشهایی در جهت تکثیر و پرورش این ماهیان مفید خواهدبود،چرا که با تعیین زمان تغذیه مناسب این ماهی پس از آگاهی از زمان آغاز رشد و نمو لوله گوارش می توان تا حدودی ازاثرات مواد توکسیک بر جنین ولارو آنها جلوگیری کرد و با کمترین هزینه و کوتاهترین زمان بیشترین محصول رابا ارزش اقتصادی بالاتر تولید نمود.

روش کار: در این مطالعه جنین ماهی قره برون در محدوده سنی ۱۴-۱ روزپس از تخم گشائی (1-14dph) انتخاب و سپس مطالعات هیستولوژیک و هیستوشیمیایی با استفاده از روش های H-E ، PAS ، آلسین بلو pH 2/5 و pH 1 به منظور مشاهده فرایند جذب کیسه زرده و تغییرات سیستم هضمی انجام شد .

نتایج و بحث : لوله گوارش ماهیان در ابتدا دارای ساختارساده ای است و توسط مواد زرده ای پر شده است. **معده،** در روز هفتم پس از تخم گشائی، شامل دو بخش غده ای و غیر غده ای ، شکل می گیرد.در این تحقیق، با افزایش سن ، حجم معده زیاد شده، بخش غده ای نسبت به PAS واکنش مثبت و نسبت به آلسین بلو دارای واکنش منفی بود. بافت اپی تلیوم معده در روز ۱۴دارای سلولهای استوانه ای شکل بود که احتمالا بدلیل حضور مواد موکوسی، به شدت با PAS واکنش مثبت داشتند. **روده،** از روز اول بعد از تخم گشایی بااپی تلیومی استوانه ای قابل تشخیص بود. ذرات ملانین درروده از روز ۱۲ بعد از تخم گشایی حذف شدند. سلولهای گابلت در میان سلولهای استوانه ای ،احتمالا بدلیل حضور ترکیبات موکوپپی ساکاریدی مختلف ،در رنگ آمیزی با PAS وآلسین بلو واکنش مثبت و شدید داشتند

واژگان‌کلیدی: قره برون، دستگاه گوارش، معده ،روده، هیستوشیمیایی

مجله زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد

گرمسار،۱۳۸۸، دوره٤، شماره۱، ۳۱ – ۲۱

Histological and histochemical study of digestive tube in Acipencer persicus larvae until 2weeks post hatching

Khayatzadeh J [1],Khoshnegah S [2],Fatemi F[2] ,Shahsavsn D[3] ,Saadatfar Z[3]

1-Department of Biology, Sciences Faculty, Islamic Azad University, Mashhad Branch, 2- MS of biology ,Islamic Azad University, Mashhad Branch 3-Associate Professor, Veterinary faculty, Ferdowsi University.

Abstract

Acipenser persicus is ponto–caspian endemic species and primarily in the eastern of the south caspian. *Acipenser persicus* has become the most popular sturgeon in aquaculture due to its good rearing characteristics so the histopathologic and histochemical study of gastrointestinal tract in order to use some methods for proper feeding and prevating of toxic materials on larva, can be used to produce more valuable product with much lower cost in a short time.

Methods and material: This study was carried out on *Acipenser persicus* at the age of 1-14 days post hatching (dph). Histochemical and histological studies for observation of yolk sac resorption process, and the changes of digestive system were done d with HE, (PAS) and alsian blue (AB) pH2.5 pH1 staining .

Result and Discussion: In fishes digestive tube is undifferentiated simple tube and filled with yolk platelets. On 7dph, stomach differentiate into glandular and non glandular portion. In this study, stomach increased in size and the glandular portion had positive PAS and negative AB reaction .The stomach of 14 day old larvae shows the columnar epithelium cells that probably the presence of mucous substances stained strongly with PAS.

The intestine was identified with a layer of columnar epithelial cells on day 1 after hatching . The melanin plug was disappeard from the lumen of the spiral intestine on day 12. Goblet cells were interspersed among the columnar epithelial cells. Because of mucosubstances presence in goblet cells thay had very strongly reaction with PAS and AB staining.

Keyword; Acipenser persicus , stomach , intestine , histochemistry

مجله زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد

گرمسار،۱۳۸۸، دوره٤، شماره۱، ۳۱ – ۲۱

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ماهیان خاویاری دریای خزر و جایگاه تاس ماهی ایرانی یا قره برون بعنوان گونه بومی حوضه جنوب دریای خزر و دارا بودن بالاترین میزان صید و بهره برداری ,دارای اهمیت است و لذا پرورش لارو این ماهی از نقطه نظر تجاری بسیار با اهمیت است (۱). رشد و نمو سیستم گوارش ماهی نقش زیادی را در سازمان بندی مورفولوژیک اندامها در طی دوران تغذیه بازی می کند .از آنجا که تغییرات رشد ونموی سیستم گوارشی به فرایند جذب غذا مربوط می شود ، آگاهی از زمان دقیق آغاز عملکرد لوله گوارش از نظر اقتصادی برای پرورش دهندگان ماهی اهمیت زیادی دارد (۱۲). بر خلاف ماهیان استخوانی teleost ،ماهیان خاویاری sturgeonهولوبلاست بوده و زرده داخل جنینی بطور مستقیم در تشکیل سیستم گوارش ماهی شرکت دارد. به عبارت دیگر دستگاه گوارش در sturgeon بی نظیر است که این بدلیل حضور یک روده مارپیچی ، موکوسی و معده مژه دار است که در سراسر زندگی موجود باقی می ماند . وقتی لارو این ماهی شروع به تغذیه خارجی می کند دارای یک سیستم گوارشی کامل آناتومیکی است و آنزیمهای کاملی دارد که مشابه ماهیان جوان بالغ است (۸).

اهمیت آنزیمها در فرایند هضم با استفاده از روشهای هیستوشیمیایی در لاروهای teleost بطور واضح ثابت شده است (۸) و یافته ها در مورد تغییرات هیستولوژیکی دستگاه گوارش در بیشتر ماهیان خاویاری (sturgeon) به یکدیگر شبیه است (٤). لذا در مطالعه ما، شروع فعالیت لوله گوارش با روشهای هیستوشیمیایی مورد توجه قرار گرفت چرا که لازمه شناخت عملکرد سیستم گوارشی ماهی است (۱۲). امید است مطالعات هیستولوژیکی و هیستوشیمیایی برای مشاهده فرایند جذب کیسه زرده و تغییر در سیستم گوارشی برای تعیین زمان شروع تغذیه خارجی ماهی و جزئیات زمان های بحرانی زندگی لارو شرایط مناسب تر پرورش و تکثیر این ماهیان را فراهم کند (۱۳).

روش کار

زمان جفت گیری و تخم ریزی درمولدین مورد نظر ما اوایل فروردین ماه می باشد و در نتیجه نمونه گیری جهت شروع پروژه از اواسط فروردین ماه آغاز شد. به این منظور ماهیان بالغ (نر و ماده) از اواخر اسفند تا اوایل فروردین از رودخانه سفید رود صید شدند، درون استخرهای مدور سیمانی به طور جداگانه نگهداری و سپس مورد هورمون تراپی قرار گرفتند و پس از تخم ریزی، تخمک ها و اسپرم ها در محیط آب لقاح یافتند ، تخم های ایجاد شده به داخل انکوباتورهای خاص با دمای مناسب که مرتبا آب با فشار از روی تخم ها عبور می کرد، منتقل شدند. این انکوباتورها شرایط موجود در رودخانه را برای رسیدگی تخم ها ایجاد می کند. چهار تا پنج روز بعد از لقاح، لاروها از تخم خارج می شوند(تخم گشایی=hatching). سپس لاروها ی خارج شده ازتخم رابه داخل تشتک های مدوری به نام ونیرو(Veniro)انتقال دادیم. جنین های ماهی قره برون در هفته اول پس ازhatch هر روز و تا روز١٤ پس از hatch (14dph) هر ۲ روز یک بار از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی در نزدیکی شهرستان گرگان از درون تشتک های تکثیر به نام ونیرو جمع آوری شدند(تعداد ۵-۱۰ قطعه در هر مرحله) و درون محلول فرمالین ۱۰ درصد فیکس شده، به آزمایشگاه منتقل شدند . پس از آبگیری ، از کلروفرم در برخی از نمونه ها و از زایلن در برخی دیگر نمونه ها به عنوان شفاف کننده استفاده شد. برش هایی به ضخامت ۷ میکرون تهیه و رنگ آمیزی هماتوکسیلن-ائوزین و نیز رنگ آمیزی اختصاصی آلسین بلو (pH1،pH2.5) و PAS(پریودیک اسید) به منظور تشخیص ترکیبات قندی اسیدی (اسیدهای کربوکسیله و سولفاته) و خنثی صورت گرفت (۳،۱).

نتایج

لارو تاس ماهی ایران چند روز اول بعد از hatch دارای دستگاه گوارش ساده ای بوده ، در اطراف کیسه زرده یک لایه سروزی وجود دارد که دارای سلولهای

www.SID.ir

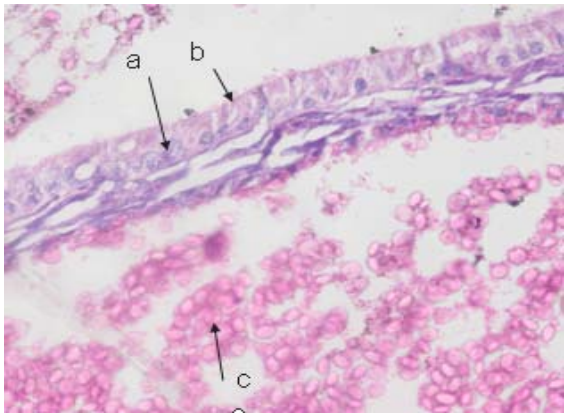
Archive of SID

سنگفرشی است این لایه سروزی از سمت خارج با یک لایه سلول مکعبی در تماس است (تصویر شماره ۱). حضور معده اولیه در روز ٤ پس از تخم گشایی (4dph) مشاهده شد. حضور چینهای اپی تلیومی در دیواره کیسه زرده نشان دهنده شکل گیری معده اولیه است (تصویر شماره ۲). در روز ۷ پس از تخم گشایی ،معده که شامل بخش غده ای با سلولهای واکوئل دار غده ای و معده غیر غده ای با لایه عضلانی (تصویر شماره ۳). معده با رنگ آمیزی PAS واکنش مثبت ضعیف (++) و با آلسین بلو(pH1) و (pH2/5)پاسخ منفی(-) داشت.

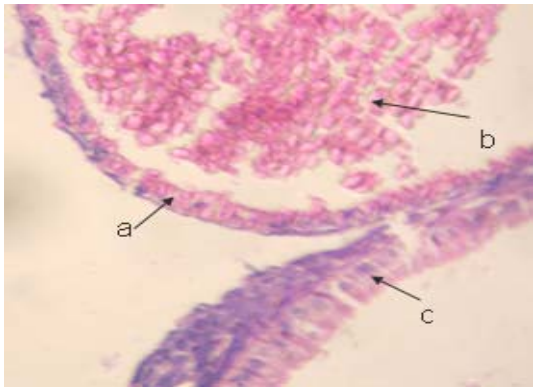
در روز اول قسمت ابتدایی (اسپیرال) روده دیده می شود که با کیسه زرده در ارتباط است. سلولهای روده بصورت استوانه ای ساده هستند که به سلولهای استوانه ای مطبق مژه دار تغییر شکل می یابد (تصویر شماره ٤). در نتایج هیستوشیمیایی در طول هفته اول ترشحات سلولهای استوانه ای روده با PAS واکنش مثبت با شدت رنگ قرمز ضعیف (+)دارند (تصویر شماره ۵). در روده بخصوص در قسمت خلفی و میانی مقدار زیادی ذرات ملانین وجود دارد . در قسمت خلفی روده پاسخ رنگ برای آلسین بلو با pH1 مثبت وشدید (++++) و در pH 2/5 پاسخ متوسط (+++) می باشد (تصویر شماره ٦و۷).

مخلوط تغذیه داخلی – خارجی از روز ۸-۱۲ روزگی شروع می شود و از روز ۱۲ ماهیان منحصرا تغذیه خارجی دارند.در طول تغذیه مخلوط تغییراتی در سیستم گوارشی ایجاد می شود، مقدارکیسه زرده کم می شود.

درهفته دوم معده از نظر مورفولوژیکی تکوین می یابد (تصویر شماره ۸). بخش خلفی روده بصورت پیچ خورده است در بخش بن بست پیلوریک چینهای مخاطی طویل ترند و در غشائ مخاطی تمام روده سلولهای موکوسی فراوانی وجوددارد (تصویر شماره ۹). در طول این هفته در معده غده ای فقط راس سلولهای استوانه ای PAS مثبت شدید (++++)و معده غیر غده ای متوسط (+++) بود(تصویر شماره ۱۰). در روده نیزپاسخ سلولهای موکوسی در رنگ آمیزی با PAS واکنش مثبت داشت و از نظر شدت رنگ قرمز در روده قدامی شدید(++++) و در روده خلفی متوسط (+++)می باشد(تصویر شماره ۱۱). سلولهای معده از نظر واکنش به آلسین بلو با pH1 منفی(-) و سلولهای موکوسی روده خلفی مثبت و شدید (++++)می باشد. در این بازه زمانی پاسخ برای رنگ آمیزی با آلسین بلوpH2/5 در معده غده ای و غیر غده ای کماکان منفی و در روده خلفی مثبت و ضعیف (++) می باشد (تصاویر شماره ۱۲).



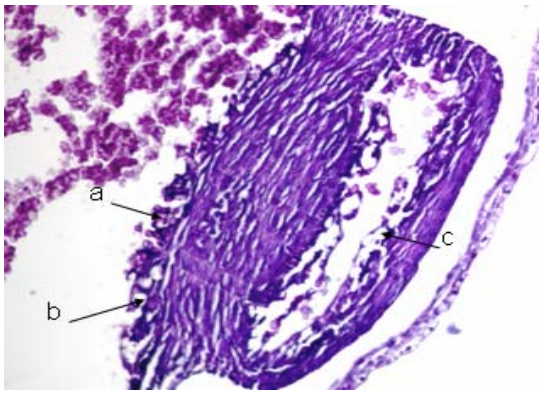
شکل ۱: برش طولی دیواره روده و کیسه زرده در سن ٤ روزگی.
a) اپی تلیوم استوانه ای ساده با هسته های مختلف الشکل b) پرز. c) زرده با رنگ اسیدوفیلی. (H-E – ٤۰۰X)



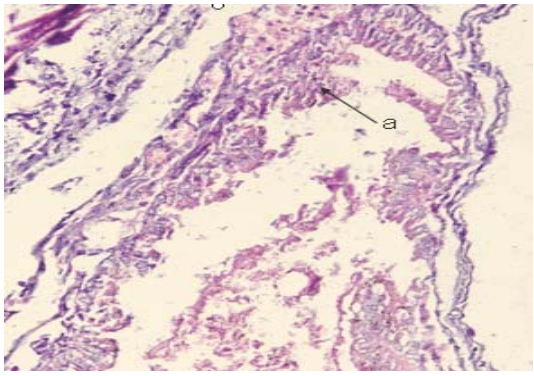
شکل ۲: برش طولی از معده اولیه در سن ٤ روزگی.
a) چینهای مخاطی اولیه دیواره معده. b) ذخایرزرده ای.
c) سلولهای استوانه ای مژه داردیواره روده (H-E – ٤۰۰X)

www.SID.ir

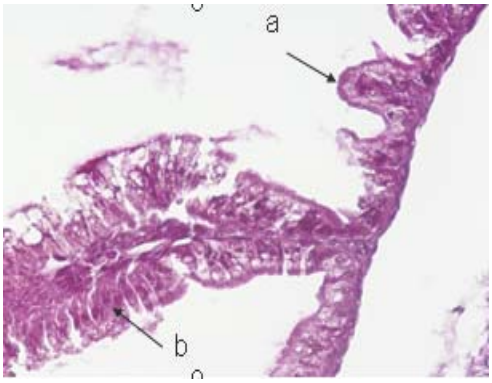
Archive of SID



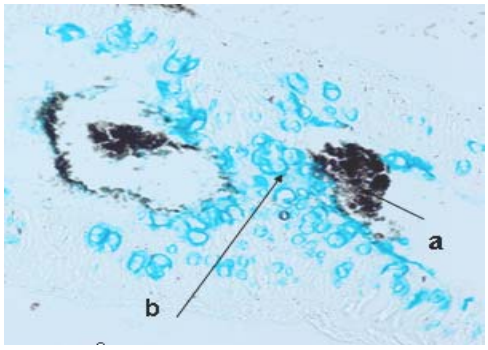
شکل ۳: برش طولی معده در سن ۷ روزگی.
a) اپی تلیوم استوانه ای b) واکوئلهای موکوسی در معده غده‌ای
c) واکوئلهای موکوسی در معده غیر غده ای (H-E – ۲۰۰X)



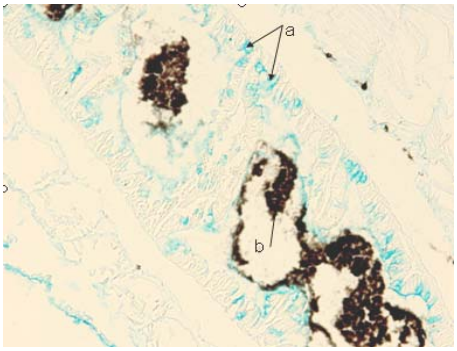
شکل ٤: روده خلفی بچه ماهی قره برون در سن ۱ روزگی .
a) چینهای مخاطی اولیه. (H-E – ٤۰۰X)



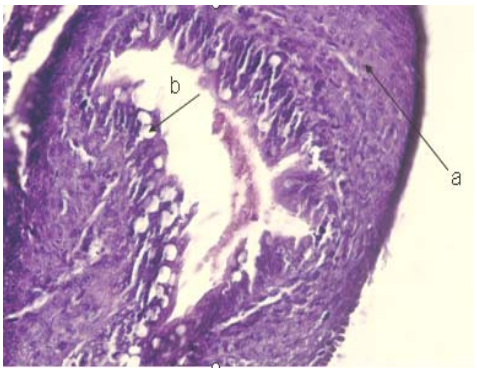
شکل ٥: برش طولی روده خلفی در جنین ۷ روزه .
a) پاسخ ضعیف در روده خلفی.
b) سلولهای استوانه ای ساده در چینهای مخاطی روده. (PAS– ٤۰۰X)



شکل ٦: برش طولی روده خلفی در سن ٤ روزگی.
a) ذرات ملانین در روده.
b) واکوئلهای موکوسی ب پاسخ مثبت(رنگ آمیزی آلسین بلو pH 1 – ۲۰۰X)



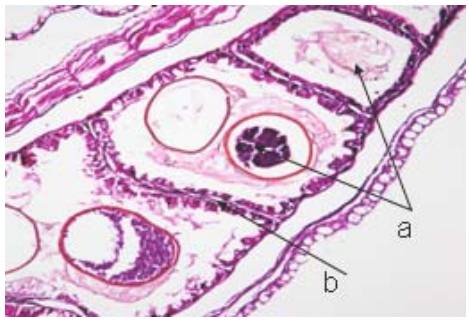
شکل ۷: برش طولی روده خلفی در سن ٤ روزه.
a) پاسخ مثبت روده.b) ذرات ملانین. (رنگ آمیزی آلسین بلو PH2/5– ۱۰۰X)



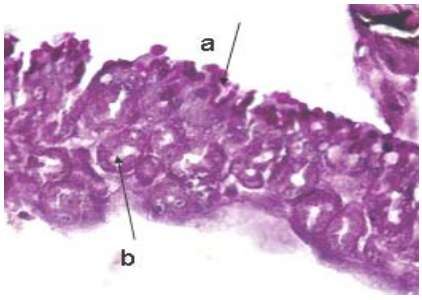
شکل ۸: معده غیر غده ای در سن ۱۰ روزگی.
a) لایه عضلانی. b) واکوئلهای موکوسی. (H-E – ۲۰۰X)

www.SID.ir

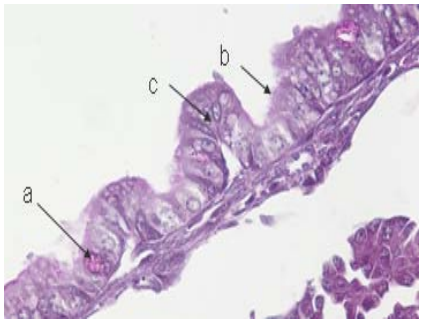
Archive of SID



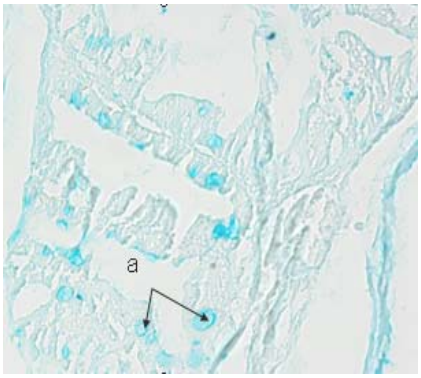
شکل ۹: برش طولی روده در سن ۱۲ روزگی.
a)ذرات غذا در روده. b) چینهای روده ای. (H-E – ٤٠X)



شکل ۱۰: برش طولی معده غده ای در سن ۱۲ روزگی.
a) راس سلولهابا پاسخ مثبت.
b) غدد معده ای (رنگ آمیزی PAS – X ٤٠٠)



شکل ۱۱: برش طولی روده قدامی در سن ١٤ روزگی.
a) پاسخ مثبت واکوئلهای موکوسی.b) پرزهای دیواره روده. c) سلولهای استوانه ای مطبق با هسته های قاعده ای. (رنگ آمیزی با PAS – X٤٠٠)



شکل ۱۲: برش طولی روده خلفی در سن ۱۰ روزگی.
a) واکوئلهای موکوسی با پاسخ مثبت.(آلسین بلو pH2/5 – ٢٠٠X)

بحث

به جهت اهمیتی که تغییرات رشد و نمو لوله گوارش بر تغذیه ، رشد و نمو و تکثیر و پرورش ماهیان دارد، لذا مطالعه این تغییرات از اهمیت اقتصادی شیلاتی برخوردار است و لذا مطالعه تغییرات رشد و نموی این اندام از نظر مرفولوژیک، هیستولوژیک، هیستوشیمی و فیزیولوژیک (آنزیماتیک) مورد توجه بسیاری از محققان واقع شده است . ماهی قره برون که از جمله مهمترین ماهیان خاویاری اقتصادی در جهان و بخصوص ایران محسوب می شود (۳) ،از این تحقیقات مستثنی نبوده است. اما از آنجا که در هیچیک از مطالعات انجام شده ,تغییرات هیستوشیمیایی به همراه تغییرات بافتی در این ماهی مطالعه نشده بود، اساس تحقیق حاضر بر مطالعه چگونگی پیدایش و روند تغییرات شیمیایی حادث در لوله گوارش این ماهی (معده و روده) از یک روزبعداز تخم گشایی تا روز ١٤ (14dph), قرار گرفت.

از آنجا که دستگاه گوارش در فرایند هضم و جذب مواد غذایی نقش مهمی دارد، با ازدیاد زمان رشد و نموجنینی عملکرد آن بدلیل تغییر درساختار هیستولوژی و هیستوشیمیایی لوله گوارش متفاوت می شود از جمله لوله گوارش در لارو ابتدایی ماهی قره برون، در طول دوره تغذیه داخلی از لحاظ مورفولوژی کامل نیست و با

www.SID.ir

Archive of SID

افزایش سن و در طی تغذیه مخلوط و شروع تغذیه خارجی کامل می شود (۳). تغذیه داخلی در ماهی خاویاری قره برون تا ۸ روز بعد از تخم گشایی (8dph) طول می کشد که با افزایش سن میزان زرده کاهش و نوع تغذیه نیز تغییر می کند.

در مطالعه ما در مرحله تخم گشایی(hatching) سیستم گوارش ماهی Acipenser persicus بصورت یک لوله کوتاه مستقیم بود که در آن معده وجود نداشته و مری با روده رابطه نداشت. در طول تغذیه داخلی تغییرات رشدونموی سریع سیستم گوارشی مشاهده شد. پس از تخم گشایی دستگاه گوارش ماهی قره برون بصورت دو قسمت جدا از هم ۱- کیسه زرده آندودرمی ۲- لوله گوارش اولیه که با محیط بیرون ارتباطی ندارند مشخص می شود. کیسه زرده که توسط مواد زرده ای پر شده است , در قسمت خلفی با چینهای مخاطی روده خلفی که رشد ناچیزی دارند، در ارتباط است. در مطالعات ما معده غده ای در روز ۷ بعد از تخم گشایی تشکیل شد.

در مطالعات Teresa در ۲۰۰۵ درماهی استخوانی سوف در طول دوره تغذیه داخلی ،تکوین سریع سیستم گوارشی مشاهده شده است. نتایج مطالعات تکوین لاروی این ماهیان استخوانی نشان داد که جذب محتویات کیسه زرده با تکوین سیستم گوارشی همراه است و مطالعه میکروسکوپی نشان داد که آثار باقی مانده از زرده تا روز ۱۷ بعد از تخم گشایی مشاهده می شود (۲۲). مقایسه نتایج این تحقیق با نتایج تحقیق ما اصول یکسانی را نشان می دهد هر چند زمان شروع تغذیه خارجی بدلیل اختلافات بین گونه ای در نوع تغذیه، جثه بدن و شرایط اکولوژیک ماهیان می تواند متفاوت باشد و به این جهت در لارو قره برون ، حضورزرده تا روز ۱۲ بعد از تخم گشایی مشاهده شد.

مطابق بررسی های Buddingtonدر سال ۱۹۸٦ بر روی sturgeon white در مرحله تغذیه درونی، تمایز لوله گوارش ناهمزمان بوده و از بخش خلفی به قسمت پیشین پیشرفت کند ,بطوریکه دریچه مارپیچی اولین قسمت و معده آخرین بخش متمایز شونده است (۸).درمطالعات Gisbert در سال ۲۰۰۲ در green sturgeonدر مرحله hatching ،سیستم گوارشی لارو از دو قسمت تشکیل شده بود: کیسه زرده آندودرمی بزرگ و یک لوله گوارش اولیه. در طول فاز تغذیه داخلی دیواره کیسه زرده به دو قسمت تقسیم می شود:۱- ناحیه غده ای و ناحیه غیر غده ای و۲- بخش خلفی و میانی روده (۱۳).بنظر میرسد این یافته هابانتایج ومشاهدات تکوین لوله گوارش ماهی قره برون مطابق است

مطالعات انجام شده بر روی ماهی crocea توسط Kangsen Malو همکارانش در سال ۲۰۰۵ نشان داد که ذخایر زرده ای در اولین تغذیه خارجی بطور کامل تمام نشده و یک دوره تغذیه مخلوط تا روز ٦ بعد از تخم گشایی مشاهده شد. با اتمام زرده ,تغییرات مهم مورفولوژیکی در پایان مرحله لاروی اتفاق افتاد که با متامورفوژنز همراه بود (۱۷). لذااحتمالا می توان نتیجه گرفت که وجود تغذیه درونی و تغذیه از ذخایر زرده ای در مرحله لاروی، بدلیل عدم رشد و نمو لوله گوارش از نظر بافتی و عملکردی است . لذا با شناخت دقیق دوره تغذیه درونی و آغاز تغذیه فعال می توان در جهت رشد و نمو سریعتر لوله گوارش و بلوغ زود رس ماهی اقدام نمود.

در ماهی قره برون در سنین ابتدایی که تغذیه فقط از کیسه زرده انجام می گیرد، عضلات لوله گوارش به اندازه کافی رشد نیافته ، بنابراین نقش هضم مکانیکی و نگهدارنده طعمه را ندارد و لذا غذا دهی در سنین ابتدایی و شروع تغذیه فعال زودتر ازسن ۸ روزگی بی ثمر است.این نتایج هم راستا با تحقیقات پژوهشگران دیگر است که در گونه های ماهیان خاویاری تاس ماهی سیبری ، بی ثمر بودن غذادهی قبل از سن ۸ تا ۹ روزگی را عنوان کرده اند(۱۲) .

در تحقیق حاضر،در پایان تغذیه داخلی ، حجم کیسه زرده کاهش می یابد که این خود باعث جدایی معده از مری می شود. در تایید این نتیجه ، مطالعات Kozaric در سال ۲۰۰٤ نشان داده که با تمام شدن زمان متامورفوز،

www.SID.ir

Archive of SID

سیستم هاضمه کامل شده و ماهیان نوزاد قادرند با ماهیان بالغ رژیم یکسانی داشته باشند (۱۵).

با اتمام زرده تغذیه خارجی شروع می شود که بر اساس مطالعات ما تغذیه خارجی از روز ۱۲ زندگی در ماهی قره برون مشاهده می شود که در ماهیان استخوانی از روز ۹ زندگی مشاهده می شود (۱۸). بنابراین به نظر می رسد که زمان شروع تغییرات مورفولوژیکی در ماهیان استخوانی سریعتر و زودتر از ماهیان خاویاری است و احتمالا به همین دلیل فرایند مورفوژنز در ماهی خاویاری قره برون نیز طی دوره طولانی تری مشاهده می شود.

معده در ماهی قره برون شامل دو بخش غده ای و غیر غده ای است که در طی تغذیه داخلی و در طی کاهش مواد زرده ای شکل گرفته بطوری که به تدریج بافت پوششی آن قابل رویت است .معده آخرین قسمت لوله گوارش است که از نظر ساختاری کامل می شود (۳). مطالعات ما نشان داد که درتکوین معده ، تشکیل غدد گاستریک و پیلوریک در لارو ماهی قره برون در روز ۷ زندگی اتفاق می افتد، معده از بخشهای غده ای ،غیر غده ای و اسفنگتر پیلوریک ساخته شده است ،که این قسمتها براساس تفاوت در جزئیات هیستولوژیکی و هیستوشیمیایی مشخص می شود . مطالعات انجام شده در سال ۲۰۰۵ توسط Teresa و همکارانش بر روی ماهی استخوانی سوف نشان داد که این رشد و نمو بین روز ۱۵ و ۳۰ زندگی اتفاق می افتد و معده به شکل y است و از دهانه معده ، معده پیلوریک و کیسه کور تشکیل شده است. تکوین پیلوریک از مهمترین تغییرات مورفولوژیکی در سیستم گوارشی است که نشان می دهد ماهیان به مرحله جوانی رسیده اند (۲۲) . بر طبق مقایسه نتایج یافته های فوق، به نظر می رسد که تکوین سریع معده در ماهی خاویاری قره برون نسبت به ماهیان استخوانی موید آغاز سریعتر مرحله جوانی در این ماهی است.

مطالعات انجام شده بر روی ماهی crocea توسط Kangsen Mal و همکارانش در سال ۲۰۰۵ نشان داد در روز 17dph بن بست پیلوریک تغییر کرده و معده پیلوریک را به روده قدامی متصل می کند که در طی رشد و نمو مورفولوژیکی و با توجه به رفتارهای هیستولوژیکی موکوسها,معده به بخش غده ای و غیر غده ای تقسیم می شود.غدد معده برای اولین بار در روز ۲۱ مشاهده شد (۱۷). در ماهی خاویاری سیبری در اولین تغذیه خارجی (9dph) ذخایر زرده ای بطور کامل از معده کاردیاک خارج نشده اند که این بیانگر وجود تغذیه مخلوط در این زمان است (۱۲) . در مطالعات ما بر روی ماهی خاویاری قره برون نیز تغذیه مخلوط (8-12 dph) دیده شد که وجود تغذیه مخلوط در ماهیان احتمالا بیانگر رشد و نمو تدریجی بافتی و شروع عملکردی دستگاه گوارش است،لذااحتمالا تشابه زمان بندی در مراحل رشدونمو با ماهی خاویار سیبری وجود دارد.

بر اساس مطالعات ما در طی تغذیه مخلوط (8-12 dph) غدد گاستریک معده شکل می گیرد و فعالیتهای هضمی معده آغاز می شود و با شروع تغذیه فعال در سن ۱۲ روزگی عملکرد غدد گاستریک و فعالیتهای هضمی معده ماهی قره برون تکامل می یابد. با توجه به مطالعات انجام شده توسط Balon در سال ۱۹۷۵ مرحله جوانی (Juvenile) زمانی شروع می شود که غدد گاستریک تکوین یابد، معده فعالیت هضمی را نشان دهد و ناحیه پیلوریک ظاهر شود .در بعضی گونه ها تغذیه خارجی را قبل از تکوین غدد گاستریک آغاز می کنند در صورتیکه دیگر ماهیان مشکلاتی را در هضم غذا و جذب آن نشان دادند (٦).

بر اساس مطالعاتی که در تحقیق ما بر روی ماهی قره برون انجام شد، شروع پیدایش سلولهای موکوسی در معده ونمایش حضور موکوس با توجه به پاسخ مثبت به PAS، ترشحات معدی را از روز ۷ پس از تخم گشایینشان داد اما پاسخ معده برای آلسین بلو منفی بود. این نتایج احتمالا گویای حضور ترکیبات قندی خنثی مانند موکوس و گلیکوژن در ترشحات این ناحیه است. مطالعات انجام شده در سال ۱۹۹۸ توسط Gisbert و همکارانش نشان داد که در تاس ماهی سیبری در یک روزگی دیواره معده توسط بافت پوششی آندودرمی سنگفرشی با غشایی که به PAS مثبت بوده شکل گرفته

www.SID.ir

Archive of SID

اند و پرزهای معده پیلوری در سن ۵ روزگی به PAS واکنش مثبت نشان می دهند (۱۲).

بر اساس مطالعات انجام شده توسط Petrinec و همکارانش در سال۲۰۰۵ نشان داده شد که راس سلولهای اپی تلیال معده در گربه ماهی و ماهی سوف پاسخ شدید PAS و پاسخ متوسط در واکنش به آلسین بلو دارند این عکس العمل ها حضور مواد موکوسی خنثی و کمی از مواد موکوسی اسیدی را نشان می دهد (۱۹). یافته های فوق در نمایش فعالیت های آنزیماتیک معده، تقریبا با اطلاعات و یافته های تحقیق حاضر بر روی ماهی قره برون نیز مطابقت دارد. در ماهی، مواد موکوسی خنثی که توسط اپی تلیوم معده ترشح می شوند در جذب مولکولهای هضمی ساده تر مانند دی ساکاریدها و زنجیره های کوتاه اسید چرب نقش دارند (١٤).مواد موکوسی حرکت ذرات بزرگ غذا را آسان تر می کند که این باعث حفاظت مخاط معده از آسیبهای مکانیکی می شود. از طرفی، حضور هر دو ماده موکوسی خنثی و اسیدی در راس سلولهای اپی تلیومی معده ماهی خاویاری سفید (۱۰) و در مرحله لاروی و بلوغ ماهی Sparus aorata مشاهده شده است (۹).لذا بنظر میرسد تفاوت های اندک سیستماتیک درطبقه بندی موجودات ،با تفاوت های مولکولی و هیستوشیمیائی بین آنان قابل تائید است.

ترشحات هضمی ماهی lake sturgeon توسط Buddington در سال ١٩٨٤ تا مرحله ٦٠ روز بعد از تخم گشایی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و نشان داده شد که شروع ترشحات غدد معده ای با ایجاد تغذیه فعال (14-18 dph) همراه است و فعالیت هضمی پس از آن افزایش می یابد ولی به دنبال ایجاد پدیده متامورفوز فعالیت هضمی لارو تا دوران جوانی کاهش می یابد (24- 30 dph) . این مسئله بیان میکند که سن و عادات غذایی ماهی با شروع فعالیت هضمی در ارتباط است (۷).

مطابق نتایج ما می توان پیشنهاد کرد که یک روز قبل از اولین تغذیه خارجی ،لاروها هنوز از ذخایر داخلی استفاده می کنند. زیرا پایان دوره تغذیه داخلی وقتی مشخص می شود که خروج کیسه های ملانین اتفاق می افتد. مطابق با نتایج تحقیق ما بررسی های مشابه Gawlika et al (1995)در دستگاه گوارش تاس ماهی سفید، حضور توده حجیمی از ذرات سیاه ملانین در روده خلفی (دریچه های مارپیچی)در یک روز قبل از شروع تغذیه خارجی (۱۱ روزگی) را بیان می کند و همچنین به جذب کامل زرده و عدم حضور توده ملانین در دریچه های مارپیچی روده در دو روز بعد از شروع تغذیه فعال خارجی اشاره دارد (۱۱).در طول تغذیه داخلی در تاس ماهی سفید لاروها به ذخایر غذایی داخلی وابسته هستند بنابراین مقدار آنزیمهای هضمی کم است و شروع ترشحات گاستریکی (اسید و پپسین) با اولین تغذیه خارجی همراه است (۸).

بر اساس نتایج ما درماهی قره برون روده دارای غدد موکوسی فراوان بوده ،با شروع تغذیه خارجی (12dph) در این ماهی ذرات ملانین در روده حذف می شوند. در مطالعات انجام شده توسط تقی زاده و همکارانش بر روی ماهی قره برون در شروع تخم گشایی، در روز ۹ لایه مخاطی روده دارای سلولهای مژه دار و تعداد اندکی گابلت سل است که در این روز روده اسپیرال شکل گرفته و لوله گوارش اولیه با سلولهای مکعبی بلند که دارای حفرات واکوئلی هستند پوشیده شده است. ذرات ملانین تا روز ۹ بعد از تخم گشایی در روده مارپیچی دیده شده است. غذای لارو اولیه از ذخایر زرده است و مواد غذایی خارجی را نمی تواندبه حلق فرو دهد و یا هضم کند بنابراین هیچ غذایی در سیستم گوارشی این نمونه دیده نمی شود (۲۱). این زمان تفاوت در شروع تغذیه خارجی و حذف ذرات ملانین احتمالا به تفاوت در شرایط پرورش این ماهی برمیگرددو با توجه به رشد و نمو سریع لوله گوارش می تواند قابل توجیه باشد.

ناحیه خلفی و میانی روده مشابه هستند و با یک اپی تلیوم مژه دار ستونی پوشیده شده اند که توسط تعداد زیادی چین مخاطی و سطوح تشکیل واکوئل در روده میانی تشخیص داده می شوند.در قزل آلای رنگین کمان بخش میانی روده از قسمتهای دیگر به علت تنگی فضای داخلی آن قابل تشخیص می باشد و اغلب طرح چینهای مخاط آن متفاوت است (۲). در لاروهای ماهی قره برون

www.SID.ir

Archive of SID

در روز ۷ پس از تخم گشایی سلولهای گابلت در بین سلولها در روده خلفی و قدامی پدیدار می شوند که این در ماهیان استخوانی سوف در روز ۱۱ پس از تخم گشایی پدیدار شد سلولهای مشابه توسط Dameneghini و همکارانش در سال ۱۹۹۸ شناسایی شدند و بعنوان سلولهای اصلی ترشحی مشخص شدند (۹). این امر احتمالا زمان سریعتر شروع فعالیت ترشحی روده را برای شروع عملکرد هضم و جذب نشان می دهد بخصوص که شروع تغذیه خارجی را در ماهی قره برون از روز ۱۲ داریم اما در ماهی سوف از روز ۱۷ است لذا مشاهده سریعتر زمان ترشحات موکوسی قابل توجیه و مطابق با پدیده های فیزیولوژیک آتی در روده است .

Grau و همکارانش در سال ۱۹۹۲ گزارش کردند که در ماهی *Seriola dumerii* amberjack ترکیبات موکوسی خنثی روده در هضم آنزیمی غذا و همچنین در تشکیل توده های غذایی و جذب نیز شرکت می کنند. در مهره داران موکوسهای روده ای نقش مثبت و مهمی را بازی می کنند. لذا واکنش PAS مثبت در این تحقیق هم راستا با مطالعات دیگر دانشمندان و مطابق با توجیهات فیزیولوژیکی است. در ماهی قره برون جوان بعد از فرایند متامورفوژنز سلولهای موکوسی در تمام روده خیلی فراوانند اما در بخشهای مختلف تعدادشان متفاوت است، بیشترین تعداد را در روده قدامی و انتهای خلفی دارند در حالیکه این در ماهیان استخوانی بیشتر در روده قدامی دیده شده است (۱٤) و این احتمالا موید این است که فرایند جذب غذا در طول لوله گوارش ماهی خاویاری قره برون در ناحیه گسترده تری نسبت به ماهیان استخوانی است که این مشاهده با توجه به زمان شروع تغذیه خارجی در ماهی خاویاری قره برون قابل توجیه است. علاوه بر این وجود سلولهای جامی، بیشتر در قسمت انتهایی روده در سنین بالاتر بیانگر هضم و جذب نهایی و کامل مواد غذایی در روده است بطوری که در سنین بالای ۱۰ سال نیز چنین پدیده ای تایید می گردد (٤). در قزل آلای رنگین کمان معمولا سلولهای موکوسی در روده خلفی کم ولی در روده قدامی و رکتوم فراوان هستند(۲). با توجه به مطالعات انجام شده در سال ۱۹۹۸ انبوه بالایی از سلولهای گابلت در روده قدامی برای تصفیه آسانتر ضروری است (۹).

شروع پیدایش سلولهای موکوسی روده در ماهی قره برون در روز ۲ پس از تخم گشایی است . در روده گابلت سلها با PAS و همچنین برای آلسین بلو نیز پاسخ شدید نشان می دهند. در تائید یافته های ما، بر طبق مطالعات Petrinecو همکارانش در سال ۲۰۰۵ بر روی ماهی سوف و گربه ماهی نشان داده شد که مواد موکوسی روده تنها در گابلت سلها حضور دارند و با PASو AB به شدت رنگ می شوند. در مخاط روده ماهیچه مخاطی وجود ندارد حتی در گونه هایی که فاقد این لایه در دیواره معده باشند . در رکتوم نیز طبقه متراکم قابل ملاحظه نیستند و در تمام طول روده ماهیچه های صاف ممکن است از دو یا سه لایه تشکیل شده باشند(۲). با توجه به مطالعات دانشمندان در سال ۲۰۰۵ بر روی ماهی روده خلفی مهمترین قسمت در هضم پروتئولیتیک خارج سلول در طول دوره لاروی است (۲۲).

مطالعات انجام شده توسط Sastry در سال ۲۰۰۱ بر روی یک نوع ماهی استخوانی نشان داد که در روده فعالیت ATPase در سلولهای اپی تلیومی استوانه ای روده دیده شده که این فعالیت در روده نسبت به قسمتهای دیگر قویتر است .فعالیت تیامین پیروفسفات در روده تنها در سلولهای گابلت دیده می شود (۲۰). بنابراین بر اساس مطالعات انجام شده می توان گفت که علیرغم تشابه اصول کلی، تمایز قسمتهای مختلف لوله گوارش در تمام گونه های ماهیان خاویاری دقیقا یکسان نبوده بلکه بسته به درجه حرارت ,اندازه تخم گونه ماهی می تواند تغییر زمانی و هیستوشیمیائی داشته باشد و شروع تغذیه فعال یکی از مراحل بحرانی بوده که بایستی با دقت زیاد مد نظر قرار گیرد .امید است این اطلاعات می تواند در بهبود کارایی پرورش تاس ماهی ایران مفید باشد (۳).

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

۱-بهمنی محمود، (۱۳۸۱-۱۳۷۷) , بررسی بافت شناسی آبشش, گناد , کلیه , کبد و دستگاه گوارش در تاس ماهی ایران . انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری بخش آبزی پروری موسسه تحقیقات شیلات ایران .صفحات ۷۰-٤٥

۲-پوستی ایرج، صدیق مرودستی عبدالحمید. (۱۳۷۸).اطلس بافت شناسی ماهی . انتشارات دانشگاه تهران .صفحه٥٦-٤٥

۳- پهلوان یلی مرتضی،مجازی امیری باقر, پوستی ایرج , بهمنی محمود , (۱۳۸۱). مطالعه بافت شناسی تکامل لوله گوارش تاس ماهی ایرانی (*A.persicus*) در مراحل ابتدایی زندگی .مجله علمی شیلات ایران شماره ۲ , سال سیزدهم ,صفحه ۵۰-۳۲.

٤- شیبانی محمد تقی، پوستی ایرج ، (۱۳۷۹) .مطالعه بافت شناسی روده ها در ماهی قره برون (*Acipenser persicus*) . پژوهش و سازندگی،(۱۳)٤ (پی آیند ٤٩))۸۹-۹۱.

٥- محسنی کوچصفهانی همـا, پریور کاظم،(۱۳۷۸).روشهای فنی بافت شناسی ,جنین شناسی و جانور شناسی.انتشارات الحسین – چاپ اول.صفحات ۱۰٥-۱۲٥

6-Balon E.K. (1975) Terminology of intervals in fish development. J. Fish. Res. Bd. Can. 32: 1663-1670.

7- Buddington R.K.(1984) Digestive secretions of lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, during early development. Fish Biology.10.1111/j.1095-649.1985.tb04311.

8- **Buddington RK**, Doroshov SI. (1986) Development of digestive secretions in white sturgeon juveniles (Acipenser transmontanus). Comp Biochem Physiol A Comp Physiol. 83(2):233-8.

9- Domeneghini C., R. P. Stranina I, A.Veggeet I (1998) Gut glycoconjugates in *Sparus aurata* L. (Pisces, Teleostei), a comparative histochemical study in larval and adult ages. Histol. Histopathol. 13, 359-372.

10- Domeneghin C., Arrighi G. Radaelli G., Bosi G.S., (1999) Morphological and histochemical peculiarities of the gut in white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. European J. Histochemistry 43, 135-145.

11- Gawlicka A, The S,J , Hung S.S.O, Hinton D.E & Delanoue J. (1995) . Histological and histochemical changes in the digestive tract of white sturgeon larvae during ontogeny.Fish physiologyandBiochemistry,14(5)357-371.

12- Gisbert E., RODRIGUEZ A., Castello-orvay F, Williot P. (1998) A histological study of the development of the digestive tract of Siberian sturgeon *(Acipenser baeri*) during early ontogeny. Aquaculturevol. 167, 3-4,195-209(21 ref.).

13 - Gisbert .E, Doroshov S.I .(2002) Histology of the developing digestive system and the effect of food deprivation in larval green sturgeon (*A.medirostris*) . Fish Biol. 41: 287-303.

14- Grau A., Crespo S., Sarasquete M.C. & Gonzalez de Canales M.L. (1992) The digestive tract of the amberjack *Seriola dumerii*, Risso: a light and scanning electron microscopy study. J. Fish Biol. 41: 287-303.

15- Kozariæ.Z , Kužir.S , Nejedli.S , Petrinec.Z and Sreboèan.E**.** (2004). Histochemical distribution of digestive enzymes in hake, *Merluccius merluccius* L. 1758. *VeterinarskyI arhiv,74* (4), 299-308.

16- Kozarić Z, Kužir1 S, Petrinec Z, Gjurčević E**,** Baturina N. (2007) Histochemistry of complex glycoproteins in the digestive tract mucosa of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.). *Veterinarski Arhiv 77* (5), 441-452.

17- Mai M , YU H, Duan Q, Gisbert E, Zambonino J.L. , Cahu C.(2005) A histological study on the development of the digestive system of Pseudosciaena crocea larvae and juveniles. Journal of Fish Biology. 67(4) : 1094-1106.

18- Pedersen B.H. & Hjelmeland K. (1988) Fate of trypsin and assimilation efficiency in larval herring (*Clupea*

www.SID.ir

Archive of SID

harengus) following digestion of copepods. Mar. Biol. 97: 467-476.
19- Petrinec Z , Nejedli.S Kužir S and Opačak A . (2005)Mucosubstances of the digestive tract mucosa in northern pike (*Esox lucius* L.) and european catfish (*Silurus glanis* L) *VeterinarskyI arhiv 75* (4), 317-327.
20-**Sastry KV**.(2001) Histochemical localization of adenosine triphosphatase and thiamine pyrophosphatase in the digestive system of a teleost fish, Ophiocephalus punctatus. Acta Histochem. 53(2):224-32.
21-Tenjaroenkul B. , Smith B. (2002) Ontogenic development of intestinal enzymes of cultured Nile tilapia, Oreochromis niloticus. Aquaculture 211, 241-251
22-Teresa.**O**.(2005).Developmental changes of digestive system structures in pick perch. *Electronic Journal of Ichthyology, 35.* 65-78.

www.SID.ir