اثر جیره‌های غذایی حاوی سطوح مختلف ویتامین‌های C و E بر نوسانات گلبول‌های سفید خون ماهی استرلیاد پرورشی (*Acipenser ruthenus*)

*مصطفی تاتینا[۱]، محمود بهمنی[۲]، مهدی سلطانی[۳] و مهتاب قریب‌خانی[۴]

[۱]گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد انزلی، ایران، [۲]انستستو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت، ایران،
[۳]دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران، [۴]گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آستارا، آستارا، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۳/۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۹/٦

چکیده

این مطالعه به‌منظور تعیین تأثیر سطوح مختلف ویتامین‌های C و E جیره بر نوسانات گلبول‌های سفید خون ماهی استرلیاد پرورشی (*Acipenser ruthenus*) در مرکز تکثیر انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان انجام گرفت. ۹ جیره غذایی شامل ترکیبی از مقادیر ۰، ۱۰۰ و ٤۰۰ میلی‌گرم ویتامین C از نوع ال- اسکوربیل- ۲- پلی‌فسفات (APP) و ۰، ۱۰۰ و ٤۰۰ میلی‌گرم ویتامین E از نوع دی- آلفا توکوفرول در کیلوگرم غذا در ۲ تکرار و به‌مدت ۱۵ هفته برای پرورش ماهیان استرلیاد در نظر گرفته شد. پس از عادت‌دهی ماهیان با غذای مصنوعی، تعداد ۱۵ عدد ماهی استرلیاد با وزن متوسط ۱٤/۲۸±۳۵۰/۹۲ گرم به هر یک از ۱۸ تانک در نظر گرفته شده، معرفی گردید. ماهیان روزانه به‌میزان ۳ درصد وزن تر بدن‌شان مورد تغذیه قرار گرفتند. در پایان آزمایش تعداد ۳ عدد ماهی از هر تانک به‌صورت تصادفی انتخاب شده و مورد خون‌گیری قرار گرفتند. در پایان دوره آزمایش (هفته پانزدهم) نتایج به‌دست آمده از آنالیز نمونه‌های خون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار آماری در شاخص گلبول‌های سفید خون و در بین گلوبول‌های سفید، مونوسیت، لنفوسیت و نوتروفیل بود ($P<۰/۰۵$). بیش‌ترین تعداد گلبول‌های سفید خون در هفته پانزدهم در تیمار $E_{۱۰۰}C_{٤۰۰}$ میلی‌گرم بر کیلوگرم (جیره ٦) و کم‌ترین تعداد در تیمار $E_{٤۰۰}C_{٤۰۰}$ میلی‌گرم بر کیلوگرم (جیره ۹) مشاهده شد. اندازه‌گیری و شمارش افتراقی سلول‌های خونی سفید نشان داد که بیش‌ترین تعداد مونوسیت در تیمار $E_{۰}C_{۰}$ میلی‌گرم بر کیلوگرم و کم‌ترین تعداد در تیمار $E_{۱۰۰}C_{۰}$ میلی‌گرم بر کیلوگرم و $E_{٤۰۰}C_{٤۰۰}$ میلی‌گرم بر کیلوگرم، بیش‌ترین تعداد لنفوسیت در تیمار $E_{۰}C_{۱۰۰}$ میلی‌گرم بر کیلوگرم و کم‌ترین تعداد در تیمار $E_{٤۰۰}C_{٤۰۰}$ میلی‌گرم بر کیلوگرم، بیش‌ترین تعداد در تیمار $E_{٤۰۰}C_{٤۰۰}$ میلی‌گرم بر کیلوگرم و کم‌ترین تعداد در تیمار $E_{۰}C_{۱۰۰}$ میلی‌گرم بر کیلوگرم شمارش گردید. بررسی نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان داد که استفاده از ویتامین‌های C و E در جیره غذایی می‌تواند بر نوسانات گلوبول‌های سفید ماهی استرلیاد پرورشی تأثیرگذار باشد.

واژه‌های کلیدی: ویتامین C، ویتامین E، گلبول سفید، استرلیاد پرورشی، *Acipenser ruthenus*

مقدمه

تاس‌ماهیان یا ماهیان خاویاری که ماهیان غضروفی- استخوانی یا استروژن (Sturgeon) نیز نامیده می‌شوند، از دسته ماهیان غضروفی دوران اولیه هستند که حدود ۲۵۰ میلیون سال قدمت دارند (Hung، ۱۹۹۱). به‌دلیل ارزش اقتصادی و غذایی بسیار بالای گوشت و خاویار از یک‌سو و کاهش میزان ذخایر ماهیان خاویاری در تمام زیستگاه‌های طبیعی آن‌ها از سوی دیگر، تکثیر و پرورش آن‌ها از

*مسئول مکاتبه: m.tatina@iau-astara.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

سال‌ها پیش مورد توجه بسیاری از کشورهای جهان قرار گرفته و پیشرفت‌های چشم‌گیری به همراه داشته است (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۸۳). برخلاف پیشرفت‌های خوبی که طی چند سال اخیر در پرورش تاس‌ماهیان صورت گرفته است، ولی اطلاعات کافی در مورد نیازهای تغذیه‌ای، تکنولوژی ساخت و ترکیبات غذایی آن‌ها وجود ندارد (Hung و Deng، ۲۰۰۲). بیش از ۵۰ درصد هزینه‌های پرورش به غذا اختصاص دارد. از این‌رو می‌توان با تهیه غذای مناسب سبب اقتصادی شدن امر پرورش شده و علاوه‌بر بهبود شاخص‌های رشد، کارایی تغذیه را نیز افزایش داد (Daulray، ۱۹۸۸).

یکی از اقلام غذایی که از نظر کمی جزء ناچیز اما از نظر کیفی جزء ضروری و مهم جیره آبزیان تلقی می‌گردد، ویتامین‌ها هستند که خود به ۲ دسته ویتامین‌های محلول در آب و ویتامین‌های محلول در چربی تقسیم‌بندی می‌شوند (NRC، ۱۹۹۳). یکی از ویتامین‌های بسیار مهم محلول در آب ویتامین C ($C_6H_8O_6$) است که به نام اسید اسکوربیک نیز شناخته می‌شود. ویتامین C از گلوکز و سایر قندهای ساده توسط گیاهان و بسیاری از گونه‌های جانوری سنتز می‌شود. این ویتامین در طبیعت فراوان بوده و اغلب جانداران و گیاهان قادرند این ترکیب شیمیایی را از اسید گلوکورونیک بیوسنتز کنند (Keefe، ۲۰۰۱؛ Halver، ۲۰۰۲). ویتامین E را دسته‌ای از ترکیبات تحت عنوان آلفاتوکوفرول‌ها تشکیل داده‌اند که آلفاتوکوفرول مهم‌ترین آن‌هاست. ویتامین E به فرمول ($C_{29}H_{50}O_2$) یک ترکیب آلی هتروسیکلیک مشتق از هسته کرومان (Chromane) می‌باشد. به‌طورکلی ویتامین E به گروهی از ترکیبات فعال که به یکدیگر شباهت زیادی دارند، اطلاق می‌شود (Nakagawa و همکاران، ۲۰۰۷).

استرلیاد (*Acipenser ruthenus Linnaeus*، ۱۷۵۸) به‌عنوان یکی از گونه‌های باارزش خانواده تاس‌ماهیان (Acipenseridae) کوچک‌ترین گونه از این ماهیان محسوب می‌شود. این ماهی یک گونه آب شیرین و پوتامودروموس است و در آب‌های شیرین مناطق سردسیری در رودخانه‌هایی که به دریای سیاه، آزوف و دریاچه خزر (ولگا و کورا) می‌ریزند زندگی می‌کند (Peterson و همکاران، ۲۰۰۶).

مطالعات خون‌شناسی ابزاری مناسب در تشخیص بیماری‌ها محسوب شده و به‌علاوه بررسی گلوبول‌های سفید نقش مهمی را در تعیین عملکرد سیستم ایمنی ماهیان ایفا می‌نماید (بهمنی، ۱۳۷۸؛ Stoskopf، ۱۹۹۳). بافت خون تغییرات فیزیکی و شیمیایی که در موجود زنده رخ می‌دهد را منعکس می‌سازد. گلوبول‌های سفید در ماهیان و مهره‌داران خود به دو گروه گرانولوسیت‌ها و آگرانولوسیت‌ها تقسیم می‌شوند (Kumar و Tembhre، ۱۹۹۸؛ بهمنی، ۱۳۷۸).

آگرانولوسیت‌ها شامل لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها شامل نوتروفیل یا هتروفیل، بازوفیل و ائوزینوفیل می‌باشند. گرانولوسیت‌ها به همراه مونوسیت‌ها نقش مهمی را در بیگانه‌خواری و سیستم ایمنی ذاتی یاخته‌ای ایفا می‌نمایند. اهمیت لنفوسیت‌ها بیش‌تر در بحث ایمنی اختصاصی یاخته‌ای مورد توجه است (Ellis، ۱۹۸۹؛ Stoskopf، ۱۹۹۳؛ Roberts، ۲۰۰۱). گلبول‌های سفید، نسبت به گلبول‌های قرمز، از فراوانی کم‌تری برخوردارند. تعداد این گلبول‌ها حتی در یک گونه خاص نیز ممکن است بسیار متغیر باشد. گلبول‌های سفید به‌طور منظمی با عملکرد ایمونولوژیکی در ارتباط هستند و تعداد آن‌ها به‌عنوان پاسخ محافظتی در ماهی در پاسخ به استرس افزایش پیدا می‌کند (Nussey، ۲۰۰۲؛ Santhakumar،

Archive of SID
www.SID.ir

۱۹۹۹). گلبول‌های سفید می‌توانند موجب محافظت ماهی در برابر بیماری‌ها شوند و مکانیسم‌های سلامت موجود را بر علیه موقعیت‌های استرس‌زا افزایش دهند.

مطالعات مختلفی توسط محققان داخلی و خارجی در ارتباط با تعیین اثرات ویتامین‌های C و E جیره غذایی بر نوسانات گلبول‌های سفید خون انجام شده است. فلاحتکار (۱۳۸٤) اثرات ویتامین C جیره را بر برخی از شاخص‌های خونی، بیوشیمیایی و رشد در فیل‌ماهی (*Huso huso*) مورد بررسی قرار داد. Wahli و همکاران (۱۹۹۸) تأثیر ترکیب ویتامین‌های C و E بر پاسخ ایمنی غیراختصاصی و مقاومت به بیماری را در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مورد بررسی قرار دادند. Montero و همکاران (۱۹۹۹) اثرات جیره‌های حاوی مکمل‌های ویتامین C و E را بر پارامترهای ایمنی ماهی (*sparus aurata*) مورد بررسی قرار دادند. Ortuno و همکاران (۱۹۹۹) اثرات جذب زیاد ویتامین C بر پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی در ماهی (*Sparus aurata*) را مورد مطالعه قرار دادند. Chen و همکاران (۲۰۰٤) تأثیر ویتامین‌های C و E جیره بر فعالیت مکمل تناوبی، خون‌شناسی، ترکیب بدن، غلظت‌های ویتامین و پاسخ به استرس گرما در ماهی‌های جوان *Notemigonus crysoleucas* را بررسی کردند Lin و Shiau (۲۰۰۵) نیازهای ویتامین E جیره غذایی ماهی هامور (*Epinephelus malabaricus*) در دو سطح چربی و اثرات آن بر پاسخ‌های ایمنی مورد بررسی قرار دادند. Andrade و همکاران (۲۰۰۷) تأثیر مکمل‌های غذایی حاوی ویتامین‌های C و E را بر پارامترهای خونی ماهی (*Arapaima gigas*) مورد بررسی قرار دادند. Lenient و همکاران (۲۰۰۸) پاسخ پارامترهای خونی بچه‌ماهیان انگشت‌قد *Heterobranchus longifilis* به مکمل ویتامین E جیره را مورد بررسی قرار دادند.

در این مطالعه تأثیر ویتامین‌های C و E جیره غذایی بر روی نوسانات گلبول‌های سفید خون ماهی استرلیاد پرورشی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

مراحل اجرایی این پروژه از اسفندماه سال ۱۳۸٦ تا تیرماه سال ۱۳۸۷ در بخش‌های تکثیر و پرورش و فیزیولوژی و بیوشیمی انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان که در ۲۵ کیلومتری شهر رشت و در مجاورت سد سنگر در جوار رودخانه سفیدرود قرار دارد، انجام شد.

در ابتدای آزمایش و به‌منظور سازگاری ماهیان با شرایط جدید پرورشی تعداد ۲۷۰ عدد ماهی استرلیاد با وزن متوسط ۱٤/۲۸±۳۵۰/۹۲ گرم که از نظر شرایط ظاهری سالم بودند، از بین ماهیان موجود در مخازن بتونی بخش تکثیر و پرورش انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری انتخاب شده و به محل آزمایش منتقل گردیدند. برای انجام عملیات پرورش از ۱۸ عدد وان ۲ تنی فایبرگلاس به حجم آبی ۲۰۰۰ لیتر در کنار یکدیگر و در یک محیط سرپوشیده استفاده شد. سطح آب در این مخازن ۵۰ سانتی‌متر بود. آب مورد نیاز وان‌ها از آب رودخانه سفیدرود تأمین می‌شد. در هر وان ۱۵ عدد ماهی رهاسازی گردید. با انجام محاسبات آماری پس از انجام زیست‌سنجی مشخص شد که هیچ اختلاف معنی‌داری از نظر وزن و طول در ماهیان موجود در تمامی وان‌ها وجود ندارد. در زمان انجام زیست‌سنجی ماهیان علامت‌گذاری شدند. بعد از رقم‌بندی، ماهیان برای سازگاری با شرایط جدید محیطی (اکسیژن، دما و pH) به‌مدت ۱۵ روز با غذای کنسانتره متداول مورد استفاده برای تغذیه ماهیان خاویاری تغذیه گردیدند.

این آزمایش به‌صورت طرح فاکتوریل (۳×۳) در قالب کاملاً تصادفی (Completely Randomized Design) انجام گردید. به این صورت که ترکیبی از

Archive of SID
www.SID.ir

۳ سطح از ویتامین C (۰، ۱۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم از غذا) و ۳ سطح از ویتامین E (۰، ۱۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم از غذا) برای تهیه ۹ جیره شامل یک جیره پایه (فاقد ویتامین‌های C و E) و ۸ جیره آزمایشی (جدول ۱) و در ۲ تکرار مورد استفاده قرار گرفت. طول مدت آزمایش نیز ۱۵ هفته در نظر گرفته شد. ترکیبات و نتایج آنالیز تقریبی جیره در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۱- ترکیبات جیره‌های غذایی مورد استفاده در طول مدت پرورش

ترکیبات جیره	جیره								
	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸	۹
آرد ماهی (درصد)	٥٤	٥٤	٥٤	٥٤	٥٤	٥٤	٥٤	٥٤	٥٤
آرد گندم (درصد)	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸
شیر خشک (درصد)	٥	٥	٥	٥	٥	٥	٥	٥	٥
کنجاله سویا (درصد)	۸	۸	۸	۸	۸	۸	۸	۸	۸
گلوتن ذرت (درصد)	٥	٥	٥	٥	٥	٥	٥	٥	٥
روغن ماهی (درصد)	٤	٤	٤	٤	٤	٤	٤	٤	٤
مخمر (درصد)	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳
مخلوط مواد معدنی[1] (درصد)	۱/۳	۱/۳	۱/۳	۱/۳	۱/۳	۱/۳	۱/۳	۱/۳	۱/۳
مخلوط مواد ویتامینی[2] (درصد)	۱/۷	۱/۷	۱/۷	۱/۷	۱/۷	۱/۷	۱/۷	۱/۷	۱/۷
ویتامین E[3] (میلی‌گرم در کیلوگرم غذا)	۰	۰	۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	٤۰۰	٤۰۰	٤۰۰
ویتامین C[4] (میلی‌گرم در کیلوگرم غذا)	۰	۱۰۰	٤۰۰	۰	۱۰۰	٤۰۰	۰	۱۰۰	٤۰۰

[1] مخلوط مواد معدنی (گرم در کیلوگرم مکمل):
calcium lactate: ۳۲۷؛ K_2PO_4: ۲۳۹/۸؛ $CaHPO_4.2H_2O$: ۱۳۵/۸؛ $MgSo_4.7H_2O$: ۱۳۲؛ $Na_2HPO_4.2H_2O$: ۸۷/۲؛ NaCl: ٤۳/٥؛ ferric citrate: ۲۹/۷؛ $ZnSo_4.7H_2O$: ۳؛ $CoCl_2.6H_2O$: ۱؛ $MnSo_4.H_2O$: ۰/۸؛ KI: ۰/۱٥؛ $AlCl_3.6H_2O$: ۰/۱٥؛ $CuCl_2$: ۰/۱.

[2] مخلوط مواد ویتامینی (گرم در کیلوگرم مکمل):
thiamin hydrochloride: ۲/٥؛ riboflavin: ۱۰؛ calcium pantothenate: ۲٥؛ nicotinic acid: ۳۷/٥؛ pyridoxine by hydrochloride: ۲/٥؛ folic acid: ۰/۷٥؛ inositol: ۱۰۰؛ ascorbic acid: ٥۰؛ chlorine chloride: ۲٥۰؛ menadione: ۲؛ retinol acetate: ۱؛ cholecalciferol: ۰/۰۰۲٥؛ biotin: ۰/۲٥؛ vitamin B_{12}: ۰/۰٥.

[3] ویتامین E: دی آلفا- توکوفرول.

[4] ویتامین C: دی آلفا- توکوفرول.

جدول ۲- ترکیبات تقریبی جیره پایه

	رطوبت	خاکستر	پروتئین	چربی	فیبر
ترکیب تقریبی (درصد)	۱٤/۲±۰/۲	۲۰/۷±۱۰/۰	٤۹/۰±۰/۸	۱٤/۱±۰/۲	۲/۰±۰/۱

با توجه به اندازه ماهیان غذادهی به‌میزان ۲ درصد وزن بیومس، به‌صورت دستی و در سه نوبت (در ساعات ۷، ۱۵ و ۲۳) انجام می‌شد.

فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب از جمله اکسیژن محلول، دما (۲ بار در روز) و pH (یک‌بار در روز) در طول دوره پرورش به دقت اندازه‌گیری شدند (جدول ۳). همچنین هر ۲۱ روز یک‌بار وان‌ها کاملاً خشک شده و سپس با مواد ضدعفونی‌کننده شستشو و ضدعفونی شدند.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۳- فاکتورهای فیزیکوشیمیایی اندازه‌گیری شده در طول مدت پرورش

فصل	دما (درجه سانتی‌گراد)	اکسیژن محلول (ppm)	pH
زمستان	۹/۵±۰/۲	۹/٤±۰/٦	۷/۳±۰/۳
بهار	۱٦/۳±۰/۲	٦/۹±۰//۵	۷/٤±۰//۱
تابستان	۱۷/۲±۰/۱	٦/۷±۰/۳	۷/۵±۰/۱

عملیات خون‌گیری از سیاهرگ دمی (Caudal vein) واقع در پشت باله مخرجی ماهیان با استفاده از سرنگ‌هایی به حجم ۵ سی‌سی صورت گرفت. بعد از گرفتن ٤ سی‌سی خون توسط سرنگ از ساقه دمی این ماهیان خون به داخل تیوب‌های اپندرف شماره‌گذاری شده منتقل و برای انجام مطالعات خون‌شناسی به آزمایشگاه ارسال گردید. لازم به ذکر است در هنگام خون‌گیری از مواد بیهوش‌کننده به‌علت احتمال تأثیر بر سطوح شاخص‌های خونی استفاده نگردید.

به‌منظور شمارش گلبول‌های سفید، میزان ۲۰ میکرولیتر خون هپارینه در ۰/٤ میلی‌لیتر محلول رقیق‌کننده (محلول داسیه) مخلوط گردید. پس از شمارش گلبول‌های سفید، مجموع اعداد ٤ خانه دو طرف لام هموسیتومتر را با هم جمع کرده، میانگین گرفته و در عدد ۱۰۰ ضرب و تعداد گلبول‌های سفید محاسبه گردید. گلبول‌های سفید با عدسی ۲۰ میکروسکوپ شمارش شدند (درگاهی و همکاران، ۱۳۷۵). مطالعه شمارش لام‌های خشک شده به‌منظور تعیین تعداد لنفوسیت، نوتروفیل، ائوزینوفیل، منوسیت و بازوفیل با استفاده از روش زیگزاگ (Stoskopf، ۱۹۹۳) به کمک دستگاه شمارنده دستی توسط میکروسکوپ نوری مجهز به رایانه (مدل E600 Nikon، ساخت کشور ژاپن) انجام شد. برای دقت بیش‌تر از خون هر ماهی سه لام تهیه و از هر لام ۱۰۰ سلول شمارش گردید (بهمنی، ۱۳۷۸). برای تعیین درصد افتراقی گلبول‌های سفید براساس روش توصیه شده توسط Wagner و همکاران (۱۹۹۷) عمل گردید.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و به‌وسیله نرم‌افزار SPSS 17 انجام گردید. رسم نمودار نیز با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج

نتایج اندازه‌گیری گلبول‌های سفید خون در هفته پانزدهم پس از تغذیه با جیره‌های حاوی مقادیر مختلف ویتامین‌های C و E در جدول ٤ نشان داده شده است. در هفته پانزدهم، بیش‌ترین تعداد WBC در تیمار $E_{۱۰۰}C_{٤۰۰}$ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده گردید. این در حالی است که کم‌ترین تعداد WBC مربوط به تیمار $E_{٤۰۰}C_{٤۰۰}$ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود (جدول ٤). با توجه به نتایج به‌دست آمده از آنالیز آماری مشخص شد که در مورد شاخص WBC در تیمارهای یاد شده اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P<۰/۰۵$).

اندازه‌گیری و شمارش افتراقی سلول‌های خونی سفید بیش‌ترین تعداد مونوسیت و ائوزینوفیل را در تیمار $E_{۰}C_{۰}$ میلی‌گرم بر کیلوگرم، بیش‌ترین تعداد لنفوسیت را در تیمار $E_{۰}C_{۱۰۰}$ میلی‌گرم بر کیلوگرم و بیش‌ترین تعداد نوتروفیل را در تیمار $E_{٤۰۰}C_{٤۰۰}$ میلی‌گرم بر کیلوگرم نشان دادند. این در حالی است که کم‌ترین تعداد مونوسیت در تیمار $E_{۱۰۰}C_{۰}$ میلی‌گرم بر کیلوگرم و $E_{٤۰۰}C_{٤۰۰}$ میلی‌گرم بر کیلوگرم، کم‌ترین تعداد لنفوسیت در تیمار $E_{٤۰۰}C_{٤۰۰}$ میلی‌گرم بر کیلوگرم، کم‌ترین تعداد ائوزینوفیل در تیمار $E_{٤۰۰}C_{۱۰۰}$

Archive of SID
www.SID.ir

میلی‌گرم بر کیلوگرم و کم‌ترین تعداد نوتروفیل در تیمار E.C۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم محاسبه شد (جدول ۵). نتایج به‌دست آمده از آنالیز آماری نیز بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف در مورد مونوسیت، لنفوسیت و نوتروفیل بود ($P<۰/۰۵$). این در حالی است که در مورد ائوزینوفیل اختلاف معنی‌دار آماری بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$).

جدول ٤- نتایج اندازه‌گیری شاخص WBC در ماهی استرلیاد پرورشی در هفته پانزدهم (n=٥٤)

شماره جیره	مقدار ویتامین (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	WBC (۱۰۰۰ بر میلی‌مترمکعب)
۱	E.C.	۱۸/۲۵±۳/۱^{ab}
۲	E.C۱۰۰	۱۳/۷۵±۵/۸۳^{ab}
۳	E.C٤۰۰	۱٤/۲۵±۱/۷۵^{ab}
٤	E۱۰۰C.	۱۵/۲۵±۲/۷۵^{ab}
۵	E۱۰۰C۱۰۰	۱۸/۵۸±۱/۷۵^{ab}
٦	E۱۰۰C٤۰۰	۱۹/٦٦±۱/٦٦^{a}
۷	E٤۰۰C.	۱٤/٦٦±۱/۳۳^{ab}
۸	E٤۰۰C۱۰۰	۱٤/۲۵±۱/۷۵^{ab}
۹	E٤۰۰C٤۰۰	۱۳/۰۰±۱/٦٦^{b}

حروف مختلف در ستون‌ها نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلافات در پارامتر یاد شده می‌باشد (P<۰/۰۵).

جدول ۵- نتایج شمارش افتراقی سلول‌های سفید خونی در ماهی استرلیاد پرورشی در هفته پانزدهم (n=٥٤)

شماره جیره	مقدار ویتامین (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	مونوسیت (درصد)	لنفوسیت (درصد)	ائوزینوفیل (درصد)	نوتروفیل (درصد)
۱	E.C.	۰/٤۱±۰/۰۸^{a}	۸۷/۱٦±۳/۵۰^{abc}	۳/۰۰±۰/٦٦	۸/۷۵±۳/٤۱^{bc}
۲	E.C۱۰۰	۰/۰۸±۰/۰۸^{c}	۹۲/۰۰±۰/۵۰^{a}	۲/٦٦±۰/۸۳	۵/۲۵±۰/۲۵^{c}
۳	E.C٤۰۰	۰/۳۳±۰/۰۰^{ab}	۸۸/۳۳±۱/۳۳^{abc}	۱/۵۸±۰/۷۵	۱۰/۰۰±۱/۸۳^{abc}
٤	E۱۰۰C.	۰/۰۰±۰/۰۰^{c}	۹۱/۱٦±۰/۸۳^{ab}	۱/۵۸±۰/۲۵	۷/۳۳±۱/۱٦^{bc}
۵	E۱۰۰C۱۰۰	۰/۰۸±۰/۰۸^{c}	۸۸/۵۰±۱/۵۰^{abc}	۱/۸۳±۱/۱٦	۹/۵۸±۰/۲۵^{abc}
٦	E۱۰۰C٤۰۰	۰/۰۸±۰/۰۸^{c}	۸۸/۵۳±۱/٤٦^{ab}	۱/۹۵±۱/۱۸	۱۰/٤۳±۱/۰٦^{abc}
۷	E٤۰۰C.	۰/۱٦±۰/۰۰^{bc}	۸٦/۳۳±۲/۳۳^{bc}	۱/۸۳±۰/۵۰	۱۱/٦٦±۱/۸۳^{ab}
۸	E٤۰۰C۱۰۰	۰/۳۳±۰/۰۰^{ab}	۸۸/۳٦±۱/۳۳^{abc}	۱/۵۳±۰/۷۰	۱۰/۰۵±۱/۸۵^{abc}
۹	E٤۰۰C٤۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰^{c}	۸۲/۹۱±۰/۹۱^{c}	۲/۱٦±۰/۸۳	۱۵/۰۰±۱/٦٦^{a}

*نبود حروف در ستون‌ها نشان‌دهنده معنی‌دار نبودن اختلافات در پارامتر یاد شده می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

یکی از باارزش‌ترین پارامترهای خونی اندازه‌گیری شده، شمارش افتراقی گلوبول سفید ماهی می‌باشد که نشان‌دهنده درصد انواع سلول‌های سفید خون می‌باشد. فاکتورهای خونی و سرمی ماهیان در گونه‌های مختلف با هم تفاوت داشته و ارتباط مستقیم و غیرمستقیم زیادی با شرایط محیطی، تغذیه‌ای، سن و... دارند (Ross و Ross، ۱۹۹۹). به‌علاوه علت اصلی نوسان تعداد گلوبول‌های سفید مرتبط با نوع غذا دانسته شده است (Palikova و همکاران، ۱۹۹۹). از طرف

Archive of SID
www.SID.ir

دیگر محققان زیادی بیان کرده‌اند که استرس نقش بسیار مؤثری در نوسان تعداد گلوبول‌های سفید دارد، به‌طوری‌که استرس‌های مزمن قادر به پاک‌سازی لنفوسیت‌ها از تمام بافت‌های لنفوئیدی و خون می‌باشند (Benfey و Biron، ۲۰۰۰).

نتایج به‌دست آمده از این بررسی در انتهای هفته پانزدهم پرورش نشان داد که تعداد گلبول‌های سفید خون تفاوت معنی‌داری را در بین تعدادی از تیمارهای مختلف دارد. بیش‌ترین تعداد گلبول‌های سفید خون در انتهای هفته پانزدهم پرورش در تیمار $E_{1}..C_{4}..$ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده شد. کم‌ترین تعداد گلبول‌های سفید خون اندازه‌گیری شده نیز در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر $E_{4}..C_{4}..$ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده شد. این امر تأییدکننده تأثیر مثبت سطوح ویتامین‌های C و E جیره بر این شاخص خونی است. همچنین اثبات شده است که ویتامین‌ها و مواد معدنی به‌طور معنی‌داری مقاومت به بیماری را توسط تنظیم سیستم ایمنی تحت‌تأثیر قرار می‌دهند (Rukgauere و همکاران، ۲۰۰۱؛ Hardie و همکاران، ۱۹۹۱). محققان مختلف ثابت کرده‌اند که ویتامین C دارای تأثیر زیادی در پارامترهای مختلف پاسخ‌های ایمنی است و مقادیر جذب شده این ویتامین از طریق جیره غذایی می‌تواند بسیاری از عملکردهای سیستم ایمنی را در ماهی تحت‌تأثیر قرار دهد (Lee و Shiau، ۲۰۰۲). علاوه‌بر آن استفاده از ویتامین C در جیره غذایی ماهیان کارایی بالاتری را در تولید آنتی‌بادی‌ها به‌منظور مبارزه با باکتری‌ها، فعالیت بیگانه‌خوارها و لیزوزیم و همچنین اثر مثبت کاهش استرس نشان داد (Montero و همکاران، ۲۰۰۱؛ Ortuno و همکاران، ۲۰۰۳؛ Ai و همکاران، ۲۰۰٤؛ Puangkaew و همکاران، ۲۰۰٤؛ Lin و Shiau، ۲۰۰۵). عمل آنتی‌اکسیدانی ویتامین C حداقل ایمنی را توسط حفظ درست عملکردی و ساختمانی سلول‌های ایمنی افزایش می‌دهد (Chen، ۱۹۹۵).

ثابت شده است که کمبود ویتامین E در جیره غذایی آبزیان پرورشی به‌طور مضری روی پاسخ‌های بیگانه‌خواری ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها اثر می‌کند و می‌تواند فعالیت‌های سیستم ایمنی را کاهش دهد (Tengerdy، ۱۹۹۰؛ Stave و همکاران، ۱۹۸۳). فقدان ویتامین E در جیره غذایی آبزیان پرورشی می‌تواند یک اثر منفی بر فعالیت سیستم ایمنی و بقا لنفوسیت‌ها به‌علت آسیب اکسیداتیو غشاهای سلولی داشته باشد و یا ممکن است لنفوسیت‌ها از خون به داخل بافت ماهیچه به‌علت التهاب و تورم مهاجرت کنند (Green و همکاران، ۱۹۹۸). ویتامین‌های C و E در ماهی‌ها می‌توانند از عملکرد گلوبول‌های سفید محافظت کنند (Adham و همکاران، ۲۰۰۰؛ Cuesta و همکاران، ۲۰۰۲؛ Sahoo و Mukherjee، ۲۰۰۲). ویتامین‌های C و E برای تحریک سیستم ایمنی خیلی بیش‌تر نسبت به سطح مورد نیاز برای رشد و جلوگیری از بروز علایم کمبود مورد نیازهستند (Chagas و Val، ۲۰۰۳؛ Puangkaew و همکاران، ۲۰۰٤؛ Verlhac و همکاران، ۱۹۹٦). از سوی دیگر ویتامین‌های C و E یک نقش بسیار مهم در پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی در ماهی بازی می‌کنند. نتایج افزودن ترکیب ویتامین‌های C و E به جیره غذایی ماهی به‌منظور افزایش آنتی‌اکسیدان‌های جیره برای افزایش مصونیت و بالا بردن قدرت سیستم ایمنی ماهی می‌تواند با دست‌یابی به سطوح مؤثر این ویتامین‌ها برای پرورش‌دهندگان ماهی بسیار مفید باشد (Hung و همکاران، ۲۰۰۷).

مطالعات مختلف در زمینه اثرات ویتامین C و ویتامین E و همچنین ترکیب آن‌ها (C+E) در ارتباط با سیستم ایمنی و تأثیر بر درصد هر یک از گلوبول‌های سفید شاخص انجام شده است که در بعضی موارد نشان‌دهنده تأثیرات مثبت و در برخی اثر کم یا بی‌تأثیر بودن آن‌ها است. به‌طوری‌که فلاحتکار

Archive of SID
www.SID.ir

(۱۳۸٤) با استفاده از مقادیر مختلف ویتامین C (۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ٤۰۰، ۸۰۰ و ۱٦۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در طی ۱٦ هفته برای پرورش فیل‌ماهیان جوان با وزن متوسط ۰/۵±۳۸/۱ گرم انجام داد نشان داد که در این دوره اختلاف معنی‌داری در تعداد لنفوسیت‌ها، مونوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و ائوزینوفیل‌ها در بین تیمارهای مختلف وجود دارد. مقایسه این نتایج با این مطالعه و با توجه به این‌که از هر دو ویتامین C و E استفاده شد، نشان‌دهنده تأثیر این ویتامین‌ها بر مونوسیت، لنفوسیت و نوتروفیل و تأثیر نداشتن آن‌ها بر ائوزینوفیل می‌باشد. Chen و همکاران (۲۰۰٤) با بررسی تأثیر سطوح مختلف ویتامین‌های C و E جیره غذایی بر فاکتورهای خونی و سیستم ایمنی ماهیان جوان *Notemigonus crysoleucas* بعد از ۱۷ هفته پرورش دریافتند که درصد نوتروفیل‌ها در بعضی از ماهیانی که از جیره‌های بدون مکمل‌های ویتامین E تغذیه کرده بودند به‌خصوص ماهیانی که از جیره‌های حاوی ۲۳ یا ٤۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C تغذیه کرده بودند، زیاد بود. درصد لنفوسیت‌ها در ماهی‌های تغذیه شده با جیره‌های بدون مکمل‌های ویتامین E کاهش پیدا کرد. بیش‌ترین درصد لنفوسیت‌ها در ماهیانی که با جیره‌های حاوی ۲۲۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C و ۳۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین E تغذیه شده بودند، دیده شد. کم‌ترین لنفوسیت هم در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی ٤۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C و بدون ویتامین E دیده شد همچنین آن‌ها بیان کردند که نوتروفیل‌ها جمعیت بزرگی از گلوبول‌های سفید را در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های بدون مکمل‌های ویتامین E تشکیل می‌دهند، به‌خصوص در ماهیانی که با سطوح پایین ویتامین C تغذیه شده بودند. نتایج این مطالعه در ارتباط با شاخص نوتروفیل و لنفوسیت با این پژوهش مغایرت دارد. Menezes و همکاران (۲۰۰٦) با بررسی تأثیر سطوح مکمل‌های غذایی حاوی ویتامین‌های C و E بر شاخص‌های خونی ماهی (*Arapaima gigas*) پرورش داده شده در قفس‌های توری به‌مدت ٤۵ روز در شمارش افتراقی گلبول‌های سفید دریافتند که لنفوسیت‌ها بیش‌ترین درصد گلبول‌های سفید را تشکیل داده‌اند. درصد لنفوسیت‌های خون به‌طور معنی‌داری در تیمارهای حاوی ویتامین (۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و ویتامین C (۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) نسبت به گروه شاهد و آن‌هایی که با مکمل‌های حاوی ویتامین‌های (C+E) تغذیه شده بودند، پایین‌تر بود. اختلاف معنی‌داری در تعداد مونوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و ائوزینوفیل‌ها در بین تیمارهای مختلف مشاهده نگردید. آن‌ها اثر هم‌زمان ویتامین‌های (C+E) را بر گلوبول‌های سفید در ماهی *Arapaima gigas* پرورش‌یافته در قفس‌های توری اثبات کردند. همچنین آن‌ها بیان نمودند که تغییرات نمایان شده برای ماهی در این تیمار یک پاسخ القاء شده فقط توسط سطوح بالای ویتامین C که مورد استفاده قرار گرفته بود، می‌باشد. نتایج به‌دست آمده با این مطالعه در ارتباط با شاخص‌های مونوسیت و نوتروفیل مشابه و در شاخص ائوزینوفیل و لنفوسیت مغایر می‌باشد. Azad و همکاران (۲۰۰۷) اثر جیره‌های حاوی سطوح بالای ویتامین C و E را بر افزایش تولید آنتی‌بادی و حافظه ایمنی در خامه ماهیان جوان (*Chanos chanos*) با وزن متوسط (۰/۰٤±۱/۰۸–۰/۰۱±۰/۸۷) گرم به‌مدت ٦ هفته مورد بررسی قرار دادند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که آنتی‌بادی‌های استخراج شده در ماهی‌های تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح بالای ویتامین‌ها به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد بیش‌تر بود. تمایل به تولید آنتی‌بادی با گذشت زمان در تیمارهای مختلف نشان داد که یک پاسخ واضح در ماهی‌های تغذیه شده با هر دو سطح ویتامین C و E وجود دارد. اگرچه بهترین حالت تحریک‌کننده تولید آنتی‌بادی‌ها در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی ویتامین C

Archive of SID
www.SID.ir

(۱۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و سپس ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی ویتامین E (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) دیده شد. بعد از این دو جیره نیز به‌ترتیب در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی (۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) ویتامین C و ماهیان تغذیه شده با (۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) ویتامین E دیده شد. آن‌ها افزایش پاسخ محافظتی و حافظه ایمنولوژیکی در خامه ماهیان جوان تغذیه شده با سطوح بالای ویتامین‌های C و E را به ترکیب افزایش تولید آنتی‌بادی‌های خاص و احتمال افزایش پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی نسبت دادند که در بسیاری از ماهیان که سطوح مختلف ویتامین C جیره را دریافت کرده بودند، گزارش شده است (Sealey و Gatlin، ۲۰۰۲؛ Verlhac و همکاران، ۱۹۹٦؛ Chen و همکاران، ۲۰۰٤). در مطالعه Azad و همکاران (۲۰۰۷) حتی مقادیر کم ویتامین‌های C و E موجود در جیره ماهیان شاهد C (۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و E (۱/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم) منجر به تولید آنتی‌بادی کم‌تر نسبت به سایر جیره‌های مورد استفاده شد. نتایج این پژوهش در حالت کلی و با توجه به تمامی شاخص‌ها با این مطالعه مطابقت دارد. Affonso و همکاران (۲۰۰۷) با بررسی تأثیر سطوح مختلف ویتامین C جیره شامل (۳۵۰، ٤۰۰، ۵۰۰، ٦۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر روی شاخص‌های خونی ماهیان جوان (*Brycon amazonicus*) که به‌مدت ۲ ماه پرورش یافته بودند، دریافتند که در شمارش افتراقی گلوبول‌های سفید، لنفوسیت‌ها بیش‌ترین درصد را به خود اختصاص داده بودند. درصد لنفوسیت‌ها به‌ترتیب در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی ٦۰۰، ۸۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C بیش‌تر بود. کم‌ترین میزان لنفوسیت‌ها نیز در تیمار ٤۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C دیده شد. در شمارش افتراقی گلوبول‌های سفید در این ماهی کم‌ترین تعداد متعلق به منوسیت‌ها بود. بیش‌ترین درصد منوسیت‌ها در جیره شاهد حاوی ۳۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C مشاهده شد و کم‌ترین درصد مونوسیت‌ها هم در تیمار حاوی ٦۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C مشاهده شد. بیش‌ترین درصد نوتروفیل‌ها در خون ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ٤۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C و کم‌ترین درصد آن نیز در خون ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C مشاهده شد. مقایسه نتایج این پژوهش با این مطالعه نشان‌دهنده وجود بیش‌ترین تعداد نوتروفیل در تیماری است که حاوی بیش‌ترین مقدار هر دو ویتامین C و E است. بنابراین با توجه به وجود هر دو ویتامین C و E در جیره مورد استفاده ماهیان در این آزمایش، نتایج سایر شاخص‌ها با مطالعه فوق مطابقت دارد.

اختلاف در پاسخ‌های ایمنی مشاهده شده در گونه‌های مختلف ماهی نسبت به سطوح ویتامین‌های استفاده شده در جیره غذایی می‌تواند به وجود اختلاف در گونه‌ها، نژاد، اندازه، وضعیت تغذیه‌ای ماهی و مدیریت تغذیه مربوط باشد (Lim و همکاران، ۲۰۰۰).

نتایج به‌دست آمده با نظریات مطرح شده توسط محققان دیگر که بیان کرده‌اند روابط متقابل بین ویتامین‌های C و E اثرات سودمند آن‌ها را تحت‌تأثیر قرار داده و این اثرات مثبت در ماهیان پرورشی استفاده‌کننده از جیره‌های حاوی این دو ویتامین در سطوح مطلوب القاء می‌شود (Lovell و همکاران، ۱۹۸٤) را در تحریک سیستم ایمنی و افزایش تعداد گلوبول‌های سفید و همچنین محافظت از آن‌ها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های قوی طبق نظریه دانشمندان مختلف (Verlhac و همکاران، ۱۹۹٦؛ Wahli و همکاران، ۱۹۹۸؛ Cuesta و همکاران، ۲۰۰۲؛ Sahoo و Mukherjee، ۲۰۰۲). به‌منظور افزایش توانایی برای غلبه بر عوامل استرس‌زای محیطی، جلوگیری از

Archive of SID
www.SID.ir

بیماری‌ها و مقابله با عوامل بیماری‌زا به‌منظور افزایش کارایی پرورش، حفظ سلامت ماهی، برقراری تعادل درونی و کاهش اثرات استرس‌های احتمالی را تأیید می‌کند (Hung و همکاران، ۲۰۰۷).

تشکر و قدردانی

از جناب آقای دکتر محمد پورکاظمی ریاست محترم انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری و کارشناسان محترم بخش‌های فیزیولوژی و تکثیر و پرورش آقایان مهندس رضوان‌الله کاظمی، مهندس میرحامد سیدحسنی، مهندس محمود محسنی، مهندس محمد پوردهقانی، مهندس ایوب یوسفی، مهندس علی حلاجیان، مهندس سهراب دژندیان، مهندس هوشنگ یگانه، مهندس جلیل جلیل‌پور و سایر پرسنل بخش تکثیر و پرورش صمیمانه تشکر می‌نماییم.

منابع

۱- ابراهیمی، ع.، پوررضا، ج.، پاناماریوف، س.و.، کمالی، ا.، حسینی، ع.، ۱۳۸۳. اثر مقادیر مختلف پروتئین و چربی بر شاخص‌های رشد و ترکیب شیمیایی لاشه بچه‌ماهیان انگشت‌قد فیل‌ماهی (*Huso huso*). مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، شماره ۸، صفحات ۲۲۹ تا ۲۴۲.

۲- بهمنی، م.، ۱۳۷۸. بررسی اکوفیزیولوژی استرس از طریق اثر بر محور HPI و HPG سیستم ایمنی و فرآیند تولیدمثل در تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*). رساله دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، ۲۷۷ صفحه.

۳- درگاهی، ح.، عظیمی، س.، شریفی، ی.، ۱۳۷۵. هماتولوژی آزمایشگاهی. مؤسسه انتشارات امید، چاپ اول، ۳۷٦ صفحه.

٤- فلاحتکار، ب.، ۱۳۸٤. اثرات ویتامین C جیره بر برخی شاخص‌های هماتولوژیک، بیوشیمیایی و رشد در فیل‌ماهی (*Huso huso*). پایان‌نامه دکتری تخصصی شیلات، دانشگاه تربیت مدرس نور، ۸٦ صفحه.

5.Adham, K.G., Hashem, H.O., Abu-Shabana, M.B., Kamel, A.H., 2000.Vitamin C deficiency in the catfish Clarias gariepinus. *Aquacult. Nutr*. 6, 129-139.

6.Affonso, E.G., Silva, E.C., Tavares-Dias, M., Menezes, G.C., Carvalho, S.M., Nunes, E.S.S., Ituassu, D.R., Roubach, R., Ono, E.A., Fim, J.D.I., Marcon, J.L., 2007. Effect of high level of dietary vitamin C on the blood responses of matrinxa (*Brycon amazonicus*). *Comp. Biochem. Phys. A.* 147, 383-388.

7.Ai, Q., Mai, K., Zhang, C., Xu, W., Duan, O., Tan, B., Liufu, Z., 2004. Effects of dietary vitamin C on growth and immune response of Japanese seabass, (*Lateolabrax japonicus*). *Aquaculture* 242, 489-500.

8.Andrade, J.I.A., Ono, E.A., Menezes, G.C., Brasil, E.M., Roubach, R., Urbinati, E.C., Tavares-Dias, M., 2007. Influence of dietssupplemented with vitamins C and Eon pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. *Comp. Biochem. Phys. A.* 146, 576-580.

9.Azad, I.S., Syama Dayal, J., Poornima, M., Ali, S.A., 2007. Supra dietary levels of vitamins C and E enhance antibody production and immune memory in juvenile milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal) to formalin-killed *Vibrio vulnificus*. *Fish. Shellfish. Immunol*. 23, 154-163.

10.Benfey, T.G., Biron, M., 2000. Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquacalture* 184, 167-176.

11.Chagas, E.C., Val, A.L., 2003. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. *Pesqui. Agropecu. Bras*. 38, 397-402.

12.Chen, C.R., Sun, L.T.Y.H., Chang, C.F., 1995. Characteristics of blood in common carp, *Cyprinus carpo* exposed to two temperatures. *J. Appl. Ichtyol*. 5 (3), 21-31.

13.Chen, R., Lochmann, R., Goodwin, A., Praveen, K., Dabrowski, K., Lee, K.J., 2004. Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). *Aquaculture* 242, 553-569.

14.Cuesta, A., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2002. Natural cytotoxic activity in seabream

Archive of SID
www.SID.ir

(*Sparus aurata L*.) and its modulation by vitamin C. *Fish Shellfish Immunol*. 13, 97-109.
15. Daulray, R., 1988. Development of artificial feeds for finfishes in: *CIBA special publication*. 2 (8), 229-258.
16. Ellise, A.E., 1989. The immunology of teleosts. Bailliere Tindall. pp. 135-152.
17. Green, D.M., Trial, J., Birdsall, H.H., 1998. TNF-a released by comigrating monocytes promotes transendothelial migration of activated lymphocytes. *J. Immunol*. 161, 2481-2489.
18. Halver, J.E., 2002. The vitamins. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), Fish Nutrition. Academic Press, San Diego, CA, pp. 61-141.
19. Hardie, L.J., Fletcher, T.C., Secombes, C.J., 1991. The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 95, 201-214.
20. Hung, S.S.O., Lutes, P.B., Conte, F.S., 1987. Carcass proximate composition of juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Comp. Biochem. Physiol*. 88 (1), 269-272.
21. Hung, S.S.O., 1991. Hand Book of Nutrition Requirement of Finfish, CRS press. pp. 153-160.
22. Hung, S.S.O., Deng, D.F., 2002. Sturgeon, *Acipenser spp.*, In: Webster, C.D., Lim, C., (Eds.), Nutrient Requirements and feeding of finfish for aquaculture, CABI publishing, pp. 344-357.
23. Hung, S., Tu, C., Wang, W., 2007. In vivo effects of adding singular or combined anti-oxidative vitamins and/or minerals to diets on the immune system of tilapia (*Oreochromis hybrids*) peripheral blood monocyte-derived, anterior kidney-derived, and spleen-derived macrophages. *Vet. Immunol. Immunop*. 115, 87-99.
24. Keefe, T., 2001. Ascorbic acid and stable ascorbate esters as sources of vitamin C in Aquaculture Feeds. *ASA Technical Bulletin* 48, 1-9.
25. Kumar, S., Tembhre, M., 1998, Anatomy and physiology of fishes. Vikas Publishing House. PVTLTD, Delhi, 275p.
26. Lee, M.H., Shiau, S.Y., 2002. Dietary vitamin C and its derivatives affect immune responses in grass shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish. Shellfish Immunol*. 12, 119-129.
27. Lenient, M., Atteh, J., Omotosho, J., Madu, C., 2008. Response of *Heterobranchus longifilis* Fingerling to Supplemental Dietary Vitamin *E. J. Fish Aquat*. Sci. 3 (1), 22-30.
28. Lim, C., Klesius, P.H., Li, M.H., Robinson, E.H., 2000. Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish *Ictalurus punctatus* to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Aquaculture* 185, 313-327.
29. Lin, M.F., Shiau, S.Y., 2005. Requirements of vitamin C (L-ascorbyl-2-sulphate and L-ascorbyl-2-polyphosphate) and its effects on non-specific immune responses of grouper (*Epinephelus malabaricus*). *Aquac. Nutr*. 11, 183-189.
30. Lovell, R.T., Miyazaki, T., Rabegnator, S., 1984. Requirement for a-tocopherol by channel catfish fed diets low in polyunsaturated triglycerides. J. *Nutr*. 114, 894-901.
31. Menezes, G.C., Tavares-Dias, M., Ono, E.A., Andrade, J.I.A., Brasil, E.M., Roubach, R., Urbinati, E.C., Marcon, J.L., Affonso, E.G., 2006. The influence of dietary vitamin C and E supplementation on the physiological response of pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture. Comp. *Biochem. Physiol. A*. 145, 274-279.
32. Montero, D., Marrero, M., Izquierdo, M.S., Robaina, L., Vergara, J.M., Tort, L., 1999. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. *Aquaculture* 171, 269-278.
33. Montero, D., Tort, L., Robaina, J., Vergara, M., Izquierdo, M.S., 2001. Low vitamin E in diet reduces stress resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Fish. Shellfish. Immunol*. 11, 473-490.
34. Nakagawa, H., Sato, M., Gatlin, D.M., 2007. Dietary Supplements for the health and quality of cultured fish. CRC press. USA, 220p.
35. National Research Council (NRC), 1993. Nutrient Requirements of Fish. National Academy Press, Washington, DC, USA, 114p.
36. Nussey, G., Vuren, J.H.J., Du Preez, H.H., 2002. The effect of copper and zinc at neutral and acidic pH on the general haematology and osmoregulation of *Oreochromis mossambicus*. *Afr. J. Aquat. Sci*. 27, 61-84.
37. Ortuno, J., Esteban, M.A., Meseguer, J., 1999. Effect of high dietary intake of vitamin C on

Archive of SID
www.SID.ir

non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish. Shellfish Immunol.* 9, 429-443.
38. Ortuno, J., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2003. The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish. Shellfish. Immunol.* 14, 145-156.
39. Palikova, M., Mares, J., Jirasek, J. 1999. Characteristics of leukocytes and thrombocytes of selected sturgean species from intensive breeding. *ACTA. Brono* 68, 259-264.
40. Peterson, D., Vecsei, P., Hochleithner, M., 2006. Threatened fishes of the world: *Acipenser ruthenus Linnaeus*, 1758 (Acipenseridae). *Environ. Biol. Fishes* 2p.
41. Puangkaew, J., Kiron, V., Somamoto, T., Okamoto, N., Satoh, S., Takeuchi, T., Watanabe, T., 2004. Non-specific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. *Fish. Shellfish. Immunol.* 16, 25-39.
42. Roberts, R.J., 2001. Fish pathology. Sounders, London, UK. 472p.
43. Ross, L.G., Ross, B., 1999. Anesthetic and Sedative techniques for aquatic animals, 2nd edn. Blackwell Science, Oxford, UK, pp. 22-57.
44. Rukgauer, M., Neugebauer, R.J., Plecko, T., 2001. The relation between selenium, zinc and copper concentration and the trace elementdependent antioxidative status. *J. Trace Elem. Biol*. 15, 73-78.
45. Sahoo, P.K., Mukherjee, S.C., 2002. Influence of fish dietary α-tocopherol intakes on specific immune response, non-specific immune resistance factors and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immuno compromised Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton). *Aquac. Nutr*. 8, 159-167.
46. Santhakumar, M., Balaji, M., Ramudu, K., 1999. Effect of sublethal concentration of monocrotophos on erythropoietic activity and certain haematological parameters of fish *Anabus testudineus* (Bloch). *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 63, 379-384.
47. Sealey, W.M., Gatlin, D.M.III., 2002. Dietary vitamin C E interact to influence growth and tissue composition of juvenile hybrid striped bass (*Morone chrysops female×M. saxatilis male*) but have limited effect on immune responses. *J. Nutr*. 132, 748-755.
48. Stave, J.W., Roberson, B.S., Hetrick, F.M., 1983. Chemiluminescence of phagocytic cells isolated from the pronephros of striped bass. *Dev. Comp. Immunol*. 7, 269-276.
49. Stoskopf, M.K., 1993. Fish medicine W.B. Sounders Company, USA, 882p.
50. Tengerdy, R.P., 1990. The role of vitamin E in immune response and disease resistance. In: Bendich, A., Chandra, R.K. (Eds.), Micronutrients and Immune Functions. N.Y. Acad. Sci., New York, pp. 24-33.
51. Verlhac, V., Gabaudan, J., Obach, A., Schuep, W., Hole, R. 1996. Influence of dietary glucans and vitamin C on nonspecific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 143, 123-133.
52. Wagner, E.J., Jeppsen, T., Arndt, R., Douglas Routledge, M.D., Bradwisch, Q., 1997. Effect of rearing density upon cutthroat trout hematology, hatchery performance, fin erosion, and general health and condition. *Pro. Fish Cult*. 59, 173-187.
53. Wahli, T., Frischknecht, R., Schmitt, M., Gabaudan, J., Verlhac, V., Meier, W., 1998. Influence of combined vitamin C and E on non-specific immunity and disease resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. *Fish Dis.* 21, 127-137.

Archive of SID

www.SID.ir