ساخت اسید اسکوربیک در سه گونه از ماهیان خاویاری (Acipenseriformes) و نقش آن در پارامترهای کمی رشد

بهرام فلاحتکار*

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

تاریخ دریافت:۸٤/۱۲/٦ تاریخ پذیرش:۸۵/۳/۱٦

چکیده

بسیاری ازمهره داران بدلیل دارا بودن آنزیم L-Gulonolactone oxidase (GLO) در کبد یا کلیه که آخرین مرحله ساخت اسید اسکوربیک را هدایت می کند دارای توانایی ساخت این ویتامین بصورت *de novo* (در درون کلیه) بوده که ماده ای ضروری برای رشد، سلامتی ، شکل گیری استخوان ها و باروری می باشد. با توجه به این امر، رشد ۳ گونه از ماهیان خاویاری با استفاده از مقادیر مختلف ویتامین C مطالعه و مشخص گردید که در تاسماهیان جوان سیبری با استفاده از جیره های فاقد این ویتامین و اضافه کردن $mg\ kg^{-1}$ ۳۰۰ به آن پس از ۱٦ هفته با وجود اختلاف در وزن نهایی، این مقدارمعنی دار نبود ($P\geq0.05$). همچنین در تاسماهی دریاچه ای با استفاده ازمقادیر صفر،۵۰ ،۲۵۰ و ۱۲۵۰ $mg\ kg^{-1}$ نیز اختلافی در رشد و بقا در یک دوره پرورشی ۳۸ روزه مشاهده نگردید ($P\geq0.05$). این در حالی است که پرورش فیل ماهیان جوان با مقادیر ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ٤۰۰، ۸۰۰ و ۱٦۰۰ $mg\ kg^{-1}$ در طی ۱٦ هفته اختلافی را در رشد و وزن نهایی نشان نداده($P\geq0.05$) اما میزان بقا در برخی تیمارها به نسبت سایرین مناسب تر بود ($P\leq0.05$) . نتایج مشخص ساخت بدلیل حضور آنزیم ذکر شده (GLO) در این راسته، ماهیان خاویاری نیازمند به این ویتامین در شرایط عادی نبوده اما بدلیل وجود شرایط متراکم پرورشی، بروز عوامل استرس زا و پاتوژنها، نیازمندی به این ویتامین در ماهیان خاویاری افزایش یافته و لذا این ویتامین می تواند در جیره ماهیان خاویاری در شرایط پرورش مصنوعی بکار رود که علاوه بر تجمع بافتی قادر است نقش یک ماده ضد اکسیدانت را علیه رادیکالهای آزاد به عهده داشته باشد.

واژه های کلیدی: اسید اسکوربیک ، ماهیان خاویاری، پرورش مصنوعی

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۹۱۲۲۰۳۷٤۲۸، پست الکترونیکی: falahatkar@guilan.ac.ir

مقدمه

ال- آسکوربیک اسید (AA، ویتامین C) در حیوانات از D- گلوکز و یا D- گالاکتوز بعنوان بخشی از مسیر گلوکورونیک اسید ساخته می شود. این فرآیند شامل سه مرحله است: (الف) لاکتونیزه شدن آنزیمی ال- گلونیک اسید توسط ال- گلونولاکتون هیدرولاز کاتالیز می‌شود (ب) اکسیده شدن ال گلونوکتون توسط ال – گلونولاکتون اکسیداز (GLO) کاتالیز می‌گردد (ج) ایزومریزه شدن خود به خودی – ۲- کتو- ال-گلونولاکتون به AA منتهی می‌گردد (٤). بنابراین حیواناتی که فاقد GLO باشند قادر به ساخت AA نبوده و وابسته به منبع ویتامین C در جیره می‌باشند (۲۷).

بیشتر مهره‌داران عالی، با توجه به دارا بون GLO قادر به ساخت AA در کبد یا کلیه و یا در هر دو بافت می‌باشند (۱و۲).

خزندگان و دوزیستان دارای فعالیت GLO در کلیه بوده و در پرندگان در برخی گونه‌ها این توانایی وجود ندارد اما در برخی گونه‌های گنجشک‌سانان (۱۲ گونه) و غیر گنجشک‌سانان (۱۱ گونه) این آنزیم در کلیه و یا کبد وجود

Archive of SID
www.SID.ir

دارد (٦). در بین پستانداران نیز برخی میمونها، خوکچه هندی و خفاشها قادر به ساخت AA نمی‌باشند (٦).

در ماهیها نیز، لامپریها، ماهیان خاویاری و ماهیان پاروپوزه، کوسه‌ها و سپرماهیان و ماهیان دودمی بدلیل حضورGLO در کلیه توانایی ساخت AA مشاهده می‌گردد اما بدلیل عدم حضور آنزیم ذکر شده در ماهیان استخوانی (Teleostei) این ماهیان قادر به ساخت AA در کلیه نمی‌باشند (۱۳،۱۸،۲۰و۲۱).

اهمیت AA در تغذیه ماهیان برای اولین بار توسط Mc Laren و همکاران در سال ۱۹٤۷ (۱۵) گزارش شد که توقف رشد و پاتولوژی را در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بررسی نمودند. از آن زمان مطالعات متعددی نشان داده است که ماهیان استخوانی قادر به ساخت این ماده مغذی ضروری نبوده و در صورت عدم وجود آن، علایمی نظیر کاهش رشد، تغییر شکل ستون فقرات، خونریزی، کم خونی، افزایش تیروزین خون (Hyperthyrosinemia)، کاهش سرعت بهبود زخم و حساسیت به عوامل عفونی رخ می دهد (۱۰).

در هر حال با توجه به رشد و توسعه آبزی پروری اطلاعات کمی در خصوص نیازمندیهای غذایی ماهیان منجمله ماهیان خاویاری وجود دارد (۱۱). در حال حاضر مشخص شده است که ماهیان استخوانی- غضروفی (Chondrostei) نظیر Acipenseridae توانایی ساخت این ویتامین را دارند (٦). لذا این مطالعه با هدف بررسی اثر ویتامین C در جیره غذائی، بر سه گونه از ماهیان راسته Acipenseriformes بعنوان گونه های مثبتی دارای توانایی ساخت AA طراحی شده است. همچنین علائم کمبود این ویتامین، اثر آن بر پارامترها و عملکرد رشد، مقدار ذخیره‌سازی و فعالیت GLO نیز مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

تاسماهی دریاچه‌ای(*Acipenser fulvescens*) بوزن متوسط ۸۹ ± ۲۵۳ گرم به تعداد ۸ عدد ماهی در هر مخزن (٤ تیمار و ۳ تکرار، مجموعاً ۱۲ مخزن) با حجم٤۰۰ لیتر معرفی شدند. طول دوره پرورش ۳۸ روز بود و غذای پایه شامل کازئین، ژلاتین، دکسترین، نشاسته ذرت، سفیده تخم مرغ، روغن کبد ماهی کاد، لسیتین، روغن ذرت و سایر افزودنیها (۱٦ و ۲۰) بمقدار ۱/۳-۱/۱ درصد بیوماس بصورت ۳ بار در روز به ماهیان داده شد. دمای آب در طول دوره ۱۹/۸±۰/٤ درجه سانتی گراد تنظیم گردید. جیره‌های ساخته شده شامل مقادیر صفر ، ۵۰، ۲۵۰، ۱۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C از نوع (Phospitan C, Showa Denko, K. K., N.Y) Ascorbyl-2-monophosphate Mg بود. جهت نمونه‌برداری از صید تصادفی ۲ ماهی به ازای هر مخزن استفاده شد. برای تعیین مقدار اسید اسکوربیک از بخش ابتدایی کلیه و جهت تعیین GLO از بخش انتهایی کلیه استفاده گردید.

تاسماهی سیبری(*Acipenser baeri*)بوزن متوسط۰/۵±۲۵/۵ گرم به تعداد ۱۳۰ عدد ماهی در هر مخزن به ابعاد ۰/۵×۱/۵×۱/۵ متر(۳ تیمار و ۲ تکرار، مجموعاً ٦ مخزن) بررسی شد. طول دوره پرورش ٤ ماه بود و غذای مورد استفاده از نوع تجاری و در حد اشباع بصورت ۲ بار در روز به ماهیان داده شد. دمای آب در طول دوره به مقدار ثابت ۱۸ درجه سانتی گراد اندازه‌گیری گردید. جیره‌های ساخته شده شامل مقادیر صفر، ۳۰۰ میلی گرم در کیلوگرم ویتامین C از نوع (F. Hoffman-La Roche Inc, Basel, Switzerland) Ascorbyl-2-polyphosphate=AP و ۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C از نوع پوشش‌دار با سیلیکون (silicone coated AA=SC) بود. جهت نمونه‌برداری و تعیین مقدار AA در کبد و کلیه، ۳ ماهی بطور تصادفی و جهت تعیین GLO از ۳-۱ ماهی صید شده استفاده گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

فیل ماهی (*Huso huso*) به وزن متوسط ۰/۵ ± ۳۸/۱ گرم به تعداد ۵۵ عدد ماهی در هر مخزن به ابعاد ۰/٤۵×۲×۲ متر (٦ تیمار و ۳ تکرار، مجموعاً ۱۸ مخزن) بررسی شد. طول دوره پرورش ٤ ماه بود و غذای پایه به مقدار ۳-۱ درصد وزن بیوماس بصورت ٤ بار در روز به ماهیان داده شد. دمای آب در طول دوره پرورش ۳/۷ ± ۲۰ درجه سانتی گراد تنظیم گردید. جیره‌های ساخته شده شامل مقادیر صفر، ۱۰۰، ۲۰۰، ٤۰۰، ۸۰۰ و ۱٦۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C از نوع اسکوربیل-۲-پلی فسفات (F.Hoffman-La Roche, Inc. Basel, Switzerland) بود. جهت نمونه‌برداری از صید ٦ عدد ماهی بطور تصادفی به ازای هر تانک استفاده، و بافتهای کبد و کلیه پس از استخراج تا تعیین مقدار AA در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

لازم به ذکر است بخش پرورش تاسماهیان در دانشکده منابع طبیعی دانشگاه اوهایو و پرورش فیل ماهی در انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری و آنالیز نمونه ها نیز در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و دانشکده منابع طبیعی دانشگاه اوهایو طی سالهای ۱۳۸۲ الی ۱۳۸٤ انجام گردید.

تعیین پارامترهای رشد: پارامترهای رشد شامل وزن متوسط، نرخ رشد ویژه، و نرخ کارایی پروتیین است که برای اندازه گیری آنها از توزین دوره ای کلیه ماهیان موجود در مخزن (هر ٤-۲ هفته) پس از بیهوشی ماهیان با مواد بیهوش کننده(MS_{222}) استفاده شد، در نهایت وزن متوسط، بازماندگی، نرخ رشد ویژه (SGR)، نرخ کارایی پروتیین (PER) و شاخص کبدی (HSI) در ماهیان مذکور از طریق روابط زیر محاسبه گردید:

$$\text{Specific Growth Rate (SGR)} = \frac{\text{Ln Final Weight} - \text{Ln Initial Weight}}{\text{Days}} \times 100$$
میزان رشد ویژه

$$\text{Hepatosomatic Index (HSI)} = \frac{\text{Liver Weight}}{\text{Body Weight}} \times 100$$
شاخص کبدی

$$\text{Protein Efficiency Ratio (PER)} = \frac{\text{Wet Weight Gain}}{\text{Protein Intake}} \times 100$$
نرخ کارایی پروتین

تعیین مقدار اسید اسکوربیک: جهت تعیین مقدار کل (Total ascorbic acid=) TAA در بافتهای مختلف از روش ۲و٤-دی نیتروفنیل هیدرازین (DNPH) کلرومتریک استفاده گردید (۷). بافتها را پس از هموژنه کردن در محلول حاوی تری کلرواستیک اسید (TCA) ۵ درصد، اسید هیپوکلریک ۲۵۰ میلی مولار، و ۰/۰۸ درصد EDTA در دمای ٤ درجه سانتی گراد با دور ۱۵۰۰۰ بمدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد، مایع رویی (supernatant) جمع آوری و از آن برای اندازه گیری TAA با افزودن دی کلرواینداوفنول(DCIP) ، انکوبه کردن بمدت ۲۰ دقیقه، قرار دادن در حمام آبی ٦۰ درجه سانتی گراد بمدت ۳ ساعت وخواندن جذب توسط اسپکتروفتومتر در طول موج nm ۵۲٤ انجام شد.

همچنین مقدار TAA در بافت تاسماهیان بزرگ با استفاده از HPLC مدل Waters و دتکتور Electrochemical، پس از اضافه کردن محلول استخراج کننده شامل (1 mM) EDTA ، متافسفریک اسید ۱ درصد و اسید استیک ۰/۱ درصد، هموژن کردن، سانتریفوژ با دور ۱۲۰۰۰ بمدت ۵ دقیقه و عبور مایع رویی از کارتریج C-18 و تزریق به دستگاه گردید (۲۳).

تعیین مقدار فعالیت ال-گلونولاکتون اکسیداز: مقدار فعالیت GLO (L-gulonolactone oxidase) با اندازه گیری مقدار اسکوربات با روش کلرومتریک تعیین شد (۵). ۲۰۰ میکرولیتر از آنزیم آماده شده (و یا نمونه ها) ٦۵۰ میکرولیتر بافر فسفات (pH= ۷/٤)، ۵۰ میکرولیتر از محلول ۵۰ میلی مولار گلوتاتیون و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۱۰۰ میلی مولار ال-گلونولاکتون در ۲۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد. ٤۰۰ میکرولیتر از مخلوط انکوبه شده در زمان صفر و سایر زمان‌ها بعد از ۲ ساعت برداشته و به آن ٤۰۰ میکرولیتر از محلول حاوی TCA ۵ درصد، اسید هیپوکلریک ۲۵۰ میلی مولار و ۰/۰۸درصد EDTA اضافه نموده تا فعالیت آنزیم متوقف گردد، سپس نمونه ها را در

Archive of SID
www.SID.ir

طول موج ٤٤٠nm خوانده و به این ترتیب فعالیت GLO بصورت نانومول اسید اسکوربیک در میلی‌گرم محلول پروتئین در ساعت تعیین گردید (۲۰).

تجزیه و تحلیل آماری: جهت تجزیه و تحلیل آماری پس از اطمینان از همگنی داده ها، از نرم افزار SPSS نسخه ۱۲ (Chicago, IL, USA) استفاده گردید. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و تستLSD به عنوان Post hoc، جهت مقایسه میانگین‌ها با سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

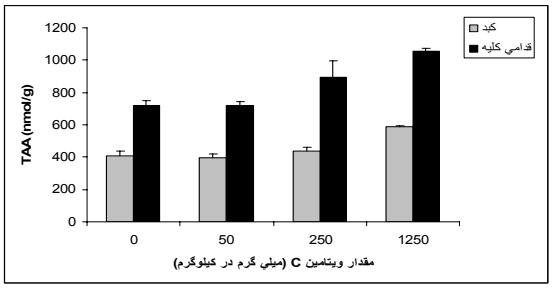
تاسماهی دریاچه‌ای: پس از ۳۸ روز پرورش هیچ اختلاف معنی داری ($P\geq0.05$) در وزن نهایی، SGR و HSI ملاحظه نشد (جدول ۱). همچنین میزان بقا در این ماهیان ۱۰۰ درصد بوده و هیچ عارضه پاتولوژیک در ماهیان تغذیه شده با جیره فاقد ویتامین C مشاهده نگردید.

جدول ۱- تأثیر مقادیر مختلف ویتامین C بر وزن ، SGR و HSI در تاسماهی دریاچه‌ای پرورشی (پس از ۳۸ روز)

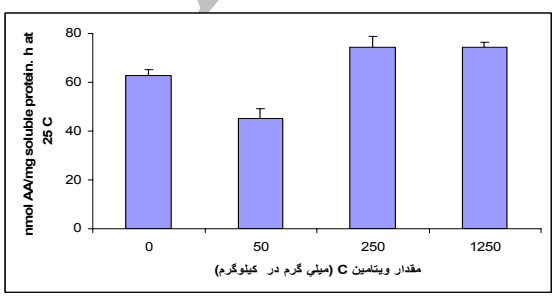
مقدار ویتامینC (mg/kg)	وزن ابتدایی (g)	وزن نهایی (g)	SGR (%/day)	HSI (%)
۰	۳۲۰/۲ ± ٤۰/۳	۵۸۲/۳±۷٤/۲	۱/٦±۰/۱	۳±۰/۱
۵۰	۳٦۱/۲ ±۵٤/۱	٦۳۹/۲±۹٤/۵	۱/۵±۰/۱	۲/۹±۰/۲
۲۵۰	۳٤۳/۷±۵۲/۸	٦۰۳±۷۵/۱	۱/۵±۰/۱	۳±۰/۱
۱۲۵۰	۲۷٦/۸±۲۱/٤	۵۲٦/۵±٤۳	۱/۷±۰/۱	۳±۰/۱

مقدار TAA نیز در کبد و قسمت قدامی کلیه در ماهیان تغذیه شده با مقدار ۱۲۵۰ میلی گرم در کیلوگرم AA بطور معنی‌داری با بیشتر دزها اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P\leq0.05$) (نمودار ۱).

مقدار GLO نیز در بخش انتهای کلیه ۲۵۰ و ۱۲۵۰ میلی گرم در کیلوگرم است که با سایرین اختلاف معنی‌داری را نشان نمی دهد ($P\leq0.05$) (نمودار ۲).



نمودار ۱- مقدارTAA در بافتهای کبد و قدامی کلیه در تاسماهی دریاچه‌ای تغذیه شده با مقادیر مختلف ویتامین C



نمودار ۲- فعالیت آنزیم GLO در تاسماهی دریاچه‌ای تغذیه شده با مقادیر مختلف ویتامین C

Archive of SID
www.SID.ir

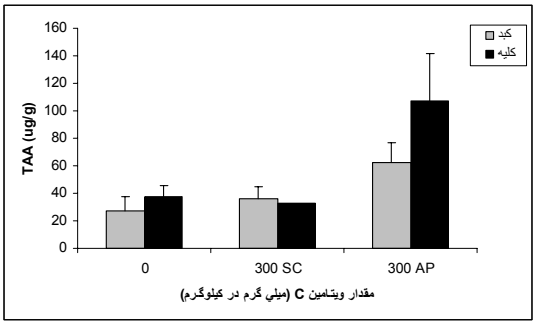
تاسماهی سیبری: پس از ۱۲۰ روز پرورش هیچ اختلاف معنی‌داری در وزن نهایی، SGR و PER مشاهده نشد ($P\geq0.05$) (جدول ۲). میزان بقا در کلیه گروهها برابر ۹۸ درصد بود و هیچ علائم ماکروسکوپیک در ماهیان تغذیه شده با جیره فاقد ویتامین C مشاهده نگردید.

جدول ۲- تاثیر مقادیر مختلف ویتامین C بر وزن نهایی، SGR و PER در تاسماهی سیبری پرورشی (پس از ۱۲۰ روز)

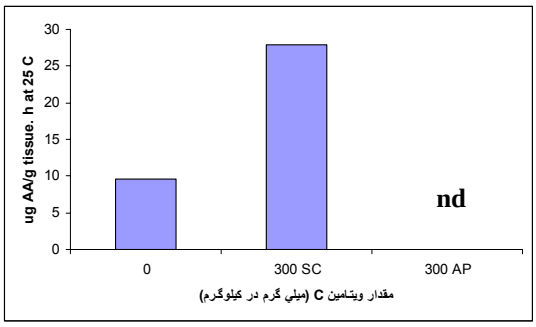
مقدار ویتامین C (mg/kg)	وزن نهایی (g)	SGR (%/day)	PER
۰	۱۸۸/۵ ±۵	۰/۸۷	۲/۲
۳۰۰ (SC)	۱۹٦/۸±٦/۸	۰/۹۰	۲/۲
۳۰۰ (AP)	۱۹۵/۱±۲/۳	۰/۸۷	۲/۲

مقدار TAA نیز در بافت کلیه ۳۰۰ میلی گرم در کیلوگرم AP است که با سایر مقادیر اختلاف آن معنی‌دار می باشد *($P\leq0.05$)*. همچنین در بافت کبد همه مقادیر اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند *($P\leq0.05$)* (نمودار ۳).

مقدار GLO نیز در فقدان ویتامین C ، در حداقل مقدار، و به میزان ۹/٦ میکروگرم AA در گرم بافت می باشد (نمودار ٤).



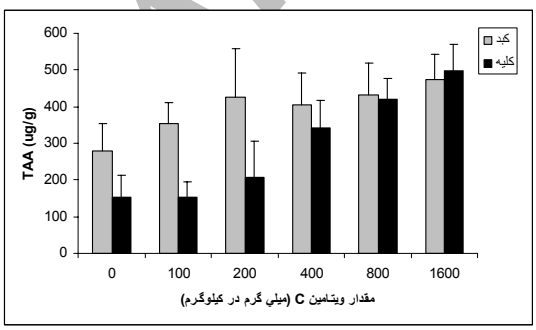
نمودار ۳- مقدارTAA در بافتهای کبد و کلیه در تاسماهی سیبری تغذیه شده با مقادیر و انواع مختلف ویتامین C



نمودار ٤- مقدار فعالیت آنزیم GLO در تاسماهیان سیبری تغذیه شده با مقادیر مختلف ویتامین C ، nd: تعیین نشده

فیل ماهی: پس از ۱۲۰ روز پرورش اختلاف معنی‌داری در وزن نهایی، SGR، PER و HSI مشاهده نگردید (جدول ۳). میزان بقا در تیمارهای مختلف از حداقل۹۳/۳ درصد در سطح صفر تا حداکثر ۹۷/٦ درصد در سطح ۲۰۰ میلی گرم در کیلوگرم متغیر بود اما هیچ علامت ماکروسکوپیک و عارضه پاتولوژیک در ماهیان تغذیه شده با جیره فاقد ویتامین C مشاهده نشد.

مقدار TAA نیز در کبد و کلیه در ماهیان تغذیه شده با مقدار ۱٦۰۰ میلی گرم در کیلوگرم در بیشترین مقدار و در سطح صفر کمترین مقدار را دارد، و تفاوت بین مقادیر مختلف معنی‌دار است ($P\leq0.05$) (نمودار ۵).



نمودار ۵- مقایسه مقدار TAA در بافتهای کبد و کلیه فیل ماهی تغذیه شده با مقادیر مختلف ویتامین C

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۳- تأثیر مقادیر مختلف ویتامین C بر وزن، SGR ، PER و HSI در تاسماهی پرورشی (پس از۱۲۰ روز)

مقدار ویتامین C (mg/kg)	وزن ابتدایی (g)	وزن نهایی (g)	SGR (%/day)	PER	HSI (%)
۰	۳۸ ±۰/۹	۲٦۸/۲ ±٤/٤	۲/٤۱	۲/۱۳	۳/٥۲±۰/٤
۱۰۰	۳۷/۸±۰/٥	۲٥۸/٦±۱۱/۱	۲/٤۰	۲/۱۰	۳/۸۳±۰/٤
۲۰۰	۳۸/۳±۰/۸	۲۷٤/۳±۸/۷	۲/٤۲	۲/۱٥	۳/۸٥±۰/٥
٤۰۰	۳۷/۹±۰/۱	۲٦٦/۱±٤/۹	۲/٤۱	۲/۰۸	۳/٥۲±۰/٦
۸۰۰	۳۸/٤±۰/٥	۲۷۸/۹±۱۹/۲	۲/٤۳	۲/۱٥	۳/۸٥±۰/٦
۱٦۰۰	۳۸/۲±۰/٤	۲۷۹±۱۱/۱	۲/٤۳	۲/۱۷	۳/۸۹±۰/٦

بحث

نتایج نشان می‌دهند هیچ یک از مقادیر مختلف ویتامین *C*، اثر معنی‌داری در پارامترهای رشد در هر سه گونه مطالعه شده ندارد. این در حالی است که در بسیاری از گونه‌های ماهیان استخوانی افزایش رشد با استفاده از ویتامین C کاملاً مشهود و دارای اثر معنی‌داری است بگونه‌ای که این امر در بسیاری از ماهیان نظیر طوطی ماهی، قزل آلا مشاهده می‌گردد (٦). مهمترین دلیل عدم تفاوت در رشد ماهیان خاویاری حضور آنزیم GLO بعنوان آنزیم کلیدی جهت تولید AA می باشد چرا که حتی در صورت عدم وجود ویتامین C درجیره، مقدار مورد نیاز آن توسط این آنزیم بصورت *de novo* (ساخت در بافت کلیه) ساخته شده و مورد مصرف ماهی در شرایط طبیعی قرار می‌گیرد. همچنین توانایی ساخت این ویتامین توضیحی بر عدم وجود علائم اسکوربیوتیک (کمبود یا فقدان این ویتامین) در ماهیان تغذیه شده با جیره فاقد AA است. در مطالعه‌ای که مورو و همکاران (۲۱) بر روی تاسماهی دریاچه‌ای و با استفاده از مقادیر صفر و ۱۲٥۰ میلی گرم در کیلوگرم بمدت ۷ هفته انجام دادند نیز فقدان اختلاف در رشد را تأئید می کند ولی مقدار ویتامین C موجود در کلیه تحت تأثیر جیره می باشد. در پرورش هیبرید تاسماهی سیبری و استرلیاد *(Acipenser ruthenus × A. baeri)* پس از ۸ هفته پرورش، اختلاف معنی‌داری در پارامترهای رشد دیده نشد ولیکن اثر خفیف مثبتی با استفاده از مقادیر بالاتر این ویتامین ملاحظه گردید که معنی‌دار نبود (*P≥0.05*) (۲٥). این مورد پس از ۱٦ هفته پرورش نیز تأثیری بر پارامترهای رشد نداشت. همچنین اثر کمبود این ویتامین در ماهیان تغذیه شده با غذای فاقد ویتامینC ملاحظه نشد ولیکن در هفته هشتم مقدار کلاژن درسطح صفر کمتر بوده و با سایر مقادیر اختلاف معنی‌داری را نشان داد (۲٦) چرا که ویتامین C بعنوان یک کو-آنزیم در هیدروکسیلاسیون پرولین به هیدروکسی پرولین عمل می‌کند (۱٤).

با توجه به سن بلوغ بالای ماهیان خاویاری و همچنین اثر مثبت این ویتامین بر کیفیت و کمیت ماهیان مولد (۸) ممکن است این ماده مغذی در زمان قبل از تولید مثل تأثیر بیشتری داشته باشد گو اینکه بنظر می رسد با توجه به نتایج کسب شده از بسیاری از تحقیقات، مدت زمان لازم جهت بروز اثرات مثبت این ویتامین در رشد ماهیان خاویاری باید بیشتر در نظر گرفته شود (مذاکرات شخصی ,Dabrowski).

با استفاده از دو نوع AA مورد استفاده در تغذیه تاسماهی سیبری نیز مشخص گردید که SC و AP دارای دسترسی

Archive of SID

www.SID.ir

زیستی یکسانی نمی‌باشند و نوع AP بر پایه نتایج کسب شده خصوصاً غلظت TAA، بهتر مورد استفاده ماهیان قرار گرفته و یا در مراحل فرآوری غذا و ذخیره سازی مقاومتر است.

در خصوص مقدار کل ویتامین C ذخیره شده در بافتهای کبد و کلیه، مقدار این ویتامین در قسمت قدامی کلیه بیشتر از کبد بوده ولیکن در صورتیکه کل کلیه (قسمت قدامی و خلفی کلیه) جهت تعیین مقدار TAA در نظر گرفته شود این مقدار کمتر از کبد می‌باشد. با تعیین TAA در بافتهای مختلف تاسماهی سیبری نیز مشخص شده است مقدار این ماده در بافت کبدی کمتر از بافتهای کلیه و قسمت انتهایی روده است (۱۷). در مطالعه انجام شده توسط مورو و دابروسکی (۱۷) مشخص شد مقدار TAA در بخش قدامی کلیه بیشتر از بخش خلفی در تاسماهی سفید، گربه ماهی جویباری و قزل‌آلای رنگین کمان می‌باشد. همچنین در برخی آزاد ماهیان نیز این امر قبلاً گزارش شده است (۹). علت این امر وجود بافت کورتیکال و کروماتین در بخش قدامی کلیه می باشد که بعنوان محلی جهت ذخیره‌سازی اسکوربات تلقی می‌گردد. در حالیکه مشخص شده است بخش خلفی کلیه در ماهی خاویاری محل تمرکز ساخت GLO است (۱۷). مطالعه حاضر مشخص ساخت که با استفاده از مقادیر بیشتر ویتامین C در جیره، مقدار تجمع TAA در بافتهای مختلف افزایش و به یک حد ثابت در دوزهای بالاتر رسیده و بعبارت دیگر بحالت اشباع خود نزدیک می‌گردد.

یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهند فعالیت GLO مشابه مطالعات قبلی در مورد تاسماهی دریاچه‌ای و تاسماهی سفید می باشد که مشخص کننده سنتز AA توسط ماهیان خاویاری است (۵). این مطالعه نشان می‌دهد که با افزایش یا کاهش ویتامین C جیره، تغییر چندانی در مقدار فعالیت GLO رخ نمی دهد این در حالی استکه با استفاده از ویتامین C در تغذیه موش، مقدار فعالیت این آنزیم کاهش یافته و بازخورد منفی بر ساخت AA دارد (۲۸). بطور کلی در تمام ماهیان غیر استخوانی باله شعاعی (actinopterygian) فعالیت GLO وجود داشته، بنابراین قادربه ساخت AA در بافت کلیه می‌باشند. بنظرمی‌رسد ماهیان استخوانی مسیر ساخت AA را در ۲۱۰-۲۰۰ میلیون سال قبل و در اواخر دوره تریاس از دست داده‌اند. این درحالی است که ماهی‌ها قبل از مهره‌داران خشکیزی قادر به ساخت AA بوده‌اند (۱۸ و ۱۹).

اصولاً نیاز به ویتامین بر اساس وزن کسب شده (Weight gain)، عدم وجود علائم کمبود، فعالیتهای آنزیمی مرتبط، یا ذخیره ویتامین C بافتی تعیین می‌گردد. عموماً، نیازمندیهای تعیین شده بر پایه وزن کسب شده، کمتر از نیازمندیهای حاصله از فعالیت آنزیمی و اطلاعات ذخیره بافتی است. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می دهد مکملهای جیره غذایی جهت رشد بیشتر دارای اثرات مثبت بر پاسخ ایمنی و مقاومت ماهی به بیماریها می‌باشد (۲٤). بعنوان مثال در نظر گرفتن مکمل جیره تا ۸ برابر جهت تولید گامتهای با کیفیت بالا در قزل‌آلای رنگین کمان مفید است (۳ و ۸).

شاید کسب اطلاع در خصوص تعداد مورد نیاز ویتامین C جهت سلامتی مطلوب را بتوان با نگاهی به غلظت AA در بافتهای ماهیان در شرایط طبیعی (وحشی) بدست آورد. در این حالت ماهیانی که قادر به ساخت AA هستند آشکارا نسبت به ماهیان مستعد اسکوروی (بیماری ناشی از کمبود ویتامین C) دارای مزیت بوده چرا که قادرند علاوه بر ساخت درونی ویتامین C ، آنرا از محیط خارج (تغذیه) نیز کسب نموده و در بدن ذخیره نمایند. حداکثر میزان ذخیره سازی بافتها در ماهیان وحشی، با توان ساخت AA ، مشابه حد مطلوب AA تا رسیدن به اپتیمم سلامت در ماهیان استخوانی است که کاملاً وابسته به منبع جیره می باشد. هنگامیکه این امر در ماهیان استخوانی بررسی گردید غلظت TAA در کبد ماهی باله کمانی (*Amia calva*)

Archive of SID

www.SID.ir

(۱۷۳±۲۰µg/g) و گار پوزه دراز (*Lepisosteus osseus*) (۹٦±۱۲µg/g) سالم که در محیط وحشی صید شده اند در مقایسه با ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تغذیه شده با ۲٤۰ppm اسکوربیل -۲- مونوفسفات Mg (۱۰٦±۹µg/g) و ۳۲۰ppm اسکوربیل -۲- پلی‌فسفات (۹۰±۱۹µg/g) بنظر بهتر می‌رسید. همچنین با توجه به مقدار TAA موجود در طحال ماهی باله کمانی (۱۷۲±۲۵µg/g) و گارپوزه دراز (۱۷۷±۷µg/g)، باید کپور معمولی با جیره حاوی ۵۰۰mgAA/kg تغذیه واقع شود (۵).

یک ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با وزن یک کیلوگرم نگهداری شده در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد، تغذیه شده بازاء یک درصد وزن خود از جیره غذائی حاوی ۱۰۰mgAA/kg (۲۲) غذا روزانه ۱mg اسکوربیک اسید وارد سیستم گوارش می نماید (۲۰). در حالی که اولاً نیازمندی ویتامین C در قزل‌آلا و تاسماهی از نظر مقدار تقریباً برابر بوده و ثانیاً ماهیان جوان خاویاری قادر به ساخت این ویتامین بوده و بنابراین نیاز به منبع خارجیAA ندارند (۲۰). از آنجا که پارامترهای زیست محیطی(۳۰) ، استرس (۱۲) و پاتولوژیها (۲۹) می‌تواند نیاز به ویتامین C را در ماهیان استخوانی بطور معنی‌داری افزایش دهد این ذهنیت نیز بوجود خواهد آمد که تحت این شرایط نیاز به AA در تاسماهی افزایش خواهد یافت. مورو و همکاران (۲۰) عقیده دارند در این شرایط تاسماهی می‌تواند با ساخت بیشترAA به این نیاز پاسخ دهند اما این مورد هنوز ثابت نشده است. مقایسه این اطلاعات مشخص می‌سازد که سطح‌مطلوب ویتامین C مورد نیاز در جیره‌های ماهیان استخوانی درمحدوه شناخته شده اشباع شدن بافتها (کبد و طحال) با AA می‌باشد. این در حالی‌است که این مقادیر چند برابر بیش از اطلاعات منتشر شده در خصوص نیازمندی ویتامین C در ماهیان استخوانی (NRC ;۵۰-۱۰۰mgAA/kg) است.

در عمل، اندازه‌گیری فعالیت GLO و محاسبه میزان ساخت AA در تاسماهی نگهداری شده در شرایط ویژه آزمایشگاهی می‌تواند بعنوان یک شاخص بیوشیمیایی جهت تشخیص این فاکتورها و پیش‌بینی نیازمندیهای AA در ماهیان استخوانی در نظر گرفته شود.

لذا با توجه به شرایط موجود در مزارع پرورشی نظیر تراکم، کاهش کیفیت آب، وجود برخی پاتوژنها و سایر عوامل که بعنوان عوامل استرس زا عمل می‌نماید، وجود منبع ویتامین C خارجی (جیره) می تواند در پرورش ماهیان خاویاری در نظر گرفته شود تا از برخی جنبه‌های مثبت آن استفاده شود.

تشکر و قدردانی: لازم می دانم مراتب سپاس و قدردانی خود را از دکتر دابروسکی از دانشگاه ایالتی اوهایو در مدت فرصت مطالعاتی و از دکتر مورو اعلام نمایم. همچنین از همکاران عزیز در انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری و دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران نیز تشکر می نمایم.

منابع

1- Birney, E. C., Jenness, R., and Hume, I. D. 1979. Ascorbic acid biosynthesis in the mammalian kidney. Experientia 35: 1425-1426.

2- Birney, E. C., Jenness, R., and Hume, I. D. 1980. Evaluation of enzyme system: Ascorbic acid biosynthesis in monotremes and marsupials. Evolution 34: 230-239.

3- Blom, J. H., and Dabrowski, K. 1995. Reproductive success of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to graded dietary ascorbyl monophosphate lavels. Biology of reproduction 52: 1073-1080.

4- Chatterjee, I. B., Chatterjee, G. C., Ghosh, N. C., Ghosh, J. J., and Guha, B. C. 1960. Biological synthesis of L-ascorbic acid in animal tissues: Conversation of L-gulonolactone into L-ascorbic acid. Biochem. J. 74: 193.

5- Dabrowski, K. 1990. Gulonolactone oxidase is missing in teleostean fish-the direct

Archive of SID
www.SID.ir

spectrophotometric assay. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 371: 107-114.

6- Dabrowski, K. 2001. Ascorbic acid in aquatic organisms. CRC press. 288p.

7- Dabrowski, K., and Hinterleitner. S. 1989. Applications of a simultaneous assay of ascorbic acid, dehydroascorbic acidand ascorbic sulphate in biological materials. Analyst, 114: 83-87.

8- Dabrowski, K., and Ciereszko, A. 2001. Ascorbic acid and reproduction in fish: endocrine regulation and gamete quality. Aquaculture research 32: 623-638.

9- Fontaine, M., and Hatey, J. 1954. Teneur en acide ascorbique de 1'interrenal des poisons(selaciens et teleosteens). Bulletin de1'Institut Oceanographique 51: 1-7.

10- Halver, J. E. 2002. The vitamins. In: Fish nutrition, Halver, J. E., Hardy, R. W. (Ed.). Academic Press. 62-141.

11- Hung, S. S. O., and Deng, D. F. 2002. Sturgeon, *Acipenser* spp. In: Nutrient requirement and feeding of finfish for aquaculture. Webster, C. D and Lim, C. (Ed.). CABI publishing, 344-357.

12- Lovell, R. T., and Lim, C. 1978. Vitamin C in pond diets for channel catfish. Transaction American Fisheries Society 107: 321-325.

13- Mæland, A., and Waagbø, R. 1998. Examination of qualitative ability of some cold water marine teleosts to synthesis ascorbic acid. Comp. Biochem. Physiol. A, 121: 249-255.

14- Matusiewicz, M., and Dabrowski, K. 1996. Utilization of bone/liver alkaline phosphatase activity ratio in blood plasma as indicator of ascorate deficiency in salmonid fish. Experimental Biology of Medicine 212: 44-51.

15- McLaren, B. A., Keller, E., O'Donnell, D. J., and Elvehjem, C. A. 1947. The nutrition of rainbow trout. I. Studies of vitamin requirements. Arch. Biochem. Biophys. 15: 169-178.

16- Moreau, R., and Dabrowski. K. 1996. Feeding stimulation in semipurified diets for juvenile lake sturgeon, *Acipenser fulvescens* Rafinesque. Aquacult. Res. 27: 953-957.

17- Moreau, R., and Dabrowski. K. 1996. The primary localization of ascorbate and its synthesis in the kidneys of acipenserids (*Chondrostei*) and teleost (*Teleostei*) fishes. J. Comp. Physiol. B, 166: 178-183.

18- Moreau, R., and Dabrowski. K. 1998. Fish acquired ascorbic acid synthesis prior to terrestrial vertebrate emergence. Free Radical Biology and Medicine, Vol. 25: No. 8, 989-990.

19- Moreau, R. and K. Dabrowski. 2000. Biosynthesis of ascorbic acid by extant actinopterygians. Journal of Fish Biology 57: 733-745.

20- Moreau, R., Dabrowski, K., and Sato, P. H. 1999. Renal L-gulono- 1 , 4- lactone oxidase activity as affected by dietary ascorbic acid in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). Aquaculture 180: 250-257.

21- Moreau, R., Dabrowski, K., Czesny, S., and Chila, F. 1999. Vitamin C-vitamin E interaction in juvenile lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*), a fish able synthesize ascorbic acid. J. Appl. Ichthyol. 15: 205-257.

22- National Research Council. 1993. Nutrient requirement of fish. National Academy Press, Washington DC, 114p.

23- Nelis, H. J., De Leenheer, A. P., Merchie, G., Lavens, P., and Sorgeloos, P. 1997. Liquid chromatographic determination of vitamin C in aquatic organisms. J. Chromatography. Sci. 35: 337-341.

24- Ortuño, J., Esteban, M. A., and Meseguer, J. 1999. Effect of high dietary intake of vitamin C on non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish and Shellfish Immunology 9: 429-443.

25- Papp, Zs. Gy., Jeney, Zs., and Jeney, G. 1995. Comparative studies on the effect of vitamin C feeding of European catfish (*Silurus glanis* L.) and sturgeon hybrid (*Acipenser ruthenus* L. X *Acipenser baeri* L.). J. Appl. Ichthyol . 11: 372-374.

26- Papp, Zs. Gy., Saroglia, M., Jeney. Zs., Jeney, G., and Terova, G. 1999. Effects of dietary vitamin C on tissue ascorbate and collagen status in sturgeon hybrids (*Acipenser ruthenus* X *Acipenser baeri*). J. Appl. Ichthyol. 15: 258-260.

27- Sato, P., Nishikimi, M., and Undefriend, S. 1976. Is L-gulonolactone-oxidase the only enzyme missing in animals subjects to scurvy? Biochem. Biophys. Res. Com.. 71, 293.

28- Tsao, C. S., and Young, M. 1990. Enzymatic formation of ascorbic acid in liver homogenate of mice fed dietary ascorbic acid. In Vivo 4, 167-170.

29- Wahli, T., Frischknecht, R., Schmitt, M., Gabaudan, J., Verlhac, V., and Meier, W. 1995. A comparison of the effect of silicone coated ascorbic acid and ascorbyl phosphate on the course of ichthyophthiriosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Dis. 18: 347-355.

Archive of SID

www.SID.ir

30- Wise, D. J., Tomasso, J. R., and Brandt, T. M. 1988. Ascorbic acid inhibition of nitrite-induced methemoglobinemia in channel catfish. Progresive Fish-Culturist 50: 77-80.

Ascorbic acid biosynthesis by 3 species of Acipenceriformes and its role on quantitative growth parameters

Falahatkar B.

Fisheries Dept., School of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, I.R. of Iran

Abstract

Many vertebrates have L-gulonolactone oxidase (GLO) in liver or kidney, the enzyme catalyzing the last step in ascorbic acid biosynthesis; they can synthesize this vitamin as *de novo*, which is necessary for growth, health, bone formation, and reproduction. Due to this fact, 3 species of acipenserids were considered for effects of different levels of vitamin C. Results showed that in juvenile Siberian sturgeon, there were no significant differences in final weight after 16 weeks treated by 0 or 300 mg kg^{-1} ascorbic acid ($P \geq 0.05$). Also, there were no significant differences in growth and survival among groups of lake sturgeon after 38 days supplemented with 0, 50, 250, and 1250 mg kg^{-1} ascorbic acid ($P \geq 0.05$). Supplemented diets with 0, 100, 200, 400, 800, and 1600 mg kg^{-1} of ascorbic acid in great sturgeon also showed no significant differences in growth rate and final weight, however, survival showed enhancement in some treatments. Results obtained from this study showed that due to presence of GLO in this specimens, acipenserids do not require this vitamin in normal conditions, since rearing conditions such as high density, stressors, and pathogens, the need for this vitamin might increase in these fish, and it seems that, it is reasonable to use this vitamin in sturgeon diet in artificial rearing condition. In addition to tissue concentration, vitamin C can play a role as a peroxidant against free radicals.

Key Words: Ascorbic acid, Acipenserids, Artificial rearing

Archive of SID

www.SID.ir