ویتامین « ث » در آبزیان

مؤلف : کنراد دابرووسکی

مترجمین : سعید زاهدی، ، حجت‌اله ذوالفقاری، محمودرضا اویسی پور

به نام خدا

ویتامین « ث » در آبزیان

مؤلف : کنراد دابرووسکی

مترجمین : سعید زاهدی ، حجت‌اله ذوالفقاری، ، محمودرضا اویسی پور

ویراستار فنی : دکتر عبدالمحمد عابدیان کناری

عنوان و نام پدیدآور	ویتامین «ث» در آبزیان / مؤلف {صحیح ویراستار} ک. دابروسکی ؛ مترجمین سعید زاهدی، حجت‌اله ذوالفقاری، محمودرضا اویسی‌پور؛ ویراستار فنی عبدالمحمد عابدیان کناری.
مشخصات نشر	: تهران : موسسه تحقیقات شیلات ایران ، مدیریت اطلاعات علمی، ۱۳۸۷.
مشخصات ظاهری	: ۳۹۹ ص. : مصور، جدول، نمودار.
شابک	: ٤٥٠٠٠ ریال : 978-964-5856-48-7
وضعیت فهرست نویسی	: فیپا
یادداشت	: عنوان اصلی : Ascorbic acid in aquatic organisms: status and perspectives, c2001.
یادداشت	: کتابنامه .
موضوع	: ماهی‌ها – تغذیه.
موضوع	: جانداران آبزی – تغذیه .
موضوع	: ویتامین «ث» .
شناسه افزوده	: دابروفسکی، کنراد .
شناسه افزوده	: Dabrowski, Konrad
شناسه افزوده	: زاهدی، سعید، ١٣٦١ - ، مترجم.
شناسه افزوده	: ذوالفقاری، حجت، ١٣٤٥ - ، مترجم.
شناسه افزوده	: اویسی‌پور، محمودرضا ، ١٣٦٠- ،مترجم.
شناسه افزوده	: عابدیان‌کناری، عبدالمحمد، ١٣٤٧- ،ویراستار.
شناسه افزوده	: موسسه تحقیقات شیلات ایران . مدیریت اطلاعات علمی.
رده‌بندی کنگره	: ١٣٨٧ ٩ و/١٥٦ SH
رده‌بندی دیویی	: ٦٣٩/٣
شماره کتابشناسی ملی	: ١٢٧٣٩٣٥

نام کتاب : ویتامین «ث» در آبزیان
مؤلف : کنراد دابروسکی
مترجمین : سعید زاهدی، حجت‌اله ذوالفقاری، محمودرضا اویسی پور
ویراستار فنی : دکتر عبدالمحمد عابدیان‌کناری
ویراستار ادبی : گل‌اندام آل‌علی
شمارگان : ٦٠٠ نسخه
چاپ اول : سال ١٣٨٧
ناشر : موسسه تحقیقات شیلات ایران – مدیریت اطلاعات علمی
(خیابان فاطمی غربی – پلاک ٢٩٧- تلفن ٦٦٩١٩١٣٣ – www. IFRO. ir)
شابک : ٧-٤٨-٥٨٥٦-٩٦٤-٩٧٨ (ISBN : 978- 964-5856-48-7)
قیمت : ٤٥٠٠٠ ریال

تشکر و قدردانی

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم که از اساتید و دوستان گرانقدر جناب آقای دکتر رجب محمد نظری، دکتر غلامرضا رفیعی، دکتر علیرضا میرواقفی، دکتر محمد باقر مجازی امیری، دکتر علی شعبانی، دکتر حمید فرحمند، دکتر مهرداد فرهنگی، مهندس چنگیز مخدومی، مهندس محمدرضا مهدیزاده، مهندس محسن برخوردار، مهندس راشد امامی، مهندس احسان ابراهیمی و آقای محسن نواری که همواره با نظریات سازنده خود راهنمای ما بوده اند و همچنین جناب آقای دکتر مطلبی ریاست محترم سازمان تحقیقات شیلات ایران که برای انتشار این اثر زحمات بسیاری متقبل شدند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

فهرست مطالب

پیشگفتار نویسنده ۱

پیشگفتار مترجمین ٤

فصل اول: آلبرت سنت – گیورگی و ماهیت حیات ٦

منابع ۱۱

فصل دوم: خانواده کینگ و لورن ۱۲

فصل سوم: ابهامات آنالیزی در سنجش ویتامین ث ۱۵

چکیده ۱۵

۱-۳- مقدمه ۱۶

۲-۳- ویتامین های ث ۱۷

۳-۳ - ابهامات تخلیص ۱۸

۴-۳ - تکنیک های سنجش ۱۹

۵-۳ - بحث و نتیجه گیری ۲۰

منابع ۲۲

فصل چهارم: فعالیت و اهمیت گلونولاکتون اکسیداز در ماهیان ۲٤

۱-۴- مقدمه ۲۴

۲-۴- مسیر ساخت اسید آسکوربیک در مهره داران ۲۶

۳-۴- اندازه گیری میزان فعالیت GLO در بافتهای ماهیان ۲۷

۱-۳-۴- آماده سازی بافت ۲۷

۲-۳-۴- سنجش کمی فعالیت ۲۷

۳-۳-۴- سنجش های کیفی فعالیت ۲۹

۴-۴ - توزیع فعالیت GLO در مهره داران ۳۰

۱-۴-۴- توزیع فعالیت GLO در مهره داران خشکی زی ۳۰

۲-۴-۴- توزیع GLO در ماهیان ۳۱

۵-۴ - میزان ساخت اسید آسکوربیک در شرایط طبیعی ۳۹

۴-۶ - فاکتورهای موثر بر فعالیت GLO در ماهیان ۴۱
۴-۷- اهمیت ساخت اسیدآسکوربیک برای ماهیان ۴۱
۴-۷-۱- آیا توانایی ساخت اسید آسکوربیک انطباقی است؟ ۴۲
۴-۷-۲- آیا فقدان توانایی ساخت اسید آسکوربیک انطباقی است؟ ۴۳
منابع ۴۵
فصل پنجم: نیاز ماهیان سردآبی به ویتامین ث ۵۲
۵-۱- مقدمه ۵۲
۵-۲- نیاز عنوان شده در NRC برای ویتامین ث ۵۳
۵-۳- غلظت‌های اسیدآسکوربیک در بافت ها و اندام ها ۵۷
۵-۳-۱- توزیع اسیدآسکوربیک ۵۷
۵-۳-۲- ظرفیت گلوبولهای سفید ۵۸
۵-۳-۳- اثر عوامل محیطی بر غلظت های بافتی ویتامین ث ۵۹
۵-۴- معیارهای مؤثر بر تعیین مقدار اسید آسکوربیک موردنیاز ۶۰
۵-۴-۱- سن و نرخ متابولیک ۶۱
۵-۴-۲- تولید مثل ۶۱
۵-۴-۳- روابط متقابل مواد مغذی ۶۲
۵-۴-۴- سلامت ۶۳
۵-۵ - نتیجه گیری ۷۰
منابع ۷۱
فصل ششم: نیاز ماهیان آب شیرین و دریایی به ویتامین ث ۷٤
۶-۱- مقدمه ۷۴
۶-۲- نیاز ماهیان به اسیدآسکوربیک ۷۷
۶-۲-۱- نیاز ماهیان آب شیرین به اسیدآسکوربیک ۸۰
۶-۲-۲- نیاز ماهیان دریایی به اسیدآسکوربیک ۸۹
۶-۳- آیا شوری بر نیاز ماهیان به اسیدآسکوربیک اثر دارد؟ ۹۲
۶-۴- نتیجه‌گیری ۹۵
منابع ۹۶

فصل هفتم: نیاز صخره ماهی کره ای به ویتامین ث ۱۰۰
چکیده ۱۰۰
۱-۷- مقدمه ۱۰۱
۲-۷- مواد و روش ها ۱۰۳
۱-۲-۷- جیره های آزمایشی ۱۰۳
۲-۲-۷- ماهیان مورد آزمایش و آزمایشهای غذادهی ۱۰۴
آزمایش I ۱۰۴
آزمایش II ۱۰۶
آزمایش III ۱۰۷
۳-۲-۷- جمع آوری نمونه ها و تجزیه و تحلیل ۱۰۷
۳-۷- نتایج ۱۰۸
آزمایش I ۱۰۸
آزمایش II ۱۱۰
آزمایش III ۱۱۳
۴-۷- نتیجه‌گیری ۱۱۴
منابع ۱۲۰
فصل هشتم: نیاز سخت پوستان به ویتامین ث ۱۲٤
چکیده ۱۲۴
۱-۸- مقدمه ۱۲۵
۲-۸- عوارض کمبود ویتامین ث ۱۲۵
۳-۸- میزان اسید آسکوربیک مورد نیاز ۱۲۵
۴-۸- ناپایداری اسید آسکوربیک ۱۲۶
۵-۸- مشتقات اسید آسکوربیک ۱۲۶
۱-۵-۸- مقایسه C2MP-Mg و C2S ۱۲۹
۲-۵-۸- مقایسه C2PP و C2S ۱۳۰
۳-۵-۸- مقایسه C2MP -Na و C2MP-Mg ۱۳۱

۶-۸- نتیجه گیری ۱۳۳
منابع ۱۳۴
فصل نهم: نیاز ماهیان گرم آبی به ویتامین ث ۱۳۶
۹-۱- تاریخچه ۱۳۶
۹-۲- تنوع نیاز به ویتامین ث ۱۳۷
۹-۳- علائم کمبود و نقش های متابولیک ۱۳۸
۹-۴- نشانگرهای وضعیت ویتامینی ماهیان ۱۳۹
۹-۵- ارزیابی مجدد نیاز به ویتامین ث ۱۴۰
۹-۶- ویتامین ث و ایمنی ۱۴۰
۹-۷- زیست فراهمی منابع ویتامین ث ۱۴۱
۹-۸- برهمکنش ویتامین با سایر مواد غذایی ۱۴۳
۹-۹- نتیجه‌گیری ۱۴۴
منابع ۱۴۵
فصل دهم: اثر ریز مغذی ها بر نیاز ماهیان و سخت پوستان به ویتامین ث ۱۴۷
چکیده ۱۴۷
۱۰-۱- مقدمه ۱۴۸
۱۰-۲- عوارض کمبود ویتامین ث و تعیین حداقل مقدار مورد نیاز ۱۴۹
۱۰-۲-۱- منابع ویتامین ث ۱۵۲
۱۰-۲-۲- تغییر در مقدار ویتامین ث موردنیاز طی چرخه حیات ۱۵۶
۱۰-۳- برهمکنش با مواد مغذی ۱۵۸
۱۰-۳-۱- برهمکنش با ویتامین E ۱۵۸
۱۰-۳-۲- رتینوئیدها و کاروتنوئیدها ۱۶۶
۱۰-۳-۳- سایر ویتامین‌ها ۱۶۶
۱۰-۳-۴- برهمکنش اسید آسکوربیک و مواد معدنی ۱۶۸
۱۰-۳-۵- آهن ۱۶۸
۱۰-۳-۶- مس ۱۷۱
۱۰-۳-۷- سایر مواد معدنی ۱۷۳

۴-۱۰- دورنما ۱۷۶
منابع ۱۷۸
فصل یازدهم: نقش ویتامین ث و مشتقات آن در مقاومت آبزیان نسبت به مسمومیت‌های غذایی و محیطی ۱۸۸
۱-۱۱- تاریخچه ۱۸۸
۲-۱۱- اسید آسکوربیک در بی مهرگان آبزی ۱۸۹
۳-۱۱- عوامل موثر بر غلظتهای اسیدآسکوربیک در ماهیان ۱۹۰
۱-۳-۱۱- دما ۱۹۰
۲-۳-۱۱- شوری ۱۹۰
۳-۳-۱۱- استرس اسارت ۱۹۱
۴-۳-۱۱- آمونیاک ۱۹۲
۴-۱۱- بر همکنش‌های بین مواد سمی آلی و اسید آسکوربیک در ماهیان ۱۹۲
۱-۴-۱۱- آفت کش‌ها ۱۹۳
۲-۴-۱۱- بی فنیل های پلی کلرینه ۱۹۴
۳-۴-۱۱- نفت ۱۹۵
۵-۱۱- بر همکنش های بین فلزات و اسیدآسکوربیک در ماهیان ۱۹۶
۱-۵-۱۱- سرب ۱۹۶
۲-۵-۱۱- مس ۱۹۷
۳-۵-۱۱- کادمیوم ۱۹۷
۴-۵-۱۱- روی ۱۹۹
۶-۱۱- برهمکنش بین اسید آسکوربیک و سایر ویتامین‌ها ۲۰۰
۷-۱۱- اسیدآسکوربیک و نقایص تولید مثلی ماهیان ۲۰۱
منابع ۲۰۵
فصل دوازدهم: اثر ویتامین ث بر پاسخ ایمنی در ماهیان ۲۰۹
چکیده ۲۰۹
۱-۱۲- مقدمه ۲۱۰
۲-۱۲- سیستم ایمنی ماهیان ۲۱۱

۱-۲-۱۲- ایمنی ذاتی (غیر اختصاصی) ۲۱۱
۲-۲-۱۲- ایمنی اکتسابی (اختصاصی) ۲۱۳
۳-۱۲- اسیدآسکوربیک و پاسخ ایمنی ۲۱۵
۱-۳-۱۲- گربه ماهی روگاهی ۲۱۶
۲-۳-۱۲- آزاد ماهیان ۲۱۷
۳-۳-۱۲- سایر گونه‌ها ۲۱۹
۴-۱۲- اسیدآسکوربیک و مقاومت در برابر بیماری ۲۲۰
۱-۴-۱۲- گربه ماهی روگاهی ۲۲۰
۲-۴-۱۲- آزاد ماهیان ۲۲۱
۳-۴-۱۲- سایر گونه‌ها ۲۲۴
۵-۱۲- برهمکنش اسید آسکوربیک و سایر مواد مغذی ۲۲۴
۶-۱۲- نتیجه گیری ۲۲۶
منابع ۲۲۷
فصل سیزدهم: مروری بر غلظت، برهمکنش و انتقال اسیدآسکوربیک درجلبک ها، سخت پوستان و ماهیان ۲۳۲
چکیده ۲۳۲
۱-۱۳- مقدمه ۲۳۳
۲-۱۳- غلظت‌های اسیدآسکوربیک در میکروارگانیسم‌های مورد استفاده درآبزی‌پروری ۲۳۴
۱-۲-۱۳- ریزجلبک ها ۲۳۴
۲-۲-۱۳- خمیرها و پودرهای ریزجلبکی ۲۳۹
۳-۲-۱۳- سایر میکروارگانیزم های مورد استفاده در آبزی پروری ۲۴۱
۴-۲-۱۳- اهمیت غلظتهای اسید آسکوربیک موجود در میکروارگانیزم ها برای جانوران مصرف کننده آنها ۲۴۲
۳-۱۳- انتقال اسید آسکوربیک به زئوپلانکتون ۲۴۳
۱-۳-۱۳ - تغییر میزان اسید آسکوربیک موجودات زنده زئوپلانکتونی ۲۴۳
۲-۳-۱۳ - ماندگاری اسیدآسکوربیک در زئوپلانکتون ها ۲۴۹
۴-۱۳- انتقال اسید آسکوربیک از زئوپلانکتون و نیاز لاروها ۲۵۰

۵- ۱۳ - برهمکنش با سایر مواد مغذی ۲۵۵
۶-۱۳- اهمیت اکولوژیک اسیدآسکوربیک و انتقال آن بین سطوح غذایی ۲۵۶
۷-۱۳- نتیجه گیری ۲۵۷
منابع ۲۵۹
فصل چهاردهم: انتقال ویتامین ث به باس دریایی از طریق غذای زنده ۲٦٦
۱-۱۴- مقدمه ۲۶۶
۲-۱۴- مواد و روش‌ها ۲۶۹
۱-۲-۱۴- غنی سازی آرتمیا ۲۷۱
۲-۲-۱۴- سنجش ویتامین ث ۲۷۲
۳-۲-۱۴- تعیین میزان اسیدهای آمینه در لاروها ۲۷۲
۴-۲-۱۴- زیست سنجی لاروها ۲۷۳
۵-۲-۱۴- آزمایش ارزیابی کیفی لاروها ۲۷۴
۳-۱۴- نتایج ۲۷۵
۱-۳-۱۴- زیست سنجی لاروها ۲۷۸
۲-۳-۱۴- آزمایش استرس اسمزی ۲۷۸
۳-۳-۱۴- آزمون مواجهه ۲۸۱
۴-۱۴- بحث و نتیجه‌گیری ۲۸۴
منابع ۲۸۹
فصل پانزدهم: روش‌های آزمایشگاهی و نتایج جذب اسیدآسکوربیک در بافت‌های اپیتلیالی ماهیان ۲۹۱
چکیده ۲۹۱
۱-۱۵- مقدمه ۲۹۲
۲-۱۵- اسیدآسکوربیک و مشتقات آن ۲۹۴
۳-۱۵- هموستازی اسیدآسکوربیک ۲۹۶
۴-۱۵- جذب اسید آسکوربیک در روده ماهیان: روش‌های آزمایشگاهی ۲۹۸
۱-۴-۱۵- قطعات جدا شده روده ۲۹۸
۲-۴-۱۵- حلقه‌های روده ای ۲۹۹

۳-۴-۱۵- محفظه‌های Schultz ۳۰۰
۴-۴-۱۵- وزیکول های غشایی ۳۰۰
۵-۱۵- جذب اسید آسکوربیک در روده ماهیان: فرآیندهای انتقال ۳۰۲
۱-۵-۱۵- انتقال وابسته به یون سدیم: خصوصیات کینتیکی ۳۰۴
۲-۵-۱۵- جذب وابسته به یون سدیم: الکتروژنسیتی ۳۰۷
۳-۵-۱۵- انتقال تسهیل شده اسید دهیدروآسکوربیک ۳۰۹
۴-۵-۱۵- هیدرولیز و جذب مشتقات اسید آسکوربیک ۳۱۰
۶-۱۵- بازجذب کلیوی اسید آسکوربیک در ماهیان استخوانی ۳۱۲
۷-۱۵- دیدگاه مطالعات جذب اسیدآسکوربیک در ماهیان: رهیافت کلونینگ ۳۱۴
۱-۷-۱۵- ساختار مولکولی سیستم انتقالی غشای پلاسمایی ۳۱۴
۲-۷-۱۵- بیان ناقلین وابسته به Na^+ اسید آسکوربیک در غشای پلاسمایی
سلول‌های اپیتلیالی ۳۱۶
۳-۷-۱۵- ناقلین مستقل از Na^+ دخیل در جذب DHA در سلول های جانوری ۳۱۷
۸-۱۵- دیدگاه مطالعات اسید آسکوربیک در ماهیان – رهیافت انتقال ژن ۳۱۹
۱-۸-۱۵- روشهای انتقال ژن در ماهیان ۳۱۹
۲-۸-۱۵- بیان ژن L- گولونو - γ – لاکتون اکسیداز در مداکای تراریخته ۳۲۱
منابع ۳۲۳
فصل شانزدهم: اثرات ویتامین ث بر رفتار ماهیان ۳۳۰
۱-۱۶- مقدمه ۳۳۰
۲-۱۶- تاریخچه ۳۳۲
۳-۱۶- مطالعات انجام شده پیرامون اثرات جذب ویتامین ث بر رفتار ماهیان ۳۳۳
۱-۳-۱۶- ماهی آیو جوان (*Plecoglossus altivelis*) ۳۳۳
۲-۳-۱۶- بچه ماهیان آیو(*Plecoglossus altivelis*) ۳۳۵
۳-۳-۱۶- بچه ماهیان انگشت قد دم زرد ژاپنی (*Seriola quinqueradiata*) ۳۳۹
۴-۳-۱۶- بچه ماهیان شانک قرمز (*Pagrus major*) ۳۴۲
۴-۱۶- بحث و نتیجه گیری ۳۴۳
منابع ۳۴۴

فصل هفدهم: مطالعات ویتامین ث در آبزیان : گذشته ، حال و آینده ۳٤٦
چکیده ۳۴۶
۱-۱۷- مقدمه ۳۴۷
۲-۱۷- تاریخچه ۳۴۷
۱-۲-۱۷- کشف عملکرد اسیدآسکوربیک در ماهیان ۳۴۷
۳-۱۷- وضعیت کنونی ۳۵۰
۱-۳-۱۷- پیشرفت در آنالیز اسید آسکوربیک ۳۵۰
۲-۳-۱۷- حضور و استفاده از سولفات آسکوربیل در ماهیان ۳۵۱
۳-۳-۱۷- ساخت آنزیمی استرهای آسکوربیل ۳۵۵
۴-۳-۱۷- گردش آسکوربات معده ای و درون روده ای ۳۵۶
۵-۳-۱۷- برهمکنش آسکوربات و فلاونوئیدها ۳۵۸
۶-۳-۱۷- نیاز ماهیان به آسکوربات ۳۶۰
۴-۱۷- آینده ۳۶۲
۱-۴-۱۷- مکانیزم عمل آسکوربات ۳۶۲
۲-۴-۱۷- تنظیم مولکولی (بیان ژنی) آسکوربات ۳۶۴
۳-۴-۱۷- ماهیان تراریخته با ژن GLO ۳۶۹
منابع ۳۷۰
ضمیمه۱ : جدول اسامی علمی، انگلیسی و فارسی آبزیان ۳۷۷
ضمیمه ۲ : علائم اختصاری ۳۸۰
ضمیمه ۳ : واژه نامه ۳۸۱

پیش گفتار نویسنده

هدف از نگارش این کتاب، پاسخ دادن به نیاز زیست شناسان علاقه مند به اکوسیستم های آبی است که تشنه دانستن نقش انفرادی مواد مغذی هستند. این کتاب فقط سرآغازی در ارتباط با اهمیت و نقش ویتامین ث در سلامت سیستم‌های طبیعی یا مصنوعی است. اکثر دانشمندان باتجربه در زمینه چرخه فسفر و نیتروژن در محیطهای آبی، از من می‌پرسند که ماهیان وحشی چگونه ویتامین ث مورد نیاز خود را بدست می‌آورند. ساخت اسیدآسکوربیک توسط گیاهان خشکی بخوبی شناخته شده است ولی جلبکها که تنها منبع تامین کننده ویتامین ث در هرم غذایی محیط آبی هستند، مورد بررسی و تحقیق قرار نگرفته‌اند. منشاء آسکوربات در شاخه جانوری نیز مطالعه نشده است و از دید من، نقش همزیستی گیاهی- جانوری (۱) نیز در ایجاد ترکیبات اساسی، نادیده گرفته شده است. کینگ[1](۲) شاید اولین شخصی بود که در بحث تکامل زیستی، این سوال را مطرح نمود که «آیا از دست دادن یک یا تعدادی ژن که عامل ساخت ویتامین‌های ضد کمبود ویتامین ث هستند فقط یک بار اتفاق افتاده یا بطور مکرر در طبیعت در حال انجام است؟»

توسعه صنعت آبزی پروری، نیازمند بکارگیری غذاهای فرموله شده برای پاسخ به نیازهای رشد، سلامت و تولید مثل آبزیان است. با توجه به این که امروزه پرورش بیش از ۱۰۰ گونه از آبزیان رواج دارد، این سوال مطرح می‌شود که آیا ما دارای اطلاعات کافی در زمینه نیاز آبزیان به ویتامین ث هستیم.

اسیدآسکوربیک در آبزیان، به عنوان یک بحث فرعی در جلسه آبزیان و آبزی پروری عملی در نشست جهانی انجمن آبزی پروری[2] در سال ۱۹۹۸، به مورد بحث گذارده شد. در آنجا، بحث‌هایی پیرامون اطلاعات علمی مربوط به ساخت، حضور و نقش ویتامین ث در ماهیان و سخت پوستان به نقطه اوج خود رسید. هدف اصلی نشست، ارائه اطلاعاتی در مورد وضعیت صنعت، بویژه در مورد نیاز آبزیان به ویتامین ث بود. در ابتدا، اینجانب به دلیل نپرداختن به پرندگان و پستانداران دریایی، مورد انتقاد قرار گرفتم. امیدوارم که این کتاب بتواند تا حدودی پاسخگوی این انتقادات باشد. ما هنوز

[1] King
[2] World Aquaculture Society

زمینه‌های زیادی را برای بررسی در پیش رو داریم و در اینجا فقط به مرور جنبه های ویتامینی آبزیان پرداخته ایم.

بحث های علمی پیرامون این موضوع، توجه جامعه علمی را به خود معطوف ساخت و موجب شد تا بیشتر به این حوزه تحقیقاتی پرداخته شود. با توجه به گزارشات موسسه اطلاعات علمی[1] (۳) تعداد مقالات پژوهشی انتشار یافته با واژگان کلیدی «ویتامین ث و ماهیان» با میانگین یک تا سه مقاله در دهه ۸۰ میلادی شروع شد که در اوایل دهه ۹۰ میلادی به ۱۵– ۵ مقاله در سال رسید و هم اکنون طی پنج سال گذشته، سالانه ۳۲ – ۲۵ مقاله پژوهشی در این زمینه بچاپ رسیده است که بالطبع، برخی از محققین به گرمی مباحث افزوده اند. با توجه به این که مرور علمی دیدگاه نقادانه را در پی می گیرد لذا انتظار می رودکه نویسنده بتواند نتایج علمی را تجزیه و تحلیل کند و برای اثبات یا رد یک تئوری، بحث علمی را دنبال کند. این عمل، بسیار سخت تر از ارائه فرضیات و نتایج جدید است. قضاوت در این مورد اینکه که آیا این مهم در کتاب حاضر رعایت شده است یا خیر را بعهده خوانندگان محترم گذارده ام.

کتاب حاضر، به نیاز به مطالعه دقیق ویتامین ث در آبزی پروری پاسخ می‌گوید. این کتاب اطلاعات مفیدی را در زمینه نیازمندی گونه‌ها و رده‌های سنی مختلف ماهیان ارائه می کند و اعتبار برخی از نتایج انتشار یافته را بعلت نادرستی روش‌های آنالیزی یا طراحی آزمایش (طول مدت آزمایش، نحوه فرموله کردن جیره غذایی) مورد سوال قرار می دهد. این کتاب تلفیقی از تحقیقات مناسب تغذیه‌ای و راهنمایی های عملی برای پرورش دهندگان است.

ما سعی در به چالش کشاندن محققین و همچنین شناسایی نکات جدید در زمینه‌های فیزیولوژی، زیست شناسی سلولی – مولکولی و تا حد امکان اکولوژی آبزیان و تغییرات جهانی محیط زیست مربوطه داشته ایم. کسانی که به کتاب حاضر به عنوان منبعی علمی رجوع می‌کنند و از آن ایده می‌گیرند، از دوستان عزیز ما خواهند بود.

Konrad Dabrowski

[1] Institute for Scientific Information(ISI)

منابع

1. Dykens, J. A. and Shick, J. M., Oxygen production by endosymbiotic algae controls superoxide dismutase activity in their animal host, *Nature*, 297, 259, 1982.

2. King, C. G., The discovery and chemistry of vitamin C, *Proc. Nutr. Soc.*, 12, 219. 1953.

3. Institute for Scientific Information (*www.isinet.com*).

پیشگفتار مترجمین

با توجه به افزایش جمعیت بشر و نیازهای غذایی آن، آبزیان توانسته‌اند به عنوان یکی از اقلام غـذایی سالم، با ارزش غذایی بالا و ارزان، نسبت به سایر اقلام غذایی، از جایگاه نسبتا خوبی برخوردار باشند. امروزه پرورش آبزیان، به منظور رهاسازی بچه ماهیان در آبهای طبیعی جهـت بازسـازی ذخـایر و بـه منظور تولید پروتئین، یک صنعت رو به رشد در سراسر دنیا محسوب می‌شود. کشور عزیزمـان، ایـران اسلامی نیز از این قاعده مستثنی نبوده و امروزه شاهد گـسترش ایـن صـنعت در تمـام زمینـه‌هـای آن هستیم.

همگام با چنین توسعه‌ای، برای دستیابی به سودآوری بیشتر با حداقل فضا و آب دردسترس، پـرورش متراکم آبزیان مد نظر قرار گرفته است ولی این نوع سیستم پرورشی، سبب ایجاد شرایط استرس برای ماهیان می‌گردد لیکن با دارا بودن دانش کافی در زمینه مـدیریت تغذیـه‌ای، مـی‌تـوان بـه شـکل قابـل توجهی از اثرات این استرس‌ها کاست.

یکی از بهترین اجزاء غذایی شناخته شده در ایـن زمینـه، ویتـامین ث اسـت. ایـن ویتـامین بـه رغـم ناپایداری بالایی که در مواجهه با آب، حرارت طی عمل آوری و نگـه داری غـذا در انبـار دارد، یـک آنتی اکسیدان بسیار قوی محلول در آب محسوب می‌شـود. حـضور ویتـامین ث در جیـره غـذایی در مقادیر بالا، نه تنها موجب دستیابی به رشد مطلوب می‌شـود، بلکـه سـبب افـزایش مقاومـت در برابـر استرس‌های محیطی مانند تراکم، کمبود اکسیژن، سموم، کمبودهای غذایی، نوسانات دمایی، بیمـاری و نیز بهبود سریعتر زخم‌ها می شود و همچنبن با تقویت سیستم ایمنـی و در نتیجـه افـزایش مقاومـت بدن، در نهایت منجر به افزایش تولید در مراکز پرورشی خواهد شد.

کتاب ویتامین ث در آبزیان، یکی از مهمترین کتب منتشره در زمینه تغذیه آبزیان بـوده کـه صـرفا بـه بررسی یک ماده مهم غذایی (ویتامین ث) پرداخته و تمام جوانب آن را مورد تجزیه و تحلیل قرار می دهد. در این کتاب، به نحو مناسبی به بررسی خواص شیمیایی، عملکرد فیزیولوژیک، اشکال شیمیایی، نحوه و میزان بکارگیری و.... ویتامین ث می پردازد.

مترجمان، مطالعه این کتاب را به دانشجویان و فارغ التحصیلان رشته‌های شیلات، علوم دامی، زیست شناسی جانوری، زیست شناسی دریا، دامپزشکی و آبزی پروران صاحبان صنایع مربوطه توصیه نموده و امید دارند که توانسته باشند گامی هر چند کوچک در جهت افزایش دانش تخصصی تغذیه آبزیان، برداشته باشند.

به رغم دقت نظری که در برگردان فارسی اعمال گردیده، متن حاضر با توجه به سنگینی نسخه اصلی، خالی از اشکال نیست که امید است این اشکالات در چاپ‌های بعدی با دریافت نظریات و راهنمایی‌های ارزنده خوانندگان محترم برطرف گردد.

در خاتمه بر خود لازم می دانیم از زحمات جناب آقای دکتر عبدالمحمد عابدیان کناری و سرکار خانم گل اندام آل علی که بترتیب ویراستاری علمی و ادبی کتاب و سرکار خانم فاطمه احمدی بیات که زحمت حروف چینی و صفحه آرایی را بر عهده داشتند، صمیمانه تشکر کنیم. همچنین از همکاری جناب آقای دکتر مطلبی ریاست محترم سازمان تحقیقات شیلات که برای چاپ و انتشار اثر، زحمات زیادی را متقبل شدند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

سعید زاهدی، ، حجت‌اله ذوالفقاری، محمودرضا اویسی پور

«فصل ۱»

آلبرت سنت-گیورگی[۱] و ماهیت حیات

Jane A.Mclaughlin

پروفسور آلبرت سنت-گیورگی، متخصص بزرگ بیوشیمی، زندگی خود را صرف درک ماهیت حیات نمود. این محقق گرانقدر در سال ۱۹۳۷ موفق به دریافت جایزه نوبل فیزیولوژی و پزشکی گردید که این موفقیت به جهت کشفیات وی در رابطه با فرآیندهای سوخت سلولی با تاکید ویژه بر ویتامین ث و کاتالیز اسید فوماریک[۲] بود. تحقیقات وی در کشورهای هلند، انگلستان و زادگاهش مجارستان، در دهه‌های ۱۹۲۰ و ۱۹۳۰ میلادی انجام شد. علاقه مطالعاتی ایشان، بر اثر مناظره اوتو واربرگ[۳]و هنریک ویلند[٤]بر سر این موضوع بوجود آمد که آیا برای تنفس به فعال شدن اکسیژن و هیدروژن نیازی هست یا خیر. او ثابت کرد که وجود هر دو عنصر برای انجام شدن فرایند، لازم است. مشاهدات وی در زمینه فرایند سیاه شدن اکسیدانی[٥] در برشی از سیب زمینی، او را موفق به جداسازی اسید هگزورونیک[٦] - بویژه از غدد آدرنال[۷]- نمود. پس از بازگشت وی به مجارستان در سال ۱۹۳۲، وی توانست این اسید را از فلفل قرمز و نوعی فلفل به نام پاپریکا[۸] جدا نماید و سپس اثبات نمود که

[1] Albert Szent-Gyorgyi
[2] Fumaric acid
[3] OttoWarburg
[4] Heinrick Weiland
[5] oxidative blackening
[6] Hexuronic acid
[7] Adrenal glands
[8] Paprika

این ماده ویتامین ث است و آن را به دلیل فعالیت ضدکمبود ویتامین ث[۱] ، اسیدآسکوربیک[۲] (AA) نامید. وی ترجیح داد به جای ادامه کارش پیرامون ویتامین ث، بر اکسیداسیون(اکسایش) زیستی متمرکز شود که موضوع مورد علاقه‌اش بود. حین مطالعه روی اسید C4- دی کربوکسیلیک[۳] (از قبیل اسید فوماریک)، نقش انتقال هیدروژن و مصرف اکسیژن دهیدروژنازها و سیتوکروم اکسیداز را توضیح داد (۱) که این کشف، بعدها مبنای چرخه تنفسی اسید سیتریک هانس کربس[٤] قرار گرفت.

پروفسور در سالهای بعد، جهت درک حیات، بر ماهیچه متمرکز شد. او در خاطرات خود نوشته بود" *مهم نیست که چه موضوعی را برای مطالعه حیات انتخاب کنیم، علف یا ماهیچه، ویروس یا مغز، اگر ما به حد کافی عمیق شویم، همیشه در عمق مطالعه به اصول پایه‌ای می‌رسیم که آنجا حیات ایجاد شده و به واسطه آن هنوز هم ادامه دارد*" (۲). طی جنگ جهانی دوم در مجارستان، او و همکارانش، کشف مهمی را در مورد بیوشیمی ماهیچه انجام دادند که میوزین[٥] در واقع از اکتین[٦] و میوزین ساخته شده است و اکتین یک فعال کننده برای شکستن ATP میوزین است. در سال ۱۹٤۹، در ایالات متحده آمریکا، در آزمایشگاه زیست دریا[۷] در Woods Hole، او غشای ماهیچه را با گلیسرول[۸] نفوذ پذیر کرد و با افزودنATP، انقباض ماهیچه را مشاهده نمود و به این ترتیب اولین مدرک دال بر اینکه سیستم انقباض متشکل از اکتین، میوزین و ATP است، به وجود آمد (۲). در اوایل سال ۱۹٤۰، وی توانست شواهد اولیه‌ای مبنی بر حضور میوزین در تعدادی از سلول‌های غیر ماهیچه‌ای ارائه دهد و خاطر نشان نمود : " یک جزء پروتئینی مشابه میوزین باید در هر سلولی باشد"

---

[1] Antiscorbutic

[2] Acid ascorbic

[3] C4-dicarboxylic acid

[4] Hans Krebs citric acid cycle

- سیستم حلقوی از واکنشهای آنزیمی برای اکسایش ریشه های استیل به دی اکسید کربن که در آن تولید سیترات اولین مرحله میباشد.چرخه اسید سیتریک، چرخه کربس و چرخه اسید تری کربوکسیلیک نیز نامیده می شود.

[5] Myosin

- یک پروتئین قابل انقباض که جزء اصلی فیلامانهای ضخیم عضله و سیستم های دیگر اکتین– میوزین می باشد.

[6] Actin

- پروتئین سازنده فیلامانهای نازک عضله که همچنین بعنوان یک جزء مهم در اسکلت سلولی بسیاری از سلولهای یوکاریوتی مطرح است.

7 Marine Biological laboratory

[8] Glycerol

(۳) (این موضوع پیش از کشف این مطلب بود که میوزین همراه پروتئین دیگری به نام اکتین است). امروزه می‌دانیم که میوزین و اکتین در هر سلولی یافت می‌شوند و در عملکردهای متنوع سلولی شرکت می‌کنند. در سال ۱۹۵٤، وی به دلیل خدماتش در درک فرایند انقباض ماهیچه، موفق به دریافت جایزه Albert Laskar شد.

او می‌گفت، "*برای درک ماهیچه باید به سطح الکترونی*[1] *رجوع کنیم که قوانین آن بوسیله مکانیک موج مدیریت می‌شود*" (٤) و همچنین ابراز داشته بود "*زمانی ما می‌توانیم واقعا به درک حیات نائل شویم که تمام ساختارها و عملکردها، کلیه سطوح از الکترونی تا فرامولکولی را به یک واحد مجزا تلفیق کنیم*" (٤). مشاهدات وی پیرامون اهمیت فرایندهای تحت مولکولی، تحت پدیده های پایه بیوشیمیایی و بیوفیزیکی بود و بنابراین پیشگام ایجاد بیوشیمی تحت مولکولی گردید. او در مورد بیوانرژتیک[2]، چندگانگی اسپین[3]، نقش گلوتاتیون احیاء شده[4] و رادیکالهای آزاد[5] مطالعه نمود (٤). اگرچه این تلاش‌های آزمایشگاهی در کاربرد این ایده‌های تئوریک برای درمان سرطان بی نتیجه ماند، لیکن موجب بسیاری از تحقیقات کنونی پیرامون نقش رادیکال‌های آزاد در تعدادی از بیماری‌ها و کاربرد مهم آنتی اکسیدان‌ها، به عنوان یک اقدام موثر و پیشگیرانه شد.

آلبرت فقط محققی برجسته نبود، او انسانی گرم وصمیمی، شجاع و خوش مشرب بود. درگیری ذهنی او با ایده های فوق العاده اش، مانع نشد که از دنیای اطرافش جدا شود و در بسیاری از حوادث زمان خود، شجاعت خویش را به همگان نشان داد. او آزمایشهای انجام شده روی اسرای ایتالیایی جنگ جهانی اول را بشدت محکوم کرد. طی اشغال مجارستان، بر علیه هیتلر و کمونیست‌ها بی پروا سخن گفت و وسیله ساز نجات دیگران از ظلم و جور این حکومت‌های ظالم گردید (٥) و بعدها نیز به عنوان یک شهروند امریکایی از خطر سلاحهای اتمی برای بشر ابراز نگرانی نمود (٦، ۷، ۸).

در پایان جنگ جهانی دوم، مقامات کشور مجارستان برای نجات از چنگال کمونیسم، سلطنت St.Stephen – سمبل قدرت مجارستان – را به ایالات متحده آمریکا واگذار نمودند. سلطنت هزار

[1] Electronic level
[2] Bioenergetics
[3] Triplet states
[4] SH-glutathione
[5] Free radical

ساله نخستین پادشاه مجارستان در Fort Knox تا اواخر دهـه ۱۹۷۰ حفـظ شـد زمانیکـه طـی یـک تصمیم سیاسی اعلام شد که هنگام رجعت پادشاه به مجارستان فرارسیده است. در سال ۱۹۷۸،آلبـرت برای همراهی پادشاه در این سفر برگزیده شد و این سفر، اولین بازگشت وی به زادگاهش پس از سی سال دوری بود. مخالفت او با کمونیست‌ها در سال ۱۹٤۷، منجر به اخراج وی از مجارستان شده بـود. در آن زمان وقتی با خودش فکر می‌کرد که به کجا برود، به یاد مکانی در بوستون امریکا افتاد که برای کنگره بین المللی فیزیولوژی[1] (۱۹۲۹) به آنجا رفته بود. بنـا بـه دعـوت آزمایـشگاه زیـست دریـا در Woods Hole، گردشی برای دانشمندانی که از کنفرانس به آنجا آورده شده بودند، ترتیب داده شده بود. در بین سایر برنامه های آنروز، برای بازدیدکنندگان لابستر سرو شد. خاطرات لابستر و آزمایشگاه یکبار دیگر برای آلبرت زنده شد و تصمیم گرفت که به آنجا مهاجرت کند و در سـال ۱۹٤۷ رهـسپار سفر شد و همچنین ترتیبی برای عزیمت همکارانش به آنجا را داد و بدین ترتیب آزمایـشگاه زیـست دریا برای مدت ٤۰ سال خانه علمی او بود.

آشنایی من با آلبرت به سالهای قبل بر می‌گردد. هنگامی که در تحقیقی در آزمایشگاه زیـست دریـا بـا وی همکاری می‌کردم. آزمایشگاه او مکان جالب و هیجان انگیـزی بـود. افـراد بـا جـدیت تمـام کـار می‌کردند و حین مشاهده جزئیات آزمایش، به نمـای کلـی تـر آن نیـز مـی‌اندیـشیدند. وقتـی آلبـرت دانشمندان سرشناسی را به آزمایشگاه دعوت می کرد، اعضای آزمایشگاه نیز برای بحثهـای علمـی بـه آنها ملحق می شدند و در بیشتر اوقات نیز برای صرف چای و بحث کردن در مـورد علایـق عمـومی مانند بحث‌های علمی، سیاسی یا اجتماعی دور هم جمع می‌شدند و صمیمیت بر آنها، حکمفرما بود.

آلبرت صبح زود به آزمایشگاه می‌رسید و مشتاقانه عقاید جدیدی را که شب قبل به آنها رسـیده بـود، مطرح می‌کرد. روزش را در محیط کارش که مـشرف بـه دریـا بـود بـا انجـام دادن آزمایـشهایی روی محلول‌های انتخابی اش سپری می‌کرد که اغلب این واکنش‌ها با تولید رنگ همراه بـود. او صـبح زود قبل از صرف صبحانه یا هنگام غروب به نوشتن مطالب علمی و مکاتباتش می‌پرداخت. البته در فصول شنا، قبل از انجام شنای صبحگاهی، به نوشتن می پرداخت.

استاد، نامی که مایل بود به آن نام خوانده شود (گفتن سنت-گیورگی وقت زیادی می‌گیرد!). استاد در

[1] International physiological congress meeting

نزدیکی دریا، در منطقه‌ای که می‌توانست طلوع و غروب خورشید را در ورای آب نظاره گر باشد، زندگی می‌کرد. در آنجا ماهی می‌گرفت، شنا می کرد و به قایقرانی می‌پرداخت. خانه اش در مکانی به نام Seven Winds (زیرا آنجا نقطه بادخیزی بود) حوالی دماغه شبه جزیره Penzance Point در Woods Hole در انتهای جنوب غربی Cape Cod قرار داشت و کانال آب بین جزیره و Point غیر قابل اطمینان و خطرناک بود. استاد که شناگر ماهری بود، میزان جزر و مد کانال Woods Hole را اندازه‌گیری کرده بود و می توانست همراه جریان شنا کند. او از ساحل نزدیک خانه اش در یک سمت شروع به شنا می کرد و دماغه Point را تا سمت دیگر دور می زد و اینکار تا پایان عمر عادت وی شده بود.

استاد به نکات ظریف صید ماهی واقف بود (شکل ۱-۱) و ادعا می کرد که با ترکیب مسیر جریان و میزان نور غروب، می‌تواند ماهی بزرگی صید کند و معمولا حرفش درست از آب در می‌آمد. استاد می‌گفت "*برای ماهیگیری معمولا از قلاب بزرگ استفاده می کنم.... اینکه ماهی بزرگی صید نکنیم، جالب تر از این است که ماهی کوچکی صید نکنیم*". این واقعیت ماهیگیری او بود، چه در عرصه علم و چه در دریا و موفق به صید چندین ماهی بزرگ نیز شد!

استاد در مورد خودش می گفت: "*من تئوری‌های متحیر کننده‌ای ارائه کرده ام، ارتباط دهنده واکنش درون لوله آزمایش با گسترده ترین ایده‌های فلسفی، ولی بیشتر وقتم را در آزمایشگاه با کار کردن روی مواد حیاتی گذرانده ام، چشمانم را باز نگه می‌دارم و کوچکترین جزئیات را دنبال می‌کنم... اذعان می‌کنم که اغلب مشاهدات تازه‌ای که انجام داده ام، بر اساس تئوری‌های غلطی بوده‌اند. تئوری‌های من فروپاشیدند، اما در پایان چیزی باقی ماند" (۵)*. استاد تا اندکی قبل از مرگش در سال ۱۹۸٦ و در سن ۹٦ سالگی در دفتر کارش مشغول تحقیق بود و آثار مکتوب وی (۹) نتیجه هفتاد و پنج سال تلاش در قرن بیستم میلادی است.

شکل ۱-۱: دکتر آلبرت سنت-گیورگی در Hole Woods حدود سال ۱۹۵۹

منابع

1. Szent-Gyorgyi, A., (1965). In: Nobel Lectures: Physiology or Medicine, 1922-1941. published for the Nobel Foundation by Elsevier, New York. Pages: 435-449.

2. Szent-Gyorgyi, A., (1951). Chemistry of Muscular Contraction. Academic Press. New York.

3. Szent-Gyorgyi, A., (1940). On protoplasmic structure and function. Enzymologia Acta Biocatalytica, 9: 98-110.

4. Szent-Gyorgyi, A., (1960). Introduction to a Submolecular Biology. Academic Press. New York.

5. Szent-Gyorgyi, A., (1963). "lost in the Twentieth Century". Annual Review of Biochemistry. 32: 1-14.

6. Szent-Gyorgyi, A., (1963). Science Ethics and politics. Vantage press, New York.

7. Szent-Gyorgyi, A., (1970). The Crazy Ape. Philosophical Library, New York.

8. Szent-Gyorgyi, A., (1971). What Next?, Philosophical Library, New York.

9. Publications of Albert Szent-Gyorgyi, (1988). Biological Bulletin. 174: 234-240.

«فصل ۲»

خانواده کینگ و لورن

Jane Loren Halver

گلن کینگ[۱] و هنری لورن[۲] بین سالهای ۱۹۱۵ و ۱۹۱۷ در کالج ایالت واشینگتن در Pullman، دانشجو بودند. پدر من، هنری لورن، دانشجوی رشته الکترونیک بود و در تیم بیس بال Couger در پست دفاع بازی می کرد. البته این دو در انجمن اخوت نیز عضویت داشتند که گلن رهبری آن را بر عهده داشت. پس از فراغت از تحصیل، گلن با هیلدا[۳] ازدواج کرد و برای اخذ مدرک دکترای بیوشیمی به Pittsburg رفت. دو سال بعد، هنری نیز فارغ التحصیل شد و با مادرم، ماریئتا[٤]، ازدواج نمود و با هم برای اقامتی دو ساله به Pittsburg رفتند تا پدرم در آنجا در رشته الکترونیک صنعتی در مرکز آموزش Westinghouse ادامه تحصیل دهد.

این دو خانواده سالهای متمادی دوستان خوبی برای هم بودند. در Pittsburg، هیلدا و مادرم همسایه بودند و با بچه هایشان به دیدن هم می آمدند. هیلدا در آن زمان تنها باب[٥] را داشت. در آن سالها، گلن در دانشگاه مشغول مطالعه در مورد ویتامین ث بود و لورن را به خوردن روزانه یک عدد

[1] Glen King
[2] Henry Loren
[3] Hilda
[4] Marieta
[5] Bob

پرتقال – برای اطمینان از جذب ویتامین ث – تشویق می‌کرد و این عادت، عادت روزمره هر دو خانواده شد که هنوز نیز ادامه دارد. مایئتا، ۱۰۱ سال عمر کرد، بنابراین ویتامین ث باید به بهبود سلامت وی کمک کرده باشد، هیلدا نیز به علت مصرف روزانه ویتامین ث، بیش از ۹۵ سال عمر کرد. در Pittsburg، من با باب و خواهرش دوروثی[1]، تا دو سال قبل از عزیمت به Tacomaی ایالت واشینگتون همبازی بودم. پدرم در Tacoma به عنوان مهندس شرکت لوازم الکتریکی Westinghouse مشغول به کار شده بود و ما مجبور عزیمت به آنجا بودیم.

هر وقت گلن و هیلدا برای دیدن بستگانشان به واشینگتن می‌آمدند، به ما نیز سر می زدند. دوروثی، باب و کندال[2]، فرزندان خانواده کینگ، همیشه والدین من را عمه ماریتا و عمو هنری خطاب می‌کردند. گاهی اوقات برای قایقرانی یا جمع آوری صدف به سواحل Puget Sound می‌رفتیم. گلن ماهیگیر نبود ولی به جمع آوری صدف و قدم زدن در ساحل یا جنگل علاقه داشت. او ذاتا مردی آرام، مهربان و خانواده دوست بود، که از همنشینی با او لذت می‌بردیم (شکل ۲-۱).

بعدها وقتی من با جان امیل هالور[3] ازدواج کردم، گلن- که مدیر سازمان تغذیه بود- در انتصاب همسر من به عنوان مدیر آزمایشگاه تغذیه ماهی غرب[4]، موثر بود. آزمایشگاهی که توسط سازمان حیات وحش و ماهیان[5] ایالات متحده امریکا در Cook ایالت واشینگتن در سال ۱۹۵۰ دایر شده بود.

گلن بیشتر علاقه مند به بررسی و تحقیق در زمینه نیاز ماهیان به ویتامین ث و عملکرد این ویتامین در آنها بود. هر وقت گلن وهیلدا به Cook می‌آمدند، منزل ما را به عنوان محل اقامت خود انتخاب می‌کردند و گاهی نیز فعالیتهای آزمایشگاه را مرور می کردیم. گلن به ترمیم بافت‌های ماهی پس از جراحی، بویژه پس از خوراندن مقادیر بالای ویتامین ث، بی نهایت علاقه داشت. اغلب شوهرم گلن را در نشست‌ها ملاقات می‌کرد و با هم به New Jersey،Atlantic city، سفر می کردند جایی که نشست FASEB در آنجا برگزار می‌شد. در سال ۱۹۷۸ که جان عضویت فرهنگستان ملی علوم را امضا نمود، گلن و هیلدا نیز در واشینگتن بودند. گلن به من گفت که غم انگیز ترین لحظه

[1] Dorothy
[2] Kendall
[3] John Emil Halver
[4] Western Fish Nutrition Laboratory
[5] Fish and Wildlife Service

زندگیش زمانی بود که پسرش کندال درگذشت که بعنوان یک متخصص بیوشیمی ادامه دهنده راه او بود. دوروثی و من سال‌هاست که با هم مکاتبه داریم ولی از دوران کودکی فرصتی برای ملاقات هم نداشته ایم.

شکل ۱-۲: دکتر چارلز گلن کینگ در سفری برای ماهیگیری در Maine، نهم نوامبر سال ۱۹٤۸

«فصل ۳»

ابهامات آنالیزی در سنجش ویتامین «ث»

John E.Halver and Samuel P.Felton

چکیده

اسیدآسکوربیک ناپایدار است و براحتی به اسید دهیدروآسکوربیک[1] اکسیده می‌شود. محققین در گذشته عصاره بافت‌ها را با دقت زیاد و با استفاده از تیمارهای ملایم اسید متافسفریک[2] تهیه می‌کردند تا به این طریق، اسیدآسکوربیک را حفظ کنند ولی با این روش‌ها، اسیدآسکوربیک متصل به بافت جدا نمی شد. تکنیک‌های دقیق تر با کمک اسیدهای قوی تر، می‌توانست منجر به تخلیص استرهای آسکوربات متصل به سایر ترکیبات شود، ولی چنین محیط‌های اسیدی سبب آبکافت (هیدرولیز) استرهای آسکوربیل می شدند و نتایج سنجش متغیری را بدست می دادند. روش اصلاح شده ای با استفاده از اسید تری کلرواستیک[3] (TCA) ۵ درصد برای تخلیص ویتامین ث وجود دارد که طی آن مراحل سانتریفیوژ، فیلتراسیون و تزریق در مدت یک ساعت انجام می شود که نتیجه آن انجام یک سنجش قابل قبول HPLC برای انواع ویتامین های ث می باشد. ستون‌های جدید بدون نیاز به ترکیب متصل کننده یونی در فاز متحرک، موجب الوشن آسکوربیک- ۲- سولفات قبل از

[1] Dehydro ascorbic acid
[2] Metaphosphoric acid
[3] Trichlor acetic acid

اسیدآسکوربیک می شود و وجود هر دو ماده با روش EIMS [1]تایید شده است.

۱-۳- مقدمه

ویتامین‌های ث از L- اسیدآسکوربیک و مشتقاتی تشکیل شده اند که در جانوران مختلف دارای فعالیت اسیدآسکوربیکی (شبه ویتامین ث) می باشند. L- اسیدآسکوربیک ناپایدار است و بسرعت به اسید دهیدروآسکوربیک (که ممکن است جهت تولید مجدد اسیدآسکوربیک فعال، احیاء شود) اکسید شده و سپس به ترکیبات غیر فعالی اکسیده می شود که فاقد فعالیت ویتامینی می باشند. محققین در گذشته، عصاره بافتها را با دقت زیاد و با استفاده از تیمارهای ملایم، اسید متافسفریک تهیه می‌کردند تا اسیدآسکوربیک تخلیص شده پایدار بماند که بعدا به شکل دهیدرو و دی کتویِ متصل به کروموفور[2] در می آمد و به روش اسپکتروفتومتری سنجش می‌شد (۱). زمانی که مشتقات اسیدآسکوربیک مقاوم به اکسایش جدا می شوند و برای تعیین فعالیت ویتامینی مورد آزمایش قرار می گیرند، به منظور اندازه گیری غلظت‌های بافتی این ویتامین، روش‌های تخلیص دقیق تری لازم است. این روش‌ها شامل واسرشت سازی پروتئین با اسید تری کلرواستیک (TCA) و اسید پرکلریک[3] (PCA) به منظور تسهیل نمودن تخلیص ترکیبات محلول در آب و سپس استفاده از آنالیز کروماتوگرافی مایع با فشار (کارایی) بالا[4] برای ویتامینهای ث و ترکیبات حد واسط موجود است (۲). استرهای آسکوربیل در این عصاره‌ها برای مدت کوتاهی پایدار می باشند ولی با استفاده از اسیدهای قوی به آرامی هیدرولیز می‌شوند. از سویی آب داغ سبب واسرشت سازی سریع بافت و تسریع اکسایش اسیدآسکوربیک می‌شود. واسرشت سازی بافتی با کمک ریز امواج[5]، موجب تظاهر ویتامین‌های ث موجود شده ولی یک فرآیند اکسایشی آهسته، در مخلوط پیچیده واکنش دهنده ها رخ می‌دهد. همگن کردن بافت‌ها در آب و سپس افزودن اسید تری کلرواستیک برای ساختن محلول ۵ درصد، سانتریفوژ، فیلتر کردن و تزریق مواد فیلتر شده سرد، نشان می دهد که ستون HPLC به L- اسیدآسکوربیک ، L-

[1] Electro-ionizing mass spectroscopy
[2] Chromophore
[3] Perchloric acid
[4] High pressure liquid chromatography(HPLC)
[5] Microwave

آسکوربیل-۲- سولفات، L- آسکوربیل-۲- منوفسفات، L- آسکوربیل-۲- دی فسفات و L- آسکوربیل-۲- تری فسفات تفکیک می‌شود (۲).

۲-۳- ویتامین های ث

اسیدآسکوربیک، یکی از عوامل عمده احیای بافتی است که بسیار ناپایدار بوده و به آسانی به اسید دهیدروآسکوربیک اکسید می‌شود که می‌تواند دوباره به اسیدآسکوربیک جهت استفاده بافت تبدیل شود (۳). شاید جذب آسکوربات در ماهیان از طریق این فرایند با احیای مجدد اسید دهیدروآسکوربیک جذب شده در سیستم گردش خون به ویتامین ث فعال، صورت بگیرد (٤). مشتقات پایدارتر ویتامین ث در ماهیان جداسازی شده اند و برخی از آنها در ماهیان دارای خاصیت ضد کمبود ویتامین ث هستند (۳، ٥). نشان داده شده است که در ماهیان L – آسکوربیل- ۲- سولفات[1] (C2S) و L – آسکوربیل – ۲- مونوفسفات[2](C2MP) فعال می باشند (٦، ۷، ۸) و احتمالا این ترکیبات طی فرایند هیدرولیز به اسیدآسکوربیک تبدیل می‌شوند. در مواقع نیاز، آسکوربیل – ۲ - سولفوهیدرولاز[3]، از طریق کنترل بازخوردی جریان خون، C2S را به اسیدآسکوربیک تبدیل می کند (۹). همچنین L – آسکوربیل- ۲- فسفاتازها (C2MP, C2DP, C2PP) نیز بسیار فعال می باشند و به آسانی در حضور فسفاتازهای موجود در بافت به اسیدآسکوربیک هیدرولیز می‌شوند (٤، ۱۰). بعلاوه آسکوربات – ۲ - گلیکوزید[4](C2G) دارای فعالیت ویتامینی در موشهای صحرایی[5] می باشد (۱۱) و آسکوربات – ۲ – استات[6] نیز شناسایی شده است که نیمه عمری نزدیک به ۲٤ ساعت در pH ٤/٥ دارد (۱۲). همچنین سایر مشتقات اسیدآسکوربیک در موقعیت کربن‌های ۲ و ٦، دارای فعالیت هستند و لازم است که در فهرست ویتامین‌های ث بالقوه قرار بگیرند (۳، ٥).

[1] L-ascorbyl-2-sulfate
[2] L-ascorbyl-2-monophosphate
[3] Ascorbyl-2-sulfohydrolase
[4] Ascorbate-2-glycoside
[5] Rat
[6] Ascorbate-2-acetate

۳-۳- ابهامات تخلیص

نخستین محققان بافت‌ها را با روش‌های ملایم، تخلیص و اسیدآسکوربیک تخلیص شده را با اسید متافسفریک نگه داری می‌کردند. سپس ماده استخراج شده را به آرامی اکسید می کردند تا اسید دهیدروآسکوربیک و ساختار دی کتویِ متصل به کروموفور تشکیل شود که براحتی به روش اسپکتروفتومتری خوانده می‌شد (۱). بدین منظور چندین ترکیب مورد استفاده قرار گرفت و ترکیب ۲-٤ دی نیترو فنیل هیدرازین[1] (DNPH) به عنوان روشی مناسب جهت آنالیز بافتی ویتامین ث انتخاب شد (مطالعه Dabrowski و همکاران (٤)). متاسفانه، تیمارهای ملایم تخلیص، منجر به شناسایی مشتقات متصل به بافت اسیدآسکوربیک نمی شود و به منظور آزادسازی مشتقات استری، باید از روش‌های دقیق تری استفاده شود. روش‌های قبلی، تخلیص ملایم را در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد استفاده می کردند که با آب در حال جوشیدن برای تولید «ویتامین ث کل» دنبال می‌شد و اختلاف حاصله به عنوان ویتامین ث متصل به بافت قلمداد می شد (۱۳، ١٤) این تکنیک‌های غیر مستقیم معایب متعددی داشتند. اول اینکه تخلیص مورد استفاده در این روش ها ناقص بود و دوم اینکه شرایط مورد استفاده سبب افزایش هرچه بیشتر هیدرولیز استرهای تخلیصی می شد و ترکیبات تداخل گر می‌توانستند در برآورد نهایی اسیدآسکوربیک یا مشتقات آسکوربات با توجه به نوع بافت مورد آزمایش، ایجاد خطا نمایند. بنابراین به منظور تشخیص نتایج تخلیص بافت توسط ترکیبات اسید تری کلرواستیک یا اسید پرکلریک مورد استفاده در واسرشت سازی بافت و تخلیص آسکوربات، تلاش‌ها روی آنالیز مستقیم ترکیب بافتی با استفاده از HPLC متمرکز شد. اسید تری کلرواستیک ۱۰ درصد پروتئین‌های بافتی را واسرشت نموده و سبب آزادسازی استرهای آسکوربات می‌شود. با این حال، استرهای سولفاته و فسفاته حتی با نگهداری در دمای پایین نیز به سرعت به اسیدآسکوربیک هیدرولیز می‌شوند. بنابراین آنالیز HPLC باید ظرف مدت چند دقیقه صورت پذیرد یا کاهش میزان استرها ثبت شود (٤، ٥). تکنیک جدیدی با استفاده از همگن نمودن بافت برای مدت یک دقیقه در مخلوط آب و یخ و سپس رقیق سازی با حجم مساوی اسید تری کلرواستیک ۱۰ درصد برای رسیدن به محلول اسید تری کلرواستیک ۵ درصد، ایجاد شده است که سپس به مدت یک دقیقه دیگر قبل از

[1] 2,4-dinitrophenyl hydrazine

انجام عمل سانتریفیوژ و فیلتراسیون، همگن می شـود (۲). ایـن عـصاره نهـایی بـه آرامـی اسـترها را هیدرولیز (آبکافت) می کند و تعیین میزان کل و میـزان اسـتری بافتهـا را ممکـن مـی سـازد زمانیکـه سنجش‌ها حداکثر ظرف مدت ۱ تا ۲ ساعت پس از آماده سازی نمونه‌ها انجام شود. واسرشت سـازی بافتها بوسیله امواج میکرو، موجب تولید محلول هایی می‌شود کـه مـستعد اکـسایش اسیدآسـکوربیک آزاد شده می باشند و مقادیر بافتی پایین آن را منجر می شوند. این معما که چه تکنیکی برای استخراج اسیدآسکوربیک کل و مشتقات فعال آن بایستی استفاده شود، هنوز هم بدون پاسخ مانـده اسـت ولـی محلول حاصله از افزودن آب برای مدت یک دقیقه و افزودن اسید تری کلرواستیک ۱۰ درصد، منجـر به تولید محلول تخلیص اسید تری کلرواستیک ۵ درصد می شـود، کـه ایـن محلـول سـبب تخلـیص استرها برای انجام سنجش آسکوربات – ۲ – گلیکوزید در محدوده زمانی مجـاز سـنجش مـی گـردد (رجوع به جدول ۱–۳).

جدول۱-۳ : ابهامات عمل تخلیص در سنجش HPLC

عصاره های آبی	**ویتامین ث متصل کمی تخلیص می شود.**
عصاره های اسید متافسفریک	**درصدی از ویتامین ث تخلیص می شود.**
اسید تری کلرواستیک (۱۰ درصد)	**موجب آبکافت ویتامینها می شود.**
اسید پرکلریک (۱۰ درصد)	**موجب آبکافت ویتامینها می شود.**
عصاره TCA (۵ درصد)	**آبکافت آهسته را موجب می شود.**
عصاره امواج میکرو	**موجب اکسایش AA می شود.**
TCA (۱ درصد به همراه امواج میکرو)	**بهترین روش موجود**

٤-۳ - تکنیک‌های سنجش

روش DNPH در آنالیز آسکوربات توسط Dabrowski و همکاران (٤) مورد بررسی قرار گرفته و روش‌های اصلاح شده‌ای توسط Dabrowski و Hinterleitner (١٦) برای تقلیل خطاهای ناشـی از وجود ترکیبات تداخل گر، ارائه شده است. این روش همه مشتقات و اسـترهای آسـکوربات دارای فعالیت ویتامینی را مورد سنجش قرار نمی دهد. روش‌های HPLC به طـور گـسترده‌ای بـا درجـات مختلفی از کارایی استفاده شده اند. یک تکنیک مناسب، کاربرد ستون‌های متوالی برای تاخیر زمان‌های اوج الوشن است تا تفکیک بهتر مقادیر کمی استرهای موجـود را ممکـن سـازد (۲) همچنـین نکـات مبهمی در مورد اتصال دهنده یونی مورد استفاده در سنجش ها، وجود دارد.

توالی الوشن با استفاده از یک اتصال دهنده یونی به صورت (از سمت چپ) C1-C2S- C2MP-C2DP-C2TP می باشد. اغلب ترکیبات تداخل گر در چندین بافت بویژه در مواد غذایی سبب پوشاندن نقاط اوج می‌شوند. پاک سازی ستون‌ها پس از سنجش، کار وقت گیری است و همچنین پایداری فاز متحرک طی زمانهای گسترده مورد نیاز در سنجش های تکراری، نادیده گرفته می شود. خصوصیات ستون از شرکت سازنده تا جزئیات پکینگ تا فشار مجاز برای تفکیک سریع ترکیبات مورد نظر متفاوت است. برخی ستون‌ها ترتیب الوشن ترکیبات را معکوس می‌کنند. مثل ستون ۵µm C18 Alltec زمانیکه هیچ ترکیب یونی اتصال دهنده ای استفاده نشود (۱۷).
تکنیک مذکور، سنجش ساده مقدار C2S موجود را ممکن می سازد (جدول ۲-۳) که با سنجش مایع الوشن شده توسط EIMS تایید شده است (۱۸).

جدول۲-۳: فازهای متحرک برای الوشن

استات سدیم ۰/۱ مولار+ ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر EDTA
استات سدیم ۰/۱ مولار+ ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر EDTA + اتصال دهنده یونی
استات آمونیوم ۰/۱ مولار
فسفات-K-H ۰/۲۵ مولار
تمامی موارد فوق در pH =۵
سرعت جریان ۰/۷۵ میلی لیتر بر دقیقه در فشار ۲۲۰۰ psi

۵-۳- بحث و نتیجه گیری

با استفاده از تلفیق همگن سازی آبی به مدت یک دقیقه و افزودن حجم مساوی از TCA ۱۰ درصد جهت ساخت محلول TCA ۵ درصد و سپس همگن سازی به مدت یک دقیقه دیگر و سرانجام انجام سانتریفوژ (۱۵۰۰۰×g برای مدت ٤ دقیقه)، تکنیک سنجش بافتی جدیدی در ماهیان حاصل آمد. مایع رویی[1] بوسیله فیلتر سرنگی ۰/٤٥ µm فیلتر، و به دستگاه HPLC تزریق می شود که دارای پمپ ایزوکراتیک و فیلتر و یک ستون ۵µm C18 Alltec می باشد. دستگاه به آشکارساز UV در طول موج ۲٥٤ nm متصل می شود که در ارتباط با یک آشکار ساز الکتروشیمیایی با ولتاژ ۰/۷۲ ولت

[1] Supernatant

می باشد (۱۷). هنگامیکه C2S ترکیب مورد نظر برای سنجش در بافت باشد، این تکنیک می‌تواند مشکل وجود این ترکیب در بدن ماهیان مختلف را رفع کند و به طور همزمان مقادیر L- اسید آسکوربیک موجود را ثبت نماید. نمونه‌ها باید چندین ساعت قبل از وقوع کاهش شدید میزان C2S، مورد سنجش قرار بگیرند (جدول ۳-۳).

جدول ۳-۳: گزارشهای C2S در بافت ماهیان

Halver et al. *Ann.* NY *Acad. Sci.* 258:81-102 (1975)
Tsujimura et al. *Vitamins* 52:35-44 (1978)
Benitez and Halver. Proc. Nat. *Acad. Sci.* U.S.A. 79:5445-5449 (1982)
Tuckler and Halver. J, *Nutrition* 114:991-1000 (1984)
Tucker and Halver. *Nutrition Rev.* 42:173-179 (1984)
Felton and Halver. *Aquacult* & Fish. *Mgmt.* 18:387-390 (1987)
Grant et al. *J. World Aquactdt. Soc.* 20:143-157 (1989)
Felton et al. J. *Liquid Chromatography* 17:123-1319 (1994)
Felton and Grace. *J. Liquid. Chromatography* 18:1563-1581 (1995)
Abdelghany. J. *World Aquaculture* 27:449-455 (1996)

منابع

1. Roe, J. H. and Kuether, C. A., (1943). The determination ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinophenylhydrazine method. J. Biol. Chem. 174: 201-208.
2. Feltone, S. P. and Halver, J. E., (1987). Vitamin C1and C2 analysis using double column reverse phase high pressure liquid chromatography. Aquacult. Fish. Mgmt. 18: 387-390.
3. Seib, P. A. and Tolbert, B. M., (eds) (1982). Ascorbic acid: chemistry, metabolism and uses. Adv. Chem., 200, American Chemical Society, 604pp.
4. Dabrowski, K., Matusiewicz, and Blom, J. H., (1994). Hydrolysis, absorption and bioavailability of ascorbic acid esters in fish. Aquaculture, 124: 169-192.
5. Seib, P. A., (1985). Oxidation, monosubstitution and industrial synthesis of ascorbic acid. Int. J. Vit. Nutrition Res. S27: 259-306.
6. Halver, J. E., Smith, R. P., Tolbert, B. M., and Baker, E. M., (1975). Utilization of ascorbic acid in fish. Ann. N. Y. Acad. Sci. 258: 81-102.
7. Abdelghany, A. E., (1996). Growth response of Nile tilapia to dietary L-ascorbic acid, L-ascorbyl-2-sulfate, and L-ascorbyl-2-polyphosphate. J. World Aquaculture Soc. 27: 449-455.
8. Grant, B. F., Seib, P. A., Liao, M. L., and Corporn, K., (1989). Polyphosphated L-ascorbic acid: A stable form of vitamin C for aquaculture feeds. J. World Aquacult. Soc. 20: 143-157.
9. Benitez, L. V., and Halver, J. E., (1982). Ascorbic acid sulfate sulfohydrolase (C2-sufatase): The modulator of cellular levels of L-ascorbic acid in rainbow trout. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79: 5445-5449.
10. Anggawate-Satyabudhyl, A. M., Grant, G. F., and Halver, J. E., (1989). Effects of L-ascorbyl phosphate (AsPP) on growth and immunoresistance of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) to infectious hematopoietic necrosis (IPN) virus. Proc. Third Int. Symp. On Feeding and Nutr. In Fish Tsoba, Japan, 411-426.
11. Muto, N., Terasawa, K., and Yamamoto, I., (1992). Evaluation of ascorbic acid-2-O-glycoside as vitamin C source: mode of intestinal hydrolysis and absorption following oral administration. Int. J. Vit. Nutr. Res. 62: 318-323.
12. Paulssen, R. B., (1975). Acylation of ascorbic acid in water. J. Pharm. Sci. 64: 1300-1305.
13. Tucker, B. W., and Halver, J. E., (1984). Ascorbate-2-sulfate metabolism in fish. Nutr. Rev. 42:173-179.
14. Tucker, B. W., and Halver, J. E., (1984). Distribution of ascorbate-2-sulfate and distribution, half-life turnover rates of (1-14C) ascorbic acid in rainbow trout. J. Nutr. 114: 991-1000.
15. Wang, X. Y., and Seib, P. A., (1990). Liquid chromatography determination of combined form of L-ascorbic acid (L-ascorbate-2-sulfate) in fish tissue by release of ascorbic acid. Aquaculture, 87: 65-84.

16. Dabrowski, K., and Hinterleitner, S., (1989). Simultaneous analysis of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and ascorbic sulfate in biological material. Analyst, 114: 83-87.

17. Felton, S. P., Grace, R., and Halver, J. E., (1994). A non-ion-pairing method for measuring new forms of ascorbate and ascorbic acid. J. Liquid Chromat. 17: 123-131.

18. Feltone, S. P., and Grace, R., (1995). Authentication of L-ascorbyl-2-sulfate in salmonid gastric tissue: HPLC/electro-spray ionization mass spectroscopic verification. J. Liquid Chromat. 18: 1563-1581.

19. Tsujimura, J., Yoshikawa, H., Hasegawa, T., Suzuki, T, Suwa, T., and Kitamura, S., (1978). Studies on the vitamin C activity of ascorbic acid-2-sufate on the feeding test of new-born rainbow trout. Vitamins, 52: 35-43.

«فصل ٤»

فعالیت و اهمیت گلونولاکتون اکسیداز در ماهیان

Regis Moreau and Konrad Dabrowski

٤-١- مقدمه

در این فصل از کتاب، پیرامون توزیع توانایی بیوسنتز L- اسیدآسکوربیک (ویتامین ث) در مهره داران بویژه ماهیان بحث می‌کنیم. کارهای تحقیقاتی انجام شده طی دهه قبل در زمینه زیست شناسی ماهیان، سبب روشن شدن نکات مهمی گردیده است ولی هنوز بحثهایی پیرامون توانایی ساخت(سنتز) اسیدآسکوربیک در سلسله جانوری و همچنین منشاء و فیلوژنی(تکامل نژادی) آن وجود دارد و در اینجا به بررسی وضعیت قبلی و کنونی دانش موجود در این زمینه خواهیم پرداخت و روش‌هایی که اغلب برای اندازه گیری فعالیت گلونو- ٤،١- لاکتون اکسیداز (GLO, EC 1.1.3.8) استفاده شده است را نیز به طور دقیق مورد بررسی قرار می دهیم. تحقیقات زیادی پیرامون مکانیزم بیوسنتز اسیدآسکوربیک در ماهیان آغاز شده است که این مطالعات نیز با مدل موجود در پستانداران مقایسه خواهد شد. مطالعه تنظیم بیوسنتز اسیدآسکوربیک در ماهیان می‌تواند در درک فرایند تغذیه و همچنین پرورش آنها و احتمالا در تعیین نیاز این جانوران به ویتامین ث در ارتباط با شرایط فیزیولوژیک همچون تولید مثل، سیستم ایمنی و استرس، موثر باشد.

اسیدآسکوربیک یک مولکول ضروری در سلامت عمومی جانوران از قبیل رشد (۱ – ٤)، تشکیل استخوان (۵ – ۷) و تولید مثل (۸ – ۱۰) است. عملکردهای ویتامین ث به دفعات بازنگری شده است و در اینجا از بحث جزئی در این مورد خودداری خواهیم نمود(۱۱). مهمترین عملکرد پذیرفته شده برای ویتامین ث، نقش این ویتامین به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی محلول در آب است. اسیدآسکوربیک به عنوان یک آنتی اکسیدان قطع کننده زنجیره[1]، می‌تواند با به دام انداختن رادیکال‌ها، سبب قطع واکنشهای زنجیری رادیکال‌های آزاد گردد. در کل بدن، اسیدآسکوربیک (به صورت یک آنیون در pH فیزیولوژیک) با دادن یک هیدروژن و یک الکترون به تعداد زیادی از زیست مولکول‌های اکسید شده و عناصر نادری مثل کوآنزیم های فلزی، به عنوان یک عامل احیاء کننده، عمل کرده و در عوض خود اسیدآسکوربیک اکسید می‌شود. اسیدآسکوربیک اکسید شده به شکل رادیکال آسکوربیل[2] (محصول تک الکترونی اکسایش) یا اسید دهیدروآسکوربیک[3] (محصول دو الکترونی اکسایش) می‌تواند مجددا بطور طبیعی، شیمیایی- بوسیله گلوتاتیون احیاء شده (GSH) - یا آنزیمی- بوسیله ردوکتاز وابسته به GSH یا NAD(P)H[4] - باز تولید شود (۱۲تا ۱۵). در نهایت دهیدرو اسیدآسکوربیک به ترکیباتی (١٦) فاقد خصوصیت آنتی اکسیدانی مانند اسید ۳،۲- دی کتو گولونیک[5] متابولیز و سپس به اکسالات[6] و تراونات[7] هیدرولیز می شود. تامین اسیدآسکوربیک به صورت داخلی (بیوسنتز) یا خارجی (جیره غذایی) به حفظ و ذخیره سازی اسیدآسکوربیک بدن کمک می‌کند. در نگاه اول، به نظر می‌رسد که مهره‌داران، در بحث تغذیه اسیدآسکوربیک، دارای تنوع زیادی باشند. با وجود اینکه بسیاری از مهره‌داران قادر به ساخت این ویتامین هستند، برخی از آنها فاقد این توانایی بوده و بنابراین به یک منبع خارجی این ویتامین نیازمند می باشند و تا به امروز هیچ مکانیزمی برای توضیح چنین اختلافی در بین مهره داران عنوان نشده است.

[1] Chain-breaking
[2] Ascorbyl radical
[3] Dehydroascorbic acid
[4] GSH or NAD(P)H-dependent reductase
[5] 2,3-diketogulonic acid
[6] Oxalate
[7] Threonate

۲-٤- مسیر ساخت L – اسید آسکوربیک در مهره داران

نخستین بار، مسیر ساخت اسیدآسکوربیک، در موش‌های صحرایی[1] مورد مطالعه و تشریح قرار گرفت و سپس به تمام مهره داران تعمیم داده شد. اسیدآسکوربیک از D – گلوکز یا ازD – گالاکتوز به عنوان بخشی از مسیر اسیدگلوکورونیک[2] ساخته می‌شود (۱۷). این مسیر همچنین در مکانیزم‌های سمیت زدایی از طریق اتصال اسیدگلوکورونیک به ترکیبات خارجی، عمل می‌کند (۱۸). مسیر بیوسنتز اسیدآسکوربیک منشعب شده از L – اسیدگولونیک[3]، شامل سه مرحله پی در پی است: در ابتدا، آنزیم L – گولونولاکتون هیدرولاز[4](EC 3.1.1.18) تشکیل لاکتون از L – اسیدگولونیک را کاتالیز می کند (۱۹). در مرحله دوم، اکسایش L - گولونولاکتون[5] بوسیله آنزیم L – گولونولاکتون اکسیداز[6] (GLO, EC 1.1.3.8) کاتالیز می‌شود و در مرحله سوم، ایزومریزاسیون(همپارش)[7] خودبخودی ۲- کتو-L - گولونولاکتون منجر به تولید اسیدآسکوربیک می‌شود (۲۰). بیوسنتز اسیدآسکوربیک در پستانداران توسط Sato و Udenfreind بررسی شده است (۲۱). در پرندگان، خزندگان، دوزیستان و ماهیانی که اسیدآسکوربیک می سازند همانند پستانداران، اسیدآسکوربیک از D - گلوکز بعنوان بخشی از مسیر اسیدگلوکورونیک حاصل می شود. از آنجایی که GLO تنها آنزیم از دست رفته در پستانداران مستعد ابتلا به اسکوروی است (۲۲)، می‌توان اذعان نمود که GLO، آنزیم کلیدی ساخت اسیدآسکوربیک در جانوران می‌باشد. جانوران فاقد آنزیم GLO، قادر به ساخت اسیدآسکوربیک نخواهند بود و بنابراین به منظور حفظ سلامتی، رشد و تولید مثل نیاز به دریافت این ویتامین از طریق غذا دارند.

---

[1] Rat
[2] Glucuronic acid
[3] L-gulonic
[4] L-gulonolactone hydrolase
[5] L-gulonolactone
[6] L-gulonolactone oxidase
[7] Isomerization

۳-٤- اندازه گیری میزان فعالیت GLO در بافتهای ماهیان

۱-۳-٤- آماده سازی بافت

با وجود بررسی بافت‌هایی مانند کبد، هپاتوپانکراس، روده و ماهیچه‌ها در ماهیان، فعالیت GLO فقط در کلیه‌ها مشاهده شده است (۲۳). فعالیت GLO میتواند در عصاره‌های خام[1] و میکروزم‌های[2] تهیه شده از بافت‌های منجمد شده به روش انجماد در دمای پایین سنجش شود. در تاسماهی سفید، بازیابی فعالیت GLO در کلیه منجمد شده در ۸۰- درجه سانتی گراد در مقایسه با کلیه تازه، اختلاف معنی داری نداشت (۲٤). اگر قرار باشد آنالیز بر اساس روش آماده سازی آنزیم خام انجام بگیرد، باید بخشی از بافت (۰/۳ تا ۰/۵ گرم) به صورت دستی یا با دستگاه همزن همگن کننده، در ۲ تا ۳ میلی لیتر از بافر فسفات ۵۰ mM (pH = ۷/٤) همگن شود که شامل ۱ میلی مول EDTA و ۰/۲ درصد داکسی کولات سدیم[3] است و سپس هموژنات حاصله در دمای ٤ درجه سانتی گراد برای مدت ۱۵ دقیقه، در g ۱۵۰۰۰ سانتریفوژ گردد. معمولا برای افزایش دقت و تکرارپذیری سنجش میزان فعالیت، تهیه میکروزم توصیه می‌شود. به منظور جداسازی میکروزم‌ها، نمونه بافتی در ساکاروز ۰/۲۵ مولار خنک (۱ گرم بافت در ٤ تا ٦ میلی لیترساکاروز) همگن شده و سپس در دمای ٤ درجه سانتی گراد برای مدت ۱۵ دقیقه در g ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ می‌شود. حال مایع رویی با دور g ۱۰۰۰۰۰ در دمای ٤ درجه سانتی گراد برای مدت ٦۰ دقیقه سانتریفیوژ شده تا پلت‌های میکروزم بدست آید. پلت‌ها در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار حاوی ۰/۲ درصد داکسی کولات سدیم معلق شده تا غشای آنها حل و آنزیم‌ها آزاد شوند.

۲-۳-٤- سنجش کمی فعالیت

شرایط بهینه برای سنجش GLO در ماهیان قبلا بیان شده است (۲۳). به طور خلاصه، نیمی از محلول آماده شده در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH = ۷/٤) در حضور L-گلونولاکتون ۱۰ میلی مولار و گلوتاتیون احیاء شده ۲/۵ میلی مولار، انکوباسیون می شود. دمای سنجش بالای ۲۸ درجه

[1] Crude extract
[2] Microsome
[3] Sodium deoxycholate

سانتی گراد اثر معنی داری بر فعالیت GLO تاسماهیان و لامپری های دریایی ندارد اگرچه فعالیت آنزیم در دمای بالاتر از این مقدارکاهش می‌یابد و بطور معمول فعالیت GLO ماهیان در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد سنجیده می‌شود. Q_{10} در ۲۵ – ۱۵ درجه سانتی گراد برای تاسماهی دریاچه ای و لامپری دریایی به ترتیب ۱/٦٥ و ۱/۷۳ می‌باشد (۲۵، ۲٦).

اغلب سنجش‌های فعالیت GLO در بافت های جانوری با تاکید بر روش‌های ارایه شده در جدول ۱-٤ انجام می‌گیرد (۲۷ تا ۳٤، ۲۳). این روش‌ها، می‌تواند به چهار دسته طبقه بندی شود، ۱) روش رنگ سنجی دی نیتروفنیل هیدرازین[1]، ۲) روش رنگ سنجی ۲، ۲ – دی پریدیل[2]، ۳) طیف سنجی UV[3]، ٤) روش مصرف اکسیژن[4]. سه روش اول میزان تولید اسید آسکوربیک را اندازه گیری می‌کنند. بطور دقیق تر، روش اول مقدار اسیدآسکوربیک کل را تعیین می‌کند، (اسیدآسکوربیک احیا شده و اکسید شده) در حالیکه روش‌های دوم و سوم، تنها اسیدآسکوربیک احیا شده را اندازه گیری می‌کنند. روش چهارم، مصرف اکسیژن را اندازه می‌گیرد که یکی از سوبستراهای GLO می باشد. دو روش اول واکنشهای متوقف شده هستند و نیازمند اخذ زیرنمونه‌هایی در ابتدا و انتهای واکنش آنزیمی هستند (۲۰ تا ۳۰ دقیقه). سرعت آنزیم باید در کل زمان واکنش خطی باشد. فعالیت GLO به صورت تولید خالص اسیدآسکوربیک بیان می‌شود. روش‌های سوم و چهارم دائما مسیر واکنش را پایش می‌کنند و مزیت این روش‌ها نسبت به روش‌های واکنش متوقف شده در این است که متصدی دستگاه[5]، از رفتار غیر عادی آنزیمی مطلع می‌شود. عیب روش چهارم در این است که فعالیت آنزیم‌های وابسته به اکسیژن (اکسیدازها و اکسیژنازها) و اکسایش خودبخودی برای مصرف اضافی اکسیژن در شرایط آزمایشگاهی بویژه در زمان سنجش عصاره بافتی خام، باید محاسبه شود. به منظور محاسبه جذب اکسیژن، گروه شاهدی بدون L – گولونولاکتون یا با D – گولونولاکتون (همپارش غیرفعال) به جای L – گولونولاکتون در گروه‌های آزمایشی گنجانده می‌شود.

[1] Dinitrophenyl hydrazine-colorimetric method
[2] 2,2-dipyridil-colorimetric method
[3] UV spectrophotometry
[4] Oxygen consumption method
[5] Operator

جدول ۱-٤: سنجش فعالیت آنزیم GLO با استفاده از L - گولونولاکتون به عنوان سوبسترا

آنالیز فرآورده نهایی	منابع
جذب مشتقات DNPH (۵۴۰-۵۲٤nm)	Roe and Kuether 1943(27), Ikeda et al. 1963(28), Ayaz et al. 1976 (29), Terada et al. 1978 (30), Dabrowski and Hinterleitner 1989 (31)
جذب مشتقات ۲،۲'- دیپریدیل (۵۲٤nm)	Sullivan and Clarke 1955 (32), Zannoni er al. 1974 (33)
جذب UV (۲٦۵nm)	Dabrowski 1990 (23)
مصرف اکسیژن	Kiuchi et al. 1982 (34), Dabrowski 1990 (23)

۳-۳-٤- سنجش کیفی فعالیت

یک روش شیمی بافتی به منظور تشخیص GLO بصورت *in situ* توسط Cohen (۳۵) ارایه و توسط Nakijima و همکاران (۳٦) اصلاح گردید. در این روش از مقاطع بافتی جانوری (۳۵، ۳٦) مثل ماهیان (۳۷) استفاده می شود. ترتیب وقایع شامل اکسایش L - گولونولاکتون همراه با انتقال الکترون ها به واسطه گرها و یک گیرنده نهایی الکترون، نیتروبلوتترازولیوم[1] است که به محض احیاء شدن تشکیل فورمازان[2] - به رنگ آبی تیره - را در محل فعالیت آنزیم می دهد. رنگ شدیدتر زمانی مشاهده می‌شود که GLO با منادیون[3] (۳۵)، ٤،۲- دی نیتروفنیل[4] و متوسولفات فنازین[5](۳٦) فعال شده باشد. با این وجود مشکلات چندی نیز وجود دارد. زنتین اکسیداز سیتوزولی[6] (۳۸) و اکسیدازهای زنجیره تنفسی با ترکیب متاسولفات فنازین- نیتروبلوتترازولیوم واکنش می‌دهند. سیانید ترکیبی است که معمولا برای جلوگیری از فعالیت سیتوکرم اکسیداز استفاده می‌شود. کاهش ترکیب تداخل گر نیتروبلوتترازولیوم زمانی است که آلدونولاکتوناز[7] D- گلورونات[8] و L- گزیلولوز را از

[1] Nitroblue tetrazolium
[2] Formazan
[3] Menadione
[4] 2,4-dinitrophenyl
[5] Phenazine methosulfate
[6] Xanthine oxidase
[7] Aldonolactonase
[8] D-glucoronate

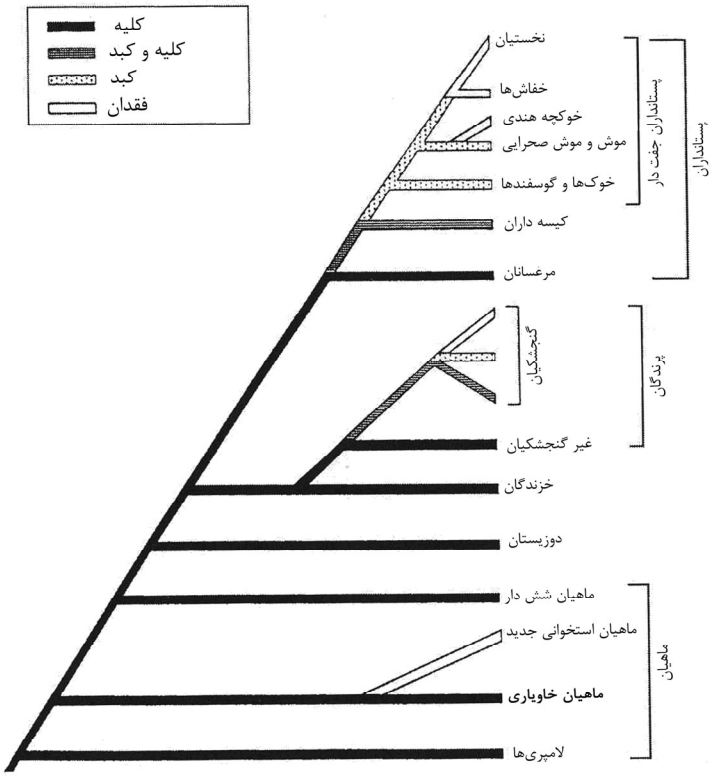
L- گولونولاکتون تولید می کند که در این مورد باید EDTA افزوده شود چرا که این ماده ممانعت کننده از فعالیت آلدونولاکتوناز است.

٤-٤- توزیع فعالیت GLO در مهره داران

١-٤-٤- توزیع فعالیت GLO در مهره داران خشکی زی

تقریبا ناتوانایی ساخت اسیدآسکوربیک در بین مهره داران یک استثناء محسوب می‌شود (شکل١-٤). بسیاری از مهره داران رده‌های بالاتر جانوری می‌توانند اسیدآسکوربیک را در بدن خود بسازند زیرا دارای GLO فعال در میکروزم‌های کبدی یا کلیوی یا هر دوی آنها می باشند (٣٩، ٤٠). در میان خزندگان و دوزیستان که تا به امروز مورد بررسی قرار گرفته‌اند، همگی دارای فعالیت GLO در کلیه‌های خود می‌باشند (٤١ تا ٤٣). در گنجشکیان[1] تحت بررسی مشخص شد که ١٦ گونه از ٢٨ گونه، قادر به تولید اسیدآسکوربیک نیستند (٤٤) و این در حالی است که ١٢ گونه از گنجشکیان و ١١ گونه از پرندگان غیر وابسته به این راسته، دارای GLO فعال در کلیه یا کبد خود هستند. آنالیز مجدد فیلوژنی جدید توسط Chaudhuri و Chatterjee (٤٤) نشان داد که وقوع توانایی ساخت اسیدآسکوربیک در آنها غیر قابل پیش بینی و مبهم است (٤٥). در بین پستانداران، نخستیان، خوکچه هندی[2] (٤٦) و خفاش‌ها[3] (٤٧) نمی توانند اسیدآسکوربیک را از نو تولید کنند که این نقص آنزیمی نتیجه جهش ژن GLO در آنهاست (٤٨ تا ٥٠). تاریخ از دست دادن GLO در اجداد خوکچه هندی و انسان تقریبا به ٢٠ و ٧٠ میلیون سال قبل بر می‌گردد (٤٩، ٥٠). تزریق GLO ماکیان (با انجام تغییراتی که از بروز پس زنی ایمنی جلوگیری شده بود) به خوکچه هندی سبب تولید اسیدآسکوربیک می شود و این عمل با افزایش میزان اسیدآسکوربیک در پلاسما همراه بود (٥٢).

[1] Passerins
[2] Guinea pig
[3] Rat



شکل۱-٤ : فیلوژنی و موقعیت بافتی آنزیم GLO در مهره‌داران. نمودار به وضوح نشان می‌دهد که اغلب اجداد مشترک مهره داران امروزی دارای فعالیت GLO در کلیه خود بوده‌اند. همزمان با تکامل مهره‌داران، مکان قرارگیری GLO از کلیه به کبد انتقال یافته است و GLO به طور همزمان در کلیه و کبد وجود دارد. در نهایت GLO در بیش از یک مکان یعنی، ماهیان استخوانی، گنجشکیان، خوکچه هندی، خفاش‌ها و نخستیان از بین رفته است.

۲-٤-٤- توزیع GLO در ماهیان (جدول۲-٤) (۲۳ تا ۲٦، ۳۷، ۵۳ تا ٦۷، ۸٤)

بیست سال پیش گزارش شد که ممکن است برخی از ماهیان دارای توانایی بیوسنتز اسیدآسکوربیک را داشته باشند (۵۵، ۵۷). قبل از این گزارش، تصور می‌شد که تمامی ماهیان فاقد فعالیت GLO باشند و توانایی ساخت اسیدآسکوربیک (با دارا بودن GLO) برای اولین بار در دوزیستان و خزندگان مشاهده شد (٤۱، ٤۲). با وجود اینکه گزارشهای اولیه اهمیت زیادی در زیر سوال بردن فقدان همیشگی GLO در بین ماهیان امروزی داشته اند، امروزه بسیاری از این اطلاعات از نظر

آنالیزی مورد تردید و از منظر تکاملی نیز گمراه کننده می باشند. Yamamoto وهمکاران (۵۵)، Sato و همکاران (٥٦) و بعدها Soliman و همکاران (۳۷) و Thomas و همکاران (۵۸)، در مطالعاتشان از روش‌های DNPH که توسط Ikeda و همکاران (۲۸) و Terada و همکاران (۳۰)، توصیه شده بود، برای اندازه گیری فعالیت GLO در ماهیان استخوانی استفاده کردند و بیان نمودند که برخی ماهیان استخوانی مانند کپور معمولی *Cyprinus carpio*، و ماهی حوض(طلایی)*Carassius auratus*، واجد فعالیت GLO می باشند. چنانکه بیان شد، بر اثر نبود تصحیح مناسب مشتقات تداخل گر DNPH، اطلاعات گزارش شده در مطالعات مذکور اشتباه بودند (شکل ۲-٤). از آنجائیکه میزان فعالیت GLO در ماهیان در پایین ترین حد خود است (۱≥ میکرومول اسیدآسکوربیک به ازای یک گرم بافت در ساعت)، نتایج این دسته از محققین دارای خطاهای آنالیزی است و در حقیقت ماهیان استخوانی مورد آزمایش، بعید است که دارای فعالیت GLO باشند (جدول۳-٤) (۲۳ تا ۲۸، ۳۰ تا ۳۲، ۳۷، ۵۵ تا ٦۱، ٦۳، ٦۷، ٦۸).

جدول ۲-٤: پراکنش حضور GLO در ماهیان

منابع	نتایج
***Chatterjee 1973b*[53]**	**عدم فعالیت GLO در ماهیان استخوانی حقیقی:** ***Anabas testudineus, Apocryptes lanceolatus, Chanos chanos, Catla catla, Cirrhina mrigala, Clarias batrachus, Heteropneustes fossilis, Labco calbasu, L.rohita, Lates calcarifer, Mystus bleekeri, Megalops cyprinoids, Mugil persiu, Notopterus notopterus, Ophiocephalus punclatus, O.Striatus, Tilapia mossambica.***
***Wilson 1973*[54]**	**عدم فعالیت GLO در ماهیان استخوانی حقیقی:** ***Ictalurus fructatus, I.punctatus.***
***Yamamoto et al., 1978*[55]**	**عدم فعالیت GLO در ماهیان استخوانی حقیقی:** ***Anguilla japonica, Oncorhynchus masou, Pagrus major, Pleglossus altivelis, Salmo gairdneri, Serriola quinqueradiata, Stephanolepis cirrhiferi, Tilapia nilotica*** **فعالیت GLO گزارش شده در ماهیان استخوانی حقیقی:** ***Carassius carassius, Cyprinus carpio, Parasilurus asotus, Tribolodon hakonensis.***
***Sato et al., 1980*[56]**	**گزارش فعالیت GLO در ماهیان استخوانی حقیقی:** ***Cyprinus carpio***

ادامه جدول ۲-۴ :

منابع	نتایج
Dykhuizen et al., 1985[37]	گزارش فعالیت GLO درماهیان دودمی (شش دار): *Neoceratodus forsteri*
Soliman et al., 1985[37]	عدم فعالیت GLO در ماهیان استخوانی حقیقی: *Ctenopharyngodon idella, Oreochromis niloticus, O. macrochir, O. mossambicus, Salmo gairdneri, S. trutta, Salvelinus fontinalis, Sarotherodon galilaeus, Tilapia buttikoferi, T. zilli* گزارش فعالیت GLO در ماهیان استخوانی حقیقی: *Cyprinus carpio, Oreochromis aureus, O. spirulus*
Thomas et al., 1985[58]	گزارش فعالیت GLO در ماهیان استخوانی حقیقی: *Carassius aurutus, Fundulus grandis, Mugil cephalus, Tilapia aurea*
Dabrowski 1990[23]	عدم فعالیت GLO در ماهیان استخوانی حقیقی: *Cyprinus carpio, Leuciscus cephalus*
Dabrowski 1991[59]	عدم فعالیت GLO در ماهیان استخوانی حقیقی: *Cyprinus carpio*
Dabrowski 1994[60]	گزارش فعالیت GLO در ماهیان غضروفی- استخوانی: *Acipcnser transmontanus, A. fulvescens, Polydon spathula.*
Touhata et al., 1995[61]	عدم فعالیت GLO در ماهیان استخوانی حقیقی: *Lophiomus setigerus, Paralichtys olivaceus, Neopterygii, Lepisosteus oculatus, chondrostei, Polypterus senegalus* گزارش فعالیت GLO درماهیان دودمی: *Protopterus aethiopicus, Elasmobranclii, Dasyatus akajei, Mustelus manazo, Agnatha, Lampetra japonica.*
Mishra and Mukhopadhyay 1996[62]	عدم فعالیت GLO در ماهیان استخوانی حقیقی: *Clarias batrachus*
Moreau et al., 1996[63]	فعالیت GLO گزارش شده در ماهیان غضروفی-استخوانی: *Acipenser baeri.*
Moreau and Dabrowski 1996[24]	عدم فعالیت GLO در ماهیان استخوانی حقیقی: *Ictalurus punctatus, Oncorhynchus mykiss* گزارش فعالیت GLO درماهیان غضروفی – استخوانی: *Acipenser transmontanus*

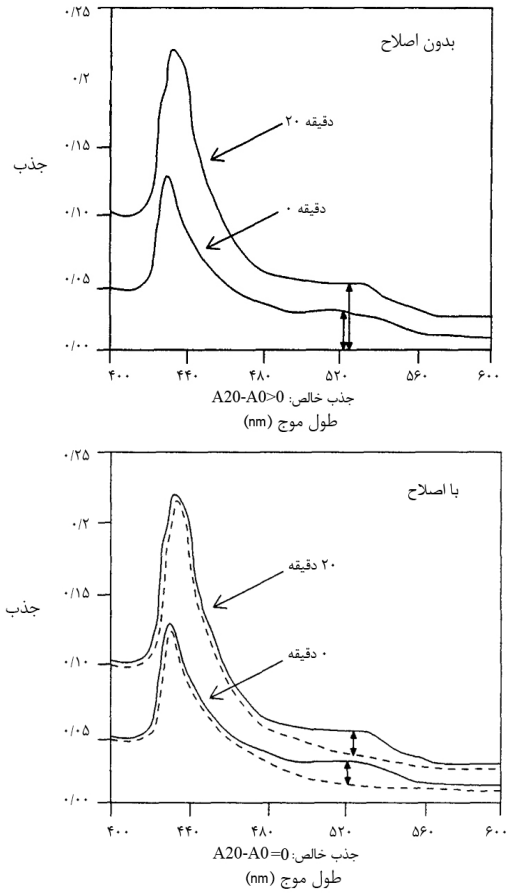
ادامه جدول ۲-۴ :

منابع	نتایج
Young et al., 1997[64]	**عدم فعالیت GLO در ماهیان استخوانی حقیقی:** ***Morone saxatilis***
Maeland and waagbo 1998[65]	**عدم فعالیت GLO در ماهیان استخوانی حقیقی:** ***Clupea harengus, Anguilla Anguilla, Salmo salar, Gadus morhua, Scomber scombrus, Hippoglossus hippoglussus, Scophthalmus maximus,.*** **گزارش فعالیت GLO درماهیان غضروفی-استخوانی:** ***Acipenser ruthenus, Elasmobanchii, Squalus acanthias.***
Moreau and Dabrowski 1998[25]	**گزارش فعالیت GLO درنئوپتریگی:** ***Amiia calva*** ***Agnatha, Petromyzon marinus***
Mukhopadhyay et al., 1998[66]	**عدم فعالیت GLO در ماهیان استخوانی حقیقی:** ***Labeo rohita***
Moreau et al., 1999a, b[26, 84]	**گزارش فعالیت GLO درماهیان غضروفی-استخوانی:** ***Acipenser fulvescens***
Moreau and Dabrowski, 2000[67]	**فعالیت GLO درنئوپتریگی:** ***Amia calva, Lepisosteus osseus,*** ***Chondrostei ,*** ***Polypterus senegalus*** **ماهیان غضروفی- استخوانی:** **عدم فعالیت GLO در ماهیان استخوانی:** ***C.Carpio, C.auratus***

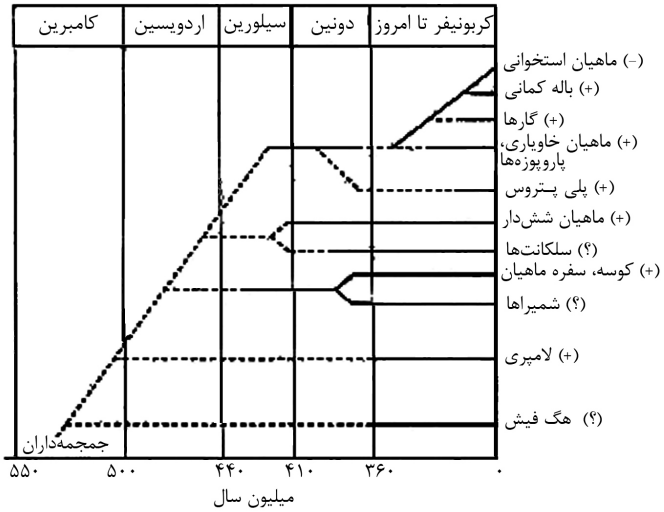
ما با تکرار آنالیز فعالیت GLO در کپور معمولی در آزمایشگاه و بـه کمـک متـدولوژی بهتـر هـم از لحاظ آنزیمی و هم از نظر ایمنی شناختی، فعالیت قابل تشخیـصی از GLO را در کلیـه و کبـد (٦٧) مشاهده نکردیم که این یافته ها موید نتایج تحقیقات قبلی بود (۲۳، ۵۹). با وجود اینکه شواهد علمـی نشان می‌دهد که ماهیان استخوانی فاقد قـدرت بیوسـنتز اسیدآسـکوربیک هـستند، تمـام ماهیـان غیـر استخوانی بررسی شده تا به امروز، مانند ماهیان شش دار (۵۷، ٦١) کوسه‌ها و سپر ماهیان (٦١ - ٦٥)، تاسماهیان و پاروپوزه‌ها (٦٠، ٦٣، ٦٥)، مـاهی *Amia calva*، گـار *Lepisosteus osseus*، مـاهی *Polypterus senegalus* (٦٧) و لامپـری‌هـا (*Lampetra japonica*, *Petromyzon marinus*) (٦١، ٢٥) می‌توانند اسیدآسکوربیک را از نو در کلیه خود بسازند. نتـایج بدسـت آمـده از

بررسی ماهیان، باعث پر رنگ تر شدن این نکته می‌شود که مکان بیوسنتز اسیدآسکوربیک در ماهیان در کلیه قرار دارد که مشابه مکان بیوسنتز در مهره داران خونسردی مانند دوزیستان و خزندگان است. این حقیقت که ماهیان استخوانی که تقریبا ۹٦ درصد ماهیان را تشکیل می‌دهند (٦۹)، فاقد قدرت بیوسنتز اسیدآسکوربیک هستند، بر ٤ درصد دیگری که دارای این توانایی می باشند برای مدت زمان طولانی سایه افکنده بود و عامل اصلی این کلی نگری بود که بیان می‌داشت « ماهیان قادر به سنتز ویتامین ث نمی باشند» (٤۲، ٤۳). با بررسی میزان فعالیت GLO در سایر ماهیان غیراستخوانی، مشخص شد که طیف وسیعی از ماهیان، دارای توانایی ساخت اسیدآسکوربیک هستند (شکل ۳-٤) (٦۹ تا ۷٤). تاکنون بررسی ماهیان پیشرفته امروزی ناقص مانده است و هنوز نمایندگان شاخه‌های هگ فیش‌ها(عجوزه مارماهی)، شیمراها(خرگوش ماهیان) و سلکانت‌ها نیز باید به منظور تعیین فعالیت GLO مورد ارزیابی قرار بگیرند.

بر اساس اطلاعات ما، ماهیان استخوانی امروزی توانایی ساخت اسیدآسکوربیک را از دست داده‌اند، که با توجه به ریشه اصلی ماهیان استخوانی و استناد به اصل صرفه جویی، فقدان این توانایی در نتیجه رخداد مجزایی است که در اجداد ماهیان استخوانی بوقوع پیوسته است. با توجه به گونه *Amia calva* که گروه خواهری زنده ماهیان خاویاری است، زمان اشتقاق بین بوفین‌ها و ماهیان استخوانی یک زمان مناسب برای برآورد زمانی است که ماهیان استخوانی توانایی ساخت اسیدآسکوربیک از دست داده‌اند، جنس مذکور مقارن دوران کرتاسه فوقانی (تقریبا۱٤۰ میلیون سال قبل) است، ولی ماهیان استخوانی امروزی به اواخر دوره تریاسه (۲۱۰ میلیون سال پیش) تعلق دارند (۷٤). با این حال سایر اعضای خانواده *Amiidae* که تا به امروز منقرض شده‌اند، مربوط به دوران ژوراسیک فوقانی (تقریبا ۲۰۰ میلیون سال پیش) بوده اند. بنابراین با یک تخمین مقدماتی، فقدان مسیر ساخت اسیدآسکوربیک در ماهیان استخوانی ممکن است ۲۰۰ تا ۲۱۰ میلیون سال پیش رخ داده باشد.



شکل۲-٤ : اندازه گیری فعالیت GLO در ماهیان استخوانی با استفاده از روش DNPH (524 nm) با یـا بدون اصلاح مشتقات تداخل گر DNPH



شکل۳-٤ : پراکنش فعالیت GLO در ماهیان امروزی در طول زمان (برگرفته از Nelson 1994[69]). خطوط ممتد نشان دهنده یافته های فسیلی و خطوط نقطه چین فیلوژنی استنباط شده را نشان می‌دهد. Greenwood 1984[70], Gardiner 1984[71], Schultze and Wiley 1984[72], Wiley and Schultze 1984[73], Carroll 1988[74], Nelson 1994[69]

حضور فعالیت GLO در ماهی شش دار استرالیایی *Neoceradotus forsteri* و ماهی شش دار آفریقایی *Protopterus aethiopicus*، باعث ایجاد یک پیوستگی مهم بین مهره داران خشکی زی و آبزی، با توجه به تکامل بیوسنتز اسیدآسکوربیک در این دسته از ماهیان شده است. هیچ شکی وجود ندارد که مهره داران خشکی زی در اوایل دوره دونین (حدود ٤۰۰ میلیون سال پیش) از گوشتی بالگان (که امروزه شامل ماهیان شش دار و سلکانت هستند) تکامل یافته‌اند. بنابراین می‌توان این گونه اذعان نمود که بیوسنتز اسیدآسکوربیک در بین مهره داران خشکی زی و آبزی مشابه هم بوده و منشاء این صفت به دوره کامبرین (۵۰۰ تا ۵۵۰ میلیون سال پیش) برمی‌گردد، که احتمالا اجداد لامپری‌های امروزی در آن زمان منقرض شده‌اند. موفقیت در استحصال GLO از کلیه تاسماهیان با استفاده از روش به کار رفته برای مرغ (۳٤)، نشان می‌دهد که آنزیم‌های ماهیان و پرندگان، دارای تشابهات ساختاری هستند که ممکن است توسط اجدادی مشترک منتقل شده باشد و تشابه مشخصه را حمایت می‌کند (٦۷).

جدول ۳-٤ : گزارش فعالیت GLO در ماهیان و روش‌های به کار گرفته شده به منظور تعیـین میزان تولید اسیدآسکوربیک به صورت طبیعی

گونه	فعالیت GLO (µmol AA/g tissue/h)	روش	اصلاح تداخل DNPH
ماهیان استخوانی			
Cyprinus carpio	0.92[a] , 0.95[b], 1.01[d]	DNPH[4]	خیر
	0[f,g]	DNPH[6] UV[7]	بله بله
	0[n]	UV[7]	n.a.
Carassius carassius	0.75[a]	DNPH[4]	No
C. auratus	0.77[e] 0[n]	DNPH[5] UV[7]	No n.a.
Tribolodon hakonensis	0.17[a]	DNPH[4]	No
Parasilurus asotus	0.24[a]	DNPH[4]	No
Oreochromis spirulus	1.0[d]	DNPH[4]	No
o. aureus	0.80[d], 0.07[e]	DNPH[4,5]	No
Mugil cephalus	0.03[e] 0[f]	DNPH[5] DNPH[6] UV[7]	No Yes
Fundulus grandis	0.11[e]	DNPH[5]	No
آمی ای فورمس			
Amia calva	2.5-4.6[n]	UV[7]	n.a.
سمیونتیفرمس			
Lepisosteus osseus	3-10[n]	UV[7]	n.a.
راسته تاسماهی شکلان			
Acipenser transmontanus	1.4[i],5.6[n]	DNPH[6], UV[7]	Yes
A. fulvescens	2,6[m], 2.8[h]	DNPH[6], UV[7]	Yes
A. baeri	0.39[k]	DNPH[6]	Yes
Polyodon spathula	1.6[h]	DNPH[6]	Yes
پلی پتری فرمس			
Polypterus senegalus	2.3[n]	UV[7]	n.a.
ماهیان دو دمی(شش دار)			
Neoceratodus forsteri	0.05[c]	DNPH[1] DCIP[3]	?
Protopterus aethiopicus	0.37[i]	Dipyridl[2]	n.a.
الاسموبرانشی ای			
Mastelus manazo	0.46[i]	Dipyridl[2]	n.a.
Dasyatus akajei	0.14[i]	Dipyridyl[2]	n.a.

ادامه جدول ۳-۴ :

گونه	فعالیت GLO (µmol AA/g tissue/h)	روش	اصلاح تداخل DNPH
راسته مارماهی شکلان			
Lampetra japonica	0.12[i]	Dipyridl[2]	n.a.
Petromyzon marinus	4.6-5.3[i]	UV[7]	n.a

[a]Yamamoto et al. 1978[55], [b]Sato et al. 1978[56], [c]Dykhuyzen et al. 1980[57], [d]Soliman et al. 1985[37], [e]Thomas et al. 1985[58], [f]Dabrowski1990[23], [g]Dabrowski 1991[59], [h]Dabrowski 1994[60], [i]Touhata et al. 1995[61], [j]Moreau and Dabrowski 1996[24], [k]Moreau et al. 1996[63], [l]Moreau and Dabrowski 1998 [25], [m]Moreau et al. 1999a[26], [n]Moreau and Dabrowski 2000[67]
[1]Roe and Kuether 1943[27], [2]Sullivan and Clarke 1955[32], [3]Chatterjee et al. 1958[68], [4]Ikeda et al. 1963[28], [5]Terada et al. 1978[30], [6]Dabrowski and Hinterleitner 1989[31], [7]Dabrowski 1990[23] , n.a. = Not applicable

٥-٤ - میزان ساخت اسیدآسکوربیک در شرایط طبیعی

تمام جانوران نیازمند ویتامین ث می‌باشند، چه دارای توانایی ساخت آن باشند و چه این توانایی را نداشته باشند. بسیاری از ماهیانی که برای پرورش مورد استفاده قرار می‌گیرند، مانند آزادماهیان، گربه ماهیان، سیچلیدها و کپورماهیان که جزء ماهیان استخوانی هستند، نیازمند دریافت ویتامین ث از طریق جیره غذایی می باشند. نیاز این ماهیان به ویتامین ث بر حسب گونه، نژاد (۷۵)، سن، شرایط محیطی (۷٦) و عوامل استرس زای القایی (۷۷) متفاوت است. تمام فاکتورهای مذکور می‌توانند به صورت معنی داری بر میزان فعالیت و بیان GLO موثر باشند. مطالعه نرخ تولید اسیدآسکوربیک در ماهیانی مانند تاسماهیان تحت شرایط کنترل شده محیطی و فیزیولوژیکی باید به متخصصین تغذیه این امکان را بدهد که بخوبی فاکتورهای موثر بر نیاز به اسیدآسکوربیک را در ماهیان استخوانی شناسایی کنند. جهت رفع نیاز ماهیان به ویتامین ث، گونه‌های ماهیان استخوانی (که برای مقاصد اقتصادی پرورش داده می‌شوند) بطور شاخص با جیره‌های غذایی که ۱۰۰mg/Kg – ۵۰ اسیدآسکوربیک به آن افزوده شده است، تغذیه می‌شوند (۷۸). روزانه، یک آزادماهی باید ۱ میلی گرم اسیدآسکوربیک به ازای هر کیلوگرم از وزن خود دریافت کند تا نیاز آن به ویتامین ث مرتفع شود. یافته‌های اخیر مبنی بر توانایی ساخت اسیدآسکوربیک توسط برخی از ماهیان، این سوال را به ذهن متبادر می‌سازد که آیا این ماهیان قادر به ساخت اسیدآسکوربیک کافی برای رفع تمام نیازهای خود هستند.

از بین ماهیانی که قادر به ساخت ویتامین ث می باشند، تعداد کمی از آنها به آسانی برای مطالعه در دسترس هستند. از آنجائیکه چندین گونه از تاسماهیان به صورت اهلی درآمده و نسل‌های آنها در

مخازن پرورشی نگه داری و با رژیم‌های غذایی تجاری یا نیمه خالص[1] تغذیه می‌شوند، این ماهیان به عنوان در دسترس ترین ماهیان برای این نوع مطالعات استفاده می شوند. طول مرحله جوانی در این ماهیان به محققین این اجازه را می‌دهد که بین مراحل زندگی پیش از بلوغ تمایز قائل شوند. به طور جایگزین، لامپری نیز می‌تواند مدل خوبی در زمان تولید مثل باشد زیرا محققین دریافتند که وضعیت اسیدآسکوربیک در بین ماهیان مهاجر رودکوچ طی دو سال متوالی، ثابت است. ما برای تعیین میزان کمی ساخت اسیدآسکوربیک در ماهی بالغ لامپری دریایی (۲۵) و تاسماهیان جوان دریاچه ای (٢٦) از اطلاعات کینتیکی آزمایشگاهی استفاده کردیم، که به صورت مدل‌های ریاضی توسط سایر محققین برای تعیین میزان بیوسنتز اسیدآسکوربیک در پستانداران استفاده شده بود (۷۹). نرخ ساخت روزانه اسیدآسکوربیک در ماهیان در ۱۵ درجه سانتی گراد، بر اساس حداکثر سرعت (V_{max}[2]) GLO، اندازه گیری شده در ۲۵ درجه سانتی گراد، محاسبه شد. ثابت میکائیلیس[3] (K_m) در محیط *in vitro*، GLO تاسماهی سفید برای L- گولونولاکتون (۰/۹۲ mM) (٢٦) در محاسبه استفاده شد. محاسبات نشان داد که ماهی لامپری دریایی یک کیلوگرمی، روزانه ٤ میلی گرم و تاسماهی یک کیلوگرمی ۳ میلی گرم اسیدآسکوربیک در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد می سازد. این محاسبات به طور مطلوبی با نیاز یک ماهی قزل آلای رنگین کمان یک کیلوگرمی مقایسه شد (۱mg اسیدآسکوربیک) (۸۰). بنابراین تاسماهیان جوان مقادیر کافی اسیدآسکوربیک را تولید می‌کنند که نیازهای بدن آنها را مرتفع می‌سازد. انجام مقایسه با پستاندارانی که قادر به ساخت اسیدآسکوربیک هستند، مانند موش صحرایی، نشان می‌دهد که نرخ ساخت در ماهیان حدود ۷ برابر کمتر از موش صحرایی به ازای وزن بدن است. در حقیقت، موش صحرایی ۰/۱ کیلوگرمی، روزانه ۲/٦ mg اسیدآسکوربیک می‌سازد (۸۱). اختلاف مهم دیگر بین متابولیسم ماهیان و جوندگان، چرخش سریعتر اسیدآسکوربیک در پستانداران در مقایسه با ماهیان است که متوسط نیمه عمر اسیدآسکوربیک در خوکچه هندی ۳ روز (۸۲) و در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان ٤٠ تا ۷۰ روز می‌باشد (۷۵، ۸۳). به طور خلاصه، متابولیسم اسیدآسکوربیک در جوندگان با نرخ بیوسنتز سریع و نیمه عمر کوتاه مشخص می‌شود (یا چرخش سریع)، در حالیکه در

[1] Semi-purified diet

۲ حداکثر سرعت یک واکنش آنزیمی در زمانیکه جایگاه اتصالی از سوبسترا اشباع می باشد.

۳ غلظت سوبسترایی که در آن سرعت یک واکنش آنزیمی برابر نصف حداکثر سرعت است

ماهیان خاویاری نرخ ساخت و چرخش آهسته تر است. به طور کلی، نرخ ساخت اسیدآسکوربیک در مهره داران ممکن است همبستگی مثبتی با نرخ متابولیک پایه داشته باشد.

٦-٤- فاکتورهای موثر بر فعالیت GLO در ماهیان

اطلاعات اندکی در مورد فاکتورهای موثر بر فعالیت GLO و تنظیم آن در ماهیان شناخته شده است. اسید آسکوربیک رژیم غذایی و جنسیت ماهیان، به عنوان دو فاکتور بالقوه و موثر بر فعالیت GLO شناخته شده است. تحقیقات صورت پذیرفته روی تاسماهی سفید و دریاچه ای (٢٦، ٦٠، ٨٤) نشان می‌دهد که افزایش اسیدآسکوربیک خوراکی اثر منفی بر فعالیت GLO، بر خلاف خرگوش (٨٥) و موش (٨٦) ندارد. بر عکس، به نظر می‌رسد که در تاسماهیان فعالیت GLO، به میزان اندکی بر اثر اسیدآسکوربیک خوراکی تحریک شود. اثر جنسیت بر فعالیت GLO در لامپری‌های دریایی بالغ *P. marinus*، در حین مهاجرت به بسترهای تخمریزی، مورد بررسی قرارگرفت (٢٥) و این بررسی هیچ تفاوت معنی داری را در فعالیت GLO بین جنس نر و ماده نشان نداد.

٧-٤- اهمیت ساخت اسیدآسکوربیک برای ماهیان

در کل سلسله جانوری، رژیم غذایی طبیعی جانوران سازنده اسیدآسکوربیک از لحاظ میزان جذب اسیدآسکوربیک ، با رژیم غذایی جانوران مستعد ابتلا به اسکوروی (فاقد قدرت ساخت اسید آسکوربیک) تفاوت فاحشی ندارد. از آنجائیکه ویتامین ث در مقادیر قابل توجهی (بیش از ٣ گرم در هر ١٠٠ گرم در میوه استرالیایی *Terminalia fernandiana*) (٨٧)، در منابع غذایی (اندام‌های جانوری، میوه‌ها و سبزیجات، به جز غلات و میوه های مغزدار)، وجود دارد، گونه‌های وحشی به ندرت در معرض کمبودهای طولانی مدت ویتامین ث قرار دارند و ناتوانایی ساخت ویتامین ث در آنها باعث ایجاد ضعف نمی شود. اگرچه در موقعیت‌هایی که غذا در اثر فعالیت‌های انسانی محدود شده است، همانند حیوانات اهلی، گونه‌های مستعد ابتلا به اسکوروی ممکن است از نتایج کمبود ویتامین ث در رژیم غذایی، آسیب بیشتری (اختلال در تشکیل استخوان، کندی در التیام زخم) در مقایسه با گونه‌های دارای این توانایی ببینند. ولی چنین شرایطی، نادر و محصول دخالتهای انسانی است و کاملا با فرایندهای تکاملی غیر مرتبط است که منجر به فقدان ساخت زیستی اسیدآسکوربیک

خیلی قبل تر از انسان شده است. ما حدس می زنیم که تقریبا ۵۰۰ میلیون سال قبل، اجداد مهره داران کنونی دارای قدرت ساخت اسیدآسکوربیک بوده‌اند و این صفت بطور ثانویه، حداقل در ۵ موقعیت مجزا یعنی ماهیان استخوانی، گنجشکیان، خفاش‌ها، خوکچه هندی و نخستیان از بین رفته است. به رغم از دست دادن این مشخصه، ماهیان استخوانی همچنان باقی مانده اند و جزء موفق ترین شاخه‌ها بوده‌اند و توانسته‌اند سراسر کره زمین را فرا بگیرند، همان طوری که این حالت در سیچلیدهای آفریقایی دیده می‌شود (۸۸، ۸۹).

۱-۷-٤ - آیا توانایی ساخت اسیدآسکوربیک انطباقی است؟

احتمالا مسیر ساخت اسیدآسکوربیک در ماهیان زمانیکه مقادیر کافی ویتامین ث در جیره غذایی وجود نداشته، ایجاد شده است (۵۰۰ تا ۵۵۰ سال پیش) ولی طی تکامل، میزان اسیدآسکوربیک در زنجیره غذایی فراوانتر شده یا مهره داران، رژیم غذایی خود را به سمت اقلام غذایی غنی از ویتامین ث تغییر داده‌اند تا جائیکه حفظ مسیر برای دارندگان آن از لحاظ بهبود شایستگی[1]، مزیت محسوب نمی شده است و در نتیجه آن، برگشت ثانویه، از لحاظ عملکردی بی اثر بوده است (۹۰). اگر دارا بودن فعالیت GLO یک صفت غیر ضروری باشد، دیگر انتخاب طبیعی قادر به اصلاح جهش‌های نقطه‌ای نبوده و در نتیجه این جهش ها تمایل به تجمع یافتن در خوکچه هندی (٤۹) و نخستیان (۵۱) خواهند داشت. ممکن است ماهیان امروزی، مثال قانع کننده ای در مورد این موضوع باشند که باقی ماندن مسیر بیوسنتز، یک خصوصیت تحلیل رفته[2] است. در حقیقت، با وجود آنکه ماهیانی مثل لامپری ها، کوسه ماهیان و تاسماهیان دارای مسیر ساخت اسیدآسکوربیک می‌باشند، ماهیان استخوانی امروزی این توانایی را از دست داده‌اند. به رغم فقدان این توانایی، ماهیان استخوانی توانسته‌اند طی روند تکامل باقی بمانند و امروزه نزدیک به ۹٦ درصد ماهیان را تشکیل دهند. به علاوه، در تاسماهیان، گونه‌هایی که قادر به ساخت اسیدآسکوربیک هستند، تنظیم نشدن آنزیم کلیدی GLO توسط اسیدآسکوربیک موجود در جیره غذایی، ممکن است دلیلی بر عملکرد خنثی مسیری باشد که بلا استفاده مانده است.

---

[1] Fitness
[2] Vestigial character

٢-٧-٤ - آیا فقدان توانایی ساخت اسیدآسکوربیک انطباقی است؟

دلایلی که چرا ماهیان استخوانی توانایی ساخت اسیدآسکوربیک را از دست داده‌اند، همچون مکانیزم تشریحی ناپدید شدن این توانایی در برخی از گنجشکیان و پستانداران، مشخص نمی باشد و آیا این پدیده نتیجه بهگزینی ژنتیکی بوده است یا رانش ژنتیکی[1]. برای یک موجود زنده حفظ ژن‌ها در شرایط عملکردی مناسب هزینه بر است. حفظ توانایی بیوسنتز اسیدآسکوربیک برای یک جاندار، زمانی که مقدار فراوانی اسیدآسکوربیک در غذاهای در دسترس آن وجود دارد، به نظر مقرون به صرفه نمی رسد. پس می توان نتیجه گرفت که تغییر تطابقی در سطح مولکولی رخ داده است که در آن آلل جدید به خاطر حمل یک شکل جدید (گونه فاقد توانایی ساخت اسیدآسکوربیک) نسبت به شکل هموزیگوت اصلی مناسب تر است. جهشی که سبب توقف بیوسنتز اسیدآسکوربیک گردیده، می تواند مفید تلقی شده (٩١) و بنابراین برای آن انتخاب شود. اگرچه در جهش یافته های موش صحرایی(٩٢) و گراز[2] (٩٣) که توانایی بیوسنتز اسیدآسکوربیک را از دست داده‌اند، هیچ مزیت خاصی نسبت به شکل اولیه گزارش نشده است. در مقابل، موش‌های صحرایی هموزیگوت واجد نقص در سیستم استخوان سازی (*od/od*) نازا بودند. در نتیجه، فرضیه تطابقی بودن (٩٤) در مورد ساخت اسیدآسکوربیک شاید به علت وجود مشکلات در اندازه گیری شایستگی بخوبی بیان نشده است.

رانش ژنتیکی[3] هم می تواند یک نیروی تکاملی موثری باشد. اثرات آن در جمعیت مشتمل بر تثبیت تصادفی[4] و از دست دادن آللها می باشد. از آنجا که رانش ژنتیکی یک فرایند نمونه گیری است، اثرات آن اغلب در جمعیت‌ها بخوبی مشخص است. تصور می شود که اغلب گونه ها از جمعیتهای کوچکی نشات گرفته باشند. اگرچه همانند ماهیان استخوانی ممکن است در نهایت جمعیت بزرگ شده و شامل تعداد زیادی از افراد شده باشد که ذخیره ژنی[5] نسل‌های بعدی از ژن‌های موجود در نسل‌های اولیه نشات گرفته اند. جهش‌هایی که در اجداد ماهیان استخوانی اولیه، خفاش‌ها یا نخستیان رخ داده

[1] Genetic drift
[2] Swine
[3] Genetic drift
[4] Random fixation
[5] Gene pool

است، ممکن است تثبیت و به نسل‌های بعدی منتقل شده باشد. جاکز[1] و کینگ (۹۵)، مطرح نمودند که فقدان بیوسنتز اسیدآسکوربیک در نخستیان و خوکچه هندی غیر تطابقی بوده و انواع وحشی این مهره داران مقادیر عظیمی از اسیدآسکوربیک را مورد مصرف قرار می دهند. با این حال حتی عملکردهای سودمند می توانند در اثر رانش ژنتیکی – بشرط مزیت انتخابی و یا کاهش اندازه جمعیت – از دست بروند.

[1] Jukes

منابع:

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

2. Halver, J. E., Ashley, L. M., and Smith, R. R., (1969). Ascorbic acid requirements of Coho salmon and rainbow trout, Transaction of the American Fisheries Society, 98, 762.

3. Wilson, R. P., and Poe, W. E., (1973). Impaired collagen formation in the scorbutic channel catfish, Journal of Nutrition, 103, 1359.

4. Lim, C. and Lovell, R. T., (1978). Pathology of vitamin C deficiency syndrome in channel catfish (Ictalurus punctatus), J. Nutr. 108: 1137.

5. Peterkofsky, B., (1991). Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhabitation of collagen synthesis in scurvy. Am. J. Clin. Nutr., 54: 1135S.

6. Philips, C. L., Tajima, S. and Pinnel, S. R., (1992). Ascorbic acid and transforming growth factor-β1 increase collagen biosynthesis via different mechanisms: Coordinate regulation of Proα1(I) and Proα1(III) collagens, Arch. Biochem. Biophys., 295: 397.

7. Gosiewska, A., Wilson, S., Kwon, D., and Peterkofsky, B., (1994). Evidence for an in vitro role of insulin-Like hormone growth factor-binding protein-1 and -2 as inhibitors of collagen gene expression in vitamin C –deficient and fasted guinea pigs.

8. Blom, J, H. and Dabrowski, K., (1995). Reproductive success of female rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) in response to graded dietary ascorbyl monophosphate levels, Biol. Reprod. 52: 1073.

9. Ciereszko, A. and Dabrowski, K., (1995). Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across-season study, Bio. Reprod. 52: 982.

10. Luck, M. R., Jeyaseelan, I., and Scholes, R. A., (1995). Ascorbic acid and fertility, Biol. Reprod. 52: 262.

11. Carr, A. C. and Frei, B., (1999). Towards a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. Am. J. Clin. Nutr., 69: 1086.

12. Rose, R. C., (1989). Renal metabolism of the oxidized form of ascorbic acid (dehydro L-ascorbic acid), Am. J. Physiol. 256, F52.

13. Choi, J. L. and Rose, R. C., (1989). Regeneration of ascorbic acid by rat colon, Proc. Soc. Exp Biol. Med, 190: 369.

14. Meister, A., (1994). Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals, J. Biol. Chem, 269: 9397.

15. Winkler, B. S., Orselli, S. M. and Rex, T. S., (1994). The redox couple between glutathione and ascorbic acid: a chemical and physiological perspective, Free Radical Biol. Med. 17: 333.

16. Niemela, K., (1987). Oxidative and non-oxidative alkali-catalysed degradation of L-ascorbic acid, J. Chromatogr. 399: 235.

17. Hassan, M. and Lehninger, A. L., (1956). Enzymatic formation of ascorbic acid in rat liver extract, J. Biol. Chem. 233: 123.

18. Smith, R. L. and Williams, R. T., (1966). Implication of the conjugation of drugs and other exogenous compounds, in Glucuronic Acid Free and Combinated, Dutton, G. J., Ed., Academic Press Inc.457.

19. Stubbs, D. W. and Haufrect, D. B., (1968). Effects of actinomyocin D and puromycin on induction of gulonolactone hydrolase by somatotrophic hormone, Arch, Biochem, biophys. 124: 365.

20. 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: Conversion of L-gulonolactone into L-ascorbic acid, Biochem, J., 74: 193.

21. Sato, P. and Udenfriend, S., (1978). Studies on ascorbic acid related to the genetic basis of scurvy, Vit. Horm. 36: 33.

22. Sato, P., Nishikimi, M. and Udenfriend, S., (1976). Is L-gulonolactone oxidase the only enzyme missing in animals subject to scurvy? Biochem. Biophys. Res. Com. 71: 293.

23. Dabrowski, K., (1990). Gulonolactone oxidase is missing in teleost fish – The direct spectrophotometric assay, Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 371:207.

24. Moreau, R. and Dabrowski, K., (1996). The primary localization of ascorbate and its synthesis in the kidneys of acipenserid (Chondrostei) and teleost (Teleostei) fishes, J. Camp. Physiol. B., 166,178.

25. Moreau, R. and Dabrowski, K., (1998). Body pool and synthesis of ascorbic acid in adult sea lamprey (Petromyzon marinus): An agnathan fish with gulonolactone oxidase activity, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 95: 10279.

26. Moreau, R. and Dabrowski, K. and Sato, P. H., (1999a). Renal L-gulono-1,4-lactone oxidase as effected by dietary ascorbic acid in Lake sturgeon (Acipenser fulvescens), Aquaculture, 180: 359.

27. Roe, J. H. and Kuether, C. A., (1943). The determination ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinophenylhydrazine method. J. Biol. Chem. 174: 201-208.

28. Ikeda, S., sato, M., and kimura, R., (1963). Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 29: 757.

29. Ayaz, K. M., Jenness, R. and Birney, E. C., (1976). An improved assay for L-gulonolactone oxidase, Anal. Biochem., 72: 161.

30. Terada, M., Watanabe, Y., Kunitomo, M. and hayashi, E., (1978). Differential rapid analysis of ascorbic acid and ascorbic acid 2-sulfate by dinitrophenylhydrazine method, Anal. Biochem., 84: 604.

31. Dabrowski, K. and Hinterlietner, S., (1989). Application of a simultaneous assay of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and ascorbic sulphate in biological materials, Analyst, 114, 83.

32. Sullivaa, M. X. and Clarke, H. C. N., (1955). A highly specific procedure for ascorbic acid, J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, 38:514.

33. Zannoni, V., Lynch, M., Goldstein, S. and Sato, P., (1974). A rapid micromethod for the determination of ascorbic acid in plasma and tissues, Biochem. Med., 11: 41.

34. Kiuchi, K., Nishikimi, M. and Yagi, K., (1982). Purification and charactrization of L-gulonolactone oxidase from chiken kidney microsomes, Biochemistry, 21: 5076.

35. Cohen, R. B., (1961). Histochemical localization of L-gulonolactone oxidase activity in tissue of several species, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 106: 309.

36. Nakajima, Y., Shantha, T. R., and Bourne, G. H., Histochemical detection of L-gulonolactone:phenazine methosulfate oxidoreductase activity in several mammals with special reference to synthesis of vitamin C in primates, Histochemie, 18, 293,1969.

37. Soliman, A. K., Jauncey, K., and Roberts, R. J., Qualitative and quantitative identification of L-gulonolactone oxidase activity in some teleosts, Aquacult. Fish Manag., 16,249,1985.

38. Nandi, A. and Chatterjje, I. B., Interrelation of xanthine oxidase and dehydroge-nase and L-gulonolactone oxidase in animal tissues, Indian J. Exp. Biol., 29, 574, 1991.

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

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

41. Roy, R. N. and Guha, B. C., Species difference in regard to the biosynthesis of ascorbic acid, Nature, 182, 319,1958.

42. Chatterjee, I. B., Evolution and the biosynthesis of ascorbic acid. Science, 182, 1271,1973a.

43. Nandi, A., Mukhopadhyay, C. K., Ghosh, M. K., Chattopadhyay, D. J., and Chatterjee, I. B., Evolutionary significance of vitamin C biosynthesis in terrestrial vertebrates. Free Radic. Biol. Med., 22,1047,1997.

44. Chaudhuri, C. R. and Chatterjee, I. B., L-Ascorbic acid synthesis in birds: phylo-genetic trend. Science, 164, 435,1969.

45. del Rio, C. M., Can passerines synthesize vitamin C? The Auk, 114:513-516.

46. Burns, J. J., Missing step in man, monkey and guinea pig required for the biosynthesis of L-ascorbic acid, Nature, 180, 553,1957.

47. Birney, E. C., Jenness, R., and Ayaz, K. M., Inability of bats to synthesize L-ascorbic add. Nature, 260, 626,1976.

48. Kawai, T., Nishikimi, M., Ozawa, T., and Yagi, K., A missense mutation of L-gulono-7-lactone oxidase causes the inability of scurvy-prone osteogenic disorder rats to synthesize L-ascorbic acid, /. Biol. Chem., 267, 21973,1992.

49. Nishikimi, M., Kawai, T., and Yagi, K,, Guinea pigs possess a highly mutated gene for L-gulono-lactone oxidase, the key enzyme for L-ascorbic acid biopsy thesis missing in this species, J. Biol. Chem., 267, 21967,1992.

50. Nishikimi, M., Fukuyama, R., Minoshima, S., Shimizu, N., and Yagi, K., Cloni and chromosomal mapping of the human nonfuctional gene for L-gulono-lactone oxidase, the enzyme for L-ascorcbic acid biosynthesis missing in man, Biol. Chem., 269,13685,1994.

51. Nishikimi, M. and Yagi, K., Molecular basis for the deficiency in humans of gulonolactone oxidase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis. Am. J. Ch Nutr., 54,1203S, 1991.

52. Sato, P. H. and Grahn, I. V, Administration of isolated chicken L-gulonolactor oxidase to guinea pigs evokes ascorbic acid synthetic capacity. Arch. Biochem. Biophys., 210, 609,1981.

53. Chatterjee, I. B., Vitamin C synthesis in animals: evolutionary trend. Science ui Culture, 39, 210,1973b.

54. Wilson, R. P., Absence of ascorbic acid synthesis in channel catfish, ktalurus punctatus and blue catfish, Ictalurusfructatus, Comp. Biochem. Physiol., 46B, 635 1973.

55. Yamamoto, Y, Sato, M., and Ikeda, S., Existence of L-gulonolactone oxidase in some teleosts. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 44, 775,1978.

56. Sato, M., Yoshinaka, R., and Yamamoto, Y, Nonessentiality of ascorbic acid in the diet of carp. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish, 44,1151,1978.

57. Dykhuizen, D. E., Harrison, K. M., and Richardson, B. J., Evolutionary implications of ascorbic acid production in the Australian lungfish, Experientia, 36, 9^ 1980.

58. Thomas, P., Bally, M. B., and Neff, J. M., Influence of some environmental variables on the ascorbic acid status of mullet, Mugil cephalus L., tissues. II. Seaso: fluctuations and biosynthesis ability,. Fish. Biol., 27, 47,1985.

59. Dabrowski, K., Administration of gulonolactone does not evoke ascorbic acid synthesis in teleost fish. Fish. Physiol. Biochem., 9, 215,1991.

60. Dabrowski, K., Primitive Actinopterigian fishes can synthesize ascorbic acid, Experientia, 50, 745,1994.

61. Touhata, K., Toyohara, H., Mitani, T., Kinoshita, M., Satou, M., and Sakaguch M., Distribution of L-gulono-l,4-lactone oxidase among fishes. Fish. Sci., 61, 7 1995.

62. Mishra, S. and Mukhopadhyay, P. K., Ascorbic acid requirement of catfish fry Clarias batrachus (Linn.), Indian J. Fish., 43,157,1996.

63. Moreau, R., Kaushik, S. J., and Dabrowski, K., Ascorbic acid status as affected dietary treatment in the Siberian sturgeon (Acipenser baeri Brandt): tissue concentration, mobilisation and L-gulonolactone oxidase activity. Fish Physiol. Biochem., 15, 431,1996.

64. Young, K. R., Brougher, D. C., and Scares, J. H., Ascorbic acid requirements, a L-gulonolactone oxidase enzyme activity in striped bass (Morone saxatilis). Bo of Abstracts, World Aauaculture '97, Feb. 19-23,1997, Seattle, WA, p. 511.

65. Maeland, A. and Waagbe, R., Examination of the qualitative ability of some cold water marine teleosts to synthesise ascorbic acid, Comp. Biochem. Physiol., 121A, 249,1998.

66. Mukhopadhyay, P. K., Nandi, S., Hassan, M. A., Dey, A, and Sarkar, S., Effect of dietary deficiency and supplementation of ascorbic acid on performance, vertebral collagen content, tissue vitamin and enzyme status in Labeo rohita, in Technological Advancements in Fisheries, Publ. #l-School Indl. Fish, Hameed, M.S. and Kurup, B.M., Eds., Cochin Univ Sci. Tech., Cochin, 1998,101-107

67. Moreau, R. and Dabrowski, K., Biosynthesis of ascorbic acid by extant Actinopterygians,;. Fish Biol., 57, 733, 2000.

68. Chatterjee, I. B., Ghosh, J. J., Ghosh, N. C., and Guha, B. C. Effect of cyanide on the biosynthesis of ascorbic acid by an enzyme preparation from goat-liver tissue, Biochem., 70, 509,1958.

69. Nelson, J. S., Fishes of the World, John Wiley & Sons, New York, 1994, 600 p.

70. Greenwood, P. H., Polypterus and Erpetoichthys: Anachronistic Osteichthyans. In Living Fossils, Eldredge, N., and Stanley, S. M., Eds., Springer-Verlag, New York, 1984,143

71. Gardiner, B. G., Sturgeons as living fossils. In Living Fossils, Eldredge, N., and Stanley, S. M., Eds., Springer-Verlag, New York, 1984,148.

72. Schultze, H.-P. and Wiley, E. 0., The Neopterygian Amid as a living fossil. In Living Fossils, Eldredge, N., and Stanley, S. M., Eds., Springer-Verlag, New York, 1984,153.

73. Wiley, E. 0. and Schultze, H.-P. Family Lepisosteida (gars) as living fossils. In Living Fossils, Eldredge, N., and Stanley, S. M., Eds., Springer-Verlag, New York, 1984,160.

74. Carroll, R. L., Vertebrate paleontology and evolution, W. H. Freeman. New York, 1988, 698 p.

75. Matusiewicz, M., Dabrowski, K., Volker, L., and Matusiewicz, K., Regulation of saturation and depletion of ascorbic acid in rainbow trout, J. Nutr. Biochem., 5, 204,1994.

76. Wahli, T., Frischknecht, R., Schmitt, M., Gabaudan, J., Verlhac, V, and Meier, W., 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, 347,1995.

77. Wise, D. J., Tomasso, J. R., and Brand, T. M., Ascorbic acid inhibition of nitrite-induced methemoglobinemia in channel catfish. Prog. Fish. Cult., 50, 77,1988.

78. National Research Council, Nutrient Requirements of Fish, National Academy Press, Washington, D.C., 1993.

79. Rucker, R. B., Dubick, M. A., and Mouritsen, J., Hypothetical calculations of ascorbic acid synthesis based on estimates in vitro, Am. J. din. Nuttr., 33, 961, 1980.

80. Hilton, J. W., Cho, C. Y, and Slinger, S. J., Effect of graded levels of supplemental ascorbic acid in practical diets fed to rainbow trout (Salmo gairdneri), J. Fish. Res. Bd. Can., 35, 431,1978.

81. Burns, J. J., Mosbach, E. H., and Schulenberg, S., Ascorbic acid synthesis in normal and drug-treated rats, studied with L-ascorbic-1-C14 acid, J. Biol. Cliem., 207, 679,1954.

82. Bannay, M. and Dimant, E., On the metabolism of L-ascorbic acid in the scorbutic guinea pig, Biochim. Biophys. Acta., 59, 313,1962.

83. Blom, J. H. and Dabrowski, K., Ascorbic acid metabolism in fish: Is there a maternal effect on the progeny?, Aquaculture, 147,215,1996.

84. Moreau, R., Dabrowski, K., Czesny, S., and Chila, R, Vitamin C-vitamin E ii action in juvenile lake sturgeon (Acipenser fulvescens R.), a fish able to synthesis ascorbic acid ,J. Appl. Ichthyol., 15, 250, 1999b.

85. Jenness, R., Birney, E. C., and Ayaz, K. L., Ascorbic acid and L-gulonolacton oxidase in lagomorphs, Cornp. Biochem. Physiol., 61B, 395, 1978.

86. Tsao, C. S. and Young, M., Effect of exogenous ascorbic acid intake on biosynthesis of ascorbic acid in mice. Life Sci., 45,1553,1989.

87. Brand, J. C., Cherikoff, V., Lee, A., and Truswell, A. S., An outstanding food source of vitamin C, Lancet, 2, 873,1982.

88. Stiassny, M, L. J. and Meyer, A., Cichlids of the rift Lakes, Sci. Am., 280, 64,1

89. Seehausen, 0. and van Alphen, J. M., Can sympatric speciation by disrupts sexual selection explain rapid evolution of cichlid diversity in Lake Victoria Ecol. Lett., 2,262,1999.

90. King, J. L. and Jukes, T. H., Non-Darwinian evolution: Most evolutionary change in proteins may be due to neutral mutations and genetic drift, Scien 164,788,1969.

91. Banhegyi, G., Csala, M., Braun, L., Garzo, T., and Mandl,]., Ascorbate synti dependent glutathione consumption in mouse liver, FEES Lett., 381, 39,199

92. Mizushima, Y., Harauchi, T., Yoshizaki, T., and Makino, S., A rat mutant un to synthesize vitamin C, Experientia, 40, 359,1984.

93. Vogeli, P., Congenital ascorbic acid (vitamin C) deficiency in the pig, 1997, http://www.zb.inw.agrl.ethz.ch/weLen.htm.

94. Pauling, L., Evolution and the need for ascorbic acid, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 67,1643,1970.

95. Jukes, T. H. and King, J. L., Evolutionary loss of ascorbic acid synthesizing ability, J. Human Evol., 4, 85,1975.

«فصل ۵»

نیاز ماهیان سردآبی به ویتامین« ث»

(Salmonids, Percids, Plecoglossids, and Flatfishes)

Jacques Gabaudan and Viviane Verlhac

۵-۱ – مقدمه

ویتامین ث برای آبزیان ضروری می‌باشد زیرا آنها فاقد توانایی بیوسنتز این ماده مغذی هستند و بنابراین به طور کامل به یک منبع خارجی این ویتامین وابسته می باشند. ویتامین ث به عنوان یک کوفاکتور در واکنش‌های هیدروکسیلاسیون و به عنوان یک عامل احیاء کننده قوی زیستی در بافت‌ها و سلول‌ها عمل می‌کند. شواهد آزمایشگاهی نشان می‌دهد که ویتامین ث در فرایندهای فیزیولوژیک همچون رشد، تولید مثل، مقاومت در برابر استرس، بهبود زخم و پاسخ ایمنی نقش دارد. اطلاعات جمع‌آوری شده طی سالهای گذشته در زمینه نیاز ماهیان سردابی به اسیدآسکوربیک، منجر به ناپدید شدن علائم بالینی کمبود این ماده در ماهیان پرورشی شده است. با این حال، تناقضاتی در متون علمی در مورد مقدار اسیدآسکوربیک مورد نیاز و همچنین میزان افزودن آن به جیره غذایی، وجود دارد. مشکلی که در زمینه مطالعه ویتامین ث وجود دارد، ناپایداری بالای این ویتامین است که باعث می‌شود که در اغلب موارد، مقادیر جذب شده کمتر از مقداری باشد که تصور می شود در جیره های غذایی مورد آزمایش وجود داشته است. پیشرفت‌های شیمیایی در زمینه تولید اشکال مقاوم آسکوربات

با زیست فراهمی کامل اسیدآسکوربیک برای ماهیان مانند اشکال فسفاته آسکوربات[1] تعیین دقیق حداقل مقدار مورد نیاز را اصولا بر اساس دو معیار مقدور ساخته است: رشد و فقدان علائم بالینی. در کتاب *Nutrient Requirement of fish* (NRC, 1993) که یک منبع علمی استاندارد در مباحث تغذیه است، نیازهای تغذیه‌ای برای دستیابی به حداکثر رشد در گونه‌های عمده پرورشی در شرایط آزمایشگاهی بیان شده است که به عنوان مبنایی در تعیین حداقل میزان لازم مواد مغذی، مورد استفاده قرار گیرد. با این حال، در عمل، مقدار ویتامین ث مورد نیاز، باید با توجه به معیارهای انتخابی در برآورد به صورت مقادیری متغیر، تعیین شود. مقادیر لازم ویتامین ث جیره غذایی، بجز بحث رشد، باید در ارتباط با تامین و احتمالا تقویت عملکردهای بدن مورد مطالعه قرارگیرد. برای مثال، در مطالعه‌ای روی قزل آلای رنگین کمان، نشان داده شد که انجام تولید مثل بهینه، حفظ سلامت و پاسخ به عوامل استرس زا، مستلزم دریافت مقادیر بالاتر ویتامین ث، از مقادیر مورد نیاز برای رشد است (Halver,1995). مطالعات اخیر نشان می‌دهد که عوامل ایمنی سلولی به شکل مثبتی به افزایش غلظت ویتامین ث سلول پاسخ می‌دهند (Verlhac *et al.*, 1995). در این فصل به بررسی مقدار نیاز ویتامینی آزادماهیان، سوف ماهیان، پلکوگلوسیده و ماهیان پهن به ویتامین ث و همچنین بیان فاکتورهای زیستی و محیطی می پردازیم که ممکن است بر مقادیر مورد نیاز این ویتامین موثر باشد.

۲-۵ - نیاز عنوان شده در NRC برای ویتامین ث

برای ماهیان مورد بررسی در این بخش، از کتاب *Nutrient Requirement of fish* (NRC, 1993) استفاده می کنیم که نیاز ماهیانی همچون آزاد ماهی اقیانوس اطلس *Salmosalar*، آزاد ماهیان اقیانوس آرام *Oncorhynchus spp* و قزل آلای رنگین کمان در آن ذکر شده است (جدول ۱-۵). مبنای تعیین مقدار نیاز ۵۰mg/Kg ویتامین ث در غذای آزادماهی اقیانوس اطلس، رشد و فقدان علائم ناشی از کمبود آن و در آزادماهی اقیانوس آرام، حداکثر ذخیره سازی کلیوی بوده است. در قزل آلای رنگین کمان، وجود ٤٠mg/Kg ویتامین ث برای رشد و فقدان علائم کمبود، لازم است، در حالیکه در همین ماهی برای حداکثر ذخیره سازی کلیوی نیاز به mg/Kg ۱۰۰ ویتامین

[1] Ascorbate-phosphate

داریم. NRC تاکید دارد که این مقادیر، حداقل مقادیر مجاز برای حداکثر رشد در شرایط آزمایشگاهی هستند. معیارهای مورد استفاده طی این مطالعات که توسط NRC بیان شده است شامل افزایش وزن، فقدان علائم کمبود یا حداکثر ذخیره سازی کلیوی است و فاکتورهایی مانند اندازه، سن، سرعت رشد، ارتباطات متقابل مواد مغذی، میزان انرژی غذا، عمل آوری، اتلاف حاصله طی زمان انبارداری و شرایط محیطی، لحاظ نشده است ولی باید اذعان نمود که تمام فاکتورهای مذکور، بر نیاز ماهیان به ویتامین ث موثر می باشند (Halver, 1995) و پیشنهاد می‌گردد که این عوامل در زمان فرموله کردن غذاهای تجاری لحاظ شوند.

در کتاب NRC به دلیل فقدان اطلاعات کافی و نیز تاکید کتاب بر گونه‌های پرورشی آمریکای شمالی، اشاره‌ای به نیاز سوف ماهیان، پلکوگلوسیده و ماهیان پهن به ویتامین ث، نشده است. Lovell (١٩٩٤) پیشنهاد نمود زمانی که میزان نیاز یک ماهی به مواد غذایی مشخص نیست، از روش شبیه سازی بین ماهیان گرم آبی یا سردآبی، آب شیرین یا دریایی و گوشتخوار یا گیاه خوار استفاده شود. داده‌های جدول (٢-٥)، استنتاجاتی را حمایت می‌کند که با مطالعه نیازهای ویتامینی تعداد بیشتری از گونه ها ایجاد شده است. آزمایشهای تغذیه‌ای کمی روی سوف ماهیان انجام شده است و بنابراین توصیه‌های موجود، براساس میزان نیاز قزل‌آلا و آزادماهیان می‌باشد (Brown *et al.*, 1996). اسیدآسکوربیک برای ماهی آیو *Plecoglossus altivelis*، نیز ضروری تشخیص داده شده است (Yamamoto *et al.*, 1982). زیرا اسیدآسکوربیک بر رفتارهای دسته جمعی این ماهی اثر دارد و مقادیر بهینه ویتامین ث برای این پارامترها، در جیره غذایی با ٥٤١ ppm – ١٥٠ در مقایسه با ١٨٠ppm-٠ بدست می آید (Koshio *et al.*, 1997). با این وجود بالاترین غلظت‌های کبدی و مغزی ویتامین ث در ماهیانی مشاهده می شود که از جیره غذایی حاوی ٥٤١ ppm ویتامین ث تغذیه کرده باشند.

جدول ۱-۵: نیاز آزادماهیان به ویتامین ث (NRC)

ماهی	عامل ارزیابی	میزان نیاز(mg/kg)	منبع
آزادماهی اقیانوس اطلس	افزایش وزن و فقدان علائم کمبود	۵۰	Lall *et al*., 1990
آزادماهی اقیانوس آرام	حداکثر ذخیره سازی کبدی	۵۰	Halver *et al*., 1969
قزل‌آلای رنگین کمان	حداکثر ذخیره سازی کبدی افزایش وزن و فقدان علائم کمبود	۱۰۰ ٤۰	Halver *et al*., 1969 Hilton *et al*., 1978

جدول ۲-۵ : میزان نیاز سوف ماهیان، پلکوگلوسیده و ماهیان پهن به ویتامین ث

ماهی	میزان نیاز (mg/kg)	عامل ارزیابی	منبع
سوف زرد	ضروری	افزایش وزن و فقدان علائم کمبود	Brown *et al*., 1996
آیو	۲۰۰	افزایش وزن	Yamamoto *et al*., 1982
	۱۵۰	فاصله از نزدیک ترین ماهی مجاور، فعالیت شنا	Koshio *et al*., 1997
کفشک ماهی	۲۸ الی ٤۷	افزایش وزن	Teshima *et al*., 1991
په لیس	۲۰۰	افزایش وزن	Rosenlund *et al*., 1990
توربوت	ضروری	بیماری گرانولوماتوز کلیوی	Coustans *et al*., 1990
لارو توربوت	۱۵۰۰ – ۲۵۰۰ µg به ازای هر گرم وزن آرتمیا	غلظت بافتی ثابت	Merchie *et al*., 1996a
توربوت نوزادگاهی	۲۰	افزایش وزن و زنده مانی	Merchie *et al*., 1996b
	۲۰۰	مطالعات فراساختارهای سلول‌های کبدی	

الگوهای رفتاری به عنوان معیارهای پاسخ به میزان ویتامین ث جیره غذایی انتخاب شده اند چراکه بر کیفیت ماهیانی که برای اهداف رهاسازی پرورش می‌یابند، اثر گذار می باشند. مقادیر کمی ویتامین ث مورد نیاز در ماهیان پهن به طور معین و مشخص بررسی نشده است. اگرچه ضرورت آن برای ماهیانی مانند کفشک ماهی ژاپنی *Paralichthys olivaceus*، کفشک ماهی *Pleuronectes platessa* و توربوت *Scophthalmus maximus*، بیان شده است. در کفشک ماهی ژاپنی، بهترین افزایش وزن و ضریب تبدیل غذایی با جیره‌های غذایی حاوی mg/kg ٤۷ – ۲۸ از فسفات

منیزیم L– آسکوربیل[1] به دست می آید(Teshima *et al.*, 1991). تعیین نیاز کفشک ماهیان جوان به مقادیر خاصی از ویتامین ث، بر مبنای رشد، مرگ و میر، شاخص کبدی، غلظت‌های کبدی اسیدآسکوربیک و غلظت‌های هیدروکسی پرولین مهره‌ای بوده است (Rosenlund *et al.*, 1990) و مولفین نتیجه گرفتند که ۲۰۰ mg/Kg اسیدآسکوربیک پوشش دار[2]، نیاز ماهیان را به این ویتامین مرتفع می‌سازد. Messager و همکاران (۱۹۸۶)، بیان نمودند که ماهی توربوتی که از جیره غذایی فاقد ویتامین ث تغذیه کرده است، هیپرتیروزینمی[3]، رسوب کریستال تیروزین در چند اندام و کدورت قرنیه[4] را نشان می‌دهد. چند سال بعد، Coustans و همکاران (۱۹۹۰)، نشان دادند که سه ماه پس از تخلیه کامل اسیدآسکوربیک بافتی در ماهی توربوت، علائم اسکوروی همانند سایر ماهیان مشاهده نمی شود، ولی اختلال شدید در متابولیسم تیروزین دیده می شود که باعث بیماری گرانولوماتوز کلیوی شده و مرگ و میر شدید را به همراه دارد. متاسفانه مقدار نیاز بچه ماهیان توربوت به این ویتامین بیان نشده است. طی تلاش‌های صورت گرفته در زمینه بررسی اثر اسیدآسکوربیک بر نمو اولیه لاروهای این ماهی، غذاهای زنده با دو سطح از پالمیتات آسکوربیل غنی سازی شدند (Merchie *et al.*, 1996a) و مشاهده گردید که غنی سازی آرتمیا با مقادیر ۱۵۰۰ تا ۲۵۰۰ میکروگرم به ازای هر گرم وزن خشک، باعث بهبود رشد و بازماندگی لاروها در مقایسه با گروه شاهد نمی شود که ۵۰۰ میکروگرم اسیدآسکوربیک را به ازای هر گرم وزن خشک دریافت کرده بود ولی این عمل باعث بهبود رنگدانه سازی[5] لاروها، افزایش مقاومت آنها در برابر عفونت باکتری *Vibiro anguillarum* و آزمایش استرس شوری می شود. همچنین مراحل لاروی ماهی توربوت پرورش یافته با جیره‌های غذایی حاوی صفر، ۲۰، ۲۰۰ و۲۰۰۰ mg/Kg، بین تیمارها اختلاف معنی داری را از لحاظ خصوصیات فوق نشان نداد ولی گروهی که با جیره غذایی حاوی ۲۰۰ mg/Kg ویتامین ث تغذیه شده بود، بهترین فراساختار سلول‌های کبدی را همراه با میزان بالای ذخیره سازی گلیکوژن و چربی نشان داد (Merchie *et al.*, 1996b).

[1] L-ascorbyl-2-phosphate-Mg
[2] Coated AA
[3] Hypertyrosinemia
[4] Cornea opacity
[5] Pigmentation

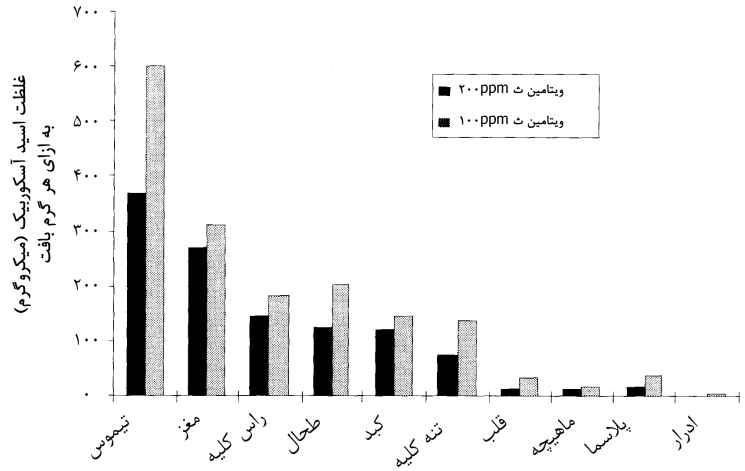
۳-۵- غلظت‌های اسیدآسکوربیک در بافت‌ها و اندام‌ها

۱-۳-۵- توزیع اسیدآسکوربیک

ویتامین ث در بسیاری از بافت‌های اصلی واجد متابولیسم فعال، انباشته می شود. غلظت ویتامین ث در بافت‌های گوناگون به دریافت ویتامین ث از طریق جیره غذایی بستگی دارد. علاوه بر این، برخی بافت‌ها مانند مغز، غده تیموس و گلوبول‌های سفید به مقدار زیادی ویتامین ث را انباشته می کنند. در این بافت‌ها در زمان کمبود ویتامین ث در جیره غذایی، مقادیر اسیدآسکوربیک به مدت طولانی تری در مقایسه با اندام‌های ذخیره‌ای مانند کبد، باقی می‌ماند. شکل ۱-۵ نتایج مطالعات آزمایشگاهی را نشان می دهد که در آنها توزیع اسیدآسکوربیک در بافتهای گوناگون ماهی قزل آلای رنگین کمان بررسی شده است. این ماهیان با مقادیر ۲۰۰ تا ۱۰۰۰ میلی گرم اسیدآسکوربیک به ازای هرکیلوگرم جیره غذایی برای مدت یک ماه تغذیه شده بودند. مقادیر بالای اسیدآسکوربیک در بافت‌های مغز و غده تیموس، فرضیه اهمیت اسیدآسکوربیک در حفظ بافت‌های حیاتی از اکسایش را ثابت می‌کند.

در ماهیان کبد و راس کلیه مهمترین اندام‌های ذخیره کننده اسیدآسکوربیک می باشند. وجود مقادیر بالای ویتامین ث در راس کلیه احتمالا مربوط به حضور بافت‌های لمفوپوئیتیک[1] در این ناحیه است. قسمت تنه کلیه و طحال می‌توانند مقادیر بالایی از ویتامین ث را ذخیره نمایند که قسمت اول محل قرار گرفتن سلول‌های کرومافین است که وظیفه اصلی آنها بیوسنتز کاتکل آمین ها می باشد. اسیدآسکوربیک در محل بیوسنتز کاتکل آمین‌ها تغلیظ شده و همراه کورتیکواستروئیدهای تازه ساخته شده، در پاسخ به عوامل استرس‌زا رها می‌شود.

[1] Lymphopoietic tissues



شکل۱-۵ : توزیع بافتی اسیدآسکوربیک در قزل آلای رنگین کمان تغذیه شده با فسفات آسکوربات در سطوح ۲۰۰ mgeq/kg و ۱۰۰۰ جیره غذایی به مدت یک ماه

۲-۳-۵- ظرفیت گلوبول‌های سفید

گلوبول‌های سفید می توانند مقادیر بسیار زیادی از اسیدآسکوربیک را در خود ذخیره‌کنند. نتایج ارائه شده در جدول۳-۵، افزایش غلظت‌های اسیدآسکوربیک درون سلولی در قزل آلای رنگین کمان را در ارتباط با جذب غذایی ویتامین ث نشان می‌دهد. بنظر می‌رسد که ظرفیت گلوبول‌های سفید، برای ذخیره سازی ویتامین ث بین nmolesAA ۵۰ - ۴۰ به ازای 10^8 سلول معادل µgAA ۷/۹۲ - ۷/۰۴ به ازای 10^8 سلول باشد (Verlhac *et al.*, 1995) که این مقدار در چندین آزمایش مشاهده شده است حتی زمانی که قزل آلای رنگین کمان با دوز ۱۰۰۰ppm ویتامین ث برای مدت دو هفته تغذیه شده بود (Verlhac *et al.*, 1998). اگرچه به درستی نمی توان مقدار ذخیره شده در کبد را که برحسب میکروگرم بر گرم بیان شده است، با میزان ذخیره شده در گلوبول‌های سفید که بر حسب تعداد سلول است، مقایسه نمود ولی µg ۷ اسیدآسکوربیک ذخیره شده در 10^8 سلول، مقدار بسیار زیادی است و نشان می‌دهد که ویتامین ث نقش مهمی را در حفظ

سلول‌های ایمنی از آسیب اکسایشی[1] ایفا می‌کند.

۳-۳-۵- اثر عوامل محیطی بر غلظت‌های بافتی ویتامین ث

فاکتورهای محیطی که می‌توانند باعث واکنش‌های فیزیولوژیک گردند، ممکن است بر میزان آسکوربات مورد نیاز موثر باشند. Thomas (1990)، نشان داد که فاکتورهای محیطی گوناگون سبب تغییراتی در وضعیت اسیدآسکوربیک در ماهی کفال خاکستری می‌شوند (جدول ٤-٥).

تغییرات در غلظت‌های اسیدآسکوربیک در آبشش، کلیه، کبد و مغز پس از قرار گرفتن ماهی در معرض تغییرات مختلف فاکتورهای محیطی مانند دما، شوری، زخم، کادمیوم و مواد نفتی مورد مطالعه قرار گرفته است.

جدول۳-۵: میزان اسیدآسکوربیک کبد و گلبول های سفید در قزل آلای رنگین کمان تغذیه شده با جیره آزمایشی حاوی مقادیر مختلف ویتامین ث برای مدت سه هفته

تیمارهای غذایی	ویتامین ث در مقدار ۲۰ mg/kg	ویتامین ث در مقدار ۲۰۰ mg/kg	ویتامین ث در مقدار ۲۰۰۰ mg/kg	ویتامین ث در مقدار ۴۰۰۰ mg/kg
اسیدآسکوربیک کبد بر حسب µg/g	۲۲/۷ ± ۰/۵	۱۱۷ ± ۰/۱	۱۶۱ ± ۱۱/۱	۱۷۸ ± ۳/۸
اسید آسکوربیک گلبول سفید برحسب $nmol/10^8Cell$	۱۱/۲ ± ۰/۳	۲۶/۶ ± ۳/۱	۴۰/۷ ± ۲/۶	۳۹/۴۱ ± ٤/۲
برحسب $\mu g/10^8Cell$	۱/۹۷ ± ۰/۰۵	٤/٦٨ ± ۰/٥٤	۷/۱٦ ± ۰/٤٦	٦/۹۳ ± ۰/۷٤

توجه: نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار از دو تکرار برای هر تیمار ارایه شده‌اند (Verlhac *et al.*, 1995)

[1] Oxidative damage

جدول٤-٥ : خلاصه‌ای از اثرات محیطی بر غلظت‌های بافتی اسیدآسکوربیک در کفال خاکستری

عوامل محیطی	فواصل بر حسب روز	تغییرات در اسیدآسکوربیک بافتی				منبع
		آبشش	کلیه	کبد	مغز	
شوری	۷	⇧	⇩	___	⇧	Thomas, 1984
جراحت	۴	⇩	⇩	___	___	
دما	۱۴	___	___	___	⇩	
کادمیوم	۴۲	⇩	⇩	⇩	⇩	Thomas *et al.*, 1982
نفت	۷	___	⇩	⇩	⇩	Thomas, 1987

اقتباس از Thomas (۱۹۹۰)

تمام فاکتورهای مورد مطالعه، باعث ایجاد تغییر در میزان ذخیره سازی اسیدآسکوربیک شدند ولی این اختلافات مختص به بافت بود. این مشاهدات منجر به این نتیجه شد که کمبود اسیدآسکوربیک در کلیه می‌تواند به عنوان یک پاسخ غیر اختصاصی به عوامل استرس زای محیطی باشد.

٤-٥ - معیارهای موثر بر تعیین مقدار اسیدآسکوربیک مورد نیاز

تعیین مقدار اسیدآسکوربیک مورد نیاز به شدت به انتخاب معیارهای مورد استفاده، وابسته‌است. در گذشته معیارهایی که به طور معمول مورد استفاده قرار می گرفتند شامل فقدان علائم کمبود، حداکثر رشد و میزان زنده مانی بود. به منظور تعیین این که چنین نیازهای حداقلی، به دریافتهای ناکافی این ماده منتهی نمی‌شوند، بایستی تعیین مقدار ویتامین ث مورد نیاز، بر اساس عملکردهای این ویتامین باشد یعنی غلظت ویتامین ث در اندام‌ها و سلول‌ها به سطحی برسد که مزایای دیگری نیز حاصل آورد. همچنین باید تفاوت بین افراد یک جمعیت و نیز اختلاف بین نژادهای مختلف ماهی مد نظر باشد. بنابراین بایستی میزان ویتامین ث مورد نیاز بر اساس هر نوع اهداف و شرایط پرورشی خاصی تعیین شود و البته نباید از نظر دور داشت که فاکتورهایی مانند اندازه، سن، میزان غذادهی، نرخ

متابولیک، حالت فیزیولوژیک ماهی، برهمکنش بین مواد مغذی، وضعیت سلامت و فاکتورهای محیطی بر این مقدار موثر خواهند بود (Lovell, 1994; Halver, 1995).

١-٤-٥ - سن و نرخ متابولیک

بسیاری از مطالعات انجام شده پیرامون تغذیه ماهیان با ویتامین ث، روی ماهیان جوان انجام شده است (Sandens, 1991)، ولی شواهدی مبنی بر تغییر میزان ویتامین ث مورد نیاز، در طول رشد وجود دارد. طی ٣٠٠ روز آزمایش، Hilton و همکاران (١٩٧٨) بیان داشتند که نیاز ماهی قزل آلای رنگین کمان به ویتامین ث در خلال رشد، کاهش می یابد. همچنین به نظر می‌رسد که این موضوع به مرحله تکاملی ماهی نیز مرتبط باشد. ماهی توربوت در مرحله لاروی در مقایسه با مرحله نوزادگاهی نیاز بالاتری به ویتامین ث دارد (Merchie *et al.*, 1996b). آزمایشی با دو نژاد از ماهی قزل آلای رنگین کمان که دارای اختلاف رشد بودند، نشان داد که نرخ رشد بالاتر، نیاز ویتامینی بالاتری را نیز به همراه دارد (Matusiewcz *et al.*, 1994). محققین بعدها عنوان نمودند که مکانیزم‌های تنظیم کننده گردش اسیدآسکوربیک، در طول دوره رشد ماهی تغییر می‌کنند. ولی این که چه زمانی و به چه دلیلی چنین تغییراتی رخ می‌دهد، نیازمند مطالعه بیشتر است.

٢-٤-٥- تولید مثل

هنوز نقش اسیدآسکوربیک در سیستم تولید مثلی ماهیان نر، به صورت گسترده‌ای مطالعه نشده است، هرچند که اثرات مفید ویتامین ث بر کیفیت اسپرم انسان ثابت شده است. در ماهی قزل آلای رنگین کمان، غلظت و تحرک اسپرم مرتبط با غلظت‌های ویتامین ث در مایع اسپرمی[1] است (Ciereszko and Dabrowski, 1995). مقادیر اسیدآسکوربیک جیره غذایی به منظور افزایش اسیدآسکوربیک مایع اسپرمی به طوری که باعث اثرات مفید گردد، ٢٧٠ – ١٣٠ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی است که خیلی بیشتر از میزانی است که NRC (١٩٩٣) برای رشد معمول (٤٠ mg/Kg) ماهیان توصیه نموده است. اخیرا طی آزمایشی، ارتباط بین درصد تفریخ و غلظت‌های

[1] Seminal plasma

اسیدآسکوربیک مایع اسپرمی، نشان داد که میزان بازماندگی جنین های حاصله از قزل آلای رنگین کمان نری با کمتر از ۷/۳ µg AA/ml مایع اسپرمی، کاهش می یابد (Dabrowski and Ciereszko, 1996). همچنین با افزایش میزان اسیدآسکوربیک در جیره غذایی مولدین ماده قزل آلای رنگین کمان، هم آوری و بازماندگی جنین ها، افزایش می‌یابد (Blom and Dabrowski, 1995) و میزان ویتامین ث جیره غذایی بر تفریخ لاروها، موثر است (Sandnes *et al*., 1984). مطالعات انجام شده توسط WaagbØ و همکاران (1989)، دال بر ارتباط بین میزان دریافت اسیدآسکوربیک و مقادیر β- ۱۷ استرادیول و ویتلوژنین خون است که بر نقش مثبت اسیدآسکوربیک در ساخت هورمون در بافت‌های درون ریز اشاره دارد. شکل ۲-۵ افزایش معنی دار میزان اسید آسکوربیک کل را در تخمدان ماهی قزل آلای رنگین کمان، متناسب با افزایش میزان ویتامین ث در جیره غذایی پس از ده ماه تغذیه نشان می‌دهد. به طور همزمان، افزایش معنی داری در توده تخم تولید شده (شکل۳-۵)، هم آوری و زنده مانی لاروی با افزایش جذب آسکوربات و غلظت‌های آسکوربات تخمدانی مشاهده می شود (Blom and Dabrowski, 1995). بنابراین وجود ٤٠٠ mgAA/Kg -۳۰۰ ویتامین ث در جیره غذایی جهت اشباع تخمدان‌ها و بهینه سازی تولید مثل در قزل آلای رنگین کمان لازم است.

۳-٤-٥- روابط متقابل مواد مغذی

اسیدآسکوربیک با عناصر فلزی که از لحاظ غذایی دارای ارزش هستند، برهمکنش دارد. در جانوران تک معده‌ای، ویتامین ث، جذب آهن غیر هِم را تحریک می‌کند و جذب مس را کاهش می‌دهد. در قزل آلای رنگین کمان، سمیت مس محلول در آب که عامل کم خونی است، با افزایش میزان اسید آسکوربیک جیره غذایی کاهش می‌یابد (Yamamoto *et al*., 1981). به نظر می‌رسد که اسیدآسکوربیک اثر ناچیزی بر روی جذب مس موجود در جیره غذایی داشته باشد (Lanno *et al*., 1985). دلیل این اختلاف و نیز اثر ویتامین ث بر متابولیسم و دفع مس در قزل آلای رنگین کمان، بخوبی درک نشده است. کمبود اسیدآسکوربیک بر میزان آهن خون اثر داشته و نیز توزیع مجدد غلظت‌های آهن بافتی را در قزل آلای رنگین کمان موجب می‌شود (Hilton, 1989).

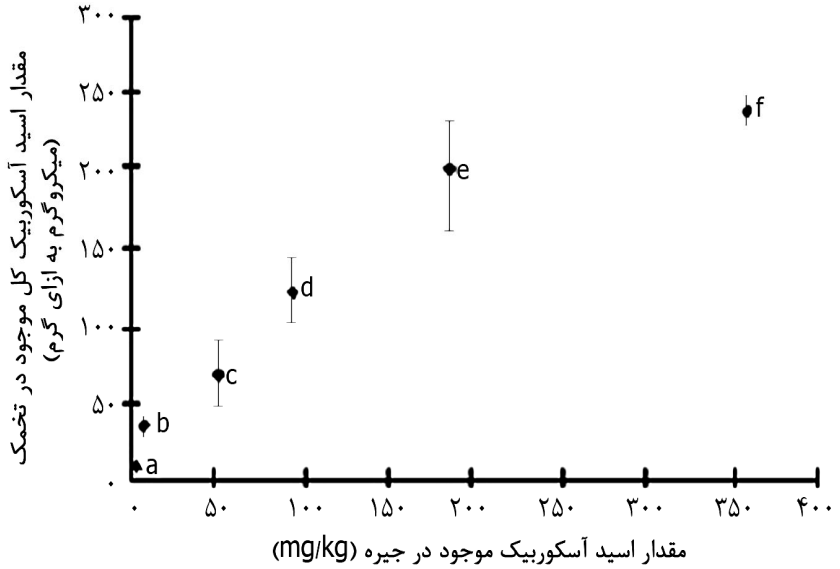
اسیدآسکوربیک جذب رودوی آهن غیر هِم را با احیاء فرم فریک به فرو و سپس تشکیل شلات[1]تشدید می‌کند که به خوبی جذب می‌شود. اگرچه شواهدی وجود دارد که اسیدآسکوربیک بر متابولیسم آهن در سطوح بافتی پستانداران اثر دارد، ولی هنوز چنین اثراتی در ماهیان تشریح نشده است.

ویتامین ث و ویتامین E در محیط طبیعی، به ترتیب آنتی اکسیدانهای حاضر در فاز آبی سیتوپلاسم و غشای سلولی هستند. مطالعات در مهره داران عالی‌تر، ممانعت مشارکتی از فرایندهای اکسایشی را توسط هر دو ویتامین و نیز تولید مجدد ویتامین E به وسیله ویتامین ث را نشان می‌دهد. چنین برهمکنش‌هایی از ویتامین‌های E و ث، هم در محلول‌های همگن و هم در سیستم‌های غشایی لیپوزومی مشاهده شده است (Niki, 1987). بنابراین مشخص می‌شود که ویتامین ث با حفاظت غشاهای زیستی از آسیب رادیکال‌های آزاد ارتباط دارد. برهمکنش ویتامین ث با سایر مواد مغذی در جانوران آبزی نیازمند مطالعات بیشتری است تا اثر آنها بر توصیه‌های عملی میزان اسیدآسکوربیک جیره غذایی، روشن شود.

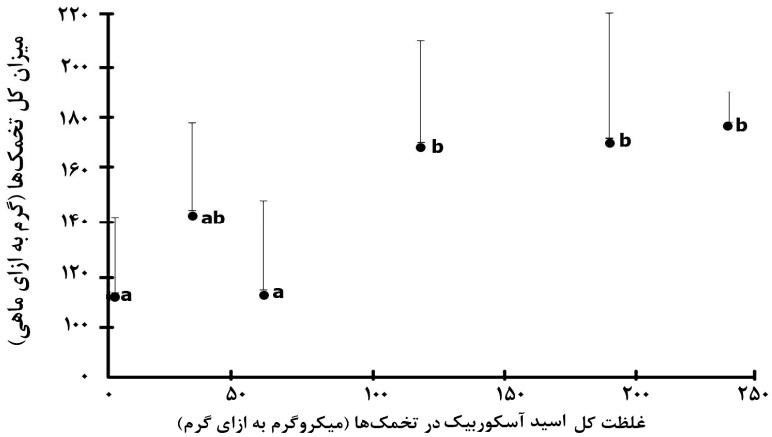
٤-٤-٥- سلامت

ویتامین ث در سلامت ماهیان نقش مهمی را ایفاء می‌کند، نه تنها به دلیل ضرورت آن بلکه به خاطر این که ویتامین ث به عنوان یک آنتی اکسیدان عمل نموده و در نتیجه سیستم ایمنی را از آسیب‌های اکسایشی حفظ می‌کند. حفظ سیستم کارآمد دفاعی برای رشد و نیز بهبود مقاومت در برابر عوامل استرس زای محیطی و عوامل بیماری زا، از اهمیت زیادی برخوردار است. در حقیقت، پرورش ماهیان سالم مستلزم این است که آنها را قادر سازیم تا مکانیزم‌های دفاعی محکمی را در برابر حمله عوامل بیماری زا ایجاد کنند. همچنین بهبود عملکردهای ایمنی به کارآمدی بهتر واکسیناسیون نیز منجر می‌شود. ماهی که تحت شرایط بسیار متراکم پرورش داده می‌شود، ممکن است تحت استرس شدیدی باشد که منجر به ضعف سیستم ایمنی ماهی گردد. در نتیجه، ماهیانی که از سیستم ایمنی تقویت شده‌ای برخوردار می باشند، بهتر می‌توانند با استرس و حمله عوامل بیماری زا مقابله کنند.

[1] Chelate



شکل۲-۵ : مقدار اسیدآسکوربیک کل در تخمک‌های قزل آلای رنگین کمان در زمان اوولاسیون پس از ۱۰ ماه تغذیه با جیره غذایی حاوی مقادیر مختلف مشتقات منوفسفاته ویتامین ث (Blom and Dabrowski, 1995)



شکل ۳-۵ : اثر غلظت اسیدآسکوربیک کل موجود در تخمک‌های قزل آلای رنگین کمان بر میزان کل تخمک‌های تولید شده (Blom and Dabrowski, 1995)

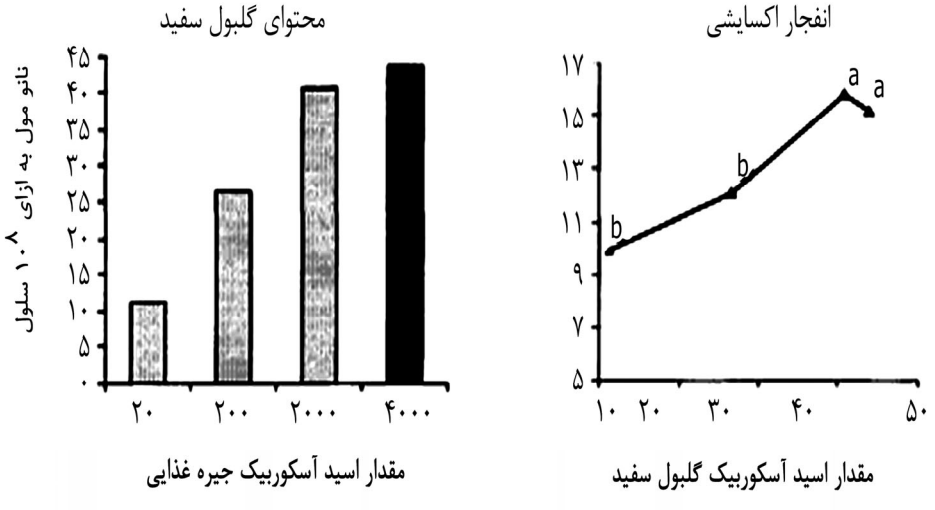
١-٤-٤-٥- پاسخ ایمنی

ویتامین ث، به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی، در حفاظت سلول‌ها در برابر آسیب اکسایشی نقش مهمی را بازی می‌کند. گلوبول‌های سفید قادرند مقدار زیادی از اسیدآسکوربیک را در خود ذخیره سازند (Verlhac *et al.*, 1995). شکل٤-٥ الف، نشان می‌دهد که چطور افزایش میزان ویتامین ث با سطوح درون سلولی اسیدآسکوربیک در گلوبول‌های سفید ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در ارتباط است. شکل ٤-٥ ب، ارتباط بین غلظت درون سلولی اسیدآسکوربیک گلوبول سفید قزل آلای رنگین کمان و پاسخ انفجار اکسایشی[1] آنها را نشان می‌دهد. فعال سازی این پاسخ، توسط عوامل بیماری زا باعث می‌شود که سلول‌ها مقادیر زیادی از انواع اکسیژن واکنشی(رادیکالهای اکسیژنی)[2] را تولید کنند که دیواره سلول باکتریایی را مورد حمله قرار می‌دهد. این نوع از اکسیژن واکنشی که به صورت درون سلولی و برون سلولی رها می‌شود، برای خود سلول نیز سمی است. اسیدآسکوربیک درون و برون سلولی، باعث محافظت سلول از خود اکسایشی[3] شده و باعث می‌شود که سلول برای مدت طولانی‌تری به رغم اکسایش، به فعالیت خود ادامه دهد.

مطالعات صورت گرفته پیرامون کارایی مقادیر افزایش یافته ویتامین ث به عنوان یک تنظیم کننده ایمنی[4] توسط Verlhac و Gabaudan (1997)، بیان شده است. اگرچه برخی مطالعات چنین اثر مثبتی را برای ویتامین ث نشان ندادند، اکثر مطالعات انجام شده بر ویژگی‌های تنظیم کنندگی ویتامین ث بر فعالیت ماکروفاژها مانند انفجار اکسایشی، فعالیت فاگوسیتوزی[5] و پینوسیتوز تاکید دارند و برخی مطالعات نیز اثر ویتامین ث را بر لیزوزیم نشان داده‌اند (Dabrowski *et al.*, 1996)، در حالی که محققین دیگر چنین اثری را گزارش نکردند (Verlhac *et al.*, 1996). به نظر نمی‌رسد که فعالیت کمپلمان(عامل مکمل) فعال شده از طریق مسیر فرعی – جزء عوامل مکانیزم‌های دفاع غیر اختصاصی - تحت تاثیر ویتامین ث بوده باشد.

---

[1] Oxidative burst response
[2] Reactive oxygen species
[3] Auto-oxidation
[4] Immunomodulator
[5] Phagocytic activity



شکل٤-٥ الف: ارتباط بین میزان اسیدآسکوربیک گلبول سفید با میزان ویتامین ث دریافتی از جیره غذایی در ماهی قزل آلای رنگین کمان تغذیه شده با ۲۰، ۲۰۰، ۲۰۰۰ و ٤۰۰۰ میلی‌گرم اسیدآسکوربیک در کیلوگرم جیره غذایی برای مدت سه هفته. ب: انفجار اکسایشی ماکروفاژهای قزل آلای رنگین کمان در ارتباط با غلظت اسیدآسکوربیک در گلبول سفید(Verlhac *et al.*, 1995).

مطالعات اندکی ثابت نموده است که تقویت پاسخ آنتی بادی مختص به یک آنتی ژن مرتبط با افزایش دریافت خوراکی ویتامین ث است، در حالی که تکثیر لمفوسیت‌ها که یک مکانیزم سلولی ایمنی اختصاصی است، به روشنی از ویتامین ث اثر می‌پذیرد، زیرا که این سلول‌ها به منظور حفظ خود در برابر آسیب اکسایشی و نیز بهبود فعالیت، قادر به ذخیره سازی مقادیر عظیمی از ویتامین ث هستند. بطور کلی کمپلمان فعال شده از طریق مسیر کلاسیک مرتبط با ایمنی اختصاصی، از ویتامین ث اثر نمی پذیرد (Verlhac and Gabaudan, 1997).

زمانیکه اثر افزایش میزان ویتامین ث مورد بررسی قرار می‌گیرد، باید طول مدت غذادهی نیز محاسبه شود. در ابتدا ثابت شده بود که ویتامین ث پس از یک دوره غذادهی طولانی مدت، اثرگذار است (Verlhac and Gabaudan, 1994). با این حال، ویتامین ث به عنوان یک افزودنی غذایی پیشگیری کننده برای تقویت سیستم ایمنی ماهی و بهبود سلامت، باید قبل از شرایط استرس احتمالی،

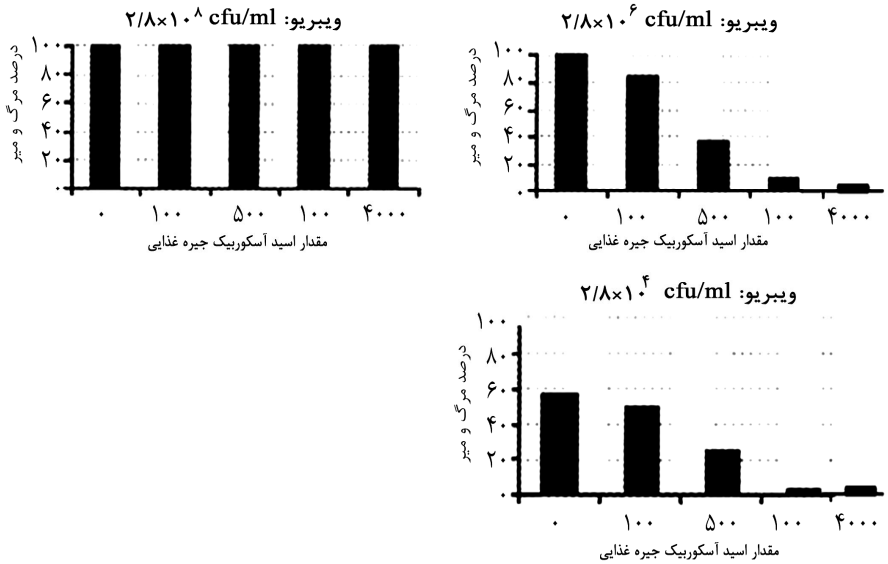
مورد استفاده قرار بگیرد و بیان شده است که جیره غـذایی دارای mg AA/Kg ۱۰۰۰ کـه بـرای دو هفته به ماهی خورانده شده است، نتایج مشابهی را در تقویت عملکرد غیراختصاصی سلولی به دسـت می‌دهد (Verlhac *et al*., 1998). در حقیقـت بـه نظـر مـی‌رسـد کـه غلظـت‌هـای درون سـلولی گلوبول‌های سفید قزل آلای رنگین کمان پس از دو هفته تغذیـه بـا mg AA/Kg ۱۰۰۰، بـه سـطح ثابت (کفه)[1] می‌رسد. در همین راستا، اکثر مطالعات فاقد اطلاعات مقدار ذخیره سازی اسیدآسکوربیک در اندام‌ها یا بافت های هدف هستند که در نتیجه مقایسه مطالعات را مشکل می‌سازد. شرایط آزمایش و رشد ماهیان مورد آزمایش نیز فاکتورهای تعیین کننده‌ای در مقایسه اثرات مشاهده شده در زمینه اثـر تنظیم کنندگی ویتامین ث می‌باشد.

۲-٤-٤-٥- مقاومت در برابر بیماری

هنگام ارزیابی اثر خوراندن مقادیر بالای ویتامین ث بر مقاومت ماهی در برابـر بیمـاری‌هـای عفـونی، مشکلات کنترل نمودن آزمایش مواجهه[2]، باید مدنظر باشد. در بین مطالعـاتی کـه جهـت ارزیـابی اثـر ویتامین بر مقاومت به بیماری‌ها انجام شده است، گستره‌ای از انواع گونه های ماهیان، عوامل بیمـاری زا و انواع عفونت‌ها مورد آزمایش قرار گرفته که تفسیر نتایج حاصله را مشکل می‌سازد حتی زمانی که طول مدت غذادهی نادیده گرفته شود(Verlhac and Gabaudan, 1997). از آنجائیکـه ویتـامین ث، عامل درمانی نیست، زمانی که میزان مرگ و میر فقط طی چند روز پس از آلودگی بـه ۸۰ درصـد می‌رسد، نمی توان هیچ اثر سودمندی را انتظار داشت. به منظور رسیدن به سطح معمـولی از مـرگ و میر، بایستی آزمایشهای مواجهه طرح ریزی شوند چرا که از نقطه نظر اقتـصادی، حتـی افـزایش پـنج درصدی زنده مانی، می تواند فوق العاده با ارزش باشـد. Navarre و Halver (1989)، اثـر مقـدار عفونـت تزریـق شـده را بـر مـاهی قـزل آلای رنگـین کمـانی کـه بـا جیـره غـذایی حـاوی مقـادیر متفاوتی ویتامین ث تغذیه شده بودند، نشان دادند (شکل ٥-٥). اثر معنی دار ویتامین ث بر مقاومت به بیماری زمانی می‌تواند قابل مشاهده باشد که دوز عامل بیماری زا کم باشد.

---

[1] Plateau
[2] Challenge experiment

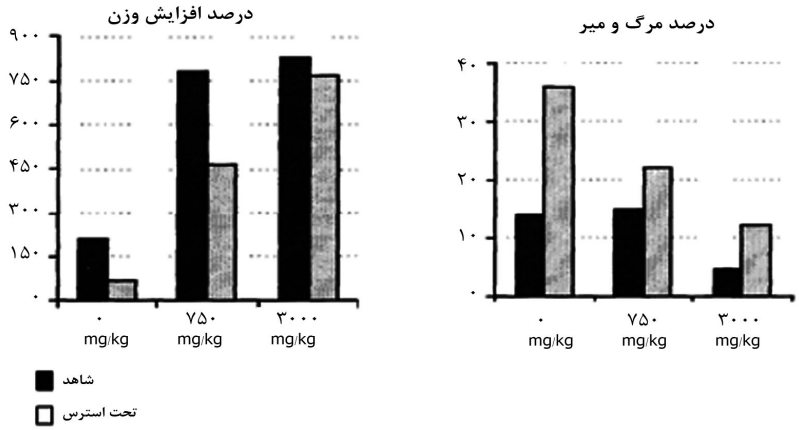


شکل ٥- ٥: اثر غلظت‌های مختلف ویتامین ث بر میزان مرگ و میر قزل‌آلای رنگین‌کمان آلوده شده با غلظتهای مختلف Vibrio (Navarre and Halver, 1989)

۳-٤-٤-٥- التیام زخم

طی ساخت کلاژن، اسیدآسکوربیک به عنوان کوآنزیم، در عمل هیدروکسیلاسیون پرولین به هیدروکسی پرولین، نقش دارد. مطالعات اندکی در زمینه توانایی ویتامین ث در افزایش قدرت ترمیم زخم انجام شده است. هر چند بهبود معنی داری توسط Halver (۱۹۷۲) در زخم‌های قزل آلای رنگین‌کمان و آزاد ماهی کوهو مشاهده شدکه با مقادیر متفاوت ویتامین ث به صورت اسیدآسکوربیک کریستاله، تغذیه شده بود.

به رغم مشکل بودن انجام چنین آزمایشهایی، ارزیابی مجدد اثر ویتامین ث بر حفظ انسجام سدهای طبیعی پوست، از اهمیت زیادی برخوردار است چرا که این سدهای طبیعی پوست مانع دسترسی عوامل بیماری زا به بافت‌های درونی و سیستم گردش خون می‌شود.



شکل ٦-٥ : اثر ویتامین ث خوراکی بر رشد و مرگ و میر طوطی ماهی قرار گرفته تحت استرس کمبود اکسیژن به صورت متناوب (Ishibashi *et al.*, 1992)

٤-٤-٤-٥- مقاومت در برابر عوامل استرس زا

تمام عوامل استرس زای فیزیولوژیک بر وضعیت سلامتی ماهیان اثرگذارند و باعث انحراف ذخایر ریزمغذی بدن از عملکرد اصلی خود شده و برای زنده مانی صرف می‌شوند. تضعیف سیستم ایمنی مهمترین اثر ثانویه در پاسخ موجود زنده به استرس است. بسیاری از شرایط مانند حمل و نقل، تراکم بالا، دستکاری و افت کیفیت آب می‌توانند منجر به ایجاد پاسخ استرسی در ماهیان شود. ماهیان با ترشح مقادیر بالای هورمون‌های استرسی (کورتیکواستروئیدها و کاتکل آمین‌ها) به استرس پاسخ می‌دهند که این هورمونها به عنوان تضعیف کننده سیستم ایمنی شناخته شده‌اند. بنابراین پیشگیری از استرس، به مواد مغذی این اجازه را می‌دهد که صرف رشد و بهبود وضعیت سلامت جانور شوند.

نقش خوراندن مقادیر بالای ویتامین ث در کاهش اثرات استرس می‌تواند با این حقیقت تفسیر شود که رهاسازی هورمون‌های استرسی توسط سلول‌های بین کلیوی و کرومافین توام با مصرف بالای اسیدآسکوربیک است. بنابراین با خوراندن مقدار بالایی از ویتامین ث می توان ذخایر اسیدآسکوربیک بافتی را در سطح بالا نگه داشت تا تغییرات هورمونی و حفظ توان سیستم ایمنی حفظ شود و به ماهیان این امکان را بدهد که تحت شرایط عادی رشد کنند.

Ishibashi و همکاران (1992)، (شکل٦-٥) بیان نمودند که خوراندن مقدار زیادی ویتامین ث به ماهیانی که در معرض استرس کمبود اکسیژن قرار دارند، رشد طبیعی آنها را در مقایسه با گروه شاهد به دنبال دارد و بنابراین، تلفات ناشی از استرس با افزایش میزان ویتامین ث جیره غذایی، کاهش می‌یابد.

۵-۵ – نتیجه گیری

مقدار ویتامین ث مورد نیاز آزاد ماهیان که در کتاب NRC (۱۹۹۳) عنوان شده است، بر اساس حداقل مقدار مجاز برای حفظ رشد و زنده مانی آن هم، تحت شرایط کنترل شده آزمایشگاهی بوده و اطلاعات بیشتری درباره نیاز این ماهیان به این ویتامین همسو با معیارهای خاص لازم است. احتمالا بایستی نیاز به اسیدآسکوربیک طی تغذیه زمستانه به علت کاهش مصرف غذا، جهت حفظ مقادیر مناسب اسیدآسکوربیک بافتی، بررسی شود زیرا میزان دریافت غذا در ماهیان وابسته به دمای آب است. در سالهای اخیر سرعت رشد بویژه در آزاد ماهیانی که با جیره غذایی حاوی مقادیر بالای انرژی تغذیه شده‌اند، به طور قابل ملاحظه‌ای بهبود یافته است و در بسیاری از موارد خیلی بهتر از موارد مشاهده شده در آزمایشگاه بوده است. اثر رشد سریع آزادماهیان بر نیاز ماهیان به ویتامین ث باید مورد ارزیابی قرار گیرد و بایستی اثر باهم بیشی ویتامین ث و E در جیره‌های غذایی حاوی انرژی بالا بازنگری شود. احتمالا شرایط محیطی و بهداشتی و تکنیک‌های پرورشی بر مقدار ویتامین ث مورد نیاز ماهیان اثر گذار می باشند که چنین اثراتی باید بررسی شود. میزان آسکوربات بصورت غلظت‌های بافتی، باید در ارتباط با هر نوع شرایط خاص فیزیولوژیک تعریف شود. به علاوه، این موضوع در ارتباط با ارزیابی نقش اسیدآسکوربیک در سطح سلولی و در نظر داشتن تفاوتهای فردی خواهد بود. چنین اطلاعاتی غلظت‌های ویتامین ث موجود در اندام‌ها و سلول‌ها را برای هر کدام از گونه‌های پرورشی و تحت شرایط پرورشی خاص خود، تضمین می کند.

منابع

1. Blom, J. H., Dabrowski, K., (1995). Reproductive success of female rainbow trout(Oncorhynchus mykiss) in response to graded dietary ascorbyl monophosphate levels. Biol. Reprod. 52: 1073-1080.

2. Brown, P. B., Dabrowski, K., Garling, D. L., (1996). Nutrition and feeding of yellow perch (Perca flavescens). J. Appl. Ichthyol. 12: 171-174.

3. Ciereszko, A., Dabrowski, K., (1995). Sperm quality and AA concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across-season study. Biol. Reprod. 52: 982-988.

4. Coustans, M. F., Guillaume, J., Metailler, R., Dugornay, O., Messager, J. L., (1990). Effect of an AA deficiency on tyrosinemia and renal granulomatous disease in turbot (Scophtalmus maximus) interaction with a slight polyhypovitaminosis. Comp. Biochem. Physiol. 97a: 145-152.

5. Dabrowski, K., Ciereszko, A., (1996). AA protects against male infertility in a teleost fish. Experientia 52: 97-100.

6. Dabrowski, K., Matusiewicz, K., Matusiewicz, M., Hoppe. P. P., Ebeling, J., (1996). Bioavaibility of vitamin C from two ascorbyl monophosphate esters in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbum). Aquaculture Nutrition. 2: 3-10.

7. Halver, J. E., (1972). The role of ascorbic acid in fish disease and tissue repair. Bull. Gap. Soc. Sci. Fish. 38: 79-92.

8. Halver, J. E., (1995). Vitamin requirement study techniques. J. App. Ichthyol. 11: 215-224.

9. Halver, J. E., Ashley, L. M., Smith, R. R., (1969). AA requirement of coho salmon and rainbow trout. Trans. Am. Fish Soc. 90: 762-771.

10. Hilton, J. W., (1989). The interaction of vitamins, minerals and diet composition in the diet of fish. Aquaculture, 79: 223-244.

11. Hilton, J. W., Cho, C. Y., Slinger, S. J., (1978). Effect of graded levels of supplemental AA in practical diets fed to rainbow trout (Salmo gairdneri). J. Fish. Res. Board. Can. 35: 431-436.

12. Ishibashi, Y., Kato, K., Ikeda, S., Murata, O., Nasu, T., Kumai, H., (1992). Effect of dietary AA on tolerance to intermittent hypoxic stress in Japanese parrot fish. Nippon Suisan Gakkaishi. 58: 2147-2152.

13. Koshio, S., Sakakura, Y., Lida, Y., Tsukamoto, K., Kida, T., Dabrowski, K., (1997). The effect of vitamin C intake on schooling behaviore of amphidromous fish, ayu, Plecoglossus altiveli. Fish Sci. 63: 619-624.

14. Lall, S. P., Olivier, G., Weerakoon, D. E. M., Hines, J. A., (1990). The effect of vitamin C deficiency and excess on immune response in Atlantic salmon (salmo salar L.). In: M. Takeda and T. Watanabe (Editors), Proceedings of the Fish Nutrition Meeting. Tokyo, pp: 427-441.

15. Lanno, R. P., Slinger, S. J., Hilton, J. W., (1985). Effect of AA dietary copper toxicity in rainbow trout (Salmo gairdneri Richardson). Aquaculture, 49: 269-287.

16. Lovell, R. T., (1994). Dietary nutrient allowance for fish. Feedstuffs July 20, 91-97.

17. Matusiewicz, M., Dabrowski, K., Volker, L., Matusiewicz, K., (1994). Regulation of saturation and depletion of AA in rainbow trout. J. Nutr. Biochem. 6: 204-212.

18. Merchie, G., Lavens, P., Dhert, Ph., Garcia Ulloa Gòmez, M., Nelis, H., De Leenheer, A and Sorgeloos, P. 1996a. Dietary ascorbic acid requirements during the hatchery production of turbot larvae. Journal of Fish Biology,49:573-583.

19. Merchie, G., Lavens, P., Storch,V., Übel, U., Nelis, H., De Leenheer, A and Sorgeloos, P. 1996 b. Influence of dietary vitamin C dosage on turbot (Scophthalmus maximus) and European sea bass (Dicentrarchus labrax) nursery stage. Comp. Biochem. Physiol. 114 A(2) : 123-133.

20. Messager, J. L., Ansquer, D., Metailler, R., Person-Le Ruyet, J., (1989). Induction experimental de l'hyperlyrosinemie granulomateuse chez le turbot d'elevage (Scophtalmus maximus) par une alimentaion carencee en acide ascorbique. Ichthyophysiologica Acta, 10: 201-214.

21. NRC (National Research Council), (1993). Nutrient Requirement of Fish. Washington. D. C., National Academy press.

22. Navarre, O., Halver., J. E., (1989). Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. Aquaculture, 79: 207-221.

23. Niki, E., (1987). Interaction of ascorbate and α-tocopherol. Ann. N. Y. Acad. Sci. 498:189-199.

24. Rosenlund, G., Jorgensen, L., Waagbo, R., Sandnes, K., (1990). Effect of different dietary levels of AA in plaice (Pleuronectes platessa L.). Comp. Biochem. Physiol. 96a: 395-398.

25. Sandnes, K., (1991). Vitamin C in fish nutrition- a review. Fisk. Dir. Ser. Ernaering 4, 3-32.

26. Sandnes, K., Ulgenes, Y., Braekkan, O. R., Utne, F., (1984). The effect of AA supplementation in broodstock feed on reproduction of rainbow trout (Salmo gairdneri). Aquaculture, 43: 167-177.

27. Teshima, S. I., Kanazawa, A., Koshio, S., Itoh, S., (1991). L-ascorbyl-2-phosphate-MG as vitamin C source for Japanese flounder (Paralichthys olivaceus). In: S. J. Kuashik and P. Luquet (Editors), Fish Nutrition in Practice. Coll. Les Colloq, No. 61. INRA, Paris, pp. 157-166.

28. Thomas, P., (1984). Influence on some environmental variables on the ascorbic acid status of mullet, Mugil cephalus L., tissues. I. Effect of salinity capture-stress and temperature. J. Fish Biol. 25: 711-721.

29. Thomas, P., (1987). Influence on some environmental variables on the ascorbic acid status of mullet, Mugil cephalus L., tissues. III. Effect of exposure to oil. J. Fish Biol. 30: 485-494.

30. Thomas, P., (1990). Molecular and biochemical responses of fish to stressors and their potential use in environmental monitoring. American Fisheries Symposium 8, 9-28.

31. Thomas, P., Bally, M., Neff, J. M., (1982). AA status of mullet, Mugil cephalus L. Expossed to cadmium. J. Fish Biol. 20: 183-196.

32. Verlhac, V., Gabaudan, J., (1994). Influence of vitamin C on the immune system of salmonids. Aquaculture, 25: 21-36.

33. Verlhac, V., Gabaudan, J., (1997). The effect of vitamin C on fish health. Brochure No. 51002. Goffmann-La Roche AG 4070 basel, Switzerland.

34. Verlhac, V., Gabaudan, J., Schuep, W., (1995). Immunomodulation in fish: II. Effect of dietary vitamin C. In: K. Kurmaly (Editor). Proceeding of the 2nd Roche Aquaculture center Conference on Nutrition and Disease. Bankok, Thailand.

35. Verlhac, V., Gabaudan, J., Schuep, W., Hole, R., (1996). Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune response of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Aquaculture, 143: 123-133.

36. Verlhac, V., Obach, A., Gabaudan, J., Schuep, W., Hole, R., (1998). Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Fish and Shelfish Immunol. 8: 409-424.

37. Waagbo, R, Thorsen, T., Sandnes, K., (1989). Role of dietary AA in vitellogenesis in rainbow trout (Salmo gairdneri). Aquaculture: 80: 301-314.

38. Yamamoto, S., (1982). The rearing of larval ayu (Plecoglossus altivelis) using a test diet of compound food supplemented with vitamin C and phosphatic salts. Can. Transl. Fish. Aquat. Sci. No. 4851, 2 pp.

39. Yamamoto, Y. K., Hayama, K., Ikeda, S., (1981). Effect of dietary ascorbic acid on copper poisoning in rainbow trout. Bull. Jp.Soc. Sci. Fish. 47: 1085-1089.

«فصل ٦»

نیاز ماهیان آب شیرین و دریایی به ویتامین «ث»

Marie F. Gouillu-Coustans and Sadasiram J.Kaushik

١-٦- مقدمه

اخیرا مطالعاتی پیرامون نیاز ویتامینی ماهیان جوان پرورشی منتشر شده است (١). همان طور که نشان خواهیم داد، تفاوت در مقدار ویتامین مورد نیاز بین دو بولتن شورای ملی پژوهش (NRC[1]) (٢، ٣) ممکن است اختلاف نظریه های موجود را به عنوان هدف کتاب‌های NRC (جدول١-٦) منعکس سازد. بنابراین اطلاعات NRC (٣) سطح حداقل ویتامین‌های لازم جهت جلوگیری از علائم کمبود ویتامین در ماهیان گرم آبی به ویژه گربه ماهی روگاهی*Ictalurus punctatus*، را فهرست نموده است و این گونه به نسبت کپور معمولی و شانک قرمز بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته است. همچنین NRC (٢) مقادیر توصیه شده برای ماهیان سردابی را نیز فهرست بندی نموده است که مقادیر مذکور، دوبرابر (ویتامین D 3، ریبوفلاوین، اسیدآسکوربیک و اسید پانتوتنیک)، سه برابر

[1] National Research Council

(پیرودوکسین)، یا ۱۰ برابر (تیامین و نیاسین) مقادیر توصیه شده برای مورد اول است. زیرکمیته های NRC در مورد نیاز ماهیان به مواد مغذی، متوجه شدند که ترکیب دو بولتن قبلی، درست است زیرا شواهد اخیر از نیاز گونه‌های مختلف ماهیان به مواد مغذی با احتمال وجود چند استثناء، اختلاف فاحشی را نشان نمی دهد. به نظر می رسد که در گونه های مختلف ماهیان، منبع غذایی ترجیحی حاوی مواد مغذی خاص، تفاوت زیادی با نیاز واقعی گونه به آن مواد مغذی داشته باشد (۷). بنابراین آخرین ویرایش NRC تمام گونه‌های ماهیان تجاری را با جداول قبلی تلفیق نموده است (٤) و بنابراین مقادیر نیازمندی‌های تغذیه‌ای جدول، نشان دهنده حداقل مقدار مورد نیاز برای رسیدن به حداکثر عملکرد ماهی، در شرایط آزمایشگاه است. در مورد قزل‌آلای رنگین‌کمان و گربه ماهی روگاهی نیاز به چند ویتامین مانند ویتامینهای A، E، تیامین، ریبوفلاوین، پیردوکسین، اسید پانتوتنیک، نیاسین، اسید فولیک و اسیدآسکوربیک مشابه است. اگرچه تفاوت‌هایی نیز در مورد ویتامین D_3، کولین و میواینوزیتول وجود دارد. برای گربه ماهی حضور بیوتین و B_{12} در جیره غذایی ضروری دانسته شده است ولی هنوز میزان دقیق آن مشخص نشده است و به همین ترتیب، نیاز ویتامینی ماهی آزاد کوهو *O.kisutch*، بیان شده است در حالی که فقط برخی از نیازهای کپورمعمولی و تیلاپیای آبی شناخته شده است (٤).

سرانجام، مقایسه بین گونه‌هایی که از لحاظ فیلوژنی فاصله دارند مانند قزل آلای رنگین کمان، گربه ماهی، مرغ و خوک، نشان می دهد که نیاز ویتامینی برای بسیاری از ویتامین‌های محلول در آب، بسیار مشابه است (جدول ۱-٦). از آنجایی که نیازهای ویتامینی بین گونه‌های مختلف قابل مقایسه است، ما می‌توانیم فرض کنیم که اختلاف های موجود در زمینه نیازهای ویتامینی، بین گونه‌های آب شیرین و آب شور، قابل اغماض است.

در اینجا، ما برآنیم تا ثابت کنیم که آیا افزودن مکمل ویتامینی به میزان حداقل مقدار مورد نیاز ذکر شده توسط NRC (٤) برای دو گونه ماهی آب شیرین، قزل آلای رنگین کمان و آزادماهی شینوک *O. tschawytscha* و دو گونه ماهی دریایی، باس دریایی اروپایی *Dicentrarchus labrax* و میش ماهی قرمز *Scianops ocellatus*، که با جیره‌های غذایی کاربردی تغذیه شده‌اند،کافی‌است یا خیر؟ (۸، ۹). نتایج نشان می دهد که تامین تمام ویتامین‌ها بر اساس حداقل میزان مورد نیاز، برای

جدول ۱-٦: مقادیر توصیه شده و داده‌های مربوط به حداقل ویتامین مورد نیاز برای فقدان علائم کمبود و دستیابی به حداکثر افزایش وزن در گونه‌های مختلف

ویتامین	سطح توصیه شده[۲]	حداقل میزان برای فقدان علائم کمبود	حداقل میزان مورد نیاز برای دستیابی به حداکثر افزایش وزن[۳]			
	ماهیان سردآبی	گربه ماهی روگاهی	قزل آلای رنگین‌کمان	گربه ماهی روگاهی	مرغ	خوک
ویتامین آ، IU	۲۵۰۰	۱۰۰۰-۲۰۰۰	۲۵۰۰	۱۰۰۰-۲۰۰۰	۱۵۰۰	۲۲۰۰
ویتامین D3، IU	۲٤۰۰	۵۰۰-۱۰۰۰	۲٤۰۰	۵۰۰	۲۰۰	۲۲۰
ویتامین E، IU	۳۰	۳۰	۵	۵۰	۱۰	۱٦
ویتامین K، mg	۱۰	ضروری	ضروری	ضروری	۰/۵	۰/۵
اسید آسکوربیک، mg	۱۰۰	٦۰	۵۰	۲۵-۵۰	غیرضروری	غیرضروری
تیامین، mg	۱۰	۱	۱	۱	۱/۸	۱/۵
ریبوفلاوین، mg	۲۰	۹	٤	۹	۳/٦	٤
پریدوکسین، mg	۱۰	۳	۳	۳	۳	۲
اسید پانتوتنیک، mg	٤۰	۱۰-۲۰	۲۰	۱۵	۱۰	۱۲
نیاسین، mg	۵۰	۱٤	۱۰	۱٤	۲۷	۲۰
بیوتین، mg	۱	ضروری	۰/۱۵	ضروری	۰/۱۵	۰/۰۸
اسید فولیک، mg	۵	غیرضروری	۱	۱/۵	۰/۵۵	۰/۳
ویتامین B12، mg	۰/۰۲	ضروری	۰/۰۱	ضروری	۰/۰۰۹	۰/۰۲
کولین، mg	۳۰۰۰	ضروری	۱۰۰۰	٤۰۰	۱۳۰۰	٦۰۰
میواینوزیتول، mg	٤۰۰	غیرضروری	۳۰۰	غیرضروری	غیرضروری	غیرضروری

توجه: سطوح براساس IU یا mg/kg ارائه شده است

حفظ افزایش وزن سریع و حداکثر در انواع ماهیان آب شیرین یا دریایی مثل بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان و آزادماهی شینوک و باس دریایی اروپایی و میش ماهی قرمز وقتی که این گونه ها با اجزای غذایی کاربردی تغذیه می شوند، کافی است (جدول ۲-٦).

به نظر می‌رسد که با آگاهی از کل نیازهای ویتامینی ماهیان، مقایسه میزان نیاز ماهیان آب شیرین و دریایی، جالب باشد. منابع علمی اطلاعات وسیعی را در مورد نیاز یک گونه و گونه‌های آب شیرین و دریایی به اسیدآسکوربیک نشان می‌دهد و ما بدنبال این هستیم که بفهمیم آیا این اختلافات ظاهری هستند یا واقعی؟

جدول۲-٦: رشد، بهره وری از غذا و کسب روزانه نیتروژن در ماهیان آب شیرین و شور تغذیه شده با جیره‌های غذایی عملی حاوی مقادیر مختلف مخلوط ویتامینی

گونه	مخلوط ویتامینی	وزن نهایی (g)	بهره وری از غذا	کسب نیتروژن (mg)	منبع
قزل‌آلای رنگین‌کمان	بیش از اندازه	٤١/٤	١/٤٠	٥٢٠	٨
قزل‌آلای رنگین‌کمان	×١	٤١/٤	١/٣٩	٥٣٢	٨
آزاد ماهی شینوک	× ١/٢٥	٢٤/٧	٠/٦٨	ردیابی نشده	٨
آزاد ماهی شینوک	×١	٢١/٩	٠/٥٧	–	٨
باس دریایی	×٢	٧/٧	٠/٩١	٥٠٧	٨
باس دریایی	×١	٧/٨	٠/٩١	٥١٦	٨
میش ماهی قرمز	×٤	١٢١	٠/٩٨	٦٩٩	٩
میش ماهی قرمز	×٣	١٢٤	٠/٩٨	٧٢٨	٩
میش ماهی قرمز	×٢	١٢٢	١	٧٣٧	٩
میش ماهی قرمز	×١	١٢٤	٠/٩٧	٦٨٧	٩

قزل آلای رنگین کمان (وزن اولیه بدن = ۲/۸ گرم) پرورش یافته در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ هفته
آزادماهی شینوک (وزن اولیه بدن= ۹/۸ گرم) پرورش یافته در دمای ۱۲ درجه سانتی گراد به مدت ١٦ هفته
باس دریایی (وزن اولیه بدن= ۰/۸ گرم) پرورش یافته در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ هفته
میش ماهی قرمز (وزن اولیه بدن= ٤/٥ گرم) پرورش یافته در دمای ۲۸ الی ۳۱ درجه سانتی گراد به مدت ۷ هفته
کارایی جیره غذایی = جذب غذای خشک/افزایش وزن تر

۲-٦- نیاز ماهیان به اسیدآسکوربیک

در مورد تمام ویتامین‌ها، در حال حاضر اطلاعات ارائه شده توسط NRC بهترین برآورد از میزان ویتامین مورد نیاز است (٤). زمانی که چندین عدد در منابع علمی دیده می‌شود، زیرکمیته NRC منطقی‌ترین برآورد را می‌پذیرد. در مورد قزل‌آلای رنگین‌کمان، Woodward (١) فهرستی از مطالعات مختلفی را تهیه نمود که حداقل نیاز خوراکی برای تمام ویتامین‌ها و مواد مغذی شبه ویتامینی را برآورد می‌کند. برای شش ویتامین (ویتامین D_3، تیامین، ریبوفلاوین، پیریدوکسین، اسیدپنتانوتنیک، نیاسین) مقادیر ارائه شده NRC منطبق بر حداقل میزان نیاز غذایی است. برای چهار ویتامین (ویتامین E، اسیدفولیک ، بیوتین و B12)، مقادیر گزارش شده توسط NRC (٤)، دو برابر میزان برآورد شده است (جدول ٦-٣) هر چند، اسیدآسکوربیک به صورت استثناء باقی مانده و مقادیری معادل ۵۰ میلی گرم اسیدآسکوربیک به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی، با ایجاد یک حاشیه

امنیت، ۵ برابر حداقل مورد نیاز قزل آلای رنگین کمان جوان است. سطح ۱۰ میلی گرمی مشتق مونوفسفاته اسیدآسکوربیک- شکل پایدار و زیست فراهم[1] - به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی با ارتقاء زنده مانی و افزایش وزن، به عنوان معیار نهایی، برآورد شده است (۱۰).

مطالعات زیادی برای تعیین نیاز خوراکی ماهیان به ویتامین ث با استفاده از اسیدآسکوربیک آزاد (L- اسیدآسکوربیک) به عنوان یک منبع غذایی (حفاظت نشده یا پوشش دار) انجام شده است. ویژگی بی ثباتی این ترکیب در غذای ماهیان و حلالیت بالای آن در آب منجر به تراوش[2] این نوع ویتامین به درون آب شده و مطالعات دقیق جهت ارزیابی نیاز به آن را با مشکل مواجه ساخته است. در نتیجه، برآورد میزان نیاز به ویتامین ث با خوراندن اسیدآسکوربیک حفاظت نشده، مقدور نمی‌باشد. ارزیابی دقیق از میزان حداقل ویتامین ث مورد نیاز مستلزم به کارگیری شکل پایدار و زیست فراهم ویتامین ث است. در انواع منابع علمی دیده می شود که فسفاتهای آسکورباتی، می‌توانند به عنوان شکل پایدار و نیز زیست فراهم ویتامین ث مطرح باشند که به متخصصین تغذیه این اجازه را می دهد که حداقل ویتامین ث خوراکی مورد نیاز را بسیار آسانتر و دقیق تر از بررسی با نوع کریستاله آن تعیین کنند (۱۱ تا ۱۳).

اسیدآسکوربیک های عرضه شده به شکل منوفسفات آسکوربیل (AMP) یا پلی فسفات آسکوربیل (APP) برای انواع ماهیان آب شیرین و دریایی آزمایش شده اند (جدول٤-٦ و٥-٦). از مطالب فوق می‌توان نتیجه گرفت که در زمان مقایسه مطالعات با استفاده از منابع غذایی مختلف ویتامین ث یا روش‌های آزمایشگاهی مختلف، باید جوانب احتیاط را رعایت نمود. در جداول ٤-٦ و ٥-٦ یکسری از مطالعات به صورت انتخابی، فهرست بندی شده‌اند که اغلب شرایط آزمایشگاهی ذیل را مد نظر داشته‌اند:

.

[1] Bioavailable
[2] Leaching

جدول۳-٦ : اطلاعات مربوط به حداقل نیاز ویتامینی براساس شاخص‌های موجود به دست آمده تحت شرایط آزمایشگاهی به منظوردستیابی به حداکثر عملکرد در ماهی قزل آلای رنگین کمان

ویتامین	حداقل میزان مورد نیاز	تخمین حداقل میزان مورد نیاز در جیره
ویتامین آ، IU	۲۵۰۰	۲۵۰۰-۵۰۰۰
ویتامین IU،D3	۲٤۰۰	۲٤۰۰
ویتامین E، IU	۵۰	۲۷/۵
ویتامینK، mg	ضروری	۰/٤۵
اسید آسکوربیک، mg	۵۰	۱۰
تیامین، mg	۱	۱
ریبوفلاوین، mg	٤	۳/٦
پریدوکسین، mg	۳	۲
اسید پانتوتنیک، mg	۲۰	۱۹/۱
نیاسین، mg	۱۰	۱۰
بیوتین، mg	۰/۱۵	۰/۰۸
اسید فولیک، mg	۱	۰/٦
ویتامینB12، mg	۰/۰۱	۰/۰۰۷
کولین، mg	۱۰۰۰	٤۳۰-٤۰۰۰
میواینوزیتول، mg	۳۰۰	۲۵۰

توجه: مقادیر براساس IU یا mg/kg ارائه شده است

الف: استفاده از جیره های غذایی نیمه خالص[1](SPD) و یا جیره های غذایی عملی[2] (PD) تحت شرایط کنترل شده آزمایشگاهی روی ماهیان جوان سریع الرشد (در اغلب موارد، وزن اولیه بدن کمتر از ۱۰ گرم بوده است).

ب: افزودن اشکال مختلف اسیدآسکوربیک ناپایدار یا پایدار، به صورت L- اسیدآسکوربیک، پالمیتات آسکوربیل[3] (AP)، AMP یا APP (مطالعاتی که سایر اشکال ویتامین ث را استفاده نمودند، لحاظ نشده‌اند).

ج: سطوح درجه بندی شده ویتامین ث با حداقل سه سطح (سطح صفر نیز لحاظ شده است).

[1] Semi-purified diets
[2] Practical diets
[3] Ascorbyl palmitate

د: تعیین مقدار اسیدآسکوربیک مورد نیاز در رابطه با یک یا چند معیار پاسخی مانند فقدان عوارض کمبود، افزایش وزن، بازده جیره غذایی[1]، غلظت کلاژن یا هیدروکسی پرولین و حداکثر ذخیره سازی اسیدآسکوربیک در کبد، کلیه یا کل بدن (تنها مطالعاتی که غلظت‌های اسیدآسکوربیک بافتی را آنالیز کردند و به یک مقدار ثابت رسیدند، لحاظ گردیده است)

۱-۲-٦- نیاز ماهیان آب شیرین به اسیدآسکوربیک

اطلاعات به دست آمده از مطالعاتی که تحت شرایط آزمایشگاهی برای ارزیابی نیاز ١٤ گونه از ماهیان آب شیرین به ویتامین ث انجام شده‌اند، در جدول ٤-٦ به صورت خلاصه ارایه شده است.

در قزل آلای رنگین کمان و آزادماهی کوهو، حداقل ویتامین ث مورد نیاز بر مبنای افزایش وزن و فقدان علائم کمبود، در حدود ۱۰۰ – ۲۰ میلی گرم اسیدآسکوربیک به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی بوده است. در حالی که حداقل نیاز به ویتامین ث به منظور تشکیل طبیعی کلاژن (C/H) در بافت‌ها ۱۰۰- ۵۰ میلی گرم اسیدآسکوربیک به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی می‌باشد (١٤ تا ١٦). این برآوردها با افزودن L- اسیدآسکوربیک به جیره‌های غذایی عملی یا نیمه خالص بدست آمده‌اند. تنها یک آزمایش میزان اسیدآسکوربیک مورد نیاز برای حداکثر ذخیره سازی کبد (MLS)[2] از این ماده را به میزان ۵۰۰ میلی گرم اسیدآسکوربیک به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی اعلام نمود که ۲۵ برابر میزان مورد نیاز برای رشد طبیعی است (١٦). حین مقایسه آزمایش ها (۱۰، ۱۱، ۱۷،۱۸)، مقادیر اسیدآسکوربیک مورد نیاز در شرایط مشابه (افزودن AMP یا APP، لارو از لحظه شروع تغذیه یا ماهیان جوان، درجات متفاوت ویتامین ث) مطابق ۵ تا ۳۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی بوده است. این مقادیر خیلی کمتر از مقادیری است که با استفاده از L- اسیدآسکوربیک بدست آمده است و شایان ذکر است که این حداقل نیازها، دارای اختلاف چهار برابری هستند (mg AA eq/Kg ۲۰- ۵). اگرچه، این اختلافات ناشی از فرموله کردن جیره غذایی، انتخاب کمترین مقدار ویتامین ث مکمل یا تفاوتهای موجود در اوزان اولیه می باشد. در نهایت، نتایج بدست آمده مبین آن است که با وجود اینکه ۲۰mg AA eq/Kg رشد مناسب ماهی را ممکن می سازد ولی میزان ۳۲۰ mg AA eq/Kg لازم است تا مقاومت ماهیان طی مواجهه با ویروس IHN (نکروز عفونی بافت‌های خون ساز) را افزایش دهند (۱۷).

---

[1] Feed efficincy
[2] Maximum liver storage(MLS)

جدول٤-٦ : نیاز ماهیان آب شیرین درحال رشد به اسید آسکوربیک، تعیین شده تحت شرایط آزمایشگاهی

گونه	وزن اولیه	جیره‌ی غذایی	نوع اسید آسکوربیک مورد استفاده	سطوح درجه‌بندی شده AA (mg/kg)	میزان مورد نیاز (mg/kg)	معیارهای پاسخ	منبع
Oncorhynchus mykiss	۰/۳	SPD	L-AA	۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ٤۰۰، ۱۰۰۰	۱۰۰	WG, ADS	١٤
	٦/۷	PD	L-AA	۰، ۲۰، ٤۰، ۸۰، ۱٦۰، ۳۲۰، ٦٤۰، ۱۲۸۰	٤۰	WG, ADS	۱۵
	۰/۲	SPD	L-AA	۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰، ۲۰۰۰	۲۰	WG, ADS	١٦
					۱۰۰-۵۰	C/H	
					۵۰۰	MLS	
	مشخص نشده	SPD	APP(AAeq)	۰، ۲۰، ٤۰، ۸۰	۲۰	WG, ADS	۱۱
		PD	APP(AAeq)	۰، ۲۰، ۸۰، ۳۲۰	۲۰	WG	۱۷
					۳۲۰	IM/DR	
	۰/۰۷	PD	AMP(AAeq)	۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ٤۰، ۸۰، ۱٦۰، ۳۲۰	۵	WG, ADS, FE, C/H	۱۸
	۲/۹	PD	AMP(AAeq)	۰، ۱۰، ۲۰، ٤۰	۱۰	WG, ADS, FE	۱۰
Oncorhynchus kisutch	۰/٤	SPD	L-AA	۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ٤۰۰، ۱۰۰۰	۱۰۰-۵۰	WG, ADS	١٤

ادامه جدول ۴-۶:

گونه	وزن اولیه	جیره‌ی غذایی	نوع اسید آسکوربیک مورد استفاده	سطوح درجه‌بندی شده AA (mg/kg)	میزان مورد نیاز (mg/kg)	معیارهای پاسخ	منبع
Salmo salar	۳/۳	PD	L-AA	۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰	۵۰	WG, ADS	۱۹
					۱۰۰۰	MKS	
	۰/۲	PD	AMP(AAeq)	۰، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰	۱۰	WG, ADS	۲۰
					۲۰	C/H	
Ictalurus punctatus	۲/۳	SPD	L-AA	۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰	۵۰	WG, FE	۲۱
	۲/۳	SPD	L-AA	۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲۴۰	۶۰	WG, ADS, C/H	۲۲
	۷/۹	SPD	L-AA	۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۲۰۰	۲۵	ADS	۲۳
					۵۰	WG, FE	
	۴	SPD	L-AA	۰، ۳۰، ۶۰، ۱۵۰	۳۰	WG, ADS, C/H	۲۴
					۱۵۰	IM/DR	
	۱۳	SPD	AMP(AAeq)	۰، ۱۱، ۲۲، ۴۴، ۱۳۲	۱۱	WG, ADS, C/H	۲۵
	۶/۵	PD	APP(AAeq)	۰، ۵۰، ۱۵۰، ۲۵۰	۵۰	WG, FE, IM/DR	۲۶
					۱۵۰	MLS	
Oreochromis aureus	۱/۵	SPD	L-AA	۰، ۲۵، ۵۰، ۶۵، ۸۰، ۹۵، ۱۱۱۰	۵۰	WG, ADS, FE	۲۷
O.niloticus ×*O.aureus*	۱/۱	SPD	L-AA	۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰، ۲۰۰	۷۹	WG, FE, MLS	۳۰

ادامه جدول ۴-۶:

گونه	وزن اولیه	جیره‌ی غذایی	نوع اسید آسکوربیک مورد استفاده	سطوح درجه‌بندی شده AA (mg/kg)	میزان مورد نیاز (mg/kg)	معیارهای پاسخ	منبع
	۱/۵	SPD	AMP(AAeq)	۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰، ۱۲۰	۴۲-۳۷ (۲۰-۱۷)	WG, C/H	۲۸
Oreochromis niloticus	۱	PD	L-AA	۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۱۲۵۰، ۳۰۰۰، ۴۰۰۰	۱۲۵۰(۴۲۰)	WG, FE	۳۱
Cirrhina mrigala	*	SPD	L-AA	۰، ۶۰، ۳۰۰، ۶۰۰، ۹۰۰، ۱۲۰۰	۶۵۰-۷۵۰	WG, ADS	۳۲
Morone chrysops× *M.saxatilis*	۰/۵۵	SPD	APP(AAeq)	۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۷۵، ۱۵۰	۲۲	WG, ADS	۳۳
					۴۵	MLS	
Cichlasoma urophthalmus	۰/۲	SPD	L-AA	۰، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰، ۳۲۰، ۶۴۰، ۱۲۸۰، ۲۵۶۰، ۵۱۲۰، ۱۰۲۴۰	۴۰	WG	۳۴
					۱۱۰	ADS	
Piarapus mesopopamicus	۸/۷	PD	AP	۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰	۱۳۹	WG, ADS	۳۵
Clarias gariepinus	۲۰	PD	L-AA	۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۲۴۰	۶۰ (۴۶)	ADS, C/H	۳۶

ادامه جدول ۴-۶:

گونه	وزن اولیه	جیره‌ی غذایی	نوع اسید آسکوربیک مورد استفاده	سطوح درجه‌بندی شده AA (mg/kg)	میزان مورد نیاز (mg/kg)	معیارهای پاسخ	منبع
Clarias batrachus	۱/۵	SPD	L-AA	۰، ۵۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰	۲۰۰(٦۹)	WG	۳۷
Cyprinus carpio	*	SPD	APP(AAeq)	۰، ۱۰، ۹۰، ۲۷۰، ۸۱۰	٤۵	WG	۳۸
					۳۵	MBS	

(افزایش وزن مرطوب / جذب غذای خشک) راندمان تغذیه ای:FE
فقدان علایم کمبود :ADS
حداکثر ذخیره سازی کبدی :MKS
حداکثر ذخیره سازی کلیوی :MLS
حداکثر ذخیره سازی بدنی :MBS
ایمنی :IM
مقاومت در برابر بیماریها :DR
تراکم کلاژن یا هیدروکسی پرولین:C/H
لارو تازه به تغذیه افتاده*

وزن اولیه بدن:IBW
جیره عملی:PD
جیره غذایی نیمه خالص :SPD
L- اسیدآسکوربیک :L-AA
پالمیتات آسکوربیل :AP
مونوفسفات آسکوربیل :AMP
پلی فسفات آسکوربیل :APP
افزایش وزن :WG
مشخص نشده :NS

در آزادماهی اقیانوس اطلس *Salmo salar*، میزان ۵۰mg AA/Kg جهت رشد طبیعی و فقدان علائم ناشی ازکمبود و مقدار ۱۰۰۰ mg AA/Kg به منظور حداکثر ذخیره سازی در کبد لازم است (۱۹). با استفاده از AMP به عنوان منبع ویتامین ث، Sandnes و همکاران (۲۰)، نتیجه گرفتند که طی مدت زمان آزمایش، حداقل ویتامین ث مورد نیاز در جیره غذایی برای تامین رشد بهینه، ۱۰ – ۲۰mg AA eq/Kg می باشد.

از مطالعات انجام شده پیرامون نیاز گربه ماهی روگاهی به ویتامین ث، جیره غذایی نیمه خالصی با L- اسیدآسکوربیک مخلوط شده بود که نشان داد ٦۰mg AA/Kg- ۲۵ برای حداکثر رشد، کارایی جیره غذایی، فقدان علائم کمبود اسیدآسکوربیک و تراکم بهینه کلاژن یا هیدروکسی پرولین (C/H) لازم است (۲۱ تا ۲٤). افزایش مقاومت در برابر عفونت زمانی مشاهده می شود که سطح ویتامین ث افزوده شده به جیره غذایی تا بالاترین سطح غذایی (۱۵۰ mg AA/Kg) در محیط آبی در دمای ۲۳

جدول۵-٦ : نیاز ماهیان دریایی درحال رشد به اسیدآسکوبیک تحت شرایط آزمایشگاهی

گونه	وزن اولیه	جیره	نوع اسید آسکوربیک مورد استفاده	سطوح درجه‌بندی شده AA (mg/kg)	میزان مورد نیاز (mg/kg)	معیارهای پاسخ	منبع
Opleglatus fascietus	مشخص نشده	SPD	L-AA	۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۳۰۰۰	۲۵۰	WG, ADS	٤۲
					۵۰۰	MLS, MKS	
Pleuronects platessa	۲/۹	PD	L-AA	۰، ۲۰۰، ۲۰۰۰	۲۰۰	WG, ADS, C/H	٤۳
Sparus aurata	۰/۵	SPD	L-AA	۰، ۵۰، ۱۰۰، ۳۰۰، ٦۰۰، ۱۲۰۰، ۳۲۰۰	۱۰۰(٦۳)	ADS	٤٤
Sebastes schlegeli	۷	SPD	L-AA	۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۵۰، ۱۵۰۰	۱٤٤	WG	٤۵
Seriola quilqueradiata	۲/۷	PD	AMP(AAeq)	۰، ۱٤، ۲۸، ٤۷	۱٤-۲۸	WG, ADS, C/H	٤٦
Paralichthys olivaceus	٤۳	SPD	AMP(AAeq)	۰، ۵، ۱٤، ۲۸، ٤۷	۲۸-٤۷	WG, ADS, FE	٤۷
Scophthalmus maximus		SPD	APP(AAeq)	۰، ۲۰، ۲۰۰، ۲۰۰۰	۲۰	WG	٤۸
Sciaops ocellatus	٤۳	SPD	APP(AAeq)	۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ٤۵، ٦۰، ۷۵، ۱۵۰	۱۵	WG, FE, ADS	٤۹
Lats calacarifer	۰/۹	PD	L-AA	۰، ۵۰۰، ۷۰۰، ۹۰۰، ۱۱۰۰، ۲۵۰۰، ۵۰۰۰	۵۰۰-۷۰۰	WG, ADS, FE	۵۰
					۱۱۰۰	MLS	
					۲۵۰۰	MKS	
	۱/۹	PD	AMP(AAeq)	۰، ۳۰، ٦۰، ۱۰۰	۳۰(۱۲/٦)	WG, ADS, FE, C/H	۵۱
	۵/۸	PD	AMP(AAeq)	۰، ۳۰، ٦۰، ۱۰۰	۳۰	WG, ADS, FE	۵۲

ادامه جدول ۵-۶:

گونه	وزن اولیه	جیره	نوع اسید آسکوربیک مورد استفاده	سطوح درجه‌بندی شده AA (mg/kg)	میزان مورد نیاز (mg/kg)	معیارهای پاسخ	منبع
Diceltrarchus labrax	۳/۳	PD	L-AA	۰، ٦۰، ۲۰۰، ٤۲۰	۲۰۰	WG, ADS, MLS	٥۳
		SPD	APP(AAeq)	۰، ۲۰، ۲۰۰، ۲۰۰۰	۲۰	WG	٤۸
	۰/۷	PD	APP(AAeq)	۰، ٥، ۱۰، ۲۰، ٤۰، ۸۰، ۱٦۰، ۳۲۰	٥	WG, ADS, FE	٥٤
					٥-۳۱	C/H	
					۱۲۱	MLS	

FE: (افزایش وزن مرطوب / جذب غذای خشک)راندمان تغذیه ای
ADS: فقدان علایم کمبود
MKS: حداکثر ذخیره سازی کبدی
MLS: حداکثر ذخیره سازی کلیوی
MBS: حداکثر ذخیره سازی بدنی
IM: ایمنی
DR: مقاومت در برابر بیماریها
C/H: تراکم کلاژن یا هیدروکسی پرولین
***** لارو تازه به تغذیه افتاده

IBW: وزن اولیه بدن
PD: جیره عملی
SPD: جیره غذایی نیمه خالص
L-AA: L - آسکوربیک اسید
AP: پالمیتات آسکوربیل
AMP: مونوفسفات آسکوربیل
APP: پلی فسفات آسکوربیل
WG: افزایش وزن
NS: مشخص نشده

درجه سانتی گراد، افزایش بیابد (۲٤). بنابراین برآوردهای بدست آمده با L- اسید آسکوربیک خیلی نزدیک به نتایجی است که در آزادماهیان مشاهده شده است. El-Naggar و Lovell عنوان نمودند که برای گربه ماهی روگاهی، جیره های غذایی حاوی پایین ترین میزان ویتامین ث به شکل L- اسیدآسکوربیک یا AMP را ساخته اند که این جیره های غذایی برای تامین رشد، میزان معمول کلاژن استخوان، هماتوکریت طبیعی خون و بدون بروز هیچ علامت آشکاری از اسکوروی، مناسب می باشند. بدون شک این غلظت‌ها (۱۱ mg AA eq/Kg برای AMP و ۸/۸ mg AA/Kg برای L- اسیدآسکوربیک حین تغذیه) به حداقل نیاز گربه ماهی روگاهی جوان نزدیک است (۲۵). نتایج مطالعه Li و همکاران (۲٦)، نشان داد که گربه ماهی روگاهی برای رشد طبیعی، پاسخ به استرس و مقاومت در برابر بیماریها، به بیشتر از ۵۰ mg AA eq/Kg نیاز دارد. شایان ذکر است که این مقدار

پایین ترین مقدار خورانده شده به ماهی است. متناسب با افزایش ویتامین ث جیره غذایی، غلظت آسکوربات کبدی بالا رفته و به یک سطح ثابت (کفه) ۲۲۰ µg/g می‌رسد. بنابراین، این ارزیابی‌ها، نشان می‌دهد که نیاز گربه ماهی روگاهی از نظر مشتقات فسفاته ویتامین ث خیلی نزدیک به نیاز آزادماهیان است.

در تیلاپیای آبی *O. aureus*، رشد و ضریب تبدیل غذایی در مقادیر بالاتر از ۵۰mg AA/Kg، بهبودی نداشت (۲۷). در هیبرید *O.niloticus* × *O.aereus*، افزایش وزن و تراکم کلاژن مهره‌ای آنالیز شده با رگرسیون خط شکسته نشان داد که اسیدآسکوربیک غذایی خورانده شده به میزان ۴۲ mg AMP – ۳۷ به صورت مونوفسفات منیزیم L- آسکوربیل(AMP-Mg) (۲۰ mg AA eq/Kg – ۱۷) کافی می‌باشد (۲۸). اخیرا این محققین، توانایی زیستی دو منبع آسکوربات مانند ۲- مونوفسفات منیزیم L- آسکوربیل و۲- منو فسفات سدیم L- آسکوربیل(AMP-Na) را مقایسه نمودند (۲۹). بر اساس اندازه گیری رشد، نتایج حاصله نشان داد که AMP-Na در رفع نیاز تیلاپیا به ویتامین ث از AMP-Mg موثرتر است (به ترتیب ۱۵/۹۸ mg AA eq/Kg و ۱۸/۸۲). در یک مطالعه پیشتر، با استفاده از L- اسیدآسکوربیک نیاز ویتامینی به میزان ۷۹ mg AA eq/Kg گزارش شده بود (۳۰). این برآوردها منطبق بر مقادیر مورد نیاز بدست آمده از آزاد ماهیان و گربه ماهیان است. بنابراین باید میزان حجم مجاز توصیه شده در جیره غذایی برای تیلاپیای نیل *O. niloticus*، بر اساس پارامترهای تغذیه‌ای و آسیب شناسی،۱۲۵۰mg AA/Kg جیره غذایی، معادل نیاز خالص(پس از عمل آوری و ذخیره سازی) ۴۲۰mg AA به ازای هر کیلوگرم جیره خشک، باشد (۳۱). نتایج مشابهی نیز در مورد مریگال *Cirrhina mrigala* (۳۲) گزارش شده است. آنالیز آماری رشد، بدشکلی و میزان زنده مانی در مقادیر مختلف اسیدآسکوربیک خوراکی به نیاز به ۷۵۰mg AA/Kg – ۶۵۰ طی مراحل اولیه زندگی این گونه تاکید دارد و محققین نتیجه گرفتند که گذشته از دمای محیطی بالا – ۲۵ الی ۳۵ درجه سانتی گراد – که به نظر می‌رسد فاکتور عمده‌ای برای این نیاز بالای لاروها به اسیدآسکوربیک طی شروع تغذیه فعال باشد، تراوش مورد انتظار اسیدآسکوربیک به درون آب، بویژه در مورد جیره های غذایی ریز ذره، خود یک مشکل مهم است.

محاسبه نیاز ویتامینی باس سان شاین (هیبرید) *Morone chrysops* × *M. saxatilis* (۳۳)، بر اساس آنالیز رگرسیون حداقل مربعات غیر خطی وزن نشان داد که حداقل نیاز این هیبرید به اسیدآسکوربیک ۲۲ گرم به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی است. آنالیز اسید آسکوربیک کبدی نشان می‌دهد که آسکوربات کبدی در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی بیشتر از ٤٥ میلی گرم ویتامین ث فعال به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی، افزایش نمی یابد.

برای هر یک از گونه‌های زیر، فقط یک آزمایش و آن هم با اشکال غیر پایدار ویتامین ث انجام شده است (٣٤ تا ٣٧). بنابراین در *Cichlasoma urophthalmus* (٣٤)، حداقل مقدار ویتامین ث مورد نیاز برای رشد طبیعی ٤٠ mg AA/Kg و حداقل مقدار لازم برای تضمین سلامت ماهی ١١٠ mg AA/Kg می‌باشد. در مطالعه ای با استفاده از پالمیتات آسکوربیل(AP)، پیشنهاد شد که ٥٠ mg AA/Kg جهت بهبود رشد ماهیان انگشت قد *Piaractus mesopotamicus* کافی است، در صورتی که میزان بهینه ویتامین در شرایط آکواریومی و با استفاده از آنالیز رگرسیون، به میزان ١٣٩ mg AA/Kg تعیین شد (٣٥). در گربه ماهی آفریقایی *Clarias gariepinus*، غلظت ٤٦ mg AA/Kg (گنجایش جیره غذایی تا ٦٠ mg AA/Kg می‌باشد) باعث جلوگیری از عارضه شکستگی جمجمه[1] می شود و همچنین ساخت بهینه کلاژن مهره ای را به دنبال دارد (٣٦). درگربه ماهی آسیایی *Clarias batrachus* (٣٧)، بهترین رشد با میزان ٦٩ mg AA/Kg بدست آمد (گنجایش جیره تا ٢٠٠ mg AA/Kg بود) و نیاز ویتامینی این گونه برای دستیابی به افزایش وزن و نمو طبیعی در محدوده ١٣٩-٤٠ mg AA/Kg گزارش گردید.

نتایج آزمایش ما در لاروهای تازه به تغذیه افتاده کپور معمولی نشان می‌دهد که مقدار مورد نیاز می‌تواند خیلی پایین تر باشد (٣٨). بر حسب رشد لاروهای تازه به تغذیه افتاده و حداکثر میزان اسیدآسکوربیک کل بدن، میزان اسیدآسکوربیک مورد نیاز در حدود ٤٥ mg AA eq/Kg و ٣٤٥ mg AA eq/Kg برای کپور معمولی گزارش شده است. نیازهای تغذیه‌ای کپورمعمولی به ویتامین ث جهت رشد، مشابه مقادیری است که برای آزادماهیان، گربه ماهیان و تیلاپیا بدست آمده است. این نتایج بر ضرورت وجود ویتامین ث در جیره غذایی کپور معمولی اشاره دارد، به طوری که

[1] Broken-skull disease

توسط Dabrowski و همکاران (۳۹) نیز عنوان شده است ولی Reddy و Ramesh (٤٠) بیان نمودند که نیازی به کاربرد ویتامین ث به صورت مکمل در جیره غذایی کپورماهیان نیست، زیرا این ماهیان قادرند که در شرایط طبیعی میزان کافی ویتامین ث را بسازند (٤٠). در تاسماهی سیبری، *Acipenser baeri*، که یک ماهی غیر استخوانی (غضروفی- استخوانی) است، حضور آنزیم L- گلونولاکتون اکسیداز در کلیه، باعث فقدان علائم فاحش کمبود ویتامین ث در ماهیانی می‌شود که از جیره غذایی فاقد ویتامین ث تغذیه کرده اند. همچنین در این مطالعات مشخص شد که تمام گروه‌ها رشد مناسبی را از خود بروز دادند و پیشنهاد شد که این ماهیان نیازی به کاربرد ویتامین ث مکمل ندارند (٤١).

٢-٢-٦ - نیاز ماهیان دریایی به اسیدآسکوربیک

نتایج بدست آمده از مطالعات انجام شده تحت شرایط آزمایشگاهی جهت برآورد نیاز ده گونه از ماهیان دریایی به اسیدآسکوربیک در جدول ٥-٦ ارائه شده است. نخستین نکته‌ای که باید بیان گردد، این است که مطالعات انجام شده پیرامون نیاز ماهیان دریایی به ویتامین ث نسبت به ماهیان آب شیرین، جدیدتر بوده و فقط سوف عظیم الجثه *Lates calcarifer* و باس دریایی اروپایی مورد بررسی قرار گرفته است.

میزان کافی اسیدآسکوربیک مکمل برای حفظ رشد طبیعی و سلامت طوطی ماهی ژاپنی *Opleganatus fascietus*، ۲۵۰-۵۰۰ mgAA/Kg تعیین شده است تا غلظت‌های اسیدآسکوربیک بافت کلیوی و کبدی اشباع شود (٤٢). Rosenlund و همکاران (٤٣) پیشنهاد نمودند که ۲۰۰ mg AA/Kg برای رشد طبیعی کفشک ماهیان جوان *Pleuronectes platessa* کافی است و شایان ذکر است که در این مطالعه، این مقدار،کمترین مقدار آزمایش شده بود. مطالعه‌ای توسط Alexis و همکاران (٤٤) روی شانک سرطلایی *Sparus aurata*، به منظور بررسی علائم آسیب شناسی ایجاد شده در اثر کمبود آسکوربات نشان داد ماهیانی که با جیره غذایی حاوی بیش از ۱۰۰ mg AA/Kg (٦٣ mg/Kg L- اسیدآسکوربیک باقیمانده) تغذیه شده بودند، ظاهر و رفتار طبیعی در کل آزمایش داشتند. در صخره ماهیان کره‌ای جوان *Sebastes schlegeli* نتایج نشان داد

که ۱٤٤ mg AA/Kg برای رسیدن به حداکثر رشد لازم است (٤٥). در این آزمایشها، L- اسیدآسکوربیک به عنوان منبع ویتامین ث استفاده شده بود و نیاز به آن برای رسیدن به رشد طبیعی و فقدان علائم آسیب شناسی، در حدود ۲۵۰ mgAA/Kg- ٦۳ عنوان شد.

مقدار ۲۸ – ۱٤ mg AA/Kg جهت حفظ رشد مطلوب و فقدان عوارض ناشی از کمبود در ماهی دم زرد ژاپنی *Seriola quinqueradiata*، ضروری است. افزودن AMP به رژیم غذایی باعث افزایش غلظت‌های سرمی و کبدی ویتامین ث و نیز افزایش نسبت هیدروکسی پرولین به پرولین در استخوان می‌شود (٤٦). Teshima و همکاران (٤٧)، دریافتند که ٤۷ mg AA/Kg – ۲۸ برای تامین رشد مناسب کفشک ماهی ژاپنی *Paralichthys olivaceus* لازم است. لارو ۳۷ روزه توربوت *Scophthalmus maximus* که با غذای زنده تغذیه می شد، با جیره غذایی نیمه خالص حاوی مقادیر مختلفی از ویتامین ث (APP) تغذیه شد (٤۸). کاهش رشد، فقط در ماهیانی مشاهده گردید که با جیره غذایی فاقد ویتامین ث تغذیه شده بودند و این نکته نشان می دهد که میزان ۲۰ mg AA eq/Kg برای رفع نیاز ماهیان در مرحله پس از لاروی کافی است. سرانجام، آنالیز رگرسیون داده‌های وزنی به دست آمده با استفاده از مدل خط شکسته، حداقل نیاز ویتامینی را برای میش ماهی قرمز *Sciaenops ocellatus* (٤۹) پرورش یافته در آب لب شور (٦ گرم نمک در لیتر) ۱۵ میلی گرم ویتامین ث فعال به ازای هر کیلوگرم نشان می دهد. اگرچه مطالعات فوق پیرامون گونه‌های مختلفی انجام گرفته است، ولی مقایسه این دو گروه آزمایشی به روشنی نشان می‌دهد که بکارگیری AMP و APP باعث کاهش حداقل میزان ویتامین ث مورد نیاز می‌شود (۲۵۰mgAA/Kg - ٦۳ به ٤۷ mgAAeq/Kg - ۱٤کاهش می‌یابد).

در آزمایشهای مختلف می توان چنین ارزیابی‌های مجددی از حداقل ویتامین مورد نیاز را مشاهده کرد که با خوراندن اسیدآسکوربیک به اشکال L- اسیدآسکوربیک یا AMP یا APP در سوف عظیم جثه و باس دریایی اروپایی، انجام شده است. درآزمایش نخست، مقدار خوراکی ۷۰۰ mg AA/Kg جیره غذایی برای حداکثر رشد و فقدان علائم کمبود انگشت قدهای سوف عظیم جثه گرمسیری لازم است و حدود ۱۱۰۰ mg AA/Kg نیز لازم است تا غلظت اسیدآسکوربیک کبدی در حد بهینه نگه داشته شود که این میزان به عنوان میزان ترجیحی برای حفظ سلامتی نیز پیشنهاد شده است (۵۰). در

این آزمایش، اسیدآسکوربیک کریستاله به عنوان منبع ویتامین ث مورد استفاده قرار گرفت که به علت اتلاف آن طی عمل آوری و انبارداری و نیز تراوش آن به درون آب، برآورد میزان دقیق اسیدآسکوربیک جذب شده توسط ماهی مشکل است. در آزمایشی دیگر، روی سوف عظیم جثه که با جیره غذایی آزمایشی حاوی مقادیر مختلف AMP تغذیه شده بود، مشاهده شد که افزودن ۳۰ mg به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی (معادل ۱۲/٦ mg AA) برای رشد طبیعی و فقدان علائم کمبود و نیز میزان طبیعی هیدروکسی پرولین بدن، کافی است (۵۱) که این نتایج اخیرا نیز تایید شده است (۵۲). در باس دریایی اروپایی (۵۳)، رشد در ٢٤ هفته اول زندگی به ویتامین ث بستگی نداشت ولی پس از این مدت و تا پس از هفته ٤٢ اُم، در گروههایی که با جیرههای غذایی فاقد ویتامین ث یا حاوی ٦۰ mg AA/Kg تغذیه شدهاند، در مقایسه با گروههای تغذیه شده با جیرههای غذایی حاوی ٤٢۰mg AA/Kg – ۲۰۰، کاهش رشد مشاهده میشود و حداکثر ذخیره سازی کبدی، در جیرههای حاوی ۲۰۰ mg AA/Kg مشاهده می شود. باسهای دریایی ٤١ روزه، که با غذای زنده تغذیه میشدند با جیرههای غذایی نیمه خالصی تغذیه شدند که حاوی مقادیر مختلفیAPP بود. طی این عمل، کاهش تولید فقط در گروههایی مشاهده شد که از جیره غذایی فاقد ویتامین ث تغذیه کرده بودند و مشخص شد که میزان ۲۰ mg AA/Kg برای تامین رشد مطلوب بچه ماهیان باس دریایی کافی است (٤٨).

در مطالعه دیگری، بچه ماهیان باس دریایی تغذیه شده با جیرههای فاقد ویتامین ث، علائم کمبود و رشد ضعیف را در مقایسه با ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی مکمل ویتامینی (۳۲۰ mg AA eq/Kg – ۵) از خود نشان دادند. همچنین یک پاسخ وابسته به دوز ویتامین ث در غلظت اسیدآسکوربیک کبدی و پوست یا غلظتهای هیدروکسی پرولین کل بدن نسبت به مقادیر خوراکی ویتامین ث ثبت گردید. میزان مورد نیاز در حد ۵ mg AA eq/Kg، ۳۱ و ۱۲۱ به ترتیب برای رشد بهینه یا تراکم های هیدروکسی پرولین پوست، کل بدن و حداکثر ذخیره سازی کبدی، تخمین زده شد (٥٤). بنابراین بر اساس افزایش وزن، فقدان علائم کمبود ویتامین ث و غلظتهای هیدروکسی پرولین بافتی، حداقل ویتامین ث مورد نیاز برای باس دریایی آسیایی و اروپایی در محدوده ۵ mg AA eq/Kg الی ۳۱ قرار میگیرد.

اطلاعات بسیار کمی در مورد نیاز ماهیان پهن به ویتامین ث وجود دارد. همچنانکه قبلا ذکر شد، داده‌های ارائه شده توسط Rosenlund و همکاران (۴۳)، در مورد کفشک ماهیان جوان بالاتر از مقادیری است که اخیرا برای لاروهای توربوت (۴۸) ارائه شده است. شایان ذکر است که ماهی توربوت تنها گونه‌ای است که وخیم ترین حالت کمبود ویتامین ث را نشان می‌دهد که هیپرتیروزینمی بوده و باعث بیماری گرانولوماتوز کلیه می شود. در توربوت‌های دچار کمبود ویتامین ث، با وجود کاهش هیدروکسیلاسیون پرولین در پوست و ستون مهره، هیچ علایم خارجی ناشی از اسکوروی مشاهده نمی شود (۵۵).

تشخیص هیپرتیروزینمی پس از رسوب کریستالهای تیروزین در بافتهای کلیه ممکن می شود و زمانیکه جیره غذایی فاقد اسیدآسکوربیک از نظر سایر ویتامین‌ها نیز در حد ضعیفی باشد، تشدید می‌شود (جدول ٦-٦). برای گونه‌های دریایی مناطق معتدله، تیروزینمی بهترین شاخص بیوشیمیایی برای بررسی کمبود اسیدآسکوربیک است. تغییرات کلیوی در ماهی سیچلید یوری هالین دچار کمبود ویتامین ث، که با *Mycobacterium spp* مواجهه شده بود (٥٦)، و در سوف عظیم الجثه تغذیه شده با جیره غذایی فاقد اسیدآسکوربیک (۵۲)، مشاهده گردید. کمبود ویتامین ث همچنین باعث بروز علائم مشابهی در شانک سرطلایی شد (٤٤). اگرچه علت شناسی گرانولوماتوز مشاهده شده در این سه گونه ممکن است در ارتباط با کمبود ویتامین ث باشد، ولی نیاز به انجام تحقیقات دقیق تر با اندازه‌گیری تیروزینمی احساس می شود.

۳-٦ - آیا شوری بر نیاز ماهیان به اسیدآسکوربیک اثر دارد؟

فهرست تحقیقات مختلف در مورد نیاز ماهیان آب شیرین و دریایی به ویتامین ث نشان می‌دهد که معیارهای پاسخی مانند میزان افزایش وزن، فقدان علائم کمبود، تراکم کلاژن یا هیدروکسی پرولین (C/H)، بسیار مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. مقادیر مطلق در رابطه با معیارهای فوق، به ترتیب در محدوده ٤٥ mg AA eq/Kg - ٥ و ٤٧ mg AA eq/Kg - ٥ در ماهیان آب شیرین و آب شور می‌باشد.

بر اساس مطالب فوق، می‌توان نتیجه گرفت که نیاز ماهیان آب شیرین و شور به اسیدآسکوربیک

بسیار به هم شبیه است که با میزان افزایش وزن مطلوب و رشد طبیعی، این موضوع نشان داده شده است. به علاوه شایان ذکر است که در بسیاری از آزمایشها، پایین ترین میزان اسیدآسکوربیک جیره غذایی، منطبق با حداقل نیاز ماهی بر اساس افزایش رشد، فقدان علائم کمبود و غلظت کلاژن یا هیدروکسی پرولین بوده است.

تعیین مقدار دقیق ویتامین ث مورد نیاز وابسته به فاکتورهایی مانند اندازه ماهی، سن، سرعت رشد، مرحله رسیدگی جنسی، مرحله اسمولتیفیکیشن[1] در آزادماهیان، نوع جیره غذایی، عمل آوری غذا، انبار داری، عوامل استرس زای محیطی، بیماری، دما،کیفیت آب و میزان مواد سمی محیط می باشد. تغییر پذیری در میزان ویتامین ث بر اثر عوامل مختلف، می‌تواند از طریق به کارگیری اشکال پایدار ویتامین ث، کاهش یابد. اختلافات کوچک مشاهده شده در آزمایشها با استفاده از گونه‌های مشابه و اشکال فسفاته اسیدآسکوربیک، احتمالا به دلیل تغییر در پروتکل کلی آزمایش است. در نتیجه، استانداردسازی پروتکل‌های آزمایشی می‌تواند انجام مقایسه ها را تسهیل ببخشد. این حداقل شرایط پیشنهادی عبارتند از: استفاده از ماهیان بسیار ریز (در صورت امکان لارو تازه به تغذیه افتاده تا حداکثر پاسخ رشدی فراهم آید)، استفاده از جیره های غذایی نیمه خالص که بخوبی توسط ماهی گرفته شود، استفاده از مشتقات فسفاته اسیدآسکوربیک به جهت پایداری در محیط آبی و نیز زیست فراهمی این ترکیبات، درجه بندی مکملها از لحاظ میزان ویتامین ث به حداقل ۵ یا ٦ درجه مختلف، و در نهایت استفاده از حداقل معیارهای پاسخی مانند میزان رشد، مصرف غذا، فقدان علائم ناشی از کمبود، غلظت‌های بافتی ویتامین ث (کلیه، کبد) و میزان هیدروکسی پرولین یا کلاژن بافتی (پوست، ستون مهره، ماهیچه و کل بدن).

توجه ویژه‌ای باید به ذخیره ویتامینی مبذول شود و مقادیر بافتی ویتامین ث ممکن است به عنوان شاخص مفیدی از وضعیت تغذیه‌ای ماهی از این ویتامین لحاظ شود. از این رو، این شاخص‌ها می‌توانند به عنوان مکمل بررسی میزان مناسب ویتامین ث جیره غذایی، مطرح باشند. با افزایش غلظت ویتامین‌های محلول در آب به جیره غذایی، انتظار می‌رود که مقدار بافتی ویتامین نیز به مقدار حداکثر یا اشباع برسد و بالاتر از این مقدار، با افزایش بیشتر ویتامین جیره غذایی، دیگر افزایشی

[1] Smoltification

جدول ٦-٦: سطوح تیروزین پلاسما و درصد هیپرتیروزینمی درماهی توربوت تغذیه شده با جیره‌های غذایی واجد یا فاقد مکمل اسیدآسکوربیک (AA) و مکمل مخلوط ویتامینی (VM)

پارامترها	روز	جیره‌های غذایی (۵۵)			
		$AA^+ VM^+$	$AA^+ VM^-$	$AA^- VM^+$	$AA^- VM^-$
تیروزین	۳۸	٦٦ ±۹	٦٨ ± ٤	۸۱ ±۹	٦۹ ± ٥
درصد هیپرتیروزینمی		۰	۰	۰	۰
تیروزین	٦٥	٦٨ ± ۰٥	٦٦ ± ۷	۷۱ ± ٤	٦٥ ± ۸
درصد هیپرتیروزینمی		۰	۰	۰	۰
تیروزین	۹٤	٥٥ ± ۳	٥٥ ± ۲	۲٤۰ ± ۱۳۸	۱۱۷۳ ± ۳۱۱
درصد هیپرتیروزینمی		۰	۰	۷	۳۳
تیروزین	۱۰۸	٤۹ ± ۲	٤٦ ± ۲	٦٥٥ ± ۲۲۸	۱۷۰۷ ± ۳۳٤
درصد هیپرتیروزینمی		۰	۰	۲۳	٥۰
تیروزین	۱٤۲	۷۱ ± ٤	۷٥ ± ۳	۱۱٥۷ ± ۲۹۲	۳٤٦٦± ۳٤۹
درصد هیپرتیروزینمی	۱٥۹	۰	۰	٤۰	۸۰
تیروزین		٦۸ ± ٤	٦۷ ± ٤	۱٦٦٦ ± ٤۷۷	۳۳٤٤ ± ۳٥٥
درصد هیپرتیروزینمی		۰	۰	٤۷	۱۰۰

توجه: میزان تیروزین موجود در پلاسما برحسب میکرومول بر لیترمی‌باشد.

نداریم و در این حالت میزان ویتامین اضافی دفع یا متابولیزه می شود. در مجموع مقادیر مورد نیاز بر اساس ذخیره سازی کلیوی یا کبدی خیلی بیشتر از مقادیر مورد نیاز برای رشد مطلوب و فقدان علائم کمبود است.

میزان نیاز ویتامینی که تحت شرایط کنترل شده آزمایشگاهی بدست می آید معمولا مقادیر مازاد ویتامین را در بر نمی گیرد. اگرچه در عمل، به عنوان حاشیه امنیت و به منظور جبران هدررفتهای ناشی از عمل آوری و انبارداری و همچنین اختلاف در ترکیب و زیست فراهمی مواد غذایی و تفاوت در نیازهای غذایی ناشی از شرایط پرورشی، مقدار ویتامین بیشتری از مقدار مورد نیاز، به جیره غذایی افزوده می شود. نیاز ویتامینی ماهیان، از طریق جیره‌های خالص و با ترکیب مشخص شیمیایی- با قابلیت هضم بالا برای ماهیان - تعیین می شود. این نکته در زمان فرموله کردن جیره غذایی از اجزای غذایی طبیعی که نسبت به جیره‌های آزمایشگاهی زیست فراهمی کمتری دارند، مورد توجه قرار

می‌گیرد (٤). در مورد اسیدآسکوربیک ، توصیه‌های قبلی NRC (۵۰ mg AA/Kg) پنج برابر بیشتر از میزان مورد نیاز آزادماهیان (۱۰ mgAA/Kg) بوده است. یافته‌های اخیر توسط Kaushik و همکاران (۸) و Gouillou-Caustans و همکاران (۱۸) نشان می دهدکه کاهش این مقدار به ۲۵ mgAMP/Kg یا ۵ در جیره‌های عملی، اثر منفی بر رشد و سلامت ماهیان قزل آلای رنگین کمان جوان ندارد. اینکه بتوان این جیره‌های حاوی مقادیر کم ویتامین ث را در مورد ماهیان پرورش یافته در شرایط پراسترس و متراکم استفاده نمود، نیاز به تحقیق وبررسی بیشتر دارد.

٤-٦- نتیجه گیری

همانطور که تصور می شد، بررسی منابع علمی موجود در زمینه نیاز ماهیان به ویتامین ث، تصویری از نیازمندی و همچنین اختلاف زیاد موجود در این مقوله را نشان می‌دهد. بخش عمده ای از این تفاوت‌ها ناشی از استفاده از اشکال غیر پایدار ویتامین ث می باشد. تجزیه و تحلیل دقیق تر نشان می دهد که میزان نیاز ماهیان آب شیرین و دریایی به اسیدآسکوربیک مشابه یکدیگر می باشد که باعث افزایش بهینه وزن و همچنین نمو طبیعی بیان شده است. همانطوری که پیش تر توسط Woodward (۱) عنوان شده بود، اختلاف موجود در زمینه نیاز ویتامینی گونه‌ها، احتمالا به جای پیروی از قانون خاص، دارای استثناء است و اختلافات مشهود در این زمینه، می‌تواند به دلیل نوآوری های متدولوژیک[1] باشد. به نظر می‌رسد که این اصل در مورد نیاز ماهیان به ویتامین ث ثابت شده باشد و بایستی چنین مطالعات مقایسه‌ای برای سایر ویتامین‌های محلول در چربی و آب نیز انجام شود.

[1] Methodological artifact

منابع:

1- Woodward, B., (1994). Dietary vitamin requirement of cultured young fish, with emphasis on quantitative estimates for salmonids, Aquaculture, 124: 133.

2- National Research Council, (1981) Nutrient Requirements of Coldwater Fishes, National Academy Press, Washington, D. C.

3- National Research Council, (1983) Nutrient Requirements of Warmwater Fishes, National Academy Press, Washington, D. C.

4- National Research Council, (1993) Nutrient Requirements of Fishes, National Academy Press, Washington, D. C.

5- National Research Council, (1984) Nutrient Requirements of Poultry, National Academy Press, Washington, D. C.

6- National Research Council, (1988) Nutrient Requirements of swine, National Academy Press, Washington, D. C.

7- Lovell, T., and Wilson, R. P., (1993). Nutrient requirements of fish: revised NRC bulletin, in Fish Nutrition in Practie, INRA, Eds., Paris, 839.

8- Kaushik, S. J., Gouillou-Coustans, M. F., and Cho, C. Y., (1998). Application of the recommendations on vitamin requirements of finfish by NRC (1993) to salmonids and seabass using practical and purified diets, Aquaculture, 161, 463.

9- Gouillou-Coustans, M. F., Falguiere, J. C., Philippe, R., and Kaushik, S. J., (1997).Response of red drum Sciaenops ocellatus to different dietary levels of vitamin premix under tropical culture conditions, in Island Aquaculture and Tropical Aquaculture, Martinique 97, European Aquaculture Society, Ostened, Belgium, March 1997. 145.

10- Cho, C. Y., and Cowey, C. B., (1993). Utilization of monophosphate esters of ascorbic acid by rainbow trout, in Fish Nutrition practice, INRA, Eds, Paris, 149.

11- Grant, B. F., Seib, P. A., Liao, M. L., and Corporn, K. E., (1989). Polyphosphprylated L-ascorbic acid: a stable form of vitamin C for aquaculture feeds. J. World Maricult. Soc., 20: 143.

12- Sandnes, K., (1991). Vitamin C in fish nutrition. A review, Fisk. Dir. Skr. Ser. Ernoering, 4, 3.

13- Dabrowski, K., Matusiwicz, M., and Blom, J. H., (1994). Hydrolysis, absorption and bioavability of ascorbic acid esters in fish, Aquaculture, 124, 169.

14- Halver, J. E., Ashley, L. M., Smith, R. R., (1969). AA requirement of coho salmon and rainbow trout. Trans. Am. Fish Soc. 90: 762-771.

15- Hilton, J. W., Cho, C. Y., Slinger, S. J., (1978). Effect of graded levels of supplemental AA in practical diets fed to rainbow trout (Salmo gairdneri). J. Fish. Res. Board. Can. 35: 431-436.

16- Sato, M., Kondo, T., Yoshinaka, R., and Ikeda, S., Effect of dietary ascorbate on collagen formation in rainbow trout. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 48,5'

17- Anggawati-Satyabudhy A. M., Grant, B. R, and Halver, J. E., Effects of polyphosphates (AsPP) on growth and immunoresistance of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) to infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus Current Status of Fish Nutrition in Aquaculture, Takeda, M. and Watanal Eds., Tokyo University of Fisheries, Tokyo, 1989, 411.

18- Gouillou-Coustans, M. F., Metailler, R., Lebrun, L., Huelvan, C., Desbr Moriceau, J., and Kaushik, S., Dietary ascorbic acid requirement of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fry from first-feeding, presented at the IX International Symposium on Nutrition and Feeding in Fish. Miyazaki to 24,2000.

19- Lall, S. P., Olivier, G., Weerakoon, D. E. M., and Hines, J. A., The effect C deficiency and excess on immune response in Atlantic salmon (Salmo salar) in The Current Status of Fish Nutrition in Aquaculture, Takeda, M. and Watanabe, T., Eds., Tokyo University of Fisheries, Tokyo, 1989, 427.

20- Sandnes, K., Torrissen, O., and Waagbo, R., The minimum dietary requirement of vitamin C in Atlantic salmon (Salmo salar) fry using Ca ascorbate-2-monophosphate as dietary source. Fish Physiol. and Biochem., 10,315,1

21- Andrews, J. W. and Murai, T, Studies of the vitamin C requirements o nel catfish (Ictalurus punctatus), J. Nutr., 105, 557,1975.

22- Lim, C. and Lovell, R. T, Pathology of the vitamin C deficiency syndrome channel catfish (Ictalurus punctatus), J. Nutr., 108,1137,1978.

23- Murai, T, Andrews, J. W., and Bauernfeind, J. C., Use of L-ascorbyl acid coated ascorbic acid and ascorbate 2-sulfate in diets for channel catfish (Ictalurus punctatus), J. Nutr., 108,1761,1978.

24- Durve, V. S. and Lovell, R. T, Vitamin C and disease resistance in chan catfish (Ictalurus punctatus), Can. J. Fish., Aquat. Sci., 39, 948,1982.

25- El Naggar, G. 0. and Lovell, R. T, L-ascorbyl-2-monophosphate has equivalent scorbutic activity as L-ascorbic acid but L-ascorbyl-2-sulfate is inferior ascorbic acid for channel catfish,,. Nutr., 121,1622,1991.

26- Li, M. H., Wise, D. J., and Robinson, E. H., Effect of dietary vitamin C on weight gain, tissue ascorbate concentration, stress response, and disease resistance of channel catfish (Ictalurus punctatus),. World Aquacult. Soc., 29,1,1998.

27- Stickney, R. R., McGeachin, R. B., Lewis, D. H., Marks, J., Riggs, A., Sis, R. E, Robinson, E. H., and Wurts, W., Response of Tilapia aurea to dietary vitamin C, World Mariciilt. Soc., 15,179,1984.

28- Shiau S. Y. and Hsu, T. S., L-ascorbyl-2-sulfate has equal antiascorbutic activity as L-ascorbyl-2-monophosphate for tilapia (Oreochromis niloticus x 0. aureus), Aquaculture, 133,147,1995.

29- Shiau S. Y. and Hsu, T. S., Quantification of vitamin C requirement for juvenile hybrid tilapia, (Oreochromis niloticus X 0. aureus), with L-ascorbyl-2-monophos-phate-Na and L-ascorbyl-2-monophosphate-Mg, Aquaculture, 175, 317,1999.

30- Shiau, S. Y. and Jan, E L., Dietary ascorbic acid requirement of juvenile tilapia (Oreochromis niloticus X 0. aureus), Nippon Suisan Gakkaishi, 58, 671,1992.

31- Soliman, A. K., Jauncey, K., and Roberts, R. J., Water-soluble vitamin requirements of tilapia: ascorbic acid (vitamin C) requirement of Nile tilapia, (Oreochromis niloticus L.), Aquaculture and Fish Management, 25, 269,1994.

32- Mahajan, C. L. and Agrawal, N. K., Nutritional requirement of ascorbic acid by indian major carp, (Cirrhina mrigala), during early growth, Aquaculture, 19,37,1980.

33- Sealey, W. M. and Gatlin III, D. M., Dietary vitamin C requirement of hybrid striped bass Morone chrysops X M. saxatilis, J. World Aquacult. Soc., 30, 297,1999.

34- Chavez de Martinez, M. C., Vitamin C requirement of the Mexican native cichlid (Cichlasoma urophthalmus, Gunther), Aquaculture, 86, 409,1990.

35- Martins, M. L., Effect of ascorbic acid deficiency on the growth, gill filament lesions and behavior of pacu fry (Piaractus mesopotamicus Holmberg, 1887), Braz. J. Med. Biol. Res., 28, 563,1995.

36- Eya, J. C., "Broken-skull disease" in African catfish Glorias gariepinus is related to a dietary deficiency of ascorbic acid, ,. World Aquacult. Soc., 27, 493,1996.

37- Mishra, S. and Mukhopadhyay, R K., Ascorbic acid requirement of catfish fry Glorias batrachus (Linn), Indian J. Fish., 43,157,1996.

38- Gouillou-Coustans, M. E, Bergot, R, and Kaushik, S. J., Dietary ascorbic acid needs of common carp (Cyprinus carpio) larvae, Aquaculture, 161, 453,1998.

39- Dabrowski, K., Hinterleimer, S., Sturmbauer, C., El-Fiky, N., and Wieser, W., Do carp larvae require vitamin C?, Aquaculture, 72, 295,1988.

40- Reddy, H. R. V. and Ramesh, T. J., Dietary essentiality of ascorbic acid for common carp Cyprinus carpio L., Ind. J. Exp. Biol., 34,1144,1996.

41- Moreau, R., Kaushik, S. J., and Dabrowski, K., Ascorbic acid status as affected by dietary treatment in the Siberian sturgeon (Acipenser baeri Brandt): tissue concentration, mobilisation and L-gulonolactone oxidase activity. Fish Physiol. and Biochem., 15, 431,1996.

42- Ishibashi, Y, Ikeda, S., Murata, 0., Nasu, T., and Harada, T., Optimal supplementary ascorbic acid level in the Japanese parrot fish diet, Nippon Suisan Gakkaishi, 58, 267,1992.

43- Rosenlund, G., Jorgensen, L., Waagbo, R., and Sandnes, K., Effects of different dietary levels of ascorbic acid in plaice Pleuronectes platessa L., Comp. Biochem. Physiol., 96, 395,1990.

44- Alexis, M. N., Karanikolas, K. K., and Richards, R. H., Pathological findings owing to the lack of ascorbic acid in cultured gilthead bream (Sparus aurata L.), Aquaculture, 151, 209,1997.

45- Lee, K. J., Kim, K. W., and Bai, S. C., Effects of different dietary levels of L-ascorbic acid on growth and tissue vitamin C concentration in juvenile Korean it) fish, Sebastes schlegeli (Hilgendorf), AquactiH. Res., 29, 237, 1998.

46- Kanazawa, A., Teshima, S., Koshio, S., Higashi, M., and Itoh, S., Effect of L-ascorbyl-2-phosphate-Mg on the yellowtail Seriola quinqueradiata as a vitamin C ' source, Nippon Snisan Gakkaishi, 58, 337,1992.

47- Teshima, S. I., Kanazawa, A., Koshio, S., and Itoh, S., L-ascorbyl-2-phosphatl as vitamin C source for the Japanese flounder (Paralichthys olivaceus), in fish Nutrition in Practice, INRA, Eds., Paris, 1993,157.

48- Merchie, G., Lavens, P., Storch, V., Ubel, U., Nelis, H., Deleenheer, A., and Sorgeloos, P., Influence of dietary vitamin C dosage on turbot (Scophthalmw maximus) and European seabass (Dicentrarchus labrax) nursery stages, Comp, Biochem. Physiol., 114,123,1996.

49- Aguirre P. and Gatlin III, D., M., Dietary vitamin C requirement of red drum Sciaenops ocetlatns, Aquaculture Nutr., 5, 247,1999.

50- Boonyaratpalin, M., Unprasert, N., and Buranapanidgit, J., Optimal supplementary vitamin C level in seabass fingerling diet, in The Current Status offish Nutrition in Aquacidture, Takeda, M. and Watanabe, T., Eds., Tokyo Univers: Fisheries, Tokyo, 1989,149.

51- Boonyaratpalin, M., Boonyaratpalin, S., and Supamataya, K., Ascorbyl-phosphate-Mg as a dietary vitamin C source for seabass (Lates calcarifer), presented in the third Asian Fisheries Forum, Singapore, October 26 to 30,1992.

52- Phromkunthong, W., Boonyaratpalin, M., and Storch, V., Different concenti tions of ascorbyl-2-monophosphate-magnesium as dietary sources of vitamin for seabass, Lates calcarifer, Aquaculture, 151, 225,1997.

53- Saroglia, M. arid Scarano, G., Experimental induction of ascorbic acid deficiency in seabass in intensive aquaculture. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 12, 96,1992.

54- Fournier, V., Gouillou-Coustans, M. F., and Kaushik, S. J., Hepatic ascorbic saturation is the most stringent response criterion for determining the vita] requirement of juvenile European sea bass (Dicentrarchus labrax), J. Niitr., 1, 617,2000.

55- Coustans, M. F., Guillaume, J., Metailler, R., Dugornay, 0., and Messager, J, Effect of an ascorbic acid deficiency on tyrosinemia and renal granulomatc disease in turbot (Scophthalmus maximus). Interaction with a slight polyhypovitaminosis, Comp. Biochem. Physiol., 97,145, 1990.

56- Chavez de Martinez, M. C. and Richards, R. H., Histopathology of vitamin deficiency in cichlid, Cichlasoma urophthalmus (Gunther),. Fish Dis., 14, 50; 1991.

«فصل ۷»

نیاز صخره ماهی کره‌ای *Sebastes schlegeli* به ویتامین «ث»

Sungchul Charles Bai

چکیده

در این فصل از کتاب، مروری بر سه آزمایشی داریم که در مورد یک گونه زنده زای دریایی، صخره ماهی کره‌ای *Sebastes schlegeli*، انجام داده ایم(شکل ۷-۱). نخستین آزمایش برای ایجاد یک مدل آزمایشی و نیز یک جیره غذایی نیمه خالص به منظور بررسی نیاز این گونه به اسیدآسکوربیک انجام شد. در آزمایش دوم، اثرات مقادیر مختلف اسیدآسکوربیک جیره غذایی بر رشد و غلظت‌های بافتی آن مورد بررسی قرار گرفت و در سومین آزمایش، غلظت‌های اسیدآسکوربیک در بافت صخره ماهی کره‌ای وحشی و پرورشی مورد آزمایش قرار گرفت که به ترتیب ۷/۸ ± ۴۰۰ g و ٦/۸ ± ۵۱ g بود.

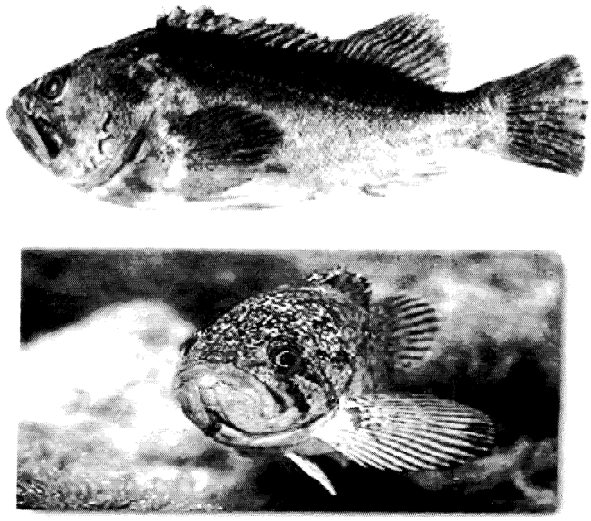
نتایج به دست آمده از آزمایش اول، بیان می داردکه مدل آزمایشی و جیره غذایی نیمه خاص، می‌تواند برای مطالعه نیاز به ویتامین ث مفید باشد و نیز نشان می‌دهد که نیاز به اسیدآسکوربیک در جیره غذایی بیشتر از ۳۹/۷ mg AA/Kg است، ولی برای رسیدن به حداکثر رشد بچه ماهیان صخره ماهی کره ای، ۱٤٤/٦ mg AA/Kg جیره غذایی لازم است. در آزمایش دوم، ماهیان به شش گروه تقسیم

شده و هر یک از آنها، یکی از شش جیره نیمه خالص را به مدت ۱۶ هفته دریافت کردند. ماهیانی که با جیره غذایی فاقد ویتامین ث تغذیه شده بودند، عوارض کمبود ویتامین ث مانند اسکولیوزیس، کوتاه شدن سرپوش آبششی، بیرون زدگی چشم و خونریزی باله را پس از ۱۲ هفته نشان دادند. مدل آنالیزی خط شکسته به منظور بررسی افزایش وزن، نرخ رشد ویژه، ضریب تبدیل پروتئین و بازده غذایی نشان داد که مقادیر بهینه ویتامین ث به ترتیب برای مقادیر فوق، ۱۰۲/۲، ۱۰۲/۱، ۱۰۵/۵ و ۱۰۰/۳ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی می باشد. این نتایج نشان می دهد که میزان mg AA/Kg ۱۰۲/۵ جیره غذایی برای دستیابی به حداکثر رشد صخره ماهیان جوان لازم است. غلظت‌های کبدی و مغزی اسیدآسکوربیک در صخره ماهیان نابالغ وحشی، به میزان معنی داری بیشتر از ماهیان جوان در حال رشد وحشی و پرورشی است. اگرچه، این غلظت‌ها با ماهیان پرورشی بزرگ نابالغ اختلافی ندارد. همچنین متوسط غلظت‌های کبدی و مغزی ماهیان در حال رشد وحشی به میزان معنی داری بیشتر از ماهیان جوان در حال رشد پرورشی است در صورتی که بین غلظت‌های اسیدآسکوربیک ماهیچه و آبشش ماهیان وحشی و پرورشی، اختلافی وجود ندارد.

۱-۷- مقدمه

بسیاری از عملکردهای فیزیولوژیک L– اسیدآسکوربیک بخوبی بیان شده‌اند. در این میان، نقش اسیدآسکوربیک به عنوان یک کوفاکتور در هیدروکسیلاسیون پرولین به هیدروکسی پرولین که عامل مهمی در شکل گیری کلاژن است، بسیار مهم تلقی می‌شود. همچنین این ویتامین یک عامل احیاء کننده قوی برای سلول به شمار می‌رود که با از دست دادن دو اتم هیدروژن به ماده‌ای به نام اسید دهیدروآسکوربیک (DHA) تبدیل می‌شود و یکی از خواص مهم خود که همان پتانسیل آنتی اکسیدانی است را نشان می‌دهد. تمام گونه های جانوری نیازمند اسیدآسکوربیک می باشند ولی اهمیت حضور این ویتامین در جیره غذایی برای برخی از مهره داران کمرنگ تر است، زیرا برخی از مهره داران قادر به بیوسنتز این ویتامین از قندهای هگزوز می‌باشند (۱). با این وجود گمان می‌رود که ضرورت وجود اسیدآسکوربیک در جیره غذایی به دلیل فقدان آنزیم L- گولونولاکتون اکسیداز باشد که تبدیل L- گولونولاکتون را به اسیدآسکوربیک در برخی از ماهیان مانند گربه ماهی روگاهی *Ictalurus punctatus* ، قزل آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss*، قزل آلای جویباری

Salvelinus funtinalis، تیلاپیای آبی *Tilapia aurea*، مارماهی ژاپنی *Anguilla japonica*، آزادماهی کوهو(ماهی آزاد نقره ای) *Oncorhynchus kisutcha*، دم زرد *Seriola quinqueradiata* و همچنین میگوهای *Penaeus sp*، بر عهده دارد (۲ تا ۱۵). نیاز به ویتامین ث در گونه های مختلف ماهیان و حتی در داخل یک گونه که در شرایط مختلف پرورشی، رشد کرده‌اند، متفاوت است (۱٦). سطوح توصیه شده ویتامین ث در جیره غذایی برخی ماهیان که تحت شرایط کنترل شده پرورش داده شده اند، به قرار زیر می‌باشد: ۵۰ mg AA/Kg برای خانواده آزادماهیان (۱٤، ۱۷)، ٤۰ -۱۰۰ mg AA/Kg برای قزل آلای رنگین کمان (۱٤، ۱۸)، ۱۱ – ٦۰ mg AA/Kg برای گربه ماهی روگاهی (۱۹ - ۲۱)، ۵۰ mg AA/Kg برای تیلاپیای آبی (۱۰) و ۱۲۲ mg AA/Kg برای دم زرد (۱٤).



شکل ۱-۷: صخره ماهی کره‌ای *Sebastes schlegeli*

صخره ماهی کره‌ای، *Sebastes schlegeli*، یکی از گونه های مهم تجاری کشور کره است که ویژگی های مناسبی برای آبزی پروری دارد. از ویژگی های مثبت این گونه می توان به مقاومت بالا در برابر تغییرات درجه حرارت، تولید و دسترسی آسان به بچه ماهیان آن به دلیل زنده زایی و توانایی تحمل تراکم بالا اشاره کرد. پرورش تجاری این ماهی بسرعت از سال ۱۹۸۷ توسعه یافته است و پس از کفشک ماهی ژاپنی *Paralichthys olivaceus*، عمده ترین ماهی پرورشی کره است. اخیرا در آزمایشگاه ما، مجموعه‌ای از آزمایشها جهت توسعه مدل های آزمایشگاهی به منظور مطالعه نیاز این ماهی به ویتامین ث و بررسی اثرات کوتاه مدت و بلند مدت جیره غذایی بر رشد و غلظت بافتی این ویتامین، انجام گرفته است (۲۲ – ۲٤). بنابراین، این فصل از کتاب مروری بر آزمایشهای ما در زمینه بررسی نیاز یک ماهی استخوانی زنده زا و دریایی، بنام صخره ماهی کره‌ای، به ویتامین ث خواهد بود.

۲-۷- مواد و روش ها

۱-۲-۷- جیره های آزمایشی

ترکیب جیره های غذایی نیمه خالص به کار رفته در آزمایش اول و دوم در جدول ۱-۷ ارائه شده است. شش جیره غذایی با مقادیر صفر، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۵۰ یا ۱۵۰۰ میلی‌گرم اسیدآسکوربیک به ازای هرکیلوگرم جیره (C_0، C_{25}، C_{50}، C_{75}، C_{150}، یا C_{1500}) از طریق اضافه کردن مقادیر مناسبی از اسیدآسکوربیک به یک پیش مخلوط (۱۰ mg AA/g سلولز) تهیه شد. جیره های آزمایشی دارای ٤۸ درصد پروتئین خام[1] و ۱۸ kj انرژی قابل دسترس(فراهم) بودند. محاسبه انرژی برآوردی جیره های آزمایشی به نحوی تنظیم شد که ۱۸ kj به ازای هر گرم از جیره غذایی، انرژی قابل دسترس وجود داشته باشد (۱٦/۷ kj، ۱٦/۷ kj و ۳۷/۷ kj به ترتیب برای پروتئین، کربوهیدرات و چربی) (۲۵، ۲٦). پودر ماهی (۱۰ درصد) جهت بهبود طعم غذا برای صخره ماهی کره‌ای، به جیره غذایی افزوده شد، زیرا ما قبلا مشاهده کرده بودیم که کاربرد جیره‌های غذایی خالص با پایه ژلاتین-کازئین و فقیر از لحاظ پودر ماهی (۵ درصد)، توسط صخره ماهیان خورده نمی شود (اطلاعات چاپ نشده). پودر ماهی استفاده شده در این تحقیق سه بار به وسیله ترکیب کلرفورم/ متانول (۱:۲ v/v) و به مدت

[1] Crude protein

یک روز تخلیص شد و سپس در معرض هوا، خشک گردید (۲٤). تعیین غلظت‌های ویتامین ث در جیره های غذایی در شروع و در پایان آزمایش، با کمک روش Thenen (۲۷) انجام گرفت که توسط Bai و Gatlin (۲۸) عنوان شده است. بر اساس آنالیزها، مقدار متوسط ویتامین ث بین شروع و پایان آزمایش اول و دوم در جدول ۲-۷ ارائه شده است. همچنین طی ذخیره سازی جیره غذایی در ۳۵ - درجه سانتی گراد برای مدتی بیش از چهار ماه، کاهش کمتر از ۲۰ درصد فعالیت اسیدآسکوربیک مشاهده شد.

۲-۲-۷ - ماهیان مورد آزمایش و آزمایشهای غذادهی

آزمایش I

قبل از شروع آزمایش غذادهی، ماهیان با جیره غذایی C_0 به عنوان جیره غذایی پایه برای مدت ٤ هفته تغذیه شدند تا به جیره های غذایی نیمه خالص سازش یابند و همچنین ذخایر ویتامینی بدن آنها تخلیه شود. آزمایش های غذادهی در آکواریوم های ٦۰ لیتری انجام گرفت که آب فیلتر شده را به میزان یک لیتر در دقیقه دریافت می‌کردند. هوادهی نیز به منظور حفظ اکسیژن در حد اشباع انجام می‌گرفت. درجه حرارت آب در ابتدای آزمایش g ۰/۵ ± ۱۵ درجه سانتی گراد و در پایان آزمایش ۰/۵ ± ۱۷ درجه سانتی گراد، بود. ماهیان آزمایشی، با میانگین وزنی g ۱۲/٦ در گروه‌های ۲۵ تایی به صورت تصادفی در آکواریوم‌ها قرار داده شدند (میانگین زی توده اولیه ۰/۵۸ ± ۳۱٦/۳، میانگین± انحراف معیار از میانگین). عمل غذادهی دو بار در روز در ساعات ۹ صبح و ۱٦ بعد از ظهر به مدت ۸ هفته در سه تکرار و به صورت سیری کامل[1] انجام گرفت (تقریبا ۲ درصد وزن بدن در هر روز).

[1] Satiation

جدول ۱-۷: ترکیب جیره غذایی پایه (برحسب مواد خشک)

اجزای غذایی	درصد
کازئین فاقد ویتامین[۱]	۳۰
ژلاتین[۱]	۱۰
پودر ماهی سفید (بدون چربی)[۲]	۱۰
دکسترین[۱]	۲۷
L- آرژنین[۳]	۰/۵
L- لیزین . HCl [۲]	۰/۵
DL- متیونین[۲]	۰/۵
روغن ماهی پولاک	۵/۰
روغن ذرت[٤]	۵/۰
کربوکسی متیل سلولز	۲/۰
آلفا سلولز	۲/۵
مخلوط ویتامینی (فاقد ویتامین ث)[٥]	۳/۰
مخلوط مواد معدنی[٦]	٤/۰

[1] United state Biochemical, Cleveland, OH 44122
[2] Kum Sung Feed Co., Pusan, Korea
[3] Yunsei Chemical Co, Japan
[٤] روغن ذرت٪٤/٩ + DHA, EPA 0.1% (25% DHA+ EPA)
[٥] شامل (برحسب گرم در ۱۰۰ گرم مخلوط):
DL – پنتوتنات کلسیم، ۰/۵ ; بیتارترات کولین، ۱۰; اینوزیتول، ۰/۵ ; منادیون، ۰/۰۲ ; نیاسین، ۰/۵ ; پیریدوکسین HCl ، ۰/۰۵ ; ریبوفلاوین، ۰/۱ ; مونونیترات تیامین، ۰/۰۵; DL – آلفا توکوفرول، ۰/۲ ; استات رتینال، ۰/۰۲ ; بیوتین، ۰/۰۰۵; اسید فولیک، ۰/۰۱۸ ; B_{12} ، ۰/۰۰۰۲; کلیکلسیفرول، ۰/۰۰۸ ; آلفا سلولز، ۸۷/۰٦ .
[٦] مخلوط H-440 شماره ۵ (مواد معدنی) (NRC, 1973).

جدول۲-۷ : درصدآنالیز تقریبی و غلظت L- اسیدآسکوربیک (میکروگرم بر کیلوگرم جیره غذایی) در جیره‌های آزمایشی (برحسب مواد خشک)[۱،۲]

	جیره های غذایی					
	C_0	C_{25}	C_{50}	C_{75}	C_{150}	C_{1500}
درصد رطوبت	۳۰/۱	۲۹/٤	۳۰/۰	۳۲/۲	۳۲/۷	۳۰/۹
درصد پروتئین خام	٤۹/٤	۵۰/۹	۵۱/٤	۵۰/۹	۵۰/۰	٤۹/۷
درصد چربی خام	۹/۲	۸/٦	۷/۸	۹/۲	۱۰/۲	۹/٦
درصد خاکستر	۷/۲	٦/۳	۵/۷	۸/۲	۷/٦	٦/۹
اسیدآسکوربیک (آزمایش اول) [۳]	۳۹/۷	٦٤/۵	۸۸/٤	۹۸/۷	۱٤٤/٦	۱۵٤۲/۱
اسیدآسکوربیک (آزمایش دوم)[۳]	۱۷/۱	۳۹/۱	٦۹/۲	۹۱/۹	۱٤٤/۰	۱۳۹۵/۰

[۱] **اعداد ارائه شده میانگین دو تکرارند**

[۲] **شاخص های C_0، C_{25}، C_{50}، C_{75}، C_{150}، C_{1500} نشانگر مقادیر صفر، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۵۰ و ۱۵۰۰ میلی گرم اسیدآسکوربیک در کیلوگرم جیره غذایی هستند**

[۳] **اعداد میانگین غلظت اسید آسکوربیک بین ابتدا و انتهای آزمایش اند.**

آزمایش II

قبل از شروع آزمایش دوم، ماهیان برای مدت یک هفته با جیره غذایی پایه تغذیه شدند تا به جیره نیمه خالص سازش یابند و بدن آنها از ویتامین ث تخلیه گردد. آزمایشهای تغذیه در آکواریوم های ٦۰ لیتری انجام گرفت که آب دریای فیلتر شده با سرعت یک لیتر در دقیقه در آن جریان داشت. هوادهی نیز به منظور بالا نگه داشتن اکسیژن در حد اشباع انجام می‌گرفت. دمای آب از ۰/۵ ± ۱۸ درجه سانتی گراد در شروع آزمایش تا ۰/۲ ± ۱۳ درجه سانتی گراد در پایان آزمایش در نوسان بود. ماهیان آزمایشی با متوسط وزن ۷ گرم در گروه های ۲۵ تایی به طور تصادفی در آکواریومها قرار داده شدند (میزان زی توده اولیه ۰/٤۱ ± ۱۷۸). جیره غذایی در سه تکرار تا حد سیری کامل به ماهیان خورانده شد (تقریبا ۳ درصد وزن بدن در شروع آزمایش و ۱/۵ درصد وزن بدن در پایان آزمایش). ماهیان دو بار در روز در ساعات ۹ صبح و ۱٦ بعد از ظهر طی ۸ هفته اول و بعد از هفته هشتم تا پایان هفته شانزدهم، فقط یکبار در روز و در ساعت ۱٦ بعد از ظهر تغذیه می شدند.

بچه ماهیان صخره ماهی کره‌ای، در مرکز تفریخگاه Wando تولید شده بودند (ایستگاه تحقیقاتی مرکز توسعه و تحقیقات ملی شیلات). وزن کل ماهیان موجود در آکواریومها هر ٤ هفته یکبار، پس از

بیهوش نمودن ماهیان در محلول ۱۰۰ mg/L از ماده MS_{222} اندازه گیری می‌شد و میزان غذادهی با توجه به آن تغییر می یافت. هر دو هفته یکبار به منظور جلوگیری از رشد جلبک‌ها و قارچ‌ها در داخل آکواریوم‌ها، برس کشی و سیفون کردن انجام می شد چرا که خود این عوامل منبعی برای ویتامین ث هستند.

آزمایش III

ماهیان وحشی و پرورشی توسط مزرعه Yongchang در Tong Yong کره، تهیه شد. دو گروه از ماهیان با اندازه های مختلف با میانگین وزنی ۷/۸۲ ±۴۰۰ گرم (ماهیان بزرگ غیر بالغ) و ٦/٨ ± ٥١ گرم (جوان و درحال رشد) از ماهیان وحشی و پرورشی به ترتیب انتخاب شدند.

۳-۲-۷ - جمع آوری نمونه‌ها و تجزیه و تحلیل

در پایان نخستین آزمایش غذادهی، تمام ماهیان به منظور محاسبه میزان افزایش وزن (WG)، بازده جیره غذایی[1] (FE)، ضریب چاقی[2] (CF) و زنده مانی، شمارش و توزین شدند. در آزمایش ١٦ هفته‌ای دوم، افزایش وزن، بازده جیره غذایی، نرخ رشد ویژه[3] (SGR)، ضریب تبدیل پروتئین (نسبت بازده پروتئین)[4] (PER)، شاخص (ارزش) تولیدی پروتئین[5] (PPV)، شاخص کبدی[6] (HSI)، ضریب چاقی و زنده مانی، محاسبه گردید. عمل خونگیری از محل ساقه دمی انجام گرفت. هماتوکریت (PCV) برای سه ماهی از هر آکواریوم با استفاده از روش میکروهماتوکریت (۲۹) و هموگلوبین (Hb) برای همان ماهیان با روش سیان مت هموگلوبین[7] با استفاده از محلول Drabkin تعیین شد (برای تهیه استاندارد هموگلوبین[8] از خون انسان استفاده شد). غلظت های بافتی ویتامین ث کبد، ماهیچه، آبشش و مغز ماهیان در سه تکرار اندازه گیری شدند. هر نمونه از پنج ماهی انتخاب

[1] Feed efficiency
[2] Condition factor
[3] Specific growth rate
[4] Protein efficiency ratio
[5] Protein productive value
[6] Hepatosomatic index
[7] Cyan methemoglobin
[8] Sigma chemical, St. Louis, MO

شده به طور تصادفی از هر آکواریوم، بدست آمد. ویتامین ث با استفاده از روش اسپکتروفتومتری دی نیتروفنیل هیدرازین (DNPH) (۳۰، ۳۱) Bai و Gatlin (۲۸) تعیین شد. پروتئین خام، رطوبت و خاکستر کل بدن بر اساس روش AOAC (۳۲) اندازه گیری شد. میزان چربی خام با دستگاه Soxtec 1046 [1]پس از خشک کردن نمونه‌ها با انجماد[2] برای مدت ۱۲ ساعت، اندازه گیری گردید. تمام داده‌ها با استفاده از روش ANOVA با کمک نرم افزار Statistix 3.1 [3]تجزیه و تحلیل شد. با مشاهده یک اثر تیماری معنی دار، تست LSD برای مقایسه میانگین‌ها استفاده می شد. بررسی تیمارهای آزمایشی به منظور تعیین میزان اختلاف، در سطح $P<0.05$ انجام گرفت.

۳-۷- نتایج

آزمایش I

نتایج در جدول ۳-۷ ارائه شده است. میزان افزایش وزن و بازده جیره غذایی در ماهیان تغذیه شده با جیره C_0 که فاقد ویتامین ث بود، به میزان معنی داری پایین تر از ماهیانی بود که با جیره های C_{150} و C_{1500} تغذیه شده بودند ($P<0.05$)، در حالی که ماهیانی که با جیره های C_{25} تا C_{75} تغذیه شده بودند، اختلاف معنی داری را با گروه‌های تغذیه شده با جیره های C_0، C_{150} یا C_{1500} نشان ندادند ($P>0.05$). میانگین هماتوکریت (PCV) در ماهیان تغذیه شده با جیره C_0 به میزان معنی داری پایین تر از ماهیانی بود که با سایر جیره‌ها تغذیه شده بودند ($P<0.05$). اختلاف معنی‌داری در میزان زنده مانی، هموگلوبین، ضریب چاقی، پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت کل بدن در بین ماهیان تغذیه شده با شش جیره غذایی متفاوت از لحاظ میزان ویتامین ث مشاهده نشد ($P>0.05$).

[1] Tecator AB, Sweden
[2] Freeze drying
[3] St. Paul, MN

جدول ۳-۷ : درصد افزایش وزن (WG)، بازده جیره غذایی(FE)، هماتوکریت (PCV)، هموگلوبین (Hb) و ضریب چاقی (CF) صخره ماهی کره‌ای (*Sebastes schlegeli*) تغذیه شده با جیره های غذایی آزمایشی برای مدت هشت هفته (آزمایش I)[1]

	جیره های غذایی						
	C_0	C_{25}	C_{50}	C_{75}	C_{150}	C_{1500}	SEM ادغام شده
افزایش وزن (WG٪)[2]	۷۳/۳^{b}	۸۲/٦^{ab}	۸۱/۸^{ab}	۷۷/٥^{ab}	۸٤/٤^{a}	۸۷/۱^{a}	۱/٦۷
کارایی جیره غذایی (FE٪)[3]	۲۹/٥^{c}	٥٥/٥^{b}	٥۹/۱^{ab}	٦۱/۹^{ab}	٦٥/۰^{a}	۷۳/۸^{a}	۳/٤۰
هماتوکریت (PCV٪)	۳٤/۷^{b}	٤۱/۳^{a}	٤۲/۰^{a}	٤۱/٤^{a}	٤۱/۳^{a}	٤۲/۳^{a}	۰/۳٥
هموگلوبین (Hg g/dl)	۸/۰۰	۸/۳٤	۸/۰۱	۸/۰۸	۸/۲۸	۸/۲۳	۰/۰۹
ضریب چاقی (CF)[4]	۱/۷۹	۱/۸٤	۱/۸۰	۱/۸۰	۱/۸۱	۱/۸۱	۰/۰۱

[1] اعداد میانگین سه تکرار از ماهیان هستند، و میانگین های با حروف مختلف در هر ردیف، دارای اختلاف معنی دار هستند

[2] WG = (وزن نهایی – وزن اولیه) / وزن اولیه × 100

[3] FE = (افزایش وزن / مصرف غذا) × 100

[4] CF= (وزن تر / طول کل) × 100

غلظت های L- اسیدآسکوربیک ماهیچه‌ای (جدول ۷-٤) ماهیانی که با جیره C_0 تغذیه شده بودند، کمتر از ماهیانی بود که با جیره های C_{150} و C_{1500} تغذیه شده بودند ($P<0.05$)، در حالی که بین ماهیان تغذیه شده با جیره‌های C_0 الی C_{75} اختلاف معنی دار مشاهده نشد ($P>0.05$). غلظت‌های کبدی، آبشش و مغزی اسیدآسکوربیک (جدول ۷-٤)، ماهیان تغذیه شده با جیره C_{1500} به میزان معنی داری نسبت به ماهیان تغذیه شده با جیره های C_0 الی C_{150} بالاتر بود ($P<0.05$). در حالی که این غلظت‌ها بین ماهیان تغذیه شده با جیره های C_0 الی C_{150} اختلاف معنی داری نداشت ($P>0.05$).

جدول٤-٧ : غلظت اسیدآسکوربیک (µg/g) در چهار بافت مختلف صخره ماهی کره‌ای تغذیه شده با جیره های غذایی آزمایشی به مدت هشت هفته[1]

	جیره های غذایی						
	C_0	C_{25}	C_{50}	C_{75}	C_{150}	C_{1500}	SEM ادغام شده
کبد	٣٢/٦^{b}	٤١/٢^{b}	٤٦/٧^{b}	٥٨/٢^{b}	٧٦/١^{b}	١٧٩/٧^{a}	١٣/٢
ماهیچه	٤/٨٤^{c}	١٠/٧^{bc}	١٠/٤^{b}	١٢/٤^{bc}	١٣/٧^{b}	٦٣/٢^{a}	٥/٤٦
آبشش	٢١/٦^{b}	١٨/٦^{b}	٢٤/٠^{b}	٢٤/٠^{b}	٣٩/٨^{b}	١٣٩/٥^{a}	٨/٧٨
مغز	١٨١/٨^{b}	٢٣٣/٠^{b}	٢٠٣/٩^{b}	٢٢١/٥^{b}	٢٤٤/٥^{b}	٣٩٤/٦^{a}	٩/٢٢

[1] اعداد، میانگین سه تکرار از ماهیان هستند، و میانگین های با حروف مختلف در هر ردیف، دارای اختلاف معنی دار هستند
۲ اشتباه معیار از میانگین

آزمایش II

نتایج مربوط به رشد در جدول ٥-٧ بطور خلاصه بیان شده است. میزان افزایش وزن، نرخ رشد ویژه، ضریب تبدیل پروتئین، شاخص (ارزش) تولیدی پروتئین، و ضریب چاقی در ماهیان تغذیه شده با جیره C_0 به میزان معنی داری نسبت به ماهیان تغذیه شده با جیره های C_{25} الیC_{1500} پایین تر بود ($P<0.05$)، این در حالی بود که این شاخص‌ها در ماهیان تغذیه شده با جیره های C_{25} الی C_{75}، نسبت به ماهیان تغذیه شده با جیره C_{1500}، پایین تر بود ($P<0.05$). سایر پارامترهای مربوط به رشد نیز این حالت را نشان دادند. همچنین شاخص های افزایش وزن، نرخ رشد ویژه، بازده جیره غذایی، ضریب تبدیل پروتئین، شاخص تولیدی پروتئین و شاخص کبدی در ماهیان تغذیه شده با جیره C_{150} نسبت به ماهیان تغذیه شده با جیره C_{1500} اختلاف معنی داری نداشت ($P>0.05$). شاخص کبدی در ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی C_0 پایین تر از ماهیانی بود که با جیره‌های C_{50} الی C_{1500} تغذیه شده بودند ($P<0.05$). همچنین ماهیان گروه C_0 دامنه‌ای از علائم کمبود ویتامین ث را از پس از ۱۲ هفته از خود نشان دادند که شامل اسکولیوزیس، کوتاه شدگی سرپوش آبششی، بیرون زدگی چشم و خونریزی باله‌ها بود. میزان زنده مانی ماهیانی که با جیره C_0 تغذیه شده بودند کمتر از ماهیان تغذیه شده با سایر گروه‌های غذایی بود ($P<0.05$).

در پایان آزمایش، ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی C_0 بدشکلی نخاعی (۱/۰۸ ± ۵/۳ درصد)،

کوتاه‌شدگی سرپوش آبششی، بیرون زدگی چشم و خونریزی باله‌ها را نشان دادند که در هفته چهاردهم مشاهده شد. اختلاف معنی داری از لحاظ هماتوکریت، هموگلوبین، پروتئین، چربی و رطوبت کل بدن در بین تیمارها مشاهده نشد ($P>0.05$). اگرچه مقدار خاکستر ماهیانی که با جیره های غذایی C_0 و C_{25} تغذیه شده بودند، بیشتر از ماهیانی بود که از سایر جیره‌های غذایی تغذیه کرده بودند ($P<0.05$). این مقادیر بالای خاکستر در این دسته از ماهیان به دلیل پایین تر بودن ضریب چاقی در آنها بود. غلظت‌های ویتامین ث ماهیچه‌ای و کبدی (جدول۷-٦) ماهیانی که با جیره غذایی C_0 تغذیه شده بودند کمتر از ماهیانی بود که با جیره غذایی C_{150} و C_{1500} تغذیه شده بودند ($P<0.05$). اختلاف معنی داری در ماهیان تغذیه شده با جیره های غذایی C_0 الی C_{75}، وجود نداشت ($P>0.05$). غلظت‌های اسیدآسکوربیک آبششی ماهیانی که با جیره غذایی C_{1500} تغذیه شده بودند، بالاتر از ماهیانی بود که با جیره‌های غذایی C_0 الی C_{150} تغذیه شده بودند ($P<0.05$). غلظت های اسید آسکوربیک مغز در ماهیانی که با جیره های غذایی C_0 الی C_{75} تغذیه شده بودند، پایین تر از ماهیانی بود که با جیره های غذایی C_{150} و C_{1500} تغذیه شده بودند ($P<0.05$).

جدول۵-۷ : درصد افزایش وزن (WG)، بازده جیره غذایی (FE)، نرخ رشد ویژه (SGR)، ضریب تبدیل پروتئین (PER)، شاخص تولیدی پروتئین (PPV)، شاخص کبدی (HSI)، ضریب چاقی (CF)، هماتوکریت (PCV)، هموگلوبین (Hb)، و نرخ زنده مانی (SR) در صخره ماهی کره‌ای تغذیه شده با جیره های غذایی آزمایشی برای ۱۶ هفته [1]

	جیره های غذایی						
	C_0	C_{25}	C_{50}	C_{75}	C_{150}	C_{1500}	SEM^2 ادغام شده
درصد افزایش وزن3	٦١^{d}	١٤٤ ^{c}	١٥١^{bc}	١٥٩^{bc}	١٧٧ ^{ab}	١٩١^{a}	١٠/٣
درصد بازده جیره غذایی4	٢٩/٥^{c}	٥٥/٥^{b}	٥٩/١^{b}	٦١/٩^{b}	٦٥/٠^{ab}	٧٣/٨^{a}	٣/٤٠
درصد نرخ رشد ویژه5	٠/٤٤^{d}	٠/٨٥ ^{c}	٠/٨٩^{bc}	٠/٩٠^{bc}	٠/٩٩ ^{ab}	١/٨^{a}	٠/٠٥
ضریب تبدیل پروتئین6	٠/٥٠^{c}	١/١٠ ^{b}	١/١٨^{b}	١/٢٢^{b}	١/٣١^{ab}	١/٥١^{a}	٠/٠٨
درصد شاخص تولیدی پروتئین7	٨/٨^{c}	١٢/٣^{b}	١٩/١^{b}	١٩/٦^{b}	٢١/٢^{ab}	٢٤/٩^{a}	١/٢٣
شاخص کبدی8	٢/٧٣^{c}	٣/١٤^{bc}	٣/٦٥^{ab}	٣/٨٨^{ab}	٤/٤^{a}	٤/٣٣^{a}	٠/١٥
ضریب چاقی9	١/٣٢^{c}	١/٤٣^{b}	١/٥٢^{b}	١/٤٧^{b}	١/٤٨^{b}	١/٦١^{a}	٠/٠٢
درصد هماتوکریت	٣٣/٥	٣٧/٣	٣٧/٣	٣٦/٧	٣٥/٥	٣٨/٧	٠/٧٤
هموگلوبین(g/dl)	٩/٣	٨/٩١	٩/٧١	٩/٧١	٩/٤٥	١٠/٩	٠/٢٨
درصد نرخ زنده مانی(SR)	٨٩^{b}	٩٦^{a}	٩٦^{a}	١٠٠^{a}	١٠٠^{a}	١٠٠^{a}	١/١١

[1] اعداد، میانگین سه تکرار از ماهیان هستند، و میانگین های با حروف مختلف در هر ردیف، دارای اختلاف معنی دار هستند

[2] انحراف معیار ادغام شده

[3] WG = (وزن اولیه – وزن نهایی) / وزن اولیه × 100

[4] FE = (افزایش وزن / مصرف غذا) × 100

[5] SGR = (لگاریتم طبیعی وزن اولیه– لگاریتم طبیعی وزن نهایی) / روز

[6] PER= افزایش وزن/مصرف پروتئین

[7] PPV = (جذب پروتئین در بدن / ذخیره پروتئین غذا) × 100

[8] HSI = (وزن کبد/وزن بدن) × 100

[9] CF= (وزن تر / طول کل) × 100

جدول٦-۷ : غلظت اسیدآسکوربیک (µg/g) در چهار بافت مختلف صخره ماهی کره‌ای تغذیه شده با جیره های غذایی آزمایشی برای مدت ١٦ هفته (آزمایش II)[1]

	جیره های غذایی						
	C_0	C_{25}	C_{50}	C_{75}	C_{150}	C_{1500}	SEM ادغام شده
کبد	۲۸/۳^{c}	۳۳/۹^{bc}	۳۵/۳^{b}	۳۵/۷^{bc}	۵۵/۸^{b}	۱۸۰^{a}	۱۳/۰
ماهیچه	١٤/٠٩^{c}	۱۸/۹^{bc}	۱۸/۱^{bc}	۱۸/۸^{bc}	۲٤/۸^{b}	٦٠/٦^{a}	۳/۷۷
آبشش	۳۳/۲^{b}	۳٦/٥^{b}	٥۲/٥^{b}	٥۳/٥^{b}	۷۰/۳^{b}	١٤۳^{a}	۹/٦٥
مغز	۳۰/٤^{c}	۳۷/۲^{c}	۳۹/۸^{c}	٥٤/٦^{c}	۸٦/۰^{b}	۲٤۷^{a}	۱۸/۱

[1] اعداد، میانگین سه تکرار از ماهیان هستند، و میانگین های با حروف مختلف در هر ردیف، دارای اختلاف معنی دار هستند

آزمایش III

غلظت‌های بافتی اسیدآسکوربیک صخره ماهی کره‌ای، در جدول ۷-۷ ارائه شده است. متوسط غلظت‌های کبدی و مغزی ماهیان بزرگ غیر بالغ وحشی بیشتر از میزان آن در ماهیان جوان در حال رشد وحشی و پرورشی بود ($P<0.05$).

جدول ۷-۷: غلظت های اسیدآسکوربیک (µg/g) در چهار بافت مختلف صخره ماهی کره‌ای وحشی و پرورشی با میانگین وزنی ۷/۸ ± ٤۰۰ گرم (ماهیان نابالغ) و ٦/۸ ± ٥۱ گرم (درحال رشد)[1]

	وحشی		پرورشی		SEM ادغام شده
	۵۱ گرم	۴۰۰ گرم	۵۱ گرم	۴۰۰ گرم	
کبد	۷۳/۰^{b}	۷۹/۳^{a}	٥۳/۳^{c}	۷۸/٥^{ab}	۲/۲۹
ماهیچه	۲٤/٦	۲۰/۸	۲۲/٦	۲۲/۰	۱/۱٥
آبشش	۱۰۰/۷	٥۹/۳	۷۰/۳	٥۸/٥	۸/٥۹
مغز	۱۳٦^{b}	۲۹۸^{a}	۸٦/۲^{c}	۲۸۷^{a}	۱۹/٥

[1] اعداد نشان دهنده میانگین وزنی۳ الی ٦ ماهی (سه ماهی از هر گروه ماهیان وحشی و پرورشی نابالغ، پنج عدد از ماهیان وحشی، و شش عدد از ماهیان پرورشی در حال رشد) و اعداد با حروف مختلف در هر ردیف، دارای اختلاف معنی دار هستند ($P<0.05$).

در حالی که این غلظت‌ها با غلظت موجود در بدن ماهیان بزرگ غیر بالغ پرورشی، اختلاف معنی داری نداشت. همچنین متوسط غلظت های اسیدآسکوربیک کبدی و مغزی در ماهیان جوان در حال رشد وحشی به طور معنی داری از ماهیان در حال رشد پرورشی، بالاتر بود ($P<0.05$). اختلاف معنی داری در میانگین غلظت‌های اسید آسکوربیک ماهیچه‌ای و آبششی در ماهیان پرورشی و وحشی مورد آزمایش وجود نداشت.

٤-۷- بحث و نتیجه گیری

در آزمایش نخست، میزان افزایش وزن و رشد (جدول۳-۷) با نتایج بدست آمده از سایر مطالعات قابل مقایسه است (۳۳)، در حالیکه در آزمایش دوم، مقادیر به دست آمده کمتر بودند (۳٤) که ممکن است مربوط به اندازه ماهیان، طول دوره آزمایش، دما و خصوصیات کیفی آب و بویژه جیره های غذایی نیمه خالص مورد استفاده در این آزمایش باشد. در آزمایشهای اول و دوم، مقدار ۳۹/۷ mg AA/Kg جیره غذایی برای آزمایش اول و ۱۷/۱ mg AA/Kg جیره غذایی برای آزمایش دوم از جیره غذایی C_0 ممکن است به دلیل برخی تداخلات، بیش از حد برآورد شده باشد. Dabrowski (۳) اذعان نمود که مقادیر ویتامین ث که بر اساس روش دی نیتروفنیل هیدرازین (DNPH)، تعیین شده‌اند، احتمالا بیش از حد برآورد شده‌اند. علائم کمبود ویتامین ث مانند اسکولیوزیس، کوتاه شدن سرپوش آبششی، بیرون زدگی چشم و خونریزی باله ها، که در آزمایش دوم مشاهده شد، حالاتی است که در سایر ماهیان مانند گربه ماهی روگاهی (٦، ۳۵، ۳٦)، آزادماهی کوهو(١٤)، قزل آلای رنگین کمان (۱۸، ۳۷، ۳۸)،کپور معمولی (۳۹)، تیلاپیا (۱۰، ٤۰، ٤۱) یا دم زرد (٤۲) که با جیره های غذایی بدون ویتامین ث تغذیه شده بودند، نیز مشاهده می شود. صخره ماهی تغذیه شده با جیره غذایی C_0 تعدادی از علائم کمبود ویتامین ث را پس از هفته ۱۲ از خود نشان داد. Lim و Lovell (۳۵)، عوارض کمبود ویتامین ث را در گربه ماهیان ۲/۳ گرمی پس از ۸ تا ۱۲ هفته مشاهده نمودند که غلظت های اسیدآسکوربیک کبدی آنها کمتر از ۳۰ µg AA/g بود. Hilton و همکاران (٤۳)، دریافتند که قزل آلای رنگین کمانی که با جیره غذایی فاقد ویتامین ث تغذیه شده

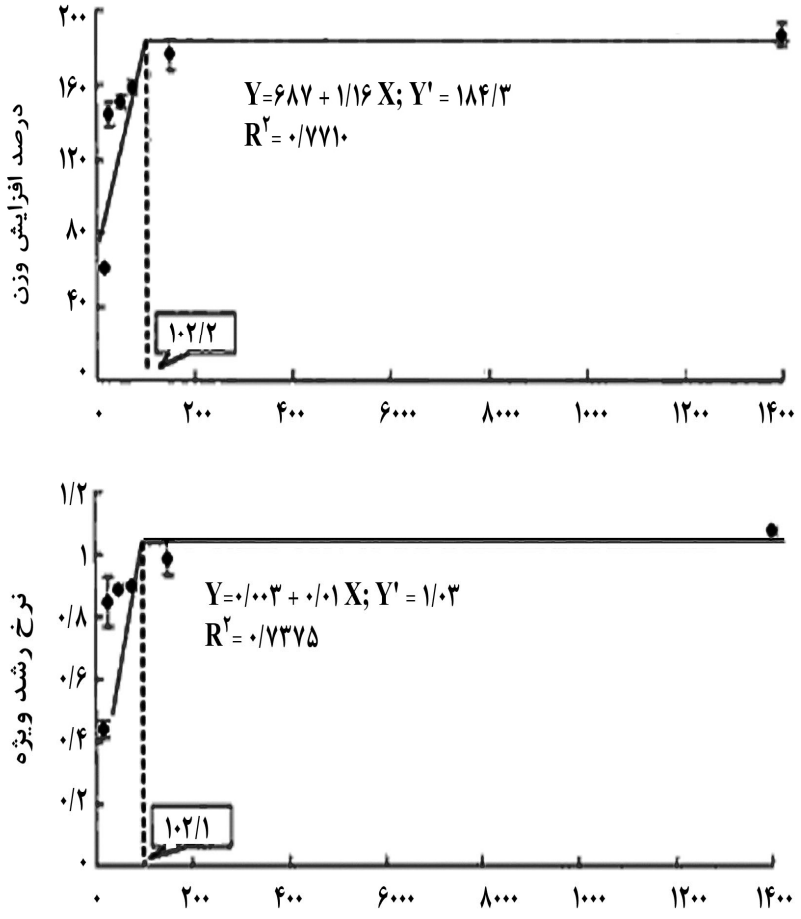
بود، عوارض کمبود ویتامین ث و نیز بی اشتهایی[1]، سستی[2] و کج شدن در آب، را پس از گذشت ۱۶–۲۰ هفته نشان می دهد که غلظت کبدی اسید آسکوربیک کمتر از ۲۰ µgAA/g بود. عوارض کمبود ویتامین ث در صخره ماهی کره‌ای که با جیره غذایی C_0 تغذیه شده بود، پس از ۱۲ الی ۱۴ هفته مشاهده گردید، زمانیکه میزان اسیدآسکوربیک کبدی به کمتر از ۳۰ µg AA/g رسید (جدول ۳–۷). علائم خارجی کمبود ویتامین ث در صخره ماهیانی مشاهده نشد که با سایر جیره های غذایی تغذیه شده بودند. از آزمایش اول این نکته قابل استنباط است که مدل آزمایشی و جیره های غذایی نیمه خالص می‌تواند برای مطالعه میزان ویتامین ث مورد نیاز، مفید باشند و نیاز به ویتامین ث در جیره غذایی، بیشتر از ۳۹/۷ mg AA/Kg (C_0) می باشد، در حالیکه ۱۴۴/۶ mg AA/Kg (C_{150}) برای حداکثر رشد صخره ماهی کره‌ای کافی است. آنالیز خط شکسته برای افزایش وزن، نرخ رشد ویژه، بازده جیره غذایی و ضریب تبدیل پروتئین در آزمایش دوم (شکل ۲–۷و ۳–۷) نشان می‌دهد که مقادیر بهینه ویتامین ث جیره غذایی، برای حداکثر رشد صخره ماهی کره ای، ۱۰۲/۲ mg AA/Kg، ۱۰۲/۱، ۱۰۲/۵ و ۱۰۰/۳ می باشد.

غلظت های کبدی اسیدآسکوربیک عمدتا به عنوان شاخص وضعیت اسیدآسکوربیک ماهیان به کار می‌رود (۳۶، ۴۳ تا ۴۵). غلظت‌های اسیدآسکوربیک کبدی ماهیان بزرگ ولی نابالغ وحشی، به میزان معنی داری بیشتر از ماهیان جوان در حال رشد وحشی و پرورشی می باشد (آزمایش ۳، ۷–۷). غلظت‌های کبدی صخره ماهیان کره‌ای پرورشی و وحشی که به طور تصادفی انتخاب شده بودند، ۷۹/۳ – ۵۳/۵ (جدول ۷–۷) می باشد، در حالیکه، تقریبا میزان ۱۸۰ µg AA/g در کبد می‌تواند نقطه اشباع بافتی در این ماهی باشد (جدول ۴–۷ و ۶–۷) و همچنین این فرضیه با مطالعات طولانی مدتی که قبلا انجام داده ایم، تایید می شود (۲۳). بچه ماهیان صخره ماهی کره‌ای که با ۱۵۰۰ mg AA/Kg به مدت ۲۸ هفته تغذیه شده اند، میزان ۱۸۰/۲ µg AA/g را در کبد خود نشان می دهند (۲۳). Lim و Lovell (۳۵) و Murai و همکاران (۳۶) دریافتند که بین غلظت های ویتامین ث جیره غذایی و میزان آن در کبد گربه ماهی روگاهی، همبستگی وجود دارد. Hilton و همکاران (۴۳) و Skelbaek و همکاران (۴۵) نیز همبستگی معنی داری را در قزل‌آلای رنگین کمان

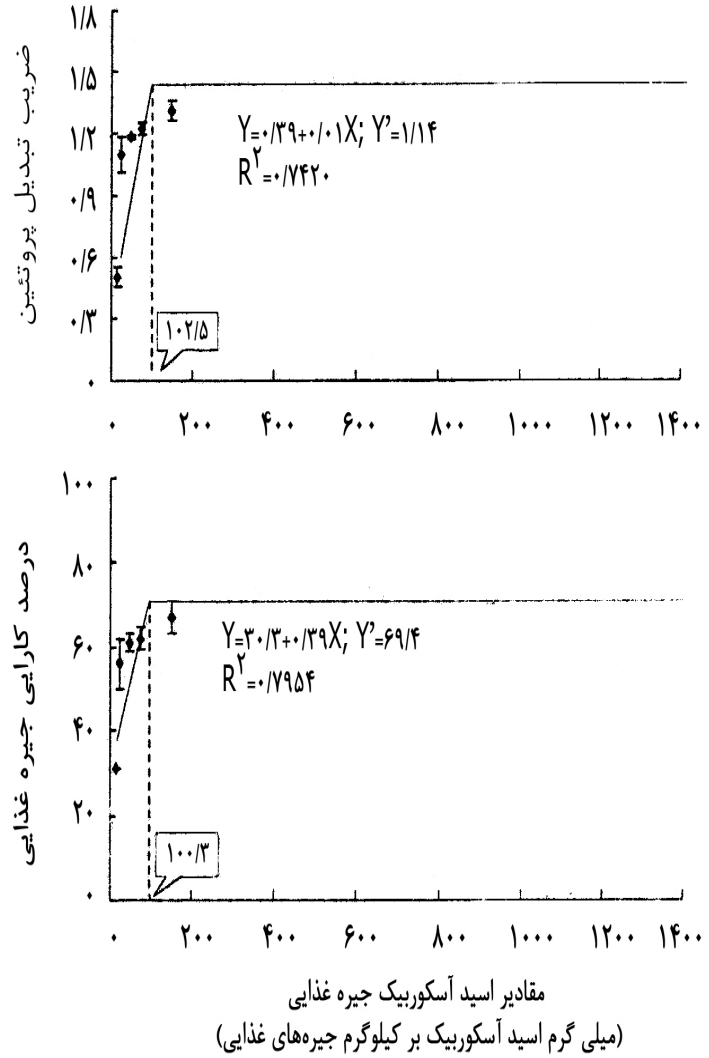
[1] Anorexia
[2] Lethargy

مشاهده نمودند. در مطالعه حاضر، غلظت اسیدآسکوربیک کبدی با رشد و با میزان اسیدآسکوربیک موجود در جیره غذایی دارای همبستگی مثبتی (r^2 =۰/۹۹) است. هر چند Hilton و همکاران (۱۸) دریافتند که قزل آلای رنگین کمان وقتی با جیره غذایی حاوی مقادیرmgAA/ kg ۳۲۰ – ۸۰ تغذیه می شود، مقادیر نسبتا ثابت کبدی را از خود نشان می‌دهد ولی زمانی که با جیره غذایی حاوی mgAA/Kg ۱۲۸۰ (۱۲ برابر بیشتر از میزان مورد نیاز برای رشد عادی) تغذیه می شود، میزان اسیدآسکوربیک کبدی تا دو برابر میزان موجود در کبد ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی mgAA/Kg ۳۲۰، می رسد. Halver و همکاران (٤٦)، غلظت اسیدآسکوربیک راس کلیه را ترجیح دادند در صورتی که Lim و Lovell (۳۵)، بیان نمودند که غلظت های اسیدآسکوربیک در کلیه گربه ماهی روگاهی، نمی‌تواند میزان نوسانات ویتامین ث جیره غذایی را منعکس کند. غلظت های اسیدآسکوربیک چهار بافت در صخره ماهی کره‌ای که با جیره غذایی حاوی mg AA/Kg ۱۵۰۰ تغذیه شده بودند (۱۰ برابر بیشتر از میزان مورد نیاز برای رشد بهینه) ۲ تا ۳ برابر بیشتر از ماهیانی بود که جیره های غذایی حاوی mg AA/Kg ۱۵۰– ۲۵ را دریافت کرده بودند. هیچ پیش بینی در مورد نقطه اشباع در غلظت های اسیدآسکوربیک کبدی در مطالعات گذشته صورت نگرفته بود.

اختلاف معنی داری در متوسط غلظت های اسیدآسکوربیک ماهیچه‌ای ماهیان وحشی و پرورشی مورد آزمایش در مطالعه اخیر، وجود نداشت (جدول ۷–۷). با این وجود غلظت های اسیدآسکوربیک ماهیچه‌ای، همبستگی مثبتی (r^2 =۰/۹۹) با رشد و با غلظت های ویتامین ث جیره غذایی در آزمایش های اول و دوم داشتند (جدول ٤–۷ و٦–۷). غلظت های ماهیچه‌ای ویتامین ث می‌تواند به عنوان شاخصی از وضعیت اسیدآسکوربیک ماهیان باشد. در این آزمایشها، میزان اسیدآسکوربیک در ماهیچه کمتر از سایر بافتها نظیر کبد، آبشش و مغز بود که این امر در مورد ماهیان وحشی نیز صادق می باشد.



شکل۲-۷ : مدل خط شکسته برای درصد افزایش وزن (بالا) و نرخ رشد ویژه (پایین) صخره ماهی کره‌ای تغذیه شده با جیره غذایی حاوی مقادیر مختلف اسید آسکوربیک برای مدت ۱۶ هفته. اعداد محور xها بیانگر مقادیر اسید آسکوربیک جیره آزمایشی می باشند. اعداد به صورت n=3 , میانگین ± انحراف معیار از میانگین می‌باشد.



شکل ۳-۷: مدل خط شکسته برای ضریب تبدیل پروتئین (بالا) و بازده جیره غذایی (پایین) در صخره ماهی تغذیه شده با جیره غذایی حاوی مقادیر مختلف اسیدآسکوربیک برای مدت ۱۶ هفته. اعداد محور xها بیانگر مقادیر اسیدآسکوربیک جیره آزمایشی می‌باشد. اعداد به صورت n=3 , میانگین ± انحراف معیار از میانگین می‌باشد

اگرچه غلظت واحد اسیدآسکوربیک در ماهیچه کمترین مقدار است، ولی مجموع کل اسیدآسکوربیک در ماهیچه، بیشترین مقدار است. این موضوع به خوبی تاییدی است بر نتایج محققینی مانند Jauncey و همکاران (٤٧)، Soliman و همکاران (٤٠)، Al-Amoudi و همکاران (٤٨)، Bai و همکاران (٢٢) و Bai و Lee (٢٣). همچنین Al-Amoudi و همکاران (٤٨) احتمال می دهند که ممکن است اسیدآسکوربیک در بافت ماهیچه به شکل فراهم برای فعالیتهای فیزیولوژیکی، وجود داشته باشد.

اختلاف معنی داری در متوسط غلظت های آبشش ماهیان وحشی و پرورشی بررسی شده در این آزمایش وجود نداشت. غلظت های مغزی اسیدآسکوربیک ماهیان بزرگ غیر بالغ وحشی، به طور معنی داری بیشتر از ماهیان در حال رشد پرورشی و وحشی بود. اسیدآسکوربیک مغزی وآبششی همبستگی مثبتی با نتایج رشد و غلظت های ویتامین ث جیره غذایی در آزمایش های اول و دوم نداشتند (جدول ٤-٧ و ٦-٧). غلظت اسیدآسکوربیک مغزی شاخص خوبی از وضعیت اسیدآسکوربیک در صخره ماهیان کره‌ای، نبود. اگرچه نتایج آنالیز اسیدآسکوربیک بافتی نشان می‌دهد که غلظت اسیدآسکوربیک در مغز در بیشترین مقدار خود بوده است.

در نتیجه، بر اساس خط شکسته رشد، این یافته‌ها بیان می‌دارند که میزان مطلوب این ویتامین، زمانی که از اسیدآسکوربیک به عنوان منبع ویتامین ث استفاده شود، تقریبا ۱۰۲/٥ mg AA/Kg (که می‌تواند حداقل نیاز باشد) برای حداکثر رشد است، ولی میزان ١٤٤ mg AA/Kg برای بهینه سازی رشد و حفظ وضعیت ویتامین ث در صخره ماهیان جوان لازم است. آنالیز بافتی ویتامین ث نشان می‌دهد که سطوح بالاتر از ۱۳۹۰ mg AA/Kg در جیره غذایی برای اشباع سازی بافت از ویتامین ث، لازم است. این نتیجه گیری می‌تواند به خوبی توسط نتایج بدست آمده از سایر مطالعات تایید گردد (۱۸، ٤٩ تا ٥٩)، از جمله سومین آزمایش که نشان می‌دهد با کاهش اندازه ماهیان موجود در قفس، میزان نیاز به ویتامین ث افزایش می‌یابد. می دانیم که اسیدآسکوربیک بسیار ناپایدار بوده و به شدت طی عمل آوری و نگه داری پلیتهای غذایی هدر می رود (٥٣). در زمان غذادهی، بیشتر هدررفت در اثر تراوش ویتامین ث به درون آب، بوقوع می‌پیوندد (٤٤). غذاهای تجاری معمولا برای مدت طولانی در انبار تحت شرایط غیراستاندارد نگهداری می‌شوند. بنابراین، پیشنهاد می‌گردد که برای

تغذیه صخره ماهی کره‌ای اگر از جیره های تجاری استفاده می‌شود، این جیره‌ها با مکمل های ویتامین ث مخلوط شده تا میزان محتوای ویتامینی آنها به ۱۰۲/۵ mg AA/Kg برسد.

تشکر و قدردانی

بخشی از این تحقیق توسط سرمایه گذاری کارخانه خوراک آبزیان Woo Sung، Gum Sung، وزارت امور دریایی و صیادی، مرکز تحقیقات توسعه صنایع اقیانوسی و مرکز توسعه منابع زیستی و غذاهای دریایی دانشگاه ملی Pukyong، انجام گرفت.

منابع

1. Burns, J. J. and Conney, A. H., Metabolism of glucuronic acid and its lacton, in *Glucuronic Acid,* Dutton, G. J., Ed., Academic Press, New York, 1996, 365.

2. Wilson, R. P., Absence of ascorbic acid synthesis in channel catfish, *Ictalurus punctatus* and blue catfish, *Ictalurus frucatus, Comp. Biochem. Physiol.,* 46B, 636, 1973.

3. Dabrowski, K., Absorption of ascorbic acid and ascorbic sulfate and ascorbate metabolism in stomachless fish, common carp, *J. Comp. Biochem. Physiol.,* 160, 549,1990.

4. Lovell, R. T., Essentiality of vitamin C in feeds for intensively fed caged catfi& ;. *Nutr.,* 103,134,1973.

5. Wilson, R. P. and Poe, W. E., Impaired collagen formation in the scorbutic cha nel catfish,;. *Nutr.,* 103,1359,1973.

6. Andrews, J. W. and Murai, T., Studies on the vitamin requirements of channel catfish *(Ictalurus punctatus), J. Nutr., 105,* 557,1975.

7. Kitamura, S., Suwa, T., Ohara, S., and Nakagawa, K., Studies on vitamin requ ments of rainbow trout, *Salmo gairdneri.* II. The deficiency symptoms of fourtf kinds of vitamins. *Bull. Jap. Soc. Fish.,* 33,1120,1965.

8. Poston, H., Effect of dietary L-ascorbic acid on immature brook trout, *N. Y. Sh Conserv. Dep. Fish. Res. Bull.,* 30, 46,1967.

9. Poston, H., Effect of dietary L-ascorbic acid on immature brook trout, *N.* Y. *Sti Conserv. Dep. Fish. Res. Bull.,* 30, 46,1967.

10. Stickney, R.R., McGeachin, R.B., Lewis, D.H., Marks, J., Riggs, R., Sis, F., Robinson, E.H., and Wurts, W., Response of Tilapia aurea to dietary vitamin, *J. World Maricul. Soc.,* 15,179,1984.

11. Arai, S., Nose, T., and Hshimoto, Y., Qualitative requirements of young eels, *Anguilla japonica,* for water-soluble vitamins and their deficiency symptoms, *Bull. Freshw. Fish. Res. Lab., Tokyo,* 22, 69,1972.

12. Guary, M., Kanazawa, A., Tanaka, N., and Ceccaldi, H. J., Nutritional requirements of prawn. III. Requirement for ascorbic acid, *Mem. Fac, Fish, Kagoshima Univ.,* 25, 53,1976.

13. Magarelli, P. C., Jr., Hunter, B., Lightner, D. V., and Colvin, L. B., Black death c ascorbic acid deficiency disease in penaeid shrimp, *Comp. Biochem. Physiol.,* 6; 103,1979.

14. Halver, J. E., Ashley, L. M., and Smith, R. R., Ascorbic acid requirements of coho salmon and rainbow trout, *Trans. Am. Fish. Soc.,* 90,762,1969.

15. Shimeno, S., Yellowtail, *Seriola quinqueradiata,* in *Handbook of Nutrition Requirements of Finfish,* Wilson, R. P., Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1991,181.

16. Halver, J. E., Vitamin requirements of fin fish, in: *Processing from World Symposium on Fin Fish Nutrition and Fish Feed Technology,* Vol. 1, Halver, J. E. and Tiews, K., Eds., Hamburg, Heenemann, Berlin, 1979, 45.

17. Lall, S. P., Oliver, G., Weerakoon, D. E. M., and Hines, J. A., The effect of vitamin C deficiency and excess on immune response in Atlantic salmon *(Salmo salar* L.), in *Proceedings of the Fish Nutrition Meeting,* Toba, Japan, Takeda, M. and Watanabe, T., Eds., Tokyo, Japan Translation Center, 1990,427.

18. Hilton, J. W., Cho, C. Y., and Slinger, S. J., Effect of graded level of supplemental ascorbic acid in practical diets fed to rainbow trout *(Salmo gairdneri), J. Fish. Res. Bd. Can.,* 35,431,1978.

19. Lim, C. and Lovell, R. T., Pathology of vitamin C deficiency syndrome in channel catfish *Ictalurus punctatus, J. Nutr.,* 108,1137,1978.

20. Robinson, E., Reevaluation of the ascorbic acid (vitamin C) requirements of channel catfish *(Ictalurus punctatus), FASEB J.,* 4, 3745,1990.

21. El Naggar, G. 0. and Lovell, R. T., L-Ascorbyl-2-monophosphate has equal antiscorbutic activity as L-ascorbic acid but L-ascorbyl-2-sulfate is inferior to L-ascorbic acid for channel catfish, J. Nutr., 121,1622,1991.

22. Bai, S. C., Lee, K. J., and Jang, H. K., Development of an experimental model for vitamin C requirement study in Korean rockfish, *Sebastes schlegeli, J. Aquacul.,* 9 (2), 169,1996 (in Korean with English abstract).

23. Bai, S. C. and Lee, K. J., Long-term feeding effects of different dietary L-ascorbic

acid levels on growth and tissue vitamin C concentrations in juvenile Korean rockfish, J. *Korean Fish. Soc.,* 29(5), 643,1996 (in Korean with English abstract).

24. Lee, K. J., Kim, K. W., and Bai, S. C., Effects of dietary levels of L-ascorbic acid on growth and tissue vitamin C concentrations in juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf), *Aquacul. Res.,* 29,237,1998.

25. Lee, D. J. and Putnam, G. B., The response of rainbow trout to varying protein/energy ratios in a test diet, *J. Nutr.,* 103,916,1973.

26. Garling, D. L., Jr. and Wilson, R. P., Effects of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth and body composition of fingerling channel catfish. *Prog. Fisli-Cul.,* 39,43,1997.

27. Thenen, S. W., Megadose effects of vitamin C on vitamin B-12 status in the rat, *Nutr.,* 119,1107,1989.

28. Bai, S. C. and Gatlin, D. M. III., Dietary rutin has limited synergistic effects on vitamin C nutrition of fingerling channel catfish *(Ictalurus punctatus), Fisli Physiol. Biochem.,* 10(3), 183,1992.

29. Brown, B. A. Routine hematology procedures, in *Hematology: Principles and Procedures,* Lea and Febiger, Philadelphia, 198, 71.

30. Schaffert, R. R. and Kingsley, G. R., A rapid, simple method for the determination of reduced, dehydro-, and total ascorbic acid in biological material, *J. Biol. Chem.,* 212,59,1955.

31. Interdepartmental Committee on Nutrition for National Defense, Serum vitamin C (ascorbic acid)-dinitrophenyl hydrazine method, in *Manual for Nutrition Surveys,* National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1963,117.

32. Association of Official Analytical Chemists, *Official Methods of Analysis,* 16th ed., Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, 1995.

33. Lee, S. M. and Lee, J. Y., Effects of dietary a-cellulose levels on the growth, efficiency and body composition in Korean rockfish, *Sebastes sclilegeli, J. Aquacul., 7(2),* 97,1994 (in Korean with English).

34. Lee, S. M., Lee, J. Y, and Hur, S. B., Eicosapentaenoic acid and docosahexaefl acid requirement of the Korean rockfish *Sebastes schlegeli,* Book of Abstracts, *World Aniiaculture 94, World Aquaculture Society Annual Meeting,* January 14-1994. New Orleans, 1994, 338.

35. Lim, C. and Lovell, R. T. Pathology of the vitamin C deficiency syndrome in channel catfish *(Ictalurus piinctatus), J. Nutr.,* 108,1137,1978.

36. Murai, T., Andrews, J. W., and Bauernfeind, J. C., Use of L-ascorbic acid, etho coated ascorbic acid and ascorbate 2-sulphate in diets for channel catfish *(Ictalurus piinctatus), J. Nutr.,* 108,1761,1978.

37. Tsujimura, M., Yoshikawa, H., Hasagawa, T., Suzuki, T., Kaisai, T., Suwa, T. and Kitamura S., Studies on the vitamin C activity of ascorbic acid 2-sulfate on the feeding test of new born rainbow trout. *Vitamins* (Japan), 5 35,1978.

38. Sato, M., Kondo, T., Yoshinake, R., and Ikeda, S., Effect of water temperature the skeletal deformity in ascorbic acid deficient rainbow trout. *Bull. Jap. Soc. Fish.,* 49, 443,1983.

39. Agrawal, N. S. and Mahajan, C. L., Nutritional deficiency in an Indian major carp, *Cirrhina mrigala,* due to a vitaminosis C during early growth, *Fish Dk* 231-248,1980.

40. Soliman, A. K., Jauncey, K., and Roberts, R. H., The effect of varying forms o dietary ascorbic acid on the nutrition of juvenile tilapias *(Oreochromis nilotia Anuaadtiire,* 52,1,1986.

41. Soliman, A. K., Jauncey, K., and Roberts, R. H., The effect of dietary ascorbic supplementation on hatchability, survival rate and fry performance in *Oreochromis mossambiciis* (Peters), *Aniiacidture,* 59,197,1986.

42. Sakaguchi, H., Takeda, F., and Tange, K. Studies on vitamin requirements yellowtail. 1. Vitamin B6 and C deficiency symptoms. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish,* 1029,1969.

43. Hilton, J. E., Cho, C. Y, and Slinger, S. J., Evaluation of ascorbic acid status o rainbow trout *(Salmo gairdneri), J. Fish. Res. Bd. Can.,* 34, 2207,1977.

44. Hardie, L. J., Fletcher, T. C., and Secombes, C. J., The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon, *Aquaculture,* 95 201,1991.

45. Skelbaek, T., Andersen, N. G., Winning, M., and Westergaard, S. Stability in feed and bioavailability to rainbow trout of two ascorbic acid forms, *Aquaculture,* 84, 335,1990.

46. Halver, J. E., Smith, R. R., Tolbert, B. M., and Baker, E. M., Utilization of ascorbic acid in fish, *Ann. N.Y. Acad. Sci.,* 258, 81,1975.

47. Jauncey, K., Soliman, A., and Roberts, R. J., Ascorbic acid requirement in reic to wound healing in the cultured tilapia, *Oreochromis niloticus* (Trewavas), *J. I Manage.,* 16,139,1985.

48. Al-Amoudi, M. M., El-Nakkadi, A. M. N., and El-Nouman, B. M., Evaluattoi optimum dietary requirement of vitamin C for the growth of *Oreochromis sparus* fingerlings in water from the Red Sea, *Aquaculture,* 105, 165,1992.

49. Ikeda, S. and Sato, M., Biochemical studies on L-ascorbic acid in carp. *Bull. Ji Soc. Sci. Fish.,* 30, 365,1964.

50. Sato, N., Yoshinaka, R., and Ikeda, S., Biochemical studies on L-ascorbic acid in aquatic animals. XI. Dietary ascorbic acid requirement of rainbow trout for growth and collagen formation. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.,* 44,1029,1995.

51. Li, Y. and Lovell, R. T., Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish, J. *Nutr.,* 115,123,1985.

52. Dabrowski, K., Hinterleitner, S., Sturmbauer, C., El-Fiky, N., and Wieser, W., Do carp larvae require vitamin C?, *Aquaculture,* 72, 295,1998.

53. Steffens, W. *Principles of Fish Nutrition,* Ellis Horwood, Chichester, 1989, 384.

«فصل۸»

نیاز سخت پوستان به ویتامین «ث»

Shi-Yen Shiau

چکیده

ویتامین ث، یک ماده مغذی ضروری برای سخت پوستان به شمار می‌آید و به طور معمول اسیدآسکوربیک تنها منبع ویتامین ث ای است که در غذای میگوها استفاده می‌شود. میزان ویتامین ث مورد نیاز چند گونه از میگوهای خانواده پنائیده تعیین شده است. همانطور که می دانیم اسیدآسکوربیک ناپایدار است و در زمان عمل‌آوری و انبارداری جیره‌های کاربردی از دست می رود. مشتقات اسیدآسکوربیک با بخش‌های سولفاته و فسفاته در موقعیت کربن شماره ۲ در حلقه لاکتونی اسیدآسکوربیک پایداری نسبتا مناسبی دارند و در رفع نیازهای میگوهای خانواده پنائیده موثر می‌باشند. مشتقات متنوعی مانند سولفات L- آسکوربیل(C2S)، منوفسفات منیزیمL- آسکوربیل (C2MP-Mg)، پلی فسفات L- آسکوربیل (C2PP)، جهت رفع نیازهای میگوها مورد استفاده قرار می گیرند. میزان نیاز به مشتقات ویتامین ث در میگوها، نسبت به زمانی که ویتامین ث معمولی در جیره غذایی آنها استفاده می شود، به مراتب کمتر است. به منظور مقایسه نیاز به هر کدام از مشتقات ویتامین ث، باید دقت زیادی در مورد داده‌های منتشره در این زمینه مبذول شود.

۸-۱- مقدمه

اگرچه اغلب جانوران خشکی زی، به وجود منبع ویتامین ث در جیره غذایی نیازی ندارند، بیشتر آبزیان از جمله سخت پوستان به کمبود ویتامین ث در جیره غذایی خود بی نهایت حساس هستند. اگرچه Lightner و همکاران (۱)، به امکان ساخت مجدد ویتامین ث در برخی از گونه‌های پنائیده اشاره نمودند، ولی تمام گونه‌های میگوهای دریایی[1] و آب شیرین[2] که تا امروز مورد بررسی قرار گرفتند، نیازمند دریافت این ویتامین از طریق غذا می باشند. بنابراین اگرچه برخی توانایی‌های محدود ساخت ویتامین ث در برخی گونه‌های میگو گزارش شده است، ولی این مقدار برای پاسخ به نیازهای متابولیکی این جانوران کافی نمی باشد.

۸-۲- عوارض کمبود ویتامین ث

فقدان ویتامین ث در جیره غذایی میگوها، منجر به نقص در ساخت کلاژن می‌شود (۲). بیماری تغذیه‌ای که در اصطلاح به بیماری مرگ سیاه[3] موسوم است تجلی ظاهری کمبود ویتامین ث در میگوها می باشد و با پراکنش یکسری زخم تیره ملانیزه شده در بخش‌های کلاژنی زیر اسکلت خارجی همراه است که برای اولین بار در میگوهای *F. Farfantepenaeus californiensis*، *aztecus* *Litopenaeus. stylirostris* مشاهده شد (۱). ضایعات مشابهی نیز در سایر میگوهای پنائیده مانند *Penaeus monodon* (۳) و *Litopenaeus vanamei* (٤) و به همان شدت در میگوی آب شیرین *Macrobrachium rosenbergii* (۵) گزارش گردید. علائم کمبود ویتامین ث در *Marsupenaeus japanicus* به شکل بی رنگ شدن بدن و رشد غیر طبیعی نقاط خاکستری روی حاشیه کاراپاس، قسمت پایینی شکم و نوک پاهای حرکتی[4] می باشد (٦).

۸-۳- میزان اسیدآسکوربیک مورد نیاز

مقدار اسیدآسکوربیک مورد نیاز برای دستیابی به حداکثر رشد در گونه‌های متعدد میگوهای خانواده

---

[1] Shrimp
[2] Prawn
[3] Black death
[4] Walking legs

پنائیده مانند *M. japanicus* (٦، ۷)، *F. californiensis* (۸) و *P. monodon* (۹) تعیین شده است. میگوی کروما، *M. japanicus* به میزان ۳۰۰۰ mg AA/Kg (٦) یا ۱۰۰۰۰-۲۰۰۰۰ mg AA/Kg (۷) جیره غذایی برای رشد بهینه احتیاج دارد. نیاز به ویتامین ث برای حداکثر رشد در میگوی *F.californiensis* به میزان ۲۰۰۰ mg AA/Kg (۸) و برای میگوی ببری سیاه *P. monodon*، ۲۰۰۰ mg AA/Kg (۹) اعلام شده است. در تمامی این مطالعات، اسیدآسکوربیک به عنوان منبع ویتامین ث مورد استفاده قرار گرفته است و بنابراین به دلیل ناپایداری این شکل از ویتامین ث در محیط، مقادیر ارائه شده مقادیر بسیار بالایی است.

٤-۸- ناپایداری اسیدآسکوربیک

به طور معمول اسیدآسکوربیک مهمترین منبع ویتامین ث می باشد که در جیره غذایی میگو و ماهی استفاده می شود ولی اسیدآسکوربیک، شکل محلول در آب و ناپایدار در برابر حرارت ویتامین ث می‌باشد. همچنین این ویتامین به آسانی بر اثر تماس با دمای بالا، اکسیژن و نور و نیز طی عمل آوری و انبارداری، اکسیده شده و به اسید دی کتوگلونیک[1] غیر فعال تبدیل می‌شود (۱۰، ۱۱، ۱۲). در مطالعه قبلی ما، به منظور عمل آوری جیره غذایی برای میگو با روش‌های مشابه شرایط تولید تجاری غذا، تقریبا ۷۵ درصد مقادیر اولیه اسیدآسکوربیک افزوده شده به خوراک میگو از بین رفت (۱۳). همچنین هنگام تخلیص با آب و نگهداری به مدت ٦۰ دقیقه در آزمایشگاه تا قبل از سنجش HPLC، کاهش مداوم فعالیت اسیدآسکوربیک تا حد ۸۵/۷ درصد مشاهده گردید.

رفتار کند تغذیه‌ای میگو، دسترسی به ویتامین ث را به دلیل تراوش این اسید آبدوست، کاهش می‌دهد و تلاشهای زیادی از طریق به کارگیری اشکال پایدار ویتامین ث مانند C2MP-Mg به منظور افزایش میزان پایداری آن در جیره غذایی صورت پذیرفته است.

۵-۸- مشتقات اسیدآسکوربیک

مشتقات اسیدآسکوربیک در اشکال فسفاته و سولفاته از طریق قرار گرفتن گروه‌های فسفات و

[1] Diketogulonic acid

سولفات در موقعیت کربن شماره ۲ حلقه لاکتون اسیدآسکوربیک به وجود می‌آیند و در برابر اکسایش بسیار پایدار هستند (۱٤). از گذشته تا به امروز، تعداد مشتقات اسیدآسکوربیک افزایش چشمگیری داشته است (جدول ۱-۸)، و برای تعیین میزان نیاز میگوهای پنائیده به این ویتامین، مورد استفاده قرار گرفته و پاسخگوی نیاز این آبزیان بوده‌اند. به عنوان مثال، نیاز به mg AA/Kg ۲۰۰۰ (۹) در میگوها به ترتیب با استفاده از C2PP[1] به mg/Kg ۲۱۰ (۱۵) و با C2MP[2] به mgAA/Kg ٤۰(۱٦) کاهش می یابد. نیاز میگوی *M.japanicus* به C2MP-Mg حدود mg AA/Kg ٤۳۰- ۲۱۵(۱۷) و mg/Kg ۵۰۰ (۱۸) و برای میگوی *L. vannamei* حدود mg/Kg۱۲۰- ۹۰ (۱۹) می‌باشد. نیاز میگوهای پنائیده به اسیدآسکوربیک و مشتقات آن در جدول ۲-۸ ارائه شده است.

جدول ۱-۸: مشتقات متداول اسیدآسکوربیک مورد استفاده در جیره غذایی میگوها

اسید آسکوربیک	علامت اختصاری
L- اسیدآسکوربیک	AA
L- آسکوربیل ۲- سولفات	C2S
L- آسکوربیل۲- مونوفسفات منیزیم	C2MP-Mg
L- آسکوربیل۲- مونوفسفات سدیم	C2MP-Na
L- آسکوربیل۲- پلی فسفات	C2PP

شاید مقایسه دقیق توانایی هر منبع اسیدآسکوربیک در هر یک از این مطالعات گمراه کننده باشد، زیرا طول مدت آزمایش، وزن اولیه میگوها، دمای آب و سایر شرایط آزمایشگاهی یکسان نبوده‌اند. به علاوه، داده‌های مورد استفاده در تعیین میزان ویتامین ث مورد نیاز متغیر می باشند زیرا برخی نتایج بر پایه مقدار اسیدآسکوربیک افزوده شده به جیره غذایی (بصورت مکمل غذایی) می باشد درحالیکه برخی دیگر بر اساس مقادیر تغذیه ای است که در عمل تعیین شده اند. برای مثال، مقایسه بین نیاز به C2PP در مطالعات Chen و Chang (۱۵) و نیاز به C2MP-Mg در مطالعات Catacutan و Lavilla-Pitogo (۳) در رفع نیاز گونه *P.monodon* به ویتامین ث، بسیار مشکل است. بجز

[1] L-ascorbyl-2-polyphosphate
[2] L-ascorbyl-2-monophosphate

جدول ۲-۸: اسیدآسکوربیک و مشتقات آن در رفع نیاز میگوهای پنائیده

ویتامین	گونه	درصد فعالیت اسیدآسکوربیک	میزان نیاز (mg/kg)			منبع
			مکمل سازی	آنالیز شده	معادل	
AA	*P.monodon*	۱۰۰	۲۰۰۰-۲۵۰۰	-	-	۹
C2MP-Mg	*M.japanicus*	?	۲۱۵-۴۳۰	?	?	۱۷
C2MP-Mg	*M.japanicus*	?	۵۰۰	?	?	۱۸
C2PP	*L.vannamei*	۱۱/۶۱	(۷۷۵-۱۰۳۴)*	?	۹۰-۱۲۰	۱۹
C2S	*P.monodon*	۴۸	-	۱۵۶/۹۷	۷۵/۳۵	۱۶
C2MP-Mg	*P.monodon*	۴۶/۴۶	-	۴۰/۲۵	۱۸/۷۰	۱۶
C2MP-Mg	*P.monodon*	(۵۰)*	۱۰۰-۲۰۰	?	۵۰-۱۰۰	۳
C2PP	*P.monodon*	۱۵	۲۱۰	?	?	۱۵
C2PP	*P.monodon*	۲۵	-	(۱۱۷/۰۸)*	۲۹/۲۷	۲۰
C2S	*P.monodon*	۴۸	-	(۱۵۳/۸۱)*	۷۳/۸۳	۲۰
C2MP-Mg	*P.monodon*	۴۶/۴۶	-	۴۸/۴۰	۲۲/۴۷	۲۱
C2MP-Na	*P.monodon*	۲۵/۲۰	-	۱۰۶/۰۷	۷۳/۲۶	۲۱

*** اعداد داخل پرانتز بر اساس اطلاعات موجود در مقاله حاضر محاسبه شده اند.**

تفاوت در شرایط آزمایشگاهی دو مطالعه، آنالیز واقعی غلظت‌های آسکوربات تغذیه‌ای دو مطالعه نیز ارائه نشده است. بنابراین مقایسه بین مشتقات مختلف اسیدآسکوربیک در یک مطالعه برای هرگونه آبزی، نسبت به مقایسه متقابل توانایی هر مشتق اسیدآسکوربیک در مطالعات مختلف، بهتر و اصولی تر است. اخیرا مجموعه مطالعاتی را در شرایط آزمایشگاه انجام دادیم که طی آن به مقایسه توان زیستی[1] هرکدام از مشتقات آسکوربات در رفع نیاز میگوهای جوان *P.monodon* پرداخته ایم.

[1] Biopotency

جدول۳-۸ : غلظتهای اسیدآسکوربیک (mg/kg) در جیره غذایی حاوی C2MP-Mg، C2S وAA

C2MP-Mg، C2S و C1 اضافه شده به جیره پایه (mg/kg)							
۰	۰	۳۰	۵۰	۲۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۲۰۰۰
گروه C2MP-Na							
C2MP-Na آنالیز شده	_	۲۲/۵	۳۷/۶	۱۵۰/۴	۳۷۷/۸	۷۵۶/۵	۱۵۴۹/۷
[a] اسید آسکوربیک معادل	_	۱۰/۵	۱۷/۵	۶۹/۶	۱۷۵/۵	۳۵۱/۵	۷۲۰/۰
گروه C2S							
C2S آنالیز شده	_	۲۴/۳	۳۹/۵	۱۵۶/۰	۳۸۶/۵	۷۷۸/۶	۱۵۶۶/۵
[a] اسید آسکوربیک معادل	_	۱۱/۷	۱۸/۹	۷۴/۹	۱۸۵/۴	۳۷۳/۷	۷۵۱/۹
گروه اسیدآسکوربیک							
اسید آسکوربیک آنالیز شده	_	۷/۵	۱۲/۶	۵۳/۵	۱۲۸/۷	۲۶۱/۵	۵۲۳/۷
[a] اسید آسکوربیک معادل	_	۷/۵	۱۲/۶	۵۳/۵	۱۲۸/۷	۲۶۱/۵	۵۲۳/۷

[a] معادل محاسبه شده مشتقات استری آسکوربیل بر اساس داده‌های شرکت سازنده

(Shiau, S. Y. and Hsu, T. S. Vitamin C requirement of grass shrimp, *Penaeus monodon,* as determined with L-ascorbyl-2-monophosphate. *Aquaculture,* 122, 347-357,1994)

۱-۵-۸- مقایسه C2MP-Mg و C2S

آزمایش رشد به منظور بررسی و مقایسه اثر دو منبع مختلف ویتامین ث یعنی C2S و C2MP-Mg روی میگوهای جوان *P.monodon* (متوسط وزن g ۰/۰۵ ± ۱/۰۶) (۱۶) انجام گرفت.

C2MP-Mg[1] (٤٦/٤٦ درصد فعالیت ویتامینی، C2S[2] (۵۲/۸۵ درصد فعالیت ویتامینی) و اسیدآسکوربیک[3] (۱۰۰ درصد فعالیت ویتامینی)، هر یک، به فرمول جیره غذایی پایه افزوده شدند تا غلظت‌های mg AA/Kg صفر، ۳۰، ۵۰، ۲۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ حاصل آمد. اگرچه، غلظت‌های واقعی که بر اساس آنالیز دستگاهی تعیین شدند، با مقادیر بیان شده در بالا تفاوت داشتند که مقادیر صحیح در جدول زیر ارائه شده است (جدول۳-۸). هر جیره غذایی در سه تکرار برای مدت ۸ هفته

[1] Showa Denko K.K, Tokyo,Japan
[2] Pfizer Inc., New York
[3] Merck Co, Germany

به میگوها داده شد. نتایج نشان می دهد که میگوهایی که با جیره غذایی حاوی مکمل‌های ویتـامین ث تغذیه شده اند، به طور معنی داری ($P<0.05$) دارای افزایش وزن بیشتر و ضریب تبدیل غذایی بهتـر نسبت به میگوهای گروه شاهد بودند که از جیره‌های فاقد ویتامین ث تغذیه کرده اند. میزان زنده مانی به صورت معنی داری در میگوهای تغذیه شده به ترتیب با سطوح بیشتر از mg/Kg ۳۷/٦، ۳۸٦/۳ و ۲٦۱/۵ از C2MP-Mg، C2S و اسیدآسکوربیک نسبت میگوهای تغذیه شده با گروه شـاهد، بـالاتر بود ($P<0.05$). آنالیز رگرسیون خـط شکـسته نـشان مـی‌دهـد کـه میـزان نیـاز بـه C2MP- Mg، mg/Kg ٤۰/۲۵ (معادل mg AA/Kg ۱۸/۷) یـا mg C2S/Kg ۱۵٦/۹۷ (معـادل mg AA/Kg ۸۲/۹۵) می باشد که نشان می‌دهد C2S تنها در حـدود یـک چهـارم C2MP-Mg، مـی‌توانـد در رفـع نیـاز میگوها به ویتامین ث موثر باشد.

۲-۵-۸- مقایسه C2PP و C2S

مقایسه C2PP با C2S در رفع نیاز بچه میگوهای *P.monodon* از نظر ویتامین ث از طریق تغذیه میگوها (متوسط وزنی g ۰/۰۸ ± ۰/۷۹) با جیره‌های غذایی خالص در شش سـطح ویتـامینی C2PP[1] (صفر، ۱۲۰، ۲۰۰، ۸۰۰، ۲۰۰۰ و ٤۰۰۰ میلی گـرم بـه ازای هـر کیلـوگرم جیـره غـذایی، بـا فعالیـت ویتامینی ۲۵ درصد) و یا C2S[2] (mg/Kg صفر، ۳۰، ۵۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بـه ازای هـر کیلوگرم جیره با ٤۸ درصد فعالیت ویتامینی) برای مدت هشت هفته انجـام گرفـت. غلظتهـای واقعـی اسیدآسکوربیک در جیره‌های غذایی آزمایشی در جدول٤-۸ ارائه شده اسـت. نتـایج نـشان مـی‌دهـد میگوهایی که با جیره‌های غذایی حاوی mg/Kg ۲۲/۸۱ ≤ یـا mg C2S ۷۲/٤۱ ≤ بـه ازای هـر کیلـوگرم جیـره غذایی تغذیه شده‌اند، به طور معنی داری ($P<0.05$) دارای وزن بیشتری نسبت بـه میگوهـایی بودنـد که از جیره غذایی فاقد مکمل ویتامینی تغذیه کرده‌اند و همچنین ضریب تبدیل غذایی، در میگوهـایی که با جیره‌های غذایی فاقد مکمل ویتامینی تغذیه شده بودند، بـالاتر بـود. میگوهـای تغذیـه شـده بـا جیره‌های غذایی دارای مقادیر mg C2PP/Kg ۱۲٦/۹ و ۲۹۲/۸ یـا مقـادیر بیـشتر از mg C2S/Kg ۷۲/٤، دارای نرخ زنده مانی بالاتری نسبت به میگوهایی بودند که از جیره‌های غذایی فاقـد مکمـل ویتـامینی

[1] Roche Rovimix Stay-C 25, Switzerland
[2] Pfizer Inc, New York

تغذیه کرده بودند. آنالیز افزایش وزن به وسیله آنالیز رگرسیون خط شکسته نشان می‌دهد کـه در بچـه میگوی *P. monodon*، که سطح اسیدآسکوربیک از هر منبعی در حدود ۲۹/۲۷ mg AA/Kg جیره غذایی برای C2PP و ۷۳/۸۳ mg AA/Kg جیره غذایی بـرای C2S بـود کـه ایـن موضـوع نـشان می‌دهد که C2S در حدود ٤٠ درصد C2PP در رفع نیاز میگوها بـه ویتـامین ث مـوثر اسـت. ایـن مقایسه رشد، مستقیما، زیستی فراهمی[1] ویتامین ث – بعنوان یک فاکتور ثانویه که می توانـد بـر رشـد موثر باشد - را منعکس نمی سازد (رجوع به بخش ۳-۵-۸).

جدول ٤-۸: غلظتهای اسیدآسکوربیک (mg/kg) در جیره غذایی حاوی C2PP و C2S

	C2PP افزوده شده به جیره پایه(mg/kg)					
	۰	۱۲۰	۲۰۰	۸۰۰	۲۰۰۰	۴۰۰۰
C2PP آنالیز شده	-	۶۶/۳۹	۹۱/۲۴	۵۰/۷۶	۱۱۷۱/۳۶	۲۳۸۲/۲۴
a اسیدآسکوربیک معادل	-	۱۶/۵۹	۲۲/۸۱	۱۲۶/۹۰	۲۹۲/۸۴	۵۹۵/۵۶
	C2S اضافه شده به جیره پایه(mg/kg)					
	۰	۳۰	۵۰	۲۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰
C2S آنالیز شده	-	۲۲/۵۴	۳۶/۸۳	۱۵۰/۸۵	۳۹۸/۱۷	۷۵۶/۲۷
a اسیدآسکوربیک معادل	-	۱۰/۸۲	۱۷/۶۸	۷۲/۴۱	۱۹۱/۱۲	۳۶۳/۰۱

[a] معادل محاسبه شده مشتقات استری آسکوربیل بر اساس داده‌های شرکت سازنده با کسب اجازه

(Hsu, T. S. and Shiau, S. Y, Comparison of L-ascorbyl-2-polyphosphate with L-ascorbyl-2-sulfate in meeting vitamin C requirements of juvenile grass shrimp *Penaeus monodon. Fisheries Sci.*, 63,958-962,1997.)

۳-۵-۸ -مقایسه C2MP-Na و C2MP-Mg

Hsu و Shiau (۲۱)، آزمایش دیگـری را بـرای تعیـین مقـدار C2MP- Na[2](بـا فعالیـت ۲۵/۲۰ درصد) مورد نیاز برای *P.monodon*، انجام دادند. C2MP-Mg[3](دارای فعالیـت ویتـامینی ٤٦/٤٦ درصد) همچنین به عنوان شاخصی برای مقایسه در این تحقیق استفاده شد. جیره‌های غـذایی خـالص با هفت سطح ویتامینی (صفر، ۳۰، ۷۰، ۱۵۰، ۳۰۰، ٦۰۰ و ۱۲۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم جیـره

[1] Bioavailability
[2] Showa Denko, K. K., Tokyo, Japan
[3] Showa Denko, K. K., Tokyo, Japan

غذایی) از C2MP-Na و یا C2MP-Mg به بچه میگوهای ببری سیاه *P.monodon* (با میانگین وزنی ۰/۰٤ ± ۰/۵۵ گرم) برای مدت هشت هفته خورانده شدند. میزان حقیقی اسیدآسکوربیک در جیره‌های غذایی در جدول ۵–۸ ارائه شده است. نتایج آنالیز رگرسیون خط شکسته نشان می دهد که اسیدآسکوربیک کافی در جیره غذایی از هر منبع برای میگو، ۱۰٦/۱ میلی گرم از C2MP-Na به ازای هرکیلوگرم جیره غذایی (معادل ۲٦/۷ میلی گرم اسیدآسکوربیک به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی) و ٤۸/٤ میلی گرم از C2MP-Mg (معادل ۲۲/۵ میلی گرم اسیدآسکوربیک به ازای هرکیلوگرم جیره غذایی) می باشد و نیز مشخص شد که C2MP-Na در حدود ۸٤ درصد C2MP-Mg در رفع نیاز بچه میگوهای ببری سیاه *P. monodon* موثر است.

جدول ۵–۸ : غلظتهای اسیدآسکوربیک (mg/kg) در جیره غذایی حاوی C2MP-Na و C2MP-Mg

	C2MP-Na و C2MP-Mg افزوده شده به جیره پایه (mg/kg)						
	۰	۳۰	۷۰	۱۵۰	۳۰۰	۶۰۰	۱۲۰۰
گروه C2MP-Na							
C2MP-Na آنالیز شده	_	۲۲/۹۵	۵۳/۷۶	۱۱۸/۶۵	۲۳۲/۵۰	۴۸۶/۶۷	۹۴۶/۸۳
[a] اسیدآسکوربیک معادل	_	۵/۷۸	۱۳/۵۵	۲۹/۸۹	۵۸/۵۹	۱۲۲/۶۴	۲۳۸/۶۰
گروه C2MP-Mg							
C2MP-Mg آنالیز شده	_	۲۲/۴۱	۵۲/۵۶	۱۱۲/۹۴	۲۲۷/۴۰	۴۵۷/۲۱	۹۲۳/۷۲
[a] اسیدآسکوربیک معادل	_	۱۰/۳۹	۲۴/۳۶	۵۲/۳۶	۱۰۵/۴۲	۲۱۱/۹۶	۴۲۸/۲۴

[a] معادل محاسبه شده مشتقات استری آسکوربیل بر اساس داده‌های شرکت سازنده با کسب اجازه

(Hsu, T. S. and Shiau, S. Y, Comparison of vitamin C requirement for maximum growth of grass shrimp, *Penaeus monodon,* with L-ascorbyl-2-monophosphate-Na and L-ascorbyl-2-monophosphate-Mg. *Aquaculture,* 163, 203-213,1998)

مقادیر C2MP-Na و C2MP-Mg مورد نیاز میگوهای *P. monodon* به منظور رسیدن غلظت‌های بدنی اسیدآسکوربیک به حداکثر مقدار خود، احتمالا از مقادیر مورد نیاز برای رشد بالاتر است. زمانی که آنالیز رگرسیون خط شکسته برای بررسی غلظت‌های اسیدآسکوربیک هپاتوپانکراس استفاده می‌شود، مقادیر ۱٦٦/۲ mg/kg از C2MP-Na و ۱٤٤/۲ mg/kg از C2MP-Mg برای

رشد میگوی *P. monodon* کافی تشخیص داده می شوند (۲۱). در حالت ایده آل، ارزیابی حاصله از میزان افزایش وزن و آنالیز میزان بافتی اسیدآسکوربیک در هپاتوپانکراس باید یکدیگر را تایید کنند. گاهی اوقات، جانوران نیازی به یک ماده مغذی نشان می دهند که بیشتر از میزان مورد نیاز برای رشد است و این نیاز جهت به حداکثر رسانی غلظت بدنی آن ماده مغذی است.

٦-٨- نتیجه گیری

ماهیت ناپایدار اسیدآسکوربیک ، نیاز به استفاده از مشتقات پایدارتر آن را در جیره‌های غذایی میگو، نشان می‌دهد. احتمالا توان نسبی اشکال مختلف ویتامین ث معلول اختلافات نسبی موجود در جذب آنها می باشد و آگاهی از توان زیستی هرکدام از منابع آسکوربات برای تعیین میزان افزودن آن به جیره غذایی سخت پوستان ضروری است. حین مقایسه مقدار مورد نیاز هرکدام از مشتقات اسیدآسکوربیک از اطلاعات منتشره، باید جوانب احتیاط را رعایت نمود. مقایسه ترکیبات C2S، C2PP، C2MP-Mg و C2MP-Na در رفع نیاز میگوی ببری سیاه *P. monodon* به این ویتامین نشان می‌دهد که توان زیستی این ترکیبات به قرار ذیل است:

C2MP-Mg (1) > C2MP-Na (84%) > C2PP (64%)> C2S (25%). اگرچه نیاز به وجود اطلاعات بیشتر در مورد توان زیستی این ترکیبات در گونه‌های مختلف میگوهای خانواده پنائیده کاملا احساس می شود.

منابع

1. Lightner, D. V, Colvin, L. B., Brand, C., and Donald, D. A., Black death, a disease syndrome of penaeid shrimp related to a dietary deficiency of ascorbic acid. *Proc. World Maricult. Soc.,* 8, 611-623,1977.

2. Hunter, B. Magarelli, P. C., Jr., Lightner, D. V., and Colvin, L. B., Ascorbic ad dependent collagen formation in penaeid shrimp. *Corn. Biochem. Physiol., 6'* 381-385,1979.

3. Catacutan, M. R. and Lavilla-Pitogo, C. R. L-ascorbyl-2 -phosphate Mg as a source of vitamin C for juvenile *Penaeus monodon. Israeli. Aquacult., Bamidgi* 46,40-47,1994.

4. Montoya, N. and Molina, C., Optimum supplemental level of L-ascorbyl-2-phosphate-Mg to diet for white shrimp *Penaeus vannamei. Fisheries Sci.,* 61, 1045-1046,1995.

5. Heinen, J. M., Nutritional studies on the giant Asian prawn, *Macrobrachium rosenbergii.* Ph.D. dissertation, Boston University, Boston, 1984.

6. Deshimaru, 0. and Kuroki, K.,Studies on a purified diet for prawn. VII: Adequate dietary levels of ascorbic acid and inositol. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 571-576,1976.

7. Guary, M., Kanazawa, A., Tanaka, N., and Ceccaldi, H. J., Nutritional requiri ments of prawn. VI. Requirement for ascorbic acid. *Mem. Fac. Fish.* Kagoshil University 25, 53-57,1976.

8. Lightner, D. V, Hunter, B., Magarelli, P. C., Jr., and Colvin, L. B., Ascorbic ac nutritional requirement and role in wound repair in penaeid shrimp. *Proc. Maricult. Soc.,* 10, 513-519,1979.

9. Shiau, S. Y. and Jan, F. L., Ascorbic acid requirement of grass shrimp, *Penaeus monodon. Nippon Suisan Gakkaishi,* 58, 363,1992.

10. Hilton, J. W., Cho, C. Y., and Slinger, S. T., Factors affecting the stability of supplemental ascorbic acid in practical trout diets. J. *Fish. Res. Board Can.,* 34, 683-687,1977.

11. Lovell, R. T. and Lim, C., Vitamin C in pond diets for channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.,* 107, 321-325,1978.

12. Soliman, A. K., Jauncey, K., and Roberts, R. T., Stability of ascorbic acid (vitamin C) and its forms in fish feeds during processing, storage and leaching. *Aquaculture,* 60, 73-83,1987.

13. Shiau, S. Y. and Hsu, T. S., Stability of ascorbic acid in shrimp feed during analysis. *Nippon Suisan Gakkaishi, 59,*1535-1537,1993.

14. Tolbert, B. M., Downing, M., Carlson, R. W., Knight, M. K., and Bakre, E. M., Chemistry and metabolism of ascorbic acid and ascorbate sulfate. Ann. N.Y. *Acad. Sci.,* 258, 48-69,1975.

15. Chen, H. Y. and Chang, C. R, Quantification of vitamin C requirements for juvenile shrimp *(Penaeus monodon)* using polyphosphorylate L-ascorbic acid. *J. Nutr.,* 124,2033-2038,1994.

16. Shiau, S. Y. and Hsu, T. S. Vitamin C requirement of grass shrimp, *Penaeus monodon,* as determined with L-ascorbyl-2-monophosphate. *Aquaculture,* 122, 347-357,1994.

17. Shigueno, K. and Itoh, S., Use of Mg-L-ascorbyl-phosphate as a vitamin C source in shrimp diets. *J. World Aquacult. Soc.,* 19,168-174,1988.

18. Alava, V. R., Kanazawa, A., Teshima, S., and Koshio, S., Effect of dietary L-ascorbyl-2-phosphate magnesium on gonadal maturation of *Penaeus japonicus. Nippon Suisan Gakkaishi,* 59, 691-696,1993.

19. He, H. and Lawrence, A. L., Vitamin C requirements of the shrimp *Penaeus van-namei. Aauaculture,* 114, 305-316,1993.

20. Hsu, T. S. and Shiau, S. Y, Comparison of L-ascorbyl-2-polyphosphate with L-ascorbyl-2-sulfate in meeting vitamin C requirements of juvenile grass shrimp *Penaeus monodon. Fisheries Sci.,* 63,958-962,1997.

21. Hsu, T. S. and Shiau, S. Y, Comparison of vitamin C requirement for maximum growth of grass shrimp, *Penaeus monodon,* with L-ascorbyl-2-monophosphate-Na and L-ascorbyl-2-monophosphate-Mg. *Aquaculture,* 163, 203-213,1998.

«فصل ۹»

نیاز ماهیان گرم‌آبی به ویتامین «ث»

R.T.Lovell

۱-۹- تاریخچه

نخستین گزارش در مورد نیاز ماهیان گرم آبی به یکی از منابع ویتامین ث (L- اسیدآسکوربیک)، توسط Ikeda و Sato (۱) ارائه شده است و آنها گزارش نمودند که کپور معمولی *Cyprinus carpio*، می‌تواند این ویتامین را در بدن خود بسازد که البته این میزان برای رشد بهینه کافی نخواهد بود. بعدها، Kitamura و همکاران (۲)، اذعان نمودند که بدشکلی‌ها ستون مهره‌ها در کپور معمولی تغذیه شده با جیره‌های غذایی فاقد ویتامین ث، بسیار مشابه قزل آلای رنگین کمانی *Oncorhynchus mykiss*، است که با جیره غذایی مشابه تغذیه شده است. این نتایج ثابت می‌کند که کپورماهیان جوان نیازمند دریافت این ویتامین از طریق غذا هستند. Dupree (۳) نتوانست نیاز به ویتامین ث را در جیره غذایی گربه ماهی روگاهی *Ictalurus punctatus* پس از ۳٦ هفته تغذیه با جیره غذایی خالص در محیط آکواریوم نشان دهد. گزارش وی در مورد سرعت رشد پایین، احتمالا مربوط دمای پایین تر از ۲۳ درجه سانتی گراد بود که عدم پاسخ مناسب را می‌تواند توجیه کند. اگرچه، بعدها Lovell (٤) و Wilson و Poe (٥) تقریبا به طور همزمان ثابت نمودند که

کمبود ویتامین ث در جیره غذایی می‌تواند سندرم شکستگی ستون فقرات[1] را باعث شود که از لحاظ اقتصادی در پرورش گربه ماهی روگاهی مهم تلقی می‌شود که توام با ساخت ناقص کلاژن در ماده زمینه ستون مهره است. Wilson و Poe نشان دادند که بچه ماهیان گربه ماهیان روگاهی فاقد فعالیت آنزیم L – گولونولاکتون اکسیداز هستند که برای ساخت اسیدآسکوربیک ضروری است(۵). بعدها، علائم کمبودی همچون بدشکلی ساختمانی مهره ها، باله‌ها، آبشش‌ها و غضروف‌های چشمی[2]، بی حالی عمومی بدن و رشد ضعیف در کپورماهیان هندی (٦) و تیلاپیای آبی *Oreochromis aurateus*، (۷) گزارش گردید. Lim و lovell (۸) گزارش نمودند که mg/kg ۵۰-۳۰ ویتامین ث در جیره غذایی برای رشد عادی و جلوگیری از بروز علائم بدشکلی ستون مهره‌ها در گربه ماهیان روگاهی با وزن اولیه ۲/۳ گرم کافی است و این مقدار مشابه میزان گزارش شده توسط Andrews و Murai (۹) بود، اگرچه آنها آسیب دیدگی ستون مهره‌ها را در ماهیان محروم از ویتامین ث مشاهده نکردند. Stickney و همکاران (۷) نیز گزارش نمودند که میزان mg/kg ۵۰ – ۲۵ ویتامین ث برای تیلاپیای آبی کوچک مورد نیاز است. Martins (۱۰) دریافت که بچه ماهیان پاکو[3] *Piaractus mesopotamicus*، نیاز به mg AA ۵۰ به ازاء هر کیلوگرم از جیره غذایی خشک دارند. این دامنه از غلظت‌های ویتامین ث در جیره غذایی، به طور کلی دامنه توصیه شده برای ماهیان گرم آبی است. چنانکه کتاب NRC (۱۱) نیز این میزان را در بخش نیازهای غذایی ماهیان، توصیه کرده است.

۲-۹- تنوع نیاز به ویتامین ث

نیاز غذایی به ویتامین ث برای یک گونه ماهی با توجه به اندازه ماهی و عملکرد متابولیک، متفاوت است. Li و Lovell (۱۲) گزارش نمودند که میزان ویتامین ث موردنیاز برای افزایش وزن گربه ماهی روگاهی با وزن کمتر از ۱۰ گرم، mg/kg ۵۰ است، ولی میزان mg/kg ۳۰ برای ماهیان با وزن ۵۰ گرم و بالاتر کافی است. Dabrowski و همکاران (۱۳) نشان دادند که غلظت اسیدآسکوربیک

[1] Broken back syndrom
[2] Eye cartilage
[3] Pacu

در بافت‌های گربه ماهی روگاهی، طی هستی زایی(انتوژنی)[1] کاهش می‌یابد که نشان می دهد نیاز ماهی با افزایش اندازه، تغییر می‌کند. مطالعه Li و Lovell (۱۲) نشان داد که ۳۰mg/kg ویتامین ث برای جلوگیری از اسکولیوزیس[2] و لوردوزیس[3] کافی است اگرچه ۵۰mg/kg برای رسیدن به حداکثر وزن در ماهیان کوچک مناسب است. Lim و Lovell (۸) دریافتند که ۳۰ mg/kg ویتامین ث به شکل مناسبی برای رشد بهینه گربه ماهی روگاهی کافی است ولی ۹۰ mg/kg ویتامین ث برای سرعت مطلوب التیام زخم لازم است. مقادیر بیشتر از حد معمول برای حداکثر مقاومت در برابرعفونت‌های باکتریایی در ماهیان گرم آبی و سردآبی لازم است. Li و Lovell (۱۲) نشان دادند که افزایش ویتامین ث جیره غذایی گربه ماهی زوگاهی به مقدار ۱۰ برابر میزان مورد نیاز برای رشد، مرگ و میر را کاهش و پاسخ ایمنی اختصاصی و غیر اختصاصی را طی مواجهه با باکتری *Edwardsiella ictaluri* افزایش میدهد.

Blom و Dabrowski (١٤) شواهدی دال بر این موضوع ارائه نمودند که بیشترین کیفیت گامتهای جنسی نر و ماده در ماهیان مولد قزل آلای رنگین کمان، زمانی قابل مشاهده است که میزان ویتامین ث جیره، هشت تا ده برابر میزان مورد نیاز برای رشد باشد. طوطی ماهی[4] ژاپنی *Oplegnathus fasciatus*، زمانی که با جیره‌های غذایی حاوی ۳۰۰ mg/kg در مقایسه با ۷۵ mg/kg تغذیه شد، مقاومت بیشتری را در برابر استرس‌های متناوب کمبود اکسیژن، از خود نشان داد. میزان مت هموگلوبین ایجاد شده توسط یون نیتریت در گربه ماهیان روگاهی که جیره غذایی حاوی ۸۰۰۰ mg AA/kg را مصرف کرده بودند نسبت به ماهیان تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی ٦٣ mg AA/kg، به طور معنی داری پایین تر بود.

۳-۹- علائم کمبود و نقش‌های متابولیک

تعدادی از علائم کمبود ویتامین ث و عملکردهای متابولیک این ماده در ماهیان گرم آبی توصیف شده‌اند که می توان به بدشکلی ساختاری باله ها، مهره ها، سرپوش آبششی و غضروف‌های پایه‌ای و

[1] Ontogeny
[2] Scoliosis
[3] Lordosis
[4] Parrot fish

مویرگ‌های خونی اشاره کرد. تبدیل آهن و اسید فولیک به اشکال احیاء شده برای متابولیسم و همچنین سمیت زدایی گزنوبیوتیک (ترکیبت خارجی)های مختلف مرتبط با ویتامین ث است. بسیاری از این واکنش‌ها، مرتبط با نقش ویتامین ث به عنوان یک عامل کاهنده است. برای مثال، بدشکلی‌های ساختاری می‌توانند در ارتباط با متابولیسم کلاژن باشند که ویتامین ث با یک عملکرد پیچیده اکسیدازی بر هیدروکسیلاسیون لیزین و پرولین طی تبدیل پروکلاژن به کلاژن اثر گذار است. ویتامین ث برای حداکثر مصونیت در برابر عفونتهای باکتریایی، لازم و ضروری است. گمان می‌رود که ویتامین ث برای ساخت ترکیبات کلاژنی سیستم کمپلمان (۱۲) و نیز به منظور حفاظت از فسفولیپیدهای حساس به اکسایش غشاهای سلولی، مانند ایکوزانوئیدها[1] ضروری باشد که پیش سازهای ترکیبات محرک سیستم ایمنی هستند (۱۵). ویتامین ث برای تولید مثل موفقیت آمیز قزل آلای رنگین کمان، بویژه در حفاظت مواد ژنتیکی حساس به اکسایش در گامت‌ها لازم است (۱٤) و احتمالا چنین عملکردی را در ماهیان گرم آبی نیز بر عهده دارد (۱٦).

٤-۹- نشانگرهای وضعیت ویتامینی ماهیان

نشانگرهای تحت بالینی شامل مقادیر بافتی ویتامین ث و میزان کلاژن استخوان‌ها، برای ارزیابی وضعیت ویتامین ث در ماهیان گرم آبی به کار می‌رود. Lim و Lovell (۸) افزایش مقادیر بافتی (کبد، کلیه، سرم) ویتامین ث را مترادف با افزایش میزان ویتامین ث جیره غذایی به اندازه ده الی بیست برابر میزان مورد نیاز برای رشد بهینه گزارش نمودند. بنابراین اندازه گیری دقیقی از نیاز تغذیه‌ای به ویتامین ث انجام نشده است. اگرچه آنها دریافتند غلظت‌های کبدی ویتامین ث کمتر از ۳۰ mg/kg بافت مرطوب، نشانه‌ای از شرایط کمبود ویتامین ث در گربه ماهی روگاهی است. Hilton و همکاران (۱۷) دریافتند که غلظت ویتامین ث، مشابه با تحقیق بالا، در ماهی سردآبی قزل آلای رنگین کمان نیز علائم کمبود را بروز می‌دهد.

Lim و Lovell (۸) و نیز Wlison و Poe (۵) متوجه شدند که میزان کلاژن مهره‌ها شاخص مناسبی از نیاز تغذیه‌ای و وضعیت ویتامین ث گربه ماهی روگاهی می باشد. هر دو تیم تحقیقاتی

[1] Eicosanoid

گزارش نمودند که میزان کلاژن مهره‌ها به شکل محسوسی در حین افزایش سطح ویتامین ث جیره غذایی به بیش از میزان مورد نیاز برای رشد مطلوب، افزایش نمی یابد. Lim و Lovell (۸) نشان دادند که محتوای کلاژن مهره ای ۲۵ درصد استخوان خشک، نشانه کمبود تغذیه ای ویتامین ث و میزان ۳۰ درصد آن، نشانه مناسب بودن این ویتامین است.

۵-۹- ارزیابی مجدد نیاز به ویتامین ث

نیاز تغذیه‌ای به ویتامین ث در گربه ماهی روگاهی و کپور و نیز دو گونه از آزادماهیان، که توسط NRC ارائه شده است، در حدود mg/kg ۵۰ می‌باشد که احتمالا این مقادیر بیشتر از حد واقعی آن برآورد شده اند. بعنوان مثال برای گربه ماهی روگاهی شواهدی وجود دارد که این میزان ویتامین، بیشتر از حد مورد نیاز می‌باشد. مطالعات قبلی که از آنها این اعداد بدست آمد، از منابع ناپایدار اسیدآسکوربیک استفاده کرده بودند و در زمان تغذیه ماهیان، میزان واقعی ویتامین ث حداقل ۵۰- ۲۰ درصد پایین تر از سطوح مدنظر بود. El Naggar و Lovell (۱۸) نشان دادند که بیش از ۵۰ درصد از مکمل ویتامین ث در جیره‌های غذایی، حتی با نگهداری در دمای انجماد، از بین می رود. وقتی آنها از منابع پایدار ویتامین ث مانند ۲- مونوفسفات L – آسکوربیل استفاده نمودند، نیاز به ویتامین ث برای حداکثر رشد و فقدان علائم کمبود در گربه ماهیان کوچکتر از ۱۳ گرم، mg/kg ۱۱ بود. Robinson (۱۹) ۲ – پلی فسفات L – آسکوربیل را به عنوان منبع ویتامین ث بکار برد و متوجه شد که تقریبا mg/kg ۱۵ ویتامین ث برای جیره‌های غذایی گربه ماهیان روگاهی جوان کافی است. هر دو این مقادیر با استفاده از منابع ویتامینی پایدار تعیین شدند که به وضوح، کمتر از میزان عنوان شده توسط NRC می‌باشد. این موضوع بیانگر آن است که نیاز اولیه در گربه ماهی و احتمالا سایر گونه‌هایی که اسیدآسکوربیک غیر پایدار در جیره غذایی آنها بوده، ممکن است بیشتر از میزان واقعی آن برآورد شده باشد.

٦-۹- ویتامین ث و ایمنی

برخی مطالعات نشان داده است که ماهیان استخوانی محروم از ویتامین ث، به عفونت‌های باکتریایی

حساس تر می باشند. Li و Lovell (۱۲)، کاهش در میزان تولید آنتی بادی، فعالیت بیگانه خواری ماکروفاژها و فعالیت کمپلمان‌ها را در گربه ماهیان روگاهی گزارش نمودند که با جیره‌های غذایی فاقد یا دارای مقادیر اندک ویتامین ث تغذیه شده بودند که مبین آن است که ویتامین ث بر پاسخ ایمنی سلولی و همورال اثر دارد. این مسئله با پاسخ‌های قزل آلای رنگین کمان متفاوت بود که تنها فاگوسیتوز و فعالیت کمپلمان‌ها در ماهیان محروم از ویتامین ث، تضعیف شده بود درحالیکه در ماهیان فاقد ویتامین E تولید آنتی بادی کاهش یافته بود (۲۰).

چندین بررسی روی گربه ماهی روگاهی نشان داد که مرگ و میر در اثر عفونت باکتری *Edwardsiella ictaluri* در ماهیان محروم از ویتامین ث بالاتر است (۱۲، ۲۱، ۲۲). Li و Lovel (۱۲) و نیز Duncan و Lovell (۲۱) دریافتند که مقادیر بالاتر از میزان نیاز طبیعی بدن، مقاومت در برابر این عامل بیماری زا را در گربه ماهیان کوچک افزایش می دهد. اگرچه Li و Robinson (۲۲) نتوانستند این نتایج را مجددا تکرار کنند. مطالعات صورت گرفته روی قزل آلای رنگین کمان و آزادماهی اقیانوس اطلس *Salmo salar*، نیز نشان می‌دهد که خوراندن مقادیر بالاتر ویتامین ث از مقادیر مورد نیاز برای رشد معمول، موجب تشدید چندین پاسخ غیر اختصاصی ایمنی می‌شود (۲۰، ۲۳).

۷-۹- زیست فراهمی منابع ویتامین ث

اسیدآسکوربیک در کربن شماره ۲ حلقه لاکتونی خود در برابر اکسایش، نسبتا حساس است. بنابراین، رطوبت، حرارت و تماس با پراُکسیدان‌ها، باعث کاهش فعالیت ویتامین ث می شود. Lovell و Lim (۲٤) و El Naggar و Lovell (۱۸) نشان دادند که تقریبا ۵۰ درصد کارایی ویتامین ث طی فرایند اکستروژن (نوعی از فرایندهای ساخت غذای آبزیان) غذای ماهی از بین می‌رود و نیمه عمر آن به کمتر از ۹۰ روز کاهش می یابد.

به دلیل اتلاف شدید ویتامین ث طی عمل آوری و ذخیره سازی، ترکیبات جدیدی که دارای فعالیت ویتامینی مذکور می باشند، به منظور استفاده در غذای آبزیان مورد بررسی قرار گرفتند. زمانی که قرار است از یک ترکیب به عنوان جایگزین اسیدآسکوربیک در جیره غذایی استفاده شود، باید اطلاعاتی در زمینه کارایی آن (آیا دارای کارایی مشابه L- اسیدآسکوربیک می‌باشد؟) و پایداری طی عمل آوری

و انبارداری بدست آورد. ترکیباتی که برای استفاده در غذای ماهیان ارایه شـده‌انـد، مـشتقات فـسفاته، سولفاته و گلوکز هستند. با وجود اینکه فعالیت ویتامینی این مشتقات در بین گونه‌های ماهیان متفاوت است ولی این ترکیبات تقریبا طی عمل آوری و نگهداری غذاها پایدار می باشند و گزارش شده است که دارای فعالیت ویتامینی برای آزاد ماهیان (۲۵)، گربه ماهی روگاهی (۹)، تیلاپیا (۲٦) و سایر گونه‌ها می باشند. بنابراین باید در غذای ماهیان فعالیت مولی و قدرت ویتامینی مشتقات فسفاته، سولفاته و یا گلوکز، نسبت به L- اسیدآسکوربیک به طور موثری شناخته شود.

El Naggar و Lovell (۱۸) گربه ماهی روگاهی را با اسیدآسکوربیک ، اسیدآسکوربیک فسفاته یـا سولفاته در میزان مولی برابر از مقادیر پایین تر از حد نیاز تا مقادیر بیشتر از حد نیاز، تغذیـه نمودنـد. آنها اطلاعات بدست آمده (افزایش وزن، میزان کلاژن استخوان، علائم بالینی کمبود ویتامین ث) را در مقابل میزان ویتامین ث جیره غذایی قرار داده و بـا اسـتفاده از روش آنـالیز شـیب، کـارایی مـشتقات استری ویتامین ث را نسبت به L- اسیدآسکوربیک تعیین نمودند. داده‌های آنها نشان می دهد کـه بـه طور کلی ۲- فسفات L- آسکوربیل و L- اسیدآسکوربیک ، دارای کـارایی ویتـامینی برابـری هـستند ولی۲- سولفات L- آسکوربیل کمتر از ۱۰ درصد L- اسیدآسـکوربیک دارای فعالیـت ویتـامینی مـی باشد. گزارشات پیشین نشان داده‌اند که گربه ماهی می‌تواند مشتق سولفاتی را به عنوان منبـع ویتـامین ث استفاده کند. هرچند، مازاد ویتامین ث در این مطالعه تنها در یک سطح تغذیه ای بکار رفته بود کـه امکان مقایسه کیفی و نه کمی را فراهم آورد. به منظور تجویز مقدار مجاز ویتامین ث در جیره غـذایی ماهیان گرم آبی، باید میزان فعالیت منبع ویتامین ث را بدانیم.

Shiau و Hsu (۲٦) با استفاده از آنالیز رگرسیون خـط شکـسته نـشان دادنـد کـه تیلاپیـای هیبریـد (*Oreochromis niloticus* ×*O. aurateus*) مـی‌توانـد از اسـتر سـولفاته اسیدآسـکوربیک و همچنین استر فسفاته این ویتامین استفاده کند ولی اثر هر دوی اینها کمتر از اسیدآسکوربیک می باشد. Abdelghany (۲۷) نیز در مورد تیلاپیای نیـل *O. Niloticus*، دریافـت کـه مـشتقات سـولفاته و فسفاته اسیدآسکوربیک ، فعالیت ویتامینی مشابهی دارنـد. Khajaren و Khajaren (۲۸) دریافتنـد که مشتقات گلوکزی اسیدآسـکوربیک ، آسـکوربات -۲-گلـوکز[1]، در رشـد و پیـشگیری از ابـتلا بـه

[1] Ascorbate-2-glucose

اسکوروی در هیبرید گربه ماهی کلاریاس[1] دارای کارایی مشابهی با اسیدآسکوربیک می باشند. Buddington و همکاران (۲۹)، اذعان نمودند که در گربه ماهی روگاهی، گروه فسفات از ۲- منو(پلی) فسفات آسکوربیل، از طریق هیدرولیز، پیش از عمل جذب اسیدآسکوربیک در روده جدا می‌شود و نتیجه گیری نمودند که تولید آنزیم‌های هیدرولاز در دیواره روده به منظور استفاده استرهای اسیدآسکوربیک ضروری است که نشان می دهد فعالیت آنزیم سولفاتاز روده ممکن است بر توانایی ماهیان مختلف در استفاده از مشتقات سولفاته به عنوان منبع ویتامین ث اثر گذار باشد (۳۰).

۸-۹- برهمکنش ویتامین با سایر مواد غذایی

به دلیل خصوصیات احیایی، ویتامین ث ممکن است بر زیست فراهمی و بنابراین نیاز تغذیه‌ای سایر مواد مغذی موثر باشد. برای مثال، آهن و سایر عناصری که معمولا در اشکال اکسید شده مورد هضم قرار می‌گیرند، باید به منظور جذب و متابولیسم به اشکال محلول تر احیا شوند و ثابت شده است که ویتامین ث در این فرآیند موثر است. مثال دیگر، اثر ویتامین ث جیره غذایی بر نیاز به فولات[2] است. Duncan و Lovell (۲۱) دریافتند که نیاز به فولات در جیره غذایی گربه ماهی روگاهی که با مقادیر اندکی از ویتامین ث تغذیه شده بود (یا پایین ترین میزان مورد نیاز برای رشد)، تقریبا ٤ mg/kg فولات بود ولی هنگامی که ویتامین ث در جیره غذایی به میزان ۲۰۰ mg/kg رسید، نیاز به فولات در جیره غذایی به ۰/٤ mg/kg کاهش یافت. ویتامین ث در احیاء فولات به کوآنزیم فعال ٥- متیل تتراهیدروفولات[3] نقش دارد و برای فعالسازی مطلوب فولات، مقدار ویتامین ث بیشتری به نسبت رشد لازم است. این موضوع نشان می‌دهد که غلظت ویتامین ث و سایر مواد مغذی جیره غذایی، می‌تواند بر نیاز تغذیه‌ای سایر مواد مغذی موثر باشد.

[1] Clarias
[2] Folate
[3] 5-methyl tetrahydrofolate

۹-۹- نتیجه گیری

بررسی چندین گونه از ماهیان خانواده سیچلیده، گربه ماهیان و کپور ماهیان نشان داد که این ماهیان نیازمند دریافت ویتامین ث از طریق جیره غذایی خود برای دستیابی به رشد معمول می باشند و تقریبا میزان نیاز ویتامینی چندین گونه از ماهیان مشابه هم است. گزارشهای قبلی نشان می دهد که ۵۰ mg/kg ویتامین ث میزان مجاز این ویتامین برای بچه ماهیان گرم آبی است. اگرچه مطالعات اخیر با استفاده از منابع ویتامینی پایدار در برابر اتلافهای ناشی از اکسایش نشان می‌دهد که نیاز به ویتامین ث ممکن است تا حدود ۵۰ درصد یا بیشترکاهش یابد. چندین علامت مشخص و ناهنجاریهای متابولیک در ماهیان گرم آبی دچار کمبود ویتامین ث شناسایی شده است که به طور کلی در ارتباط با نقش این ویتامین به عنوان یک ترکیب کاهنده است. ویتامین ث برای حداکثر مقاومت در مقابل عفونتهای باکتریایی لازم است و نقش آن در پاسخ‌های ایمنی اختصاصی و غیر اختصاصی تشخیص داده شده است. ۲- فسفات L- آسکوربیل در مقابل هدررفت ناشی از اکسایش، پایدار بوده و برای عمده ماهیان دارای توان مشابه با L- اسیدآسکوربیک است. ۲- سولفات L- آسکوربیل نیز که بطور ضعیفی توسط گربه ماهی روگاهی استفاده می‌شود، ولی مصرف آن توسط برخی از تیلاپیاها دارای مصرف به نسبت مطلوب و مناسب است.

منابع

1. Ikeda S. and Sato M. Biochemical studies of L-ascorbic acid by carp. Bull. *Jpn. Soc. Sci. Fish.,* 30, 365,1964.

2. Kitamura, S., Ohara, S., Suwa, T., and Nakagawa, K. Studies on vitamin requirements of rainbow trout *Salmo gairdneri.* 1. On the ascorbic acid. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 31,* 818,1965.

3. Dupree, H. K., Vitamins essential for growth of channel catfish, *Ictalurus punctatus,* Technical Paper No. 7. Washington, D.C. Bureau of Sport Fisheries and Wildlife, 1966.

4. Lovell, R. T., Essentiality of vitamin C in feeds for intensively fed caged channel catfish, 7. *Nutr.,* 103,134,1973.

5. Wilson, R. P. and Poe, W. E., Impaired collagen formation in the scorbutic channel catfish,. *Nutr.,* 103,1359,1973.

6. Agrawal, N. K. and Mahajan, C. L. Nutritional deficiency disease in an Indian major carp, *Cirrhina mrigala* Hamilton, due to avitaminosis C during early growth,. *Fish. Dis.,* 3, 231,1980.

7. Stickney, R. R., McGeachin, R. B., Lewis, D. H., Marks, J. Riggs, A., Sis, R. R, Robinson, E. H., and Wurts, W., Response of *Tilapia aurea* to dietary vitamin C, *J. World Maricult. Soc.,* 15,179,1984.

8. Lim, C. and Lovell, R. T. Pathology of the vitamin C deficiency syndrome in channel catfish *(Ictalurus punctatus),. Nutr.,* 108,1137,1978.

9. Andrews, J. W. and Murai, T., Studies on the vitamin C requirements of channel catfish *(Ictalurus punctatus),. Nutr.,* 105, 557,1974.

10. Martins, M. L., Effect of ascorbic acid deficiency on Pacu fry *(Piaractus mesop-tomicus), Braz. Med. Biol. Res., 28,563,*1995.

11. National Research Council, *Nutrient Requirements of Fish,* National Academy Press, Washington, D.C. 1993.

12. Li, Y. and Lovell, R. T., Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish, *J. Nutr.,* 115,123,1985.

13. Dabrowski, K., Moreau, R., El-Saidy, D. and Ebeling, J. Ontogenetic sensitivity of channel catfish to ascorbic acid deficiency, *J. Aquatic Animal Health.,* Vol. 8. No. 1.22,1996.

14. Blom, J. and Dabrowski, K., Reproductive success of female rainbow trout in response to graded dietary ascorbyl monophosphate levels, *Biol. Reprod.,* 52, 1073,1995.

15. Fracalossi, D. M., Craig-Schmidt, M., and Lovell R. T., Effect of dietary lipid sources on production of leukotriene B by head kidney of channel catfish held at different water temperatures, *J. Aquatic Animal Health.,* 6, 242, 1994.

16. Santiago, C. B. and Gonzel, A. C. Effect of prepared diet and vitamins A, E and C supplementation on the reproductive performance of cage-reared bighead carp *Aristichthys nobilis* (Richardson),. *App. Ichth., 16,8,* 2000.

17. Hilton, J. W., Cho, C. Y., and Slinger, S., Effect of graded levels of supplemental ascorbic acid in practical diets fed to rainbow trout *(Saimo gairdneri), J. Fish. Res. Board Can., 35,* 431,1978.

18. El Naggar, G. 0. and Lovell R. T. L-Asorbyl-2-monophosphate has equal antiscorbutic activity as L-ascorbic acid but L-ascorbyl-2-sulfate is inferior to L-ascorbic acid for channel catfish *J. Nutr.,* 121,1622/1991.

19. Robinson, E. H., Vitamin C studies with channel catfish/ *Tech. Bull., Miss^ Exp. Sta.,* No. 182, 8pp., 1992.

20. Verlhac, V., Doye, A., Gabaudan,.Troutland, D., Deschaux, P., Kaushik, and (ed) Luquet, P., Vitamin nutrition and fish immunity influence of an(dant vitamins (C and E) on immune response of rainbow trout. Fish nutrition practice: 4th international symposium on fish nutrition and feeding. Bial France *Les Collocfues,* No. 61,167,1991.

21. Duncan P. L. and Lovell, R. T. Influence of vitamin C on the folate requirement of channel catfish, *Ictalurus punctatus,* for growth, hematopoiesis, and resistance to *Edwardsiella ictaluri* infection, *Acfuacidture,* 127, 233,1994.

22. Li, M. H. and Robinson, E. H. Effect of dietary vitamin C on tissue vitamin concentration in channel catfish, *Ictalurus punctatus,* and clearance rate at tow temperatures-a preliminary investigation,. *Applied Aquaculture,* 4, 59, 19S.

23. Waagob, R., Glette, J., Raa-Nilsen, E., and Sandnes, K., Dietary vitamin C immunity and disease resistance in Atlantic salmon *(Salmo salar), Fish Physio. B* 12,61,1993.

24. Lovell, R. T., and Lim, C., Vitamin C in pond diets for channel catfish, *Tn Fish. Soc.,* 107, 321,1978.

25. Tucker, B. W. and Halver, J. E., Ascorbate-2-sulfate metabolism in fish, N;42(5), 173,1984.

26. Shiau, S. Y. and Hsu, T. S., L-ascorbyl-2-sulfate has equal antiscorbutic ac L-ascorbyl 2-phosphate for tilapia, *Aquaculture,* 133,147,1995.

27. Abdelghany, A. E., Growth response of Nile tilapia to dietary L-ascorbic L-ascorbyl sulfate and L-ascorbyl-2-polyphosphate, *Aquaculture,* 150,449

28. Khajaren, J. and Khajaren, S., Stability and bioavailability of vitamin C-g in hybrid *Clarius* catfish, *Aquaculture,* 151, 219,1997.

29. Buddington, R. K., Puchal, A. A., Houpe, K. L., and Diehl W. J., in, Hydrolysis and absorption of two monophosphate derivatives of ascorbic acid by channel catfish, *Aquaculture,* 114, 317,1993.

30. Matusiewicz, M. and Dabrowski, K., Characterization of ascorbyl esters hydrolysis in fish, *Comp. Bioch. Physiol.,* HOB, 739,1995.

«فصل ۱۰»

اثر ریز مغذی‌ها بر نیاز ماهیان و سخت‌پوستان به ویتامین «ث»

Rune Waagbø, Kristin Hamre and Amund Maage

چکیده

ماهیان استخوانی فاقد آنزیم های داخلی لازم برای ساخت(سنتز) ویتامین ث هستند و بنابراین نیاز به دریافت این ویتامین از طریق جیره غذایی دارند. حداقل میزان ویتامین ث مورد نیاز برای اغلب ماهیان در حدود mg/kg ٦۰ – ۱۰ در صورت استفاده از اسیدآسکوربیک آزاد می‌باشد. استفاده از میزانی کمتر از مقدار مذکور در جیره غذایی ماهیان موجب بروز عوارض شدید کمبودی مانند کاهش رشد، بدشکلی مهره‌ها، کمخونی، افزایش مرگ و میر و کاهش مقاومت به عفونت‌ها می‌گردد. اغلب مواد غذایی به کار رفته در جیره غذایی ماهیان و سخت پوستان بدلیل نوع مواد خام مورد استفاده و نیز تیمار حرارتی دارای اسیدآسکوربیک نیستند و بنابراین باید اسیدآسکوربیک در جیره غذایی به منظور تامین نیازهای رشد، سلامت و تولیدمثل افزوده شود. با استفاده از مشتقات منو و پلی فسفاته ویتامین ث با پایداری بالا در زمان عمل آوری و انبارداری غذا و نیز زیست فراهمی مناسب این ترکیبات، میزان ویتامین ث مورد نیاز در چندین گونه از ماهیان در حدود mg/kg ۲۰ و در میگوها mg/kg ۲۱۰ – ٤۰ گزارش شده است.

برهمکنش بین اسیدآسکوربیک و چند ریز مغذی در جیره غذایی ماهیان و در بافتهای آنها بر میزان

نیاز ماهیان به مکمل ویتامینی و وضعیت اسیدآسکوربیک اثر دارد. شدیدترین برهمکنش‌ها در ویتامین‌های آنتی اکسیدان و آستازانتین[1]، آهن و مس دیده می شود. مقادیر خوراکی اسیدآسکوربیک ممکن است باعث بهبود ایمنی ماهی و مقاومت آن در برابر استرس و بیماری‌های عفونی گردد و شاید نتایج متناقض موجود در این محدوده، تا حدودی به وسیله برهمکنش بین مواد مغذی و ویتامین ث توجیه شود.

در این فصل به بررسی برهمکنش‌های بین مواد ریز مغذی و ویتامین ث می‌پردازیم که شاید از عوامل مهم تاثیر گذار بر نیاز ماهیان و سخت پوستان به ویتامین ث و تامین رشد و سلامت این آبزیان می‌باشد.

۱-۱۰- مقدمه

ویتامین ث یا اسیدآسکوربیک ، یک ماده مغذی ضروری برای ماهیان استخوانی است (۱، ۲، ۳) چون این دسته از ماهیان فاقد فعالیت آنزیم GLO (E.C.11.3.8) می باشند که برای ساخت اسیدآسکوربیک ضروری است. در مورد میگوها بیان شده است که آنها توانایی محدودی برای ساخت ویتامین ث دارند (٦)، اگر چه به نظر نمی‌رسد که ساخت درونی ویتامین ث نیاز سخت‌پوستان جوان را برآورده سازد (۷). خوراندن ویتامین ث به گونه‌های پرورشی، به دلیل پایداری کم اسیدآسکوربیک در مدت تولید و انبارداری غذا، نقش‌های بیوشیمیایی ضروری و چندگانه این ماده در ماهیان و سخت پوستان و همچنین اثر آن بر کاهش استرس و تحریک سیستم ایمنی[2]، کانون توجه بسیاری از مطالعات بوده و این موارد در چندین مقاله مروری جدید با جزئیات کامل مورد بحث و بررسی قرار گرفته است (۸-۱۵).

اهمیت دقیق اختلالات مرتبط با ویتامین ث در آبزی پروری شناخته نشده، ولی کمبود ویتامین ث، موجب تلفات شدید و قابل توجهی در پرورش تجاری ماهی به ویژه طی دوره حساس شروع تغذیه فعال می شود (۹). تعیین نیاز دقیق به ویتامین ث بستگی به برهمکنش آن با سایر مواد مغذی و ترکیبات جیره غذایی و فاکتورهایی مانند سن، وضعیت سلامتی و تماس با شرایط نامساعد محیطی

[1] Astaxanthin
[2] Immunostimulating effects

دارد. مقادیر بالای اسیدآسکوربیک خوراکی ممکن است ایمنی و مقاومت ماهیان در برابر بیماری‌های عفونی را بهبود بخشد (۱۲، ۱۶). اگرچه، مطالعاتی نیز وجود دارد که اثرات تحریک ایمنی یا دخالت در پاسخ استرسی مقادیر بالای اسیدآسکوربیک خوراکی را رد می‌کند و شاید بتوان نتایج علمی متناقض موجود در این زمینه را تاحدودی با برهمکنش مواد مغذی و عوامل محیطی توجیه نمود. با وجود اینکه برهمکنش‌های بین اسیدآسکوربیک و سایر مواد مغذی، در بسیاری از مطالعات ماهیان دیده می شود، ولی مطالعات کمی به طور ویژه جهت بررسی اثرات سایر مواد مغذی و فاکتورهای محیطی بر متابولیسم اسیدآسکوربیک طراحی شده است و نیز بررسی‌های اندکی بر چنین برهمکنش‌هایی در ماهیان، متمرکز شده است (۹،۱۷، ۱۸). هدف از این فصل، ارائه دانش موجود درباره ریز مغذی‌هایی است که بر میزان اسیدآسکوربیک مورد نیاز برای تامین رشد و سلامت بهینه ماهیان و سخت پوستان از طریق ایجاد برهمکنش در سطوح تغذیه ای، روده ای و متابولیک، اثر گذار می باشند.

۲-۱۰- عوارض کمبود ویتامین ث و تعیین حداقل مقدار مورد نیاز

تحت شرایط آزمایشگاهی، ماهیان و سخت پوستانی که با جیره‌های غذایی دارای حداقل ویتامین ث تغذیه میشوند، علائم کمبود شدید ویتامین ث را نشان میدهند و معمولاً کاهش رشد، بدشکلی ستون مهره‌ها، تغییرات آسیب شناسی بافتی[1]، کمخونی، افزایش مرگ و میر، کاهش مقاومت در برابر عفونت‌ها در ماهیان مشاهده می‌شود (۱۹-۲۵). این علائم نشان دهنده بسیاری از نقشهای اساسی ویتامین ث در بدن می باشد اما حساسیت آنها با توجه به تغذیه زیر حد بهینه (نامطلوب) ویتامین ث متفاوت است.

اسیدآسکوربیک کوفاکتور ضروری برای هیدروکسیلازهای پرولین و لیزین است که هیدروکسیلاسیون(هیدروکسیل دار نمودن)اسیدهای آمینه خاص متصل به پروتئین‌ها را در پروکلاژن[2] کاتالیز می‌کند. نسبت‌های پایین تر هیدورکسی پرولین و هیدروکسی لیزین (که پیوندهای متقابل بین زیر واحدهای کلاژن را می‌سازند) منجر به آسیب نمو و عملکرد بافت پیوندی می‌شود که موجب

[1] Histopathological changes
[2] Procollagen

عوارضی مانند بدشکلی ستون مهره‌ها (لوردوزیس و اسکولیوزیس)، سایر بدریختی‌های استخوانی (آرواره ها و باله ها) و خونریزی می‌شود. با وجود اینکه برخی از مطالعات نتوانسته اند ضرورت ویتامین ث را برای سخت پوستان به اثبات برسانند (۲٦)، مطالعات دیگری نشان داده اند که جیره‌های غذایی فاقد اسیدآسکوربیک بر رشد و تشکیل کلاژن در این جانوران اثر دارند. به علاوه زمانیکه اسیدآسکوربیک در جیره غذایی میگوهای *P. stylirostris* و *P. californiensis* کمتر از حد بهینه باشد با سندرم مرگ سیاه[1] آنها در ارتباط است (۲۷، ۲۸). Kanazawa (۲۹) در مطالعه‌ای روی *P. japanicus*، اثر پیشگیری کننده وابسته به دوز اسیدآسکوربیک[2]، بر مرگ و میر میگوها را نشان داد.

در کنار نقش اسیدآسکوربیک به عنوان کوفاکتور در واکنش‌های آنزیمی، این ویتامین به عنوان یک عامل احیاء کننده نسبتا قوی و محلول در آب یا آنتی اکسیدان در بافت‌ها عمل کرده و در یک سری از واکنش‌های بیوشیمیایی خاص شرکت نموده (۹، ۳۰) و بنابراین عوارض کمبود و جذب کمتر از حد بهینه ویتامین ث در گونه‌های مختلف آبزیان متفاوت است (۲٤، ۲۵). به رغم اختلافات فاحش در روش‌های آنالیزی، مقادیر دقیق بافتی اسیدآسکوربیک به عنوان علامت بالینی کمبود آن استفاده می‌شود. بایستی غلظت‌های کبدی اسیدآسکوربیک به کمتر از ۲۰ µg/g و ۳۰ برسد تا عوارض کمبود ویتامین ث در بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان و گربه ماهی روگاهی مشاهده شود (۳۱)، درحالیکه عوارض کمبود ویتامین ث در بچه ماهیان آزادماهی اقیانوس اطلس در کمتر از ۱۰µg/g مشاهده می شود (۲۳). ایجاد مقادیر موثق آستانه ای برای اسیدآسکوربیک بافتی در فرآیندهای بیوشیمیایی وابسته به ویتامین ث در ماهیان و میگوها که بر اساس سن آنها تعیین شده است، پارامترهای ارزشمندی در تحقیقات آتی ویتامین ث خواهند بود.

نشانگرهای مورد استفاده در مطالعات انجام شده پیرامون بررسی مقدار ویتامین ث مورد نیاز، از حساسیت متفاوتی برخوردار است و براساس سودمندی آنها در تغذیه اسیدآسکوربیک، به سه دسته تقسیم می‌شوند: ۱. کمبود مطلق ویتامین ث که با عوارض ناشی از کمبود مانند بی اشتهایی، بی حالی، کاهش رشد، مرگ و میر، تشکیل بافت پیوندی معیوب به صورت هیدروکسی پرولین استخوان یا

[1] Black death
[2] Dosa-related

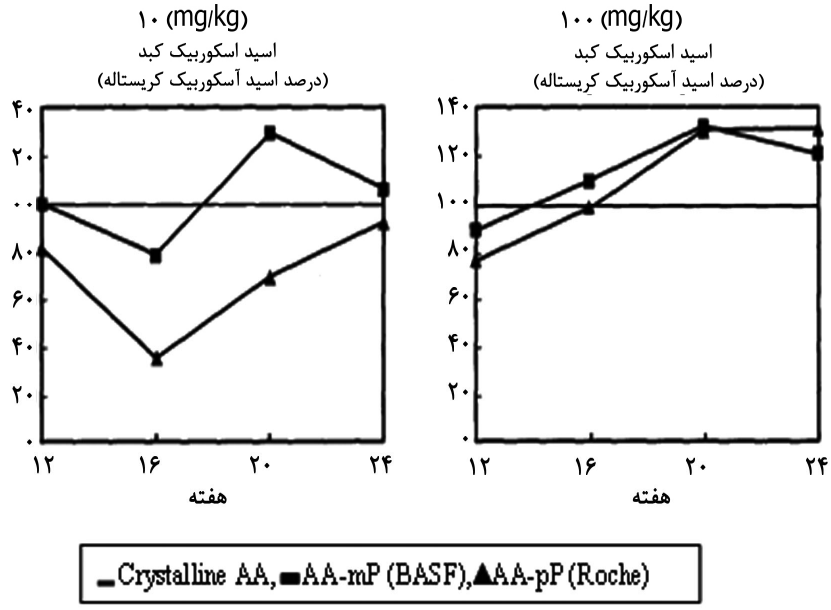
پوست، بدشکلی و هیپرپلازی لایه پوششی آبششی، خوردگی باله، بیرون زدگی چشم همراه با خونریزی، هیپرتیروزینمی، ورم شکم و خونریزی عضلانی نشان داده می‌شود ۲. وضعیت زیر حد مطلوب ویتامین ث که به صورت کم خونی، غلظت‌های پایین تر از حد مطلوب ویتامین ث در بافت، کاهش ایمنی و عفونت‌های ثانویه نشان داده می شود ۳. دوزهای بالا یا دوزهای دارویی ویتامین ث جیره غذایی که با اشباع بافت از ویتامین ث نشان داده می‌شود و اثرات مثبتی بر سم زدایی، مقاومت به عفونت‌ها و استرس، ایمنی اختصاصی و التیام زخم دارد.

حداقل مقادیر ویتامین ث مورد نیاز در گونه‌های مختلف ماهیان و سخت پوستان تحت شرایط مختلف پرورشی، مورد آزمایش قرار گرفته و با بکارگیری ترکیبات مختلف غذایی، تعیین شده است. اگرچه، وضعیت اسیدآسکوربیک نتیجه مقدار اسیدآسکوربیک جیره غذایی و ترکیب شیمیایی آن، ترکیب غذا و میزان مصرف آن و شرایط محیطی مختص به هر مکان می باشد. اغلب اسیدآسکوربیک جیره غذایی، از مخلوطهای ویتامینی افزوده شده به آن منشاء می‌گیرد زیرا بخش اعظم ویتامین ث موجود در مواد خام حین تبدیل نمودن آنها به پودر یا حین تولید غذا از بین می‌رود. در گذشته مشتقات پایدار و از لحاظ زیستی قابل دسترس(فراهم) ویتامین ث وجود نداشته و اکثر تحقیقات انجام شده در این زمینه با استفاده از اسیدآسکوربیک کریستاله بوده که این نوع ساده اسیدآسکوربیک بسیار ناپایدار است. پایداری پایین اسیدآسکوربیک کریستاله در جیره های غذایی ماهیان (٦، ٢٧،٣٤-٣٢)، بررسی دقیق میزان ویتامین مورد نیاز را با مشکل مواجه نموده است. اکسایش اسیدآسکوربیک در جیره‌های غذایی آزمایشی طی تولید و ذخیره سازی و تراوش آن به درون آب طی غذادهی، دانستن این موضوع که چه میزان اسیدآسکوربیک توسط ماهیان و سخت پوستان جذب می شود را مشکل می‌سازد. بنابراین بسیاری از برهمکنش‌های مشاهده شده بین ویتامین ث و مواد مغذی جیره غذایی، مربوط به بی ثباتی بالای اسیدآسکوربیک در جیره غذایی می باشد و احتمالا این موضوع منجر به برآوردهای خیلی بالا از حداقل نیاز به اسیدآسکوربیک در جیره‌های غذایی ماهیان (٦٠ mg/kg (٣١)، ١٠٠ mg/kg (٣٥)، تقریباً ٥٠ mg/kg (٢٥)) و میگوها (بیشتر از ١٠٠٠٠ mg/kg (٣٦)) شده است.

۱-۲-۱۰- منابع ویتامین ث

میزان ویتامین ث مورد نیاز به پایداری و فراهمی منبع ویتامینی وابسته بوده و تا به امروز ترکیبات مختلف اسیدآسکوربیک (ترکیبات پوشش دار، مشتقات ویتامینه) با توجه به پایداری آنها در جیره های غذایی طی مراحل عمل آوری و نگهداری و همچنین فعالیت زیستی[1] ویتامینی، مورد آزمایش قرار گرفته است. به نظر می‌رسد که تاکنون، مشتقات فسفاته اسیدآسکوربیک (اسیدآسکوربیک منوفسفات(AAMP) و اسیدآسکوربیک پلی فسفات(AApP)) کارآمدترین منابع ویتامین ث به کار رفته برای ماهیان و سخت پوستان باشند که دلیل آن فعالیت زیستی و پایداری بسیار بالای این ترکیبات است.در این بین، سولفات اسیدآسکوربیک (AAS)، کمترین میزان فعالیت ویتامینی را در ماهیان (تقریبا ۱۵ درصد) (۳۷، ٤۰، ٤۲) و سخت پوستان (تقریبا ۲۵ درصد) (۳۹، ٤۳) نشان می‌دهد. مشتقات اسیدآسکوربیک باید در روده قبل از جذب از طریق فرایند وابسته به یون سدیم، به اسیدآسکوربیک هیدرولیز شوند (٤٤، ٤٥). ممکن است نرخ های مختلف هیدرولیز توسط فسفاتازها و سولفاتازهای روده ای، اختلاف موجود در فعالیت زیستی بین مشتقات فسفاته و سولفاته را توضیح دهد (٤۱، ٤٦-٤۸). در مطالعه ای آزمایشگاهی پیرامون مشتقات فسفاته اسیدآسکوربیک، مشاهده گردید که هیدرولیز روده ای AApP به اسیدآسکوربیک و گروه فسفات، به نسبت AAMP از کارایی پایین تری برخوردار است (٤۸). چنین اختلافاتی در *P. monodon* سریع الرشد نیز مشاهده شد که AApP در حدود ٦٤ درصدAAMP فعالیت داشت (۳۹). به رغم این مشاهدات، مقادیر اسیدآسکوربیک کبدی اندازه‌گیری شده بین هفته های دوازدهم و بیست و چهارم پس از شروع تغذیه آغازین، در بچه ماهیان آزادماهی اقیانوس اطلس مشابه بود که مقادیر معادل (۱۰ -۱۰۰ mg/kg) اسیدآسکوربیک کریستاله، AAMP و AApP را دریافت کرده بود (شکل ۱-۱۰).

[1] Bioactivity



شکل۱-۱۰: مشتقات فسفاته AAmP (BASF, Germany) و AApP(Roche, Switzerland) در مقادیر پایین تر از حد بهینه (۱۰ mg AAequiv/kg) و بهینه (۱۰۰ mg AAequiv/kg) در جیره غذایی آزادماهی اقیانوس اطلس، از شروع تغذیه، در مقایسه با اسیدآسکوربیک کریستاله فعالیت زیستی مشابهی را نشان دادند. پس از گذشت ۲۰ هفته، مشتقات فسفاته در مقادیر ۱۰۰ میلی‌گرم اسیدآسکوربیک معادل به ازای کیلوگرم بطور معنی داری در مقایسه با اسیدآسکوربیک کریستاله، مقادیر کبدی اسیدآسکوربیک را افزایش داد. مقدار زیر حد بهینه موجب کمخونی گردید (Waagbø و Maage؛ اطلاعات منتشر نشده)

حداقل میزان ویتامین ث مورد نیاز چند گونه از آزادماهیان از قبیل بچه ماهیان آزادماهی اقیانوس اطلس (۲۳، ٤۹) و قزل آلای رنگین کمان (۵۰) با استفاده از جیره‌های غذایی مبتنی بر پودر ماهی و مشتقات فسفاته اسیدآسکوربیک، در حدود ۲۰-۱۰ میلی گرم معادل اسیدآسکوربیک به ازای هرکیلوگرم جیره غذایی تعیین شد. جیره‌های غذایی که ۱۰ میلی گرم اسیدآسکوربیک معادل را به ازای هر کیلوگرم با استفاده از اسیدآسکوربیک کریستاله، AAmP یا AApP، بصورت مکمل دریافت کرده بودند، موجب رشد و شکل‌گیری کلاژن شدند ولی غلظت‌های هموگلوبین خون، در

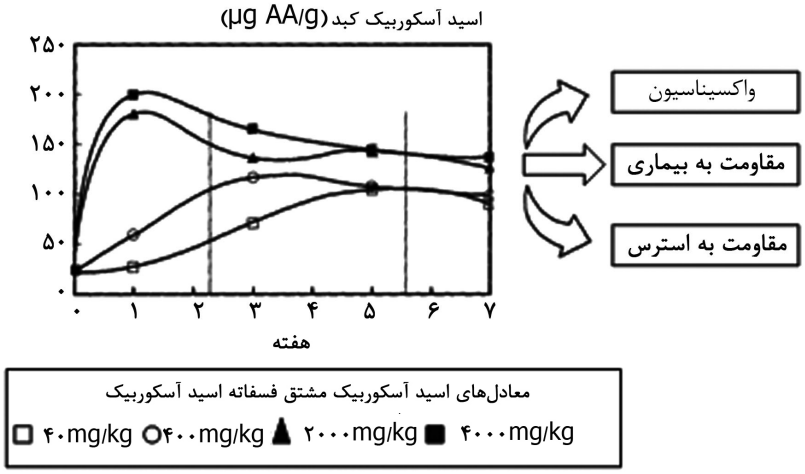
مقایسه با ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۱۰۰ mg equiv/kg، تضعیف شده بود و بنابراین سطح مکملی ۱۰ mg/kg، کمتر از حد بهینه در نظر گرفته شد (جدول ۱۰-۱). در سوف عظیم جثه *Lates calcarifer*، مقدار ۳۰ mg AAmP/kg، نیاز ماهی به ویتامین ث را مرتفع می‌سازد (۵۱). مقادیر بسیار بالای اسیدآسکوربیک برای چند گونه از میگوها (در محدوده mg AA/kg ۲۰۰۰۰-۱۰۰۰) توصیه شده است تا بتواند ناپایداری و هدر رفت (ناشی از تراوش به درون آب) ویتامین را طی مدت تماس با آب جبران نماید (٦، ۸، ۲۷، ۲۹). اگرچه با استفاده از AApP و AAS به عنوان منابع ویتامین ث جیره غذایی، اخیرا Hsu و Shiau (۳۹) دریافتند که به ترتیب ۳۰ mg AA equiv/kg و ۷۰ می‌توان نیاز بچه میگوهای ببری سیاه *P. monodon* به اسیدآسکوربیک را مرتفع سازد. سایر محققین، نیاز میگوها به اسیدآسکوربیک را بین ۲۱۰ mg/kg - ٤۱ بر حسب گونه (*P.monodon* و *P.vannamei*) و منبع فسفاته اسیدآسکوربیک تعیین نمودند (۷، ٤۳، ۵۲، ۵۳، ۵٤) ولی تاکنون از مقدار نیاز میگوی آب شیرین به ویتامین ث، اطلاعاتی در دست نمی باشد.

جدول۱-۱۰- میزان غلظت‌های اسیدآسکوربیک کل کبد، آهن کبد و هموگلوبین خون در آزادماهی اقیانوس اطلس تغذیه شده با سطوح صفر، ۱۰ و ۱۰۰ میلی گرم اسیدآسکوربیک ، AAmP، یا AApP به ازاء کیلوگرم جیره غذایی برای مدت ۲٤ هفته (Waagbø و Maage، اطلاعات منتشر نشده)

نوع و میزان جیره غذایی اسید آسکوربیک	اسیدآسکوربیک کبدی (µg/g)	آهن کبدی µg/g)	هموگلوبین خون (g/100 ml)
۰ AA	۱ a	۱۰٤	۳/٤ a
۱۰ AA	٤/۰ (۰/٦) a	۸۲ (۱)	۵/٦ (۰/۳) b
۱۰۰ AA	٤۸ (۱) b	۸۰ (۵)	۹/۲ (۰/۲) c
۱۰ AA-mP	٤/۳ (۰/۳)	۸۹ (۱٤)	٤/۸ (۰/۳) ab
۱۰۰ AA-mP	۵۹ (۲) bc	۸۷ (۳)	۸/۹ (۰/۳) c
۱۰ AApP	۷/۷ (۰/۳) a	۷۵ (۲)	٤/٤ (۰/۳) ab
۱۰۰ AApP	٦٤ (٤) c	۷۵ (۱)	۸/۵ (۰/۱) c

* حروف مختلف حاکی از اختلاف معنی دار در داخل هر ستون می‌باشد (n=3، P<0.05)

تناقضات زیادی بین حداقل نیاز به اسیدآسکوربیک و مقدار لازمه برای حفظ سلامت وجود دارد. نیاز عملی بر پایه حداقل نیاز، با یک حاشیه امنیت وسیع، فاکتورهایی همچون فراهمی و پایداری منبع اسیدآسکوربیک و تفاوت شرایط پرورشی و محیطی را مدنظر قرار می‌دهد. افزودن مکمل به جیره‌های غذایی به منظور آبزی پروری، باید نیازهایی همچون رشد، سلامت و تولید مثل را پوشش دهد. سطوح مدنظر اسیدآسکوربیک در غذاهای تجاری ماهیان، اغلب بیشتر از mg/kg ۱۰۰ حتی حین استفاده از مشتقات پایدار فسفاته، می‌باشد. Dabrowski (۵۵) بیان نمود که غلظت بهینه اسیدآسکوربیک جیره غذایی باید غلظتهای بافتی ثابت اسیدآسکوربیک در لارو ماهیان را حفظ نماید. در بچه ماهیان آزادماهی اقیانوس اطلس، خوراندن جیره‌های غذایی عملی حاوی mg/kg۲۰-۱۰ اسیدآسکوربیک از زمان شروع تغذیه فعال، غلظت پایدار اسیدآسکوربیک کبدی (از هفته ١٤ الی ٢٣) را به میزان µg/g ۱۰ ممکن می سازد (۲۳). اگرچه، احتمالا این میزان کمتر از حد دلخواه است و مقادیر اسیدآسکوربیک جیره غذایی بر غلظت اسیدآسکوربیک کبدی، اگرچه با کینتیک‌های مختلف – برحسب میزان ویتامین ث جیره غذایی (٥٦) و رژیم غذایی (٤٥) – اثرگذار است. احتمالا متابولیسم اسیدآسکوربیک شامل تنظیم جذب روده ای و دفع اسیدآسکوربیک مازاد است. نوسانات در وضعیت اسیدآسکوربیک مربوط با متابولیسم، جذب غذا و برهمکنش با فاکتورهای تغذیه ای، فیزیکی و محیطی، ممکن است موجب اثرات سودمند گذرا و وابسته به زمان بر سیستم ایمنی، مقاومت در برابر عفونت‌ها و پاسخ استرسی گردد (شکل ۲-۱۰) و ممکن است تا حدودی نتایج علمی متناقض موجود در این خصوص را توجیه کند.



شکل۲-۱۰: نوسانات در وضعیت اسیدآسکوربیک (مقدار خوراکی، جذب غذایی، متابولیسم و نرخ دفع) می‌تواند به طور موقت بر حسب مدت زمان تغذیه بر سیستم ایمنی و فیزیولوژیک موثر باشد (که توسط ستون های عمودی نشان داده شد که گروه‌هایی از ماهیان، وضعیت‌های متفاوتی را نشان می‌دهند).

۲-۲-۱۰- تغییر در مقدار ویتامین ث مورد نیاز طی چرخه حیات

برخی از مطالعات حاکی از کاهش مقدار اسیدآسکوربیک مورد نیاز همگام با افزایش سن ماهی می‌باشند (۱۷ ،۲۱، ۵۷-۵۹) که ممکن است به کاهش نرخ متابولیسم حین افزایش اندازه ماهی (٦۰) و افزایش ظرفیت ذخیره سازی اسیدآسکوربیک مربوط باشد. این پدیده برای میگوها نیز صادق است (۷).

تغذیه لارو ماهیان و میگوها با غذای زنده (زئوپلانکتون‌های طبیعی یعنی آرتمیا و *Temora longicornis* و...) ارتباط بین تغذیه سخت پوستان و ماهیان را نسبت به اسیدآسکوربیک نشان می‌دهد (٦۱). زئوپلانکتون‌های طبیعی که در تغذیه لارو ماهی هالیبوت استفاده می‌شوند، دارای مقدار قابل توجهی اسیدآسکوربیک (µg AA/g ۱۰۰۰-٦۰۰ به ازای وزن خشک که تقریبا برابر µg/g ۱۰۰-٦۰ به ازای وزن مرطوب می باشد) هستند (٦۲). ناپلی آرتمیای غنی شده با اسیدآسکوربیک به طور معمول برای تغذیه آغازین لارو استفاده می‌شود (٦۰، ٦۱) و بر حسب نوع

غنی سازی ممکن است میزان اسیدآسکوربیک در آن، بین µg/g ۲۳۰۰-۵۰۰ به ازای وزن خشک باشد (٦١). بنابراین غلظت‌های اسیدآسکوربیک جیره غذایی لارو ماهیان و سخت پوستان، به نظر می‌رسد که بیشتر از نیاز برآورد شده به اسیدآسکوربیک در ماهیانی باشد که از غذای فرموله شده از ابتدای شروع تغذیه فعال، استفاده می‌کنند (آزادماهیان). از غلظت‌های بالای اسیدآسکوربیک که در تخم ماهیان (۹، ۱۱، ٦٢-٦٤)، زئوپلانکتون‌های طبیعی و آرتمیای غنی نشده دیده می‌شود، گمان می‌رود که لارو ماهیان به میزان بالاتری از ویتامین ث برای گذراندن مرحله حساس شروع تغذیه خارجی احتیاج داشته باشند (٦١، ٦٣). مطالعات انجام شده، قابلیت دریافت میزان بیشتر ویتامین ث از آرتمیا نسبت به غذای تجاری خشک را نشان می‌دهند (٦٥). هرچند، لاروهای هالیبوت تغذیه شده با آرتمیای رشد یافته (۷۷۰ µg AA/g DW) یا غذای خشک حاوی AApP (۲۷۷ µg AA/g)، طی بیست روز، بخوبی رشد نمودند و مقادیر یکسانی از اسیدآسکوربیک را در بافت‌های خود نشان دادند (٦٣). برهمکنش بین اسیدآسکوربیک و سایر مواد مغذی در غذاهای زنده یا بدن لارو، ممکن است افزایش نیاز به اسیدآسکوربیک را در لارو ماهیان و سخت پوستان توجیه کند. میزان ثابت و وابسته به وزن اسیدآسکوربیک در لارو ماهی هالیبوت با وزن خشک بیشتر از ۱۰ میلی گرم، تغذیه شده با غذای زنده حاوی µgAA/g ۱۰۰۰-٦۰۰ وزن خشک، موجب اشباعیت اسیدآسکوربیک کل بدن می‌شود (٦٢). احتمالا وضعیت اسیدآسکوربیک بوسیله تنظیم جذب روده ای (٤٥) یا دفع اسیدآسکوربیک مازاد تعیین شده است، همچنانکه برای آزاد ماهی اقیانوس اطلس تغذیه شده با مقادیر افزایش یافته AAmP، نشان نداد (٥٦) (شکل۲-۱۰).

به رغم نقشهای مهم و محتمل ویتامین ث در اسمولتیفیکیشن آزادماهیان (ساخت کلاژن، هورمون‌ها و ناقلین عصبی[1] و همچنین تغییر فعالیت آنزیمی و متابولیسم عمومی)، مطالعه ای بر آزادماهیان اقیانوس اطلس، اثر مورد انتظار – افزایش نیاز به ویتامین ث جیره غذایی طی اسمولتیفیکیشن – را نشان داده شده است (٦٦).

ویتامین ث، نقش‌های مهمی را از طریق دخالت در ساخت هورمون‌ها (۵۸) و زرده سازی (۵۸) در تولید مثل بازی می کند و منجر به حفظ اسیدآسکوربیک تخمک‌ها و بهبود کیفیت گامت‌ها می شود

[1] Neurotransmitter

(۹، ٦٤، ٦٧، ٦٨). آسیبهای پراُکسیداتیو روی سلول‌های اسپرماتوزوئید قزل آلای رنگین کمان نر در زمان تکثیر، می‌تواند از طریق کاربرد مقادیر کافی ویتامین ث در جیره غذایی مولدین، پیشگیری شود (٦٩).

چندین مطالعه حاکی از آنست که ماهیان تحت شرایط نامناسب پرورشی از قبیل آلودگی به عوامل بیماری زا (۷۰، ۷۱) و آلودگی‌های زیست محیطی (۹، ۷۲-۷۵، ١٤٦) نیازمند دریافت میزان بیشتری از اسیدآسکوربیک از طریق غذای مصرفی می باشند. به طور مشابهی نشان داده شده است که میزان بالاتر ویتامین ث جیره غذایی می‌تواند اثرات مثبتی بر عملکردهای ایمنی داشته باشد و مقاومت ماهی را نسبت به بیماری‌ها و استرس بیفزاید (۱۲، ١٦، ٧٦).

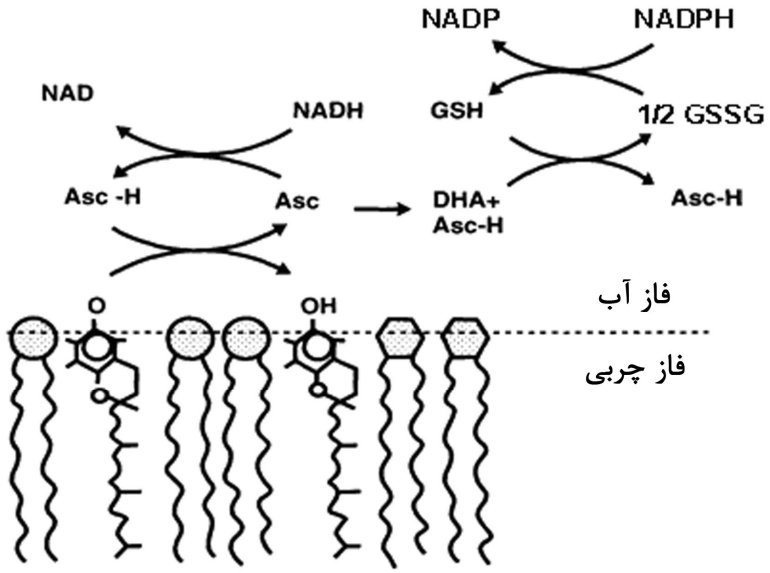
۳-۱۰- برهمکنش با مواد مغذی

برهمکنش بین اسیدآسکوربیک و سایر مواد مغذی بر وضعیت این ویتامین و مقدار نیاز به آن اثرگذار است (۹، ۱۸) و قوی ترین برهمکنش‌های این ماده با ویتامین‌های آنتی اکسیدان، آستازانتین و همچنین مواد معدنی مثل آهن و مس، دیده می‌شود.

۱-۳-۱۰- برهمکنش با ویتامین E

با وجود این که ویتامین ث به عنوان عامل از بین برنده رادیکال‌های آزاد در فاز آبی عمل میکند، ویتامین E مهمترین آنتی اکسیدان محلول در چربی در بافت‌های جانوری است (۷۷). برهمکنش بین این دو ویتامین ممکن است توام با حفاظت همزمان مولکول‌های قابل حل در آب و چربی، در برابر حمله رادیکال‌های آزاد باشد. به علاوه، فرضیه‌ای که نخستین بار توسط Tappel (۷۸) ارائه شد، بیان می‌کند که ممکن است اسیدآسکوربیک، رادیکال‌های ویتامین E تولید شده در فرآیند از بین بردن رادیکالهای چربی پروکسیل را کاهش دهد. اسیدآسکوربیک اکسید شده، توسط گلوتاتیون در داخل بدن احیاء شده و در مقابل،گلوتاتیون اکسید شده توسط NADPH مجددا احیاء می شود (۷۹، ۸۰). بنابراین به نظر می‌رسد که دفاع ردوکس[1] توام با تولید معادل های احیاء کننده از طریق متابولیسم انرژی باشد (شکل۳-۱۰).

[1] Red-ox



شکل ۳-۱۰: مکانیزم پیشنهادی برای تولید مجدد آلفاتوکوفرول از رادیکال توکوفروکسیل (Tappel, 1962). اسیدآسکوربیک (Asc) در این فرایند اکسیده می‌شود، ولی می تواند بطریقه شیمیایی یا آنزیمی بوسیله گلوتاتیون (Winkler و همکاران، ۱۹۹٤؛ Meister، ۱۹۹٤) یا تنها بطریقه آنزیمی بوسیله NADH (Meister, 1994) بازتولید شود. گلوتاتیون اکسید شده (GSSG) بوسیله آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز با مصرف NADPH تولید شده در مسیرپنتوز فسفات ، احیاء می‌شود (Meister, 1994).

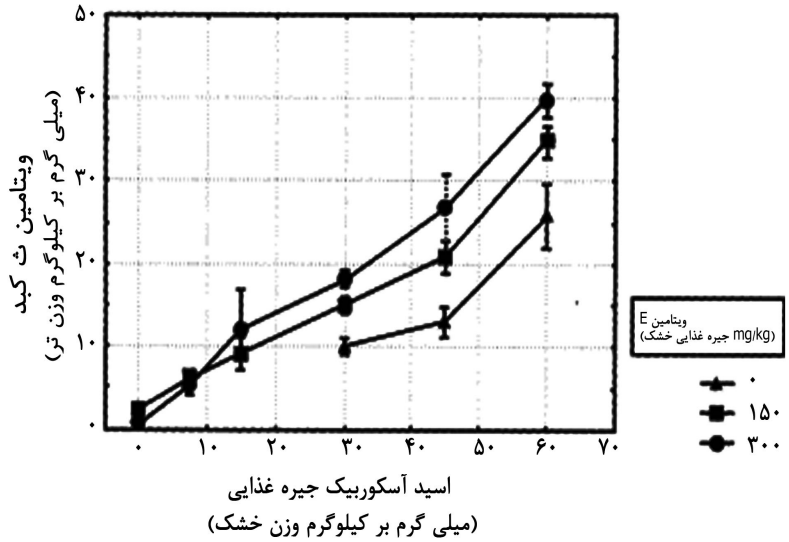
کاهش میزان رادیکال‌های ویتامین E توسط اسیدآسکوربیک در بسیاری از سیستم‌های *in vitro* یعنی در محلول هموژن (۸۱)، لیپوزوم‌ها (۸۲)، اندامکها (۸۳) و لیپوپروتئین‌های با وزن مولکولی کم[1] (LDL) (۸٤) نشان داده شده است. اگرچه نتایج این آزمایشها گمراه کننده اند (۸۵، ۸٦)، ولی امروزه پذیرفته شده است که این فرایند به صورت طبیعی(*in vivo*) نیز انجام می‌گیرد. اختلاف پتانسیل استاندارد واکنش، آن را از لحاظ ترمودینامیکی در pH فیزیولوژیک ممکن می‌سازد (۸۷) ولی برای انجام واکنش باید امکان برهمکنش بین اجزا، وجود داشته باشد. تصور می شود که گروه فنلی فعال و قطبی آلفاتوکوفرول می تواند در حد فاصل بین لیپید و اجزا محلول در آب، برای مثال در

[1] Low density lipoprorein

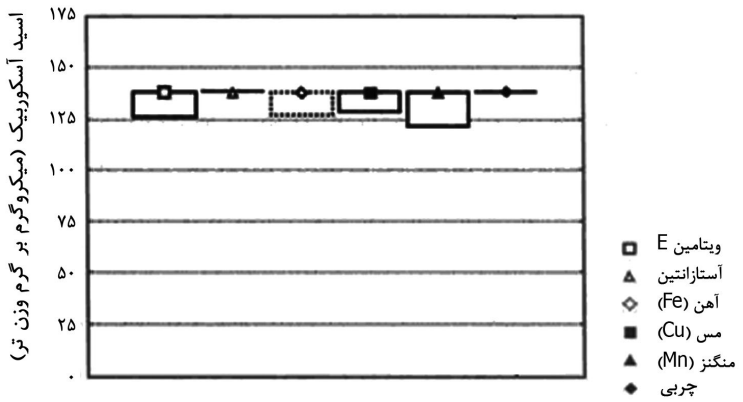
سطح غشای سلولی قرار گیرد (۸۸) که در این موقعیت می‌تواند با مولکولهای محلول در آب مانند اسیدآسکوربیک واکنش دهد. به علاوه، غلظت‌های واکنشگرها و محصولات بر سرعت و جهت واکنشهای ردوکس، بر طبق معادله Nernst اثر می گذارد.

Poston و Combs (۸۹)، برهمکنش اسیدآسکوربیک و ویتامین E را با سلنیوم در آزادماهی اقیانوس اطلس گزارش نمودند. آنها دریافتند که هر دو ویتامین از عوارض کمبود سلنیوم جلوگیری نموده و نتیجه گرفتند که آگاهی از وابستگی بین این مواد، ممکن است به توضیح برخی از تناقض های موجود در مقادیرگزارش شده برای آنها کمک کند. به رغم وجود این مسئله، مطالعات اندکی در ماهیان روی برهمکنش بین اسید آسکوربیک و ویتامین E (و سلنیوم) انجام شده است.

یکی از راه‌هایی که ممکن است ویتامین E بر نیاز به ویتامین ث اثر گذار باشد، از طریق تغییر ماندگاری ویتامین ث است. در بچه ماهیان آزادماهی اقیانوس اطلس که با جیره‌های حاوی ۰-۶۰mgAA/kg و ۰-۲۲۰ mg/kg ویتامین E تغذیه شده بودند (۴۹) مشاهده گردید که میزان بالای آلفاتوکوفرول در جیره غذایی (بالاتر از ۱۵ mg/kg) منجر به افزایش جذب اسیدآسکوربیک در کبد می شود (شکل ۱۰-۴) و نتایج مشابهی نیز توسط White و همکاران (۹۰) در مورد همین گونه گزارش گردید. با این وجود تغذیه آزادماهی اقیانوس اطلس در مرحله پس از اسمولت با جیره غذایی حاوی مقادیر افزایش یافته ویتامین E از ۸۰ به ۴۰۰ mg/kg، کاملا بی اثر یا دارای اثر منفی ناچیزی بر مقادیر ویتامین ث کبدی در ماهیانی بود که با ۶۰ mg AApP به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی تغذیه شده بودند (شکل ۱۰-۵). این تناقض با تمایل ویتامین E برای عمل کردن به عنوان پراُکسیدان وقتی در مقادیر بالا موجود باشد، به ویژه زمانی که میزان اسیدآسکوربیک کم باشد، توجیه می شود (۹۱، ۹۲). متناوباً، این موضوع ممکن است تفاوت‌های موجود در مرحله تکاملی ماهیان را منعکس سازد چرا که کارایی جذب ویتامین E و اسیدآسکوربیک در آزادماهیان طی مراحل تکاملی، تغییر می‌کند(۴۹) (مبحث قبلی را ملاحظه نمایید).



شکل٤-١٠ : غلظت اسیدآسکوربیک کبدی دربچه ماهیان آزادماهی اقیانوس اطلس تغذیه شده با جیره غذایی حاوی مقادیر مختلف اسیدآسکوربیک (به صورت AAmP) و آلفا توکوفرول (به صورت استر استات) برای مدت ۲۲ هفته.n=3 , میانگین ± انحراف معیار از میانگین(Hamre و همکاران، ۱۹۹۷) (برگرفته از Hamre و همکاران، با کسب اجازه از مجله علمی پژوهشی *Free Radical Biology and Medicine*، انتشارات Elsevier)



شکل۵-۱۰ : غلظت اسیدآسکوربیک (µg/g) در کبد پست اسمولت آزادماهی اقیانوس اطلس تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۶۰ mg AA/kg و دو سطح از ویتامین E (۸۰ یا ۴۰۰ mg/kg)، آستازانتین (۱۰ یا ۵۰ mg/kg)، چربی (۱۷۰ یا ۳۳۰ mg/kg)، آهن (۷۰ یا ۱۲۰۰ mg/kg)، مس (۸ یا ۱۱۰ mg/kg) و منگنز (۱۰ یا ۲۰۰ mg/kg) در طرح آماری فاکتوریل. جیره های غذایی به مدت ۲۲ هفته به ماهیان خورانده شدند. نقاط نشان دهنده غلظت اسیدآسکوربیک کبدی است و میله ها نشان دهنده میزان و جهت اثرات معنی دار خوراندن مقادیر بالای متغیرهای مغذی است. ضرایب رگرسیونی ($P<0.05$) با استفاده از رگرسیون خطی چندگانه محاسبه شده است (Hamre و همکاران، اطلاعات منتشر نشده)

Rønnestad و همکاران (۶۲) تعادل بدنی ویتامین ث و E را در لارو هالیبوت *Hippoglossus hippoglossus*، بررسی نموده و دریافتند که بیش از ۹۵ درصد اسیدآسکوربیک و حدود ۳۰ درصد آلفاتوکوفرول به محض شروع تغذیه فعال، از کیسه زرده به پیکره ماهی منتقل می شوند. این مسئله سطح پایین ولی پایدار آلفاتوکوفرول (۲۵ µg/g DW ≈) را در لارو دارای کیسه زرده موجب می شود و همزمان با مصرف سایر مواد مغذی موجب افزایش غلظت آلفاتوکوفرول در مابقی کیسه زرده می شود. مقارن با جذب نهایی کیسه زرده، غلظتهای آلفاتوکوفرول در بدن لاروها به میزان پنج برابر افزایش می یابد ولی ویتامین E مازاد به سرعت دفع می‌شود. سپس میزان آلفاتوکوفرول بدن لاروها در میزان ۵۰-۱۰۰µg/g وزن خشک ثابت باقی می‌ماند. با اندکی تاخیر نسبت به اوج آلفاتوکوفرول، غلظت‌های اسیدآسکوربیک به دو برابر افزایش می‌یابد ولی این افزایش نمی تواند با انتقال

اسیدآسکوربیک حین جذب نهایی کیسه زرده یا مقادیر اسیدآسکوربیک غذای زنده توجیه شود. بنابراین پیشنهاد می شود که مقادیر بالای ویتامین E در لاروها، در مرحله پایانی جذب کیسه زرده، جذب اسیدآسکوربیک را به همان شکل در آزادماهی اقیانوس اطلس القاء نموده است (٤٩).

میزان بالای ویتامین E در جیره غذایی سبب افزایش جذب اسیدآسکوربیک توسط کبد در غلظتهای پایین اسیدآسکوربیک نمی شود (شکل ۱۰-٤) و کمبود ویتامین ث در ماهیانی که با جیره‌های غذایی حاوی میزان بالای ویتامین E تغذیه شده بودند، زودتر از ماهیانی دیده می شود که با جیره‌های غذایی حاوی مقادیر متوسط ویتامین E تغذیه شده بودند (٤٩). ولی این اختلاف آنقدر ناچیز است که هیچ اثری بر نیاز به اسیدآسکوربیک ندارد ولی سبب تقویت این فرضیه میشود که رادیکال ویتامین E توسط ویتامین ث در بافت‌های ماهیان کاهش می یابد. اگر قرار باشد که بازیافتی انجام بگیرد، باید اسیدآسکوربیک کافی به منظور پیش گیری از تجمع رادیکال‌های ویتامین E وجود داشته باشد، همچنان که این رادیکال‌ها ممکن است به عنوان پراُکسیدان عمل نموده و اکسایش چربی را افزایش دهند (۹۲).

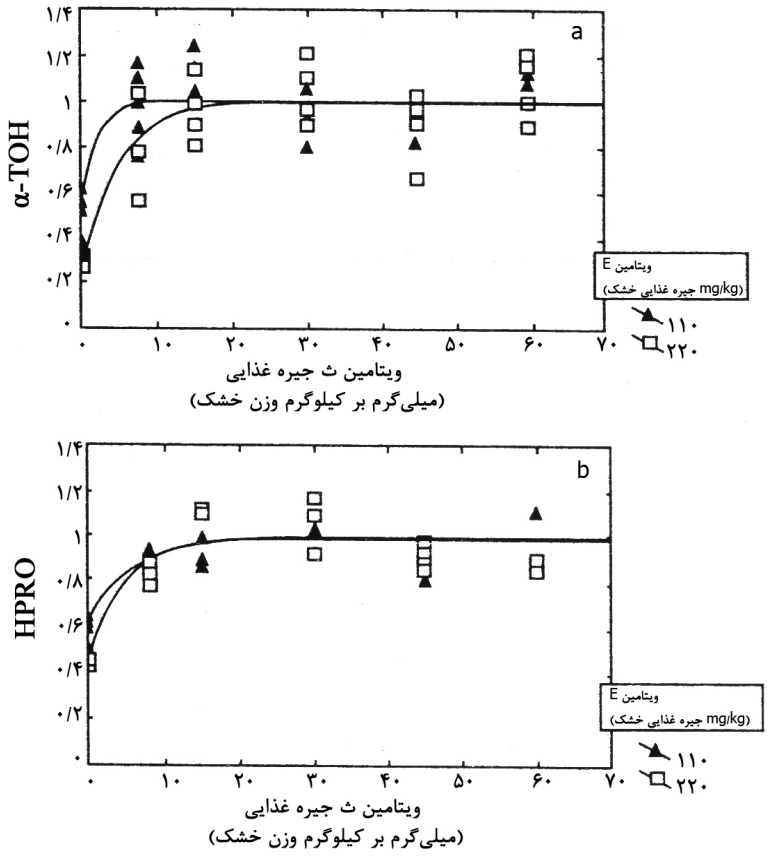
بچه ماهیان آزادماهی اقیانوس اطلس مواجه با کمبود ویتامین ث، افت و کاهش شدیدی را در غلظت ویتامین E کبدی به موازات کاهش چشمگیر غلظت هیدروکسی پرولین ستون مهره‌ها از خود نشان دادند (شکل ٦-۱۰) که نشان می‌دهد که با خوراندن جیره غذایی دارای مقادیر کافی اسیدآسکوربیک ، برخلاف جیره غذایی فاقد آن، می توان کمبود ویتامین E را جبران کرد. افزایش اسیدآسکوربیک جیره غذایی تا سطحی بیشتر از حداقل میزان مورد نیاز، هیچ اثر دیگری بر جذب ویتامین E در بدن ماهی نداشت. مطالعات متعددی نشان می‌دهد که اسیدآسکوربیک، می‌تواند در جانوران خشکی زی به جای ویتامین E عمل کند (۸۵)، در حالی که سایر محققین چنین اثری را مشاهده نکرده اند (۸٦). این تناقضات تا حدودی با مقادیر کافی ویتامین ث توجیه می‌شود در حالی که ویتامین ث زمانی می‌تواند اثر منفی بر ویتامین E داشته باشد که جیره غذایی فاقد آن باشد.

کاربرد ویتامین ث به صورت مکمل ویتامینی کمی بیشتر از میزان حداقل مورد نیاز در جیره غذایی آزادماهیان، اثرات قابل توجهی بر نیاز به ویتامین E دارد، همان طوری که توسط Frischknecht و همکاران (۹۳) و Hamre و همکاران (٤٩) نیز بیان شده است. در هر دو مطالعه، ماهیان با جیره‌های

غذایی فاقد مکمل ویتامین E تغذیه شده بودند و از مواردی همچون مرگ و میر، کاهش رشد، کم خونی و شکنندگی گلوبول‌های قرمز، به وسیله دوزهای مختلف ویتامین ث حفاظت شده بودند. Hamre و همکاران (٤٩) نیز دریافتند که اسیدآسکوربیک از اکسایش چربی در کبد و تجمع گرانول‌های اتوفلورسنت[1] در گلوبول‌های قرمز، جلوگیری می‌کند. از آنجایی که اسیدآسکوربیک اثری بر ویتامین E این ماهیان نداشت، عنوان گردید که نقش حفاظتی اسیدآسکوربیک کاهش چالش اکسایشی[2] ایجاد شده بر موجود زنده با تقلیل میزان رادیکالهای محلول در آب است. بر اساس این مطالعات، می‌توان نتیجه گرفت که افزودن اسیدآسکوربیک در مقادیری بالاتر از حداقل مورد نیاز ممکن است از کمبود ویتامین E در آزادماهیان جلوگیری کند.

برخلاف آزمایشهای انجام شده روی آزادماهیان، Gatlin و همکاران (٩٤) کمبود ویتامین E را در گربه ماهیان روگاهی *Ictalurus punctatus*، مشاهده نکردند که با جیره‌های غذایی فاقد ویتامین ث و E تغذیه شده بودند. نتایج به دست آمده از مطالعات متعدد پیشنهاد می‌کند که ماهیان تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی مقادیر کم اسیدهای چرب غیر اشباع، به طور مشخصی به کمبود ویتامین E مقاوم هستند (٩٥-٩٧). چالش اکسایشی موجود زنده و در نتیجه نیاز به ویتامین E در پاسخ به افزایش اسیدهای چرب غیر اشباع در جیره غذایی افزایش خواهد داشت (٩٨-١٠٠). در مطالعه انجام شده توسط Galtin و همکاران (٩٤) منبع چربی جیره غذایی، ٤ درصد روغن خوک بود و بنابراین یک توضیح ممکن برای فقدان علائم کمبود ویتامین E در این مطالعه ممکن است این باشد که ماهیان در معرض استرس اکسایشی کوچکی قرار گرفته بودند.

[1] Autofluorescent
[2] Oxidative challenge



شکل۶-۱۰ : غلظت‌های آلفا توکوفرول کبد (A) و هیدروکسی پرولین مهره (B) در پاسخ به اسیدآسکوربیک خوراکی در بچه ماهیان آزادماهی اقیانوس اطلس تغذیه شده با جیره غذایی حاوی مقادیر مختلف AAmP و استات آلفاتوکوفرول برای مدت ۲۲ هفته. نتایج به صورت بخشی از غلظت‌های میانگین آلفا توکوفرول و هیدروکسی پرولین در زمان کافی بودن اسیدآسکوربیک ارایه شده است. هر نقطه بیانگر یک نمونه ادغام شده از ۱۰ماهی است، و ۵ نمونه برای هر تیمار وجود دارد. مهره و کبد از همان ماهیان جدا شد (Hamre *et al.*, 1997) (برگرفته از Hamre و همکاران، با کسب اجازه از مجله علمی پژوهشی *Free Radical Biology and Medicine* ، انتشارات Elsevier)

۲-۳-۱۰- رتینوئیدها و کاروتنوئیدها

هیپرویتامینوزیس[1] (عارضه مصرف زیاد ویتامین) ویتامین A، اثری بر نیاز به ویتامین ث در ماهی قزل آلای رنگین کمان ندارد و حتی با افزایش ویتامین A به میزان IU ۱۲٤۰۰۰ یا mg/kg ۳۷/۲ جیره غذایی عوارض کمبود ویتامین ث پدیدار می شود (۱۰۱). مطالعات متعددی نشان می‌دهد که ویتامین A مازاد جیره غذایی، ممکن است باعث ایجاد بدشکلی در ستون مهره ها شود و به نظر نمی رسد که این آسیب شناسی مربوط به کمبود ویتامین ث باشد (۱۰۲). کاروتنوئیدها و رتینوئیدها ممکن است به عنوان اجزای سیستم دفاع آنتی اکسیدانی سلول در جلوگیری از پراکسیدان چربی، باهم‌بیشی داشته باشند (۱۰۳). Christiansen و همکاران (۱۰٤) در آزمایشهای تغذیه‌ای روی آزاد ماهی اقیانوس اطلس با جیره‌های غذایی خالص، به این نتیجه رسیدند افزودن آستازانتین بصورت مکمل غذایی و وضعیت آن با وضعیت تعدادی از ویتامینهای آنتی اکسیدانی همچون اسیدآسکوربیک، بر همکنش دارد. به نظر می‌رسد که این اثر مربوط به خاصیت عمومی جایگزینی آنتی اکسیدانی[2] در مقادیر ناچیز تغذیه ای آستازانتین باشد که منتهی به کمبود می شود. نتایج ما نشان می دهد که مقادیر آستازانتین جیره غذایی (mg/kg ۵۰-۱۰) در جیره‌های غذایی کاربردی به طور معنی داری بر وضعیت اسیدآسکوربیک در آزادماهی اقیانوس اطلس پرورش یافته در دریا اثر ندارد (شکل ۵-۱۰).

۳-۳-۱۰- سایر ویتامین‌ها

مطالعات اندکی پیرامون برهمکنش بین اسیدآسکوربیک و سایر ویتامین‌های محلول در آب، انجام پذیرفته است و بیشتر این مطالعات در زمینه اثر میزان بالای ویتامین ث جیره غذایی بر متابولیسم و پایداری ویتامینی است (۱۰۵).

جیره های غذایی درجه بندی شده با ویتامین ث (صفر، ۲۰، mgAAmP/kg ۲۰۰) بر پاسخ گربه ماهی روگاهی به فولات جیره اثر دارد و بالعکس که این موضوع با آسیب شناسی گلوبول‌های قرمز توسط Duncan و Lovell (۱۰٦) نیز بیان شده است. علائم کمبود ویتامین ث که به صورت افزایش میزان مرگ و میر و تغییرات پارامترهای خونی ثبت شده است، با افزایش میزان اسید فولیک

[1] Hypervitaminosis
[2] Antioxidant-sparing action

جیره غذایی (صفر، ۰/٤، mg/kg ٤) کاهش می یابد. اگرچه این افزایش بر تاخیر رشد و بدشکلی استخوانی ناشی از کمبود ویتامین اثری ندارد. با افزودن ۲۰ و ۲۰۰ میلی گرم ویتامین ث به جیره غذایی، محققین نشان دادند که اسیدآسکوربیک جیره غذایی، نیاز به فولات را در گربه ماهی روگاهی تقلیل می‌دهد (۱۰٦). افزایش اسیدآسکوربیک جیره غذایی، عوارض کمبود فولات را تقلیل داده و بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که نیاز به اسیدآسکوربیک به منظور حفظ رشد و زنده مانی و افزایش سلامت ماهیان افزایش می یابد، زمانیکه فولات کمی به جیره غذایی افزوده شود. ممکن است برهمکنش بین اسیدآسکوربیک و فولات مربوط به نقش اسیدآسکوربیک به عنوان یک عامل کاهنده و آنتی اکسیدان باشد که از اشکال احیاء شده فولات در متابولیسم حفاظت می‌کند.

فلاونوئیدها[1] سبب ایجاد نوعی حفاظت آنتی اکسیدانی می‌شوند و ممکن است اسیدآسکوربیک بر این خاصیت موثر باشد. Dabrowski و همکاران (۳۸) اذعان داشتند که ماندگاری اسیدآسکوربیک استخراج شده از آرتمیا در مقایسه با اسیدآسکوربیک استخراج شده از غذاهای خشک بالاتر است که می‌تواند مربوط به برهمکنش فلاونوئیدهای موجود در آرتمیا و مصرف اسیدآسکوربیک در لارو ماهیان باشد. با این وجود حضور فلاونوئید معمول، در جیره غذایی گربه ماهی روگاهی، سبب بهبود وضعیت اسیدآسکوربیک نمی شود (۱۰۷). بنابراین پتانسیل استفاده از فلاوونوئیدها به عنوان آنتی‌اکسیدان در جیره غذایی ماهیان، باید مورد بررسی و ارزیابی بیشتر قرار بگیرد.

خاصیت آنتاگونیستی بین مقادیر بالای اسیدآسکوربیک جیره غذایی و سایر ویتامین‌های محلول در آب در انسان‌ها به دلیل افزایش دفع یا تخریب پیشنهاد شده است ولی مطالعات جدیدتر این برهمکنشها را مردود می‌داند (۱۰۵).

Kitamura و همکاران (۱۰۸) به مطالعه‌ای روی خوکچه هندی اشاره دارند که در آن نیاز به اسیدآسکوربیک بر اثر کمبود میزان تریپتوفان افزایش یافته بود که می‌تواند توضیح دهنده پدیده اسکولیوزیس در ماهی قزل آلای رنگین کمانی باشد که دچار کمبود تریپتوفان بوده است (۱۰۹).

[1] Flavonoids

٤-۳-۱۰- برهمکنش اسیدآسکوربیک و مواد معدنی

اسیدآسکوربیک یک عامل کاهنده قوی دو الکترونی است و براحتی در مراحل تک الکترونی با یونهای فلزی و کمپلکس‌های فلزی اکسید می‌شود. اسیدآسکوربیک به عنوان یک عامل کاهنده و تشکیل دهنده شلات[1]، با مواد معدنی موجود در جیره‌های غذایی و همچنین بافت‌های موجود زنده واکنش می‌دهد. به طور کلی، اسیدآسکوربیک جذب رودوی آهن و سلنیوم را تشدید کرده و جذب مس، نیکل و منگنز را کاهش می دهد و اثرات خفیفی بر جذب کلسیم، روی و کبالت دارد و همچنین فاقد هر گونه اثری بر فلزات سنگینی مانند جیوه و کادمیوم است (۳۰). به علاوه، دریافت مواد معدنی از آب منبع مهمی برای تامین مواد و عناصر معدنی ضروری بدن آبزیان است ولی ممکن است سبب ایجاد مشکلاتی ناشی از جذب سموم و آلاینده‌های موجود در آب گردد. در ادامه این فصل، موارد فوق در مورد ماهیان به بحث گذاشته خواهند شد و البته اطلاعات کمی در مورد سخت پوستان وجود دارد.

٥-۳-۱۰- آهن

برهمکنش اسیدآسکوربیک و آهن یک حوزه تحقیقاتی کلاسیک در تغذیه انسان و جانوران می‌باشد. به علت وجود پدیده شایع کمبود آهن در بین انسان‌ها، اغلب این برهمکنش‌ها بسیار مورد توجه قرار گرفته و با توجه به چگونگی اثر مثبت ویتامین ث بر تغذیه و متابولیسم آهن، مورد بحث قرار می‌گیرد و بیان شده است که در تعیین نیاز انسانها به اسیدآسکوربیک، جذب آهن باید مدنظر باشد (۱۱۰، ۱۱۱). با این وجود در تغذیه ماهیان، میزان و شکل عنصری آهن موجود در جیره غذایی ممکن است بر مقدار اسیدآسکوربیک مورد نیاز از طریق خصوصیات پراُکسیدانی موثر بوده و عنوان شده است که افزایش میزان آهن جیره غذایی، سبب بهبود سلامت ماهیان می‌شود (به مقالات Blazer (۱٦)، Waagbø (۱۲) و Andersen (۱۱۲) رجوع شود).

افزودن اسیدآسکوربیک در میزانی کمتر از حد بهینه (mg/kg ۱۰- ۱) یا وضعیت نامطلوب ذخیره اسیدآسکوربیک بدنی - به رغم افزودن آهن کافی به جیره غذایی - منجر به بروز عوارض کم‌خونی

[1] Chelate

ناشی از کمبود آهن در آزادماهیان جوان و بالغ می‌شود (۴۰، ۵۸، ۱۱۳) (جدول ۱۰-۱). مولدین قزل آلای رنگین کمان تغذیه شده با جیره‌های غذایی فاقد اسیدآسکوربیک، طی مرحله زرده سازی، در مقایسه با ماهیانی که مقدار کافی اسیدآسکوربیک را دریافت نموده بودند، کمخونی شدیدی را از خود نشان دادند (۵۸). غلظت هموگلوبین خون در ماهیان دچار کمبود ویتامین ث، قویا همبستگی منفی با شاخص کبدی دارد که این مسئله نشان می‌دهد که آهن هِم مادری جهت تامین آهن تخمدان استفاده می‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد که فقدان اسیدآسکوربیک جیره غذایی یا مقدار اندک آن بر جذب و متابولیسم آهن در ماهیان موثر بوده و احتمالا مرتبط با فقدان توانایی کاهندگی مناسبی است که برای موبیلیزاسیون آهن از ذخیره بدنی لازم است (۱۱٤).

اسیدآسکوربیک جیره غذایی جذب رودوی آهن غیر هِم را در انسانها از طریق تبدیل آهن فریک به فرو تسهیل می‌کند و همچنین سبب افزایش حلالیت آهن در pH قلیائی بوسیله آهن شلاته می‌شود (۱۱۰، ۱۱۵). جذب آهن در قزل آلای رنگین کمان به طور مثبتی توسط جیره‌های غذایی حاوی اسیدآسکوربیک کریستاله در مقابل جیره‌های غذایی حاوی اسیدآسکوربیک آزاد افزایش می‌یابد ولی در مورد جیره‌های حاوی اسیدآسکوربیک سولفاته این حالت دیده نمی شود (٤۷). اگرچه سایر مطالعات این حوزه، اطلاعات قانع کننده‌ای را از خود نشان نداده اند (٤۱، ۱۱۳). در صورت استفاده از غلظت‌های آهن کبدی، ممکن است اثرات خفیف ایجاد شده بر جذب با گذشت زمان و متابولیسم عمومی آهن مشخص نگردد. غلظت‌های آهن سرم خون پس از سه هفته به طور معنی داری (۱/۱۵-۰/۷ µg/ml) با افزایش AApP جیره غذایی (۴۰۰۰-۲۰ mg AA equiv/kg) افزایش می‌یابد. از آنجائیکه غلظت اسیدآسکوربیک کبد این برهمکنش را منعکس نمی سازد، نشان دهنده اثر مثبت ولی وابسته به زمان بر جذب است (Waagbø و Varlhac، اطلاعات منتشر نشده). به نظر نمی رسد که افزایش مقادیر مشتقات فسفاته اسیدآسکوربیک (AApP یا AAMP) در جیره‌های غذایی بر وضعیت آهن کبدی (منعکس کننده جذب و متابولیسم) در بچه ماهیان یا اسمولتهای آزادماهی اقیانوس اطلس اثر داشته باشد (۱۱٦) (جدول ۱۰-۱). ممکن است افزایش میزان آهن جیره غذایی نیاز به افزایش اسیدآسکوربیک را در جیره‌های غذایی حاوی اسیدآسکوربیک ناپایدار و چربی‌های اکسید شده افزایش دهد (۱۱٦، ۱۱۷). جیره‌های غذایی حاوی مقادیر بالای آهن که برای تغذیه آزادماهی اقیانوس

اطلس استفاده شده بودند، مقادیر کاربرد ویتامین ث جیره غذایی و نیز وضعیت اسیدآسکوربیک کبدی را بر حسب دوز کاربردی تقلیل می دهند (۱۱۸). اشکال مختلف آهن نیز اثرات مختلفی بر اسیدآسکوربیک کبدی دارند. در وعده‌های غذایی ماهیانی که بیش از mg ۱۰۰ هِم متصل به آهن به ازای هر کیلوگرم استفاده گردید، اسیدآسکوربیک افزوده شده (۱۵۰ میلی گرم اسیدآسکوربیک روکش شده با سلولز) تقریبا به طور کامل در مقایسه با مقادیر اسیدآسکوربیک قابل قبول آنالیز شده در جیره غذایی از بین رفته بود و ماهیان مقادیر معادل سولفات آهن و آهن عنصری را خورده بودند (۱۱۹). به نظر می‌رسد که عمدتا برهمکنش آهن با نیاز به اسیدآسکوربیک در مقادیر جیره غذایی یا روده ای رخ دهد. به رغم برخی تناقضات در مورد تنظیم آهن در ماهیان، جذب آهن غیر هِم، در آزادماهی اقیانوس اطلس، در سطح روده ای به خوبی تنظیم شده است (۱۱۲). بنابراین، اسیدآسکوربیک ممکن است جذب آهن را تسهیل کند (٤٧)، اگرچه، ممکن است این موضوع فقط در غلظت‌های کم آهن جیره غذایی و بدن دارای اهمیت زیستی باشد. آهن هِم به شیوه متفاوتی جذب می‌شود که ممکن است کمتر وابسته به وضعیت آهن باشد و احتمالاً می‌تواند مشابه مکانیزم‌های جذب هِم در انسان‌ها باشد (۱۱۱). بنابراین، غلظت‌های آهن جیره غذایی و شکل آن بر نیاز ماهیان به اسیدآسکوربیک ، عمدتاً با اکسیدکردن اسیدآسکوربیک در جیره غذایی، اثر می‌گذارد. به نظر می‌رسد که مشتقات فسفاته اسیدآسکوربیک از اکسایش در قسمت معده ای- روده ای لوله گوارش در امان باشند (٤٤)، بنابراین به نظر نمی رسد که با استفاده از مشتقات فسفاته اسیدآسکوربیک و مقادیر کافی آنتی اکسیدان‌های غذایی، آهن جیره غذایی تا بیش از mg/kg ٦۰۰، نیاز به اسیدآسکوربیک مکمل را بیفزاید (۱۱٦). در آزمایشی روی آزادماهی اقیانوس اطلس بالغ که برای مطالعه برهمکنش‌های بین پراُکسیدان‌ها و آنتی اکسیدانهای جیره غذایی طراحی شده بود (رهیافت چندمتغیره)، مشخص گردید که غلظت بالای آهن جیره غذایی (mg/kg ۱۲۰۰ سولفات فرو)، کاهش ناچیز اسیدآسکوربیک (تقریبا ۷/۵ درصد،۰/۰۵ P<) را در ماهیانی ایجاد می کند که جیره غذایی حاوی ۳۰–٦۰mg AA/kg را بصورت AApP دریافت کرده بودند. بنابراین به نظر می‌رسد که مقادیر بالای سولفات آهن جیره غذایی بر نیاز متابولیک به اسیدآسکوربیک تا حد کمی اثر داشته باشد.

افزایش آهن کبدی در آزادماهیانی مشاهده شد که آهن هِم را از جیره‌های غذایی حاوی مقادیر

افزایش یافته، دریافت نموده بودند و این وضعیت ممکن است سبب افزایش نیاز به اسیدآسکوربیک به منظور محافظت در برابر اکسایش در داخل بدن گردد (۱۱۹). آهن بالا سلامت ماهیان را بدلیل افزایش خطر اکسایش و آلودگی‌ها و عفونتهای انگلی و باکتریایی به خطر می اندازد (به مقالات Blazer (۱٦) و Waagbø (۱۲) رجوع شود). با توجه به این فرضیه که تنظیم آهن در ماهیان نسبت به مهره داران خشکی کمتر است، مقادیر بالای آهن جیره غذایی، سلامت ماهیان را از طریق از بین بردن توانایی باند شدن ترانسفرین، به مخاطره می‌اندازد. به طور غیر اختصاصی، آهن پیوندی ممکن است اکسایش های خطرناکی ایجاد کند که برای رشد سریع باکتری‌های بیماری زا مناسب است و سبب افزایش وقوع عفونت‌ها، انعقاد مویرگی و زخم‌های ثانویه پوستی گردد (۱۲۱، ۱۲۲). پیشنهاد شده است که توانایی به دست آوردن آهن در بسیاری از باکتری‌ها، به شدت سمیت آنها بستگی دارد (۱۲۳). مجددا، در زمان استفاده از مقادیر کافی مشتقات فسفاته اسیدآسکوربیک و آنتی اکسیدان‌ها در جیره غذایی، آهن بالای جیره غذایی اثرات مشهودی بر مقاومت در برابر بیماری‌ها و ایمنی ندارد (۱۱٦، ۱۱۷، ۱۲٤– ۱۲۵).

به نظر می‌رسد که نیاز غذایی میگوی *P. vannamei* به آهن توسط جیره‌هایی غذایی که آهن در آنها به عنوان مکمل افزوده نمی شود و حاوی ۳۰۰۰ mg equivAA/kg (به صورت AAPP) و ۱۲ mg Fe/kg می باشند، تامین شود (۱۲٦). احتمالا نیاز پایین به آهن در میگوها با وجود هموسیانین حاوی مس به عنوان رنگدانه تنفسی به جای هموگلوبین وابسته به آهن مهره داران توجیه شود. بر اساس اطلاعات ما، هیچ داده ای در مورد برهمکنش بین این دو ماده مغذی در تغذیه سخت‌پوستان وجود ندارد.

٦-۳-۱۰- مس

از منابع علمی موجود در رابطه با نیاز تغذیه ای ماهیان به مس چنین بر می‌آید که حفظ مس بافتی همیشه نمایانگر سطوح مس در جیره غذایی تا میزان حداکثر ۱۰۰ mg/kg نمی باشد (۱۲۷– ۱۳۱) که این موضوع با داده‌های حاصل از ماندگاری مس با منشاء آبی، متفاوت است (۱۳۲– ۱۳۵). اسیدآسکوربیک بر ماندگاری و سمیت مس با منشاء آبی در کپور معمولی و قزل آلای رنگین کمان اثر

گذار است (۱۳۲، ۱۳۳). طی یک مطالعه ۹ هفته‌ای روی کپور معمولی، سمیت ppm ۰/۰۵ مس با منشاء آبی (اندازه گیری شده بصورت تجمع بافتی مس) با افزودن mg AA/kg ۲۰۰۰، با کاهش همزمان اسیدآسکوربیک کبدی در مقایسه با ماهیانی که اسیدآسکوربیک را دریافت نکرده بودند، کاهش یافت. فعالیت L- گلونولاکتون اکسیداز کبدی نیز با افزایش تجمع مس در بدن، کاهش یافت (۱۳۲). در یک مطالعه مشابه ۱۸ هفته‌ای روی ماهی قزل آلای رنگین کمان، تقریبا نتایج یکسانی به دست آمد (۱۳۳). این نکته بوضوح مشخص می‌کند که نیاز به اسیدآسکوربیک با حجم بالای مس افزایش می‌یابد و برای کاهش تجمع مس دارای منشاء آبی در کبد، وجود مقدار مازاد بر نیاز اسیدآسکوربیک الزامی است. به نظر میرسد که دریافت مس از طریق جیره غذایی خیلی محدود تر از دریافت آن از طریق آبشش باشد (۱۳۰، ۱۳۵). به نظر می‌رسد که مس جیره غذایی دقیقا بر اساس سطوح روده ای و پاسخ‌های رایج زیستی، تنظیم شده باشد و بر این اساس میزان mg Cu/kg ۵۰۰ در جیره غذایی آزادماهی اقیانوس اطلس مجاز شمرده می‌شود (۱۳۱، ۱۳٦). مقادیر اسیدآسکوربیک تا mg/kg ۱۰۰۰۰ جیره غذایی نمی تواند از آسیب‌های بوجود آمده بر اثر میزان mg Cu/kg ۸۰۰ جلوگیری کند (۱۲۷). در حالی که اسیدآسکوربیک سبب افزایش فراهمی آهن در جیره غذایی می شود، میزان جذب روده ای مس بر اثر اسیدآسکوربیک در برخی از جانوران (۱۳۷) از جمله ماهیان (٤۱) کاهش می یابد . این برهمکنش‌ها ممکن است مربوط به کاهش ظرفیت اسیدآسکوربیک تحت شرایط فیزیولوژیک موجود در روده باشد که آهن در یک وضعیت مناسب و مس در یک وضعیت نامناسب از لحاظ جذب، نگه داری می‌شوند. ممکن است کاهش مس بدن که بر اثر اسیدآسکوربیک بوجود آمده است، مربوط به افزایش ترشح مس از طریق کبد و صفرا باشد. در مطالعه برهمکنش چند متغیره بر آزادماهیان بالغ اقیانوس اطلس، جیره‌های غذایی حاوی مقادیر بسیار بالای مس (۱۱۰ mg Cu/kg) با جیره‌های غذایی حاوی مقادیر مورد نیاز مس (۸ mg Cu/kg) توانست مقادیر اسیدآسکوربیک کبدی را در ماهیان تغذیه شده با میزان متوسط اسیدآسکوربیک (۳۰-٦۰mg AApP/kg) به میزان ٦ درصد کاهش دهد. همچنین میزان مس موجود در غذا، اثری بر میزان مس موجود در کبد نداشت (شکل۵-۱۰). این اطلاعات نشان می‌دهدکه غلظت‌های بالای مس در جیره غذایی اثرات خفیفی روی نیاز تغذیه ای به اسیدآسکوربیک دارد و احتمالا از طریق

برهمکنش‌های روده ای و متابولیک وساطت می‌شود. مقادیر بیش از حد مس منجر به پراُکسیداسیون شدید در کبد و روده آزادماهی اقیانوس اطلس می‌شود که احتمالا از اکسایش در جیره غذایی و بافت‌های هدف ناشی می‌شود (۱۳۱). هنوز مشخص نشده است که افزودن ویتامین‌های آنتی اکسیدان، می‌تواند این اثر پراُکسیدانی مس را بکاهد یا خیر.

۷-۳-۱۰- سایر مواد معدنی

طی مطالعات ما روی آزادماهی اقیانوس اطلس، بجز آهن، برهمکنش‌های بین اسیدآسکوربیک و مواد معدنی دیگر که ممکن است منجر به کمبود ویتامین ث گردد، مشاهده نشد (Waagbø و Maage؛ اطلاعات منتشر نشده)(۱۱۳). در مطالعه جذب غیر مستقیم، Dabrowski و Kock (٤٧) پیشنهاد نمودند که اسیدآسکوربیک جذب آهن روده ای را در مقایسه با ASS تسهیل می بخشد. کاهش غلظت های مس و روی در قزل آلای رنگین کمان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۵۰۰ mgAA/kg برای مدت ۱۵ هفته، در مقایسه با ماهیانی که با جیره‌های غذایی حاوی مقادیر مشابه از AAS یا جیره‌های غذایی فاقد اسیدآسکوربیک تغذیه شده بودند، مشاهده گردید (٤١). Yamamoto و همکاران (۱۳۳)، گروه هایی از ماهیان قزل آلای رنگین کمان را با جیره‌های غذایی حاوی ۲۰۰۰ mg AA/kg یا فاقد این ویتامین تغذیه نمودند و سپس برای مدت ۱۸ هفته در معرض مس با منشا آبی، قرار دادند که در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های غذایی فاقد ویتامین ث، افزایش میزان فلز روی در آبشش‌ها مشاهده گردید ولی چنین حالتی در کبد، کلیه و روده گزارش نشد. Maage و همکاران (۱۱۳) و Lanno و همکاران (۱۲۷) کاهشی در غلظت‌های روی و مس کبدی را در آزادماهی اقیانوس اطلس یا قزل آلای رنگین کمان مشاهده نشد که به ترتیب با مقادیر درجه بندی شده ویتامین ث بیش از ۵۰۰۰ mg AA/kg و ۱۰۰۰۰ تغذیه شده بودند. در لاروهای ماهی کلمه *Rutilus rutilus*،که فلز روی با بصورت خوراکی در مقادیر ۱٤۲ mg/kg و ٤۸۳ جیره خشک دریافت کرده بودند، میزان روی کل بدن بین ۱٦۰٤-۳۳٤ µg/g گزارش شد که همبستگی مثبتی با مقادیر اسید آسکوربیک بافتی بین ۸۲-۱۱ µg/g داشت. این نتایج نشان دهنده برهمکنش متابولیک بین روی و ویتامین ث است (۱۲۹).

به نظر می رسد در ماهیانی که با جیره غذایی فاقد اسیدآسکوربیک تغذیه شده بودند، جذب کلسیم از آب شیرین و جیره غذایی، دچار اخلال شده باشد. این پدیده به صورت کاهش میزان کلسیم آبشش، پوست، استخوان و بافت‌های عضلانی در ماهی سرماری *Channa punctatus* (۱۳۸) و کلسیم کل بدن ماهی قزل آلای رنگین کمان (٤۱) تغذیه شده با جیره‌های غذایی فاقد اسیدآسکوربیک در مقایسه با جیره‌های غذایی حاوی مکمل اسیدآسکوربیک کاملا مشهود است. به نظر میرسد که در آزمایش نخست، جذب کلسیم جبرانی در روده وجود داشته باشد، در صورتی که در آزمایش اخیر، کاهش کلسیم وابسته به زمان بوده و در نیمه دوم آزمایش ناپدید شده است (٤۱). اگرچه ممکن است مرگ و میر شدید این آزمایش مربوط به ماهیانی باشد که دارای کلسیم بالاتری بوده اند. Ishibashi و همکاران (۱۳۹) تا حدودی کلسیم خونی کمتری را در طوطی ماهیان جوان *Oplegnathus faciatus*، تغذیه شده با جیره‌های غذایی فاقد اسیدآسکوربیک، تشخیص دادند. کاهش در چند پارامتر خونی دیگر مانند پروتئین نشان می‌دهد که این مسئله می‌تواند به اختلالات اسمزی مربوط باشد. ما در یک مطالعه منتشر نشده در بچه ماهیان آزادماهی اقیانوس اطلس، اثرات ناچیز اسیدآسکوربیک جیره غذایی (mg AA, AApP, AAmP/kg صفر، ۱۰ و ۱۰۰) را بر غلظتهای کلسیم و فسفر استخوان مشاهده کردیم (Waagbø و Maage، اطلاعات منتشر نشده). بر اساس اطلاعات ما، کلسیم جیره غذایی بر نیاز به اسیدآسکوربیک اثری ندارد و بنابراین به نظر می رسد که برهمکنش‌های بین اسیدآسکوربیک و کلسیم بصورت زخم‌های ثانویه کمبود اسیدآسکوربیک در سلول‌های اپیتلیالی، مشاهده شود. اثرات غیر مستقیم اسیدآسکوربیک جیره غذایی بر کلسیم و متابولیسم استخوان در جانوران پرورشی – از طریق وساطت تبدیل ویتامین D به شکل فعال آن یعنی دهیدروکسی ویتامین D_3 (۱٤۰) – نمی‌تواند در پرورش متراکم آبزیان نادیده گرفته شود.

دوزهای بسیار بالای اسیدآسکوربیک کریستاله (۵۰۰۰ mg/kg) – نه دوزهای معادل AAS – می‌توانند غلظت های سلنیوم کبدی را در آزادماهی اقیانوس اطلس احتمالا از طریق کاهش سلنیوم و کاهش فراهمی آن برای جذب روده ای، کاهش دهند (۱۱۳). مقدار کافی سلنیوم برای حداکثر فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز لازم است و مقادیر ناچیز سلنیوم جیره غذایی ممکن است با افزایش مقدار سایر اجزای سیستم – مثل ویتامین ث و E – جبران شود (۱۰۳، ۱٤۰).

در آزادماهی اقیانوس اطلس تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر کم ویتامین ث (mg AApP/kg۶۰-۳۰) در میان برخی از متغیرهای تغذیه ای (ویتامین E، آستازانتین، آهن، مس، منگنز و سطح چربی)، منگنز (mg/kg۲۰-۱۰) بیشترین اثر را بر غلظت اسید آسکوربیک کبدی دارد (تقریبا ۱۲ درصد، شکل۵-۱۰). طی مطالعه‌ای در محیط *in vitro* با فاگوسیت‌های راس کلیه آزادماهی اقیانوس اطلس که در پلاسما شناور بودند، افزایش منگنز پلاسما از µg/ml ۰/۰۳۵ به ۰/۱۹٤ مانع تولید انواع اکسیژن واکنشی(رادیکالهای اکسیژنی) از فاگوسیت‌های تحریک شده، گردید(۱٤۲). اثرات بازدارندگی فقط در پلاسما با غلظت‌های بالای اسیدآسکوربیک مشاهده می‌شود (تقریبا µg/ml ۳۷). Bell و همکاران در مطالعه ای روی آزادماهی سوک آی *Oncorhynchus nerka*، برهمکنش محتمل بین روی، منگنز و اسیدآسکوربیک (بصورتAAS) جیره غذایی را در گسترش بیماری باکتریایی کلیه بیان نکردند (۱٤۳). مطالعات اخیر ما نشان می‌دهد که برهمکنش‌های تغذیه ای و متابولیک اسیدآسکوربیک و منگنز نیازمند مطالعات بیشتر است.

مطالعه‌ای پیرامون اثرات افزایش تدریجی منیزیم جیره غذایی در دو سطح پروتئینی مختلف بر ویتامین ث در کپورماهی معمولی نشان داد که سطح بالای پروتئین (٤٤ درصد)، در مقایسه با سطح پایین آن (۲۵ درصد) اسیدآسکوربیک را کاهش می داد در حالی که همبستگی بین سطوح منیزیم جیره غذایی و غلظت‌های اسید آسکوربیک در هپاتوپانکراس، کلیه و مغز مشاهده نمی شود (۱٤٤). اگرچه، هدررفت های معنی داری (۹۵ درصد از mg/kg ۱٦۸۰) از اسیدآسکوربیک افزوده شده طی عمل آوری جیره غذایی، ممکن است برهمکنش بالقوه اسیدآسکوربیک و منیزیم را از نظر دور کرده باشد.

تعدادی از محققین به وضوح برهمکنش‌های بین اسیدآسکوربیک و فاکتورهای نامطلوب محیطی پرداخته‌اند (بررسی شده توسط Sandnes) (۹) و اگرچه عنصر کادمیوم یک ریزمغذی نمی باشد، ولی برخی از نظریات در مورد سمیت آن برای مقایسه با سایر مواد معدنی مورد بررسی قرار گرفته است. مقادیر بالای اسیدآسکوربیک جیره غذایی (mg/kg ٦۰۰۰) سمیت کادمیوم با منشاء آبی را (ppm ۰/۱٤ برای مدت ۲٤ روز) در قزل آلای رنگین کمان کاهش می دهد (۷۵) در حالی که کفال خاکستری *Mugil cephalus* که بمدت شش هفته در معرض mg/L ۱۰ کادمیوم قرار گرفته بود، کاهش ٦۰ درصدی اسیدآسکوربیک کبد و همچنین تجمع کادمیوم در بافت کبد و آبشش را نشان داد

(۷۳). اسیدآسکوربیک جیره غذایی اثرات ناچیزی بر تجمع کادمیوم در مقادیر پایین (۰/۱۱ mgCd/kg) دارد (۱۱۳)، ولی ممکن است تا حدودی تجمع اضافی این فلز را در ماهیانی توجیه کند که پنج برابر این مقدار را دریافت نموده‌اند (۱٤٥). داده‌های جدید پیرامون آزادماهیان اقیانوس اطلس در مرحله پار[1] نشان می‌دهد که مقادیر خیلی بالای این فلز در جیره غذایی (بیش از ۲۵۰ mg/kg) ممکن است قابل تحمل باشد و اثری بر اسیدآسکوربیک کبدی نداشته باشد (A. K. Lundebye، مصاحبه). جهت خلاصه نمودن اطلاعات موجود پیرامون برهمکنش‌های اسیدآسکوربیک و مواد معدنی باید بر موارد ذیل تمرکز کنیم: ۱) متابولیسم ناقص مواد معدنی در حالت کمبود اسیدآسکوربیک که ممکن است بصورت ثانویه برای فقدان اسیدآسکوربیک تظاهر یابد و مربوط به عملکردهای اساسی آن باشد، ۲) اختلافات موجود در برهمکنش‌های اسیدآسکوربیک بین مواد معدنی دارای منشاء آبی و غذایی که نشان دهنده مشهودترین اثرات مواد معدنی با منشاء آبی بر نیاز به اسیدآسکوربیک جیره غذایی است ۳) برهمکنش‌های روده ای که اسیدآسکوربیک موجب تسهیل جذب (روی و آهن) یا ممانعت (مس وسلنیوم) جذب می شود ٤) برهمکنش‌های متابولیک (آهن، مس، روی، منگنز وکادمیوم). برخی از برهمکنش‌های ضعیف بین اسیدآسکوربیک و مواد معدنی ممکن است برای سایر مواد ریز مغذی ثانویه باشدکه بشدت تحت تاثیر اسیدآسکوربیک بوده‌اند. آزمایشهای مذکور و برخی آزمایشهای قدیمی‌تر در مورد اسیدآسکوربیک و مواد معدنی در ماهیان، منجر به یکسری از دلالت‌هایی شده‌اند که بایستی در آزمایشهای برهمکنشی که بخوبی طراحی شده‌اند، تحت شرایط محیطی بهینه یا کمتر از آن، اثبات شوند.

٤-۱۰- دورنما

توصیه‌های موجود پیرامون میزان افزودن اسیدآسکوربیک به جیره‌های غذایی ماهیان و سخت‌پوستان، بر اساس نیازهای حداقلی است که از آزمایشهای دقیق تغذیه ای بدست آمده است. با استفاده از مشتقات پایدار فسفاته اسیدآسکوربیک، بسیاری از برهمکنش‌های بین ریز مغذی‌ها و اسیدآسکوربیک در جیره غذایی حذف می‌شوند. دانش کنونی در مورد فاکتورهایی که ممکن است نیاز به

[1] Parr

اسیدآسکوربیک را با برهمکنش‌های ایجاد شده طی عمل آوری جیره غذایی، جذب و کاربرد در شرایط طبیعی تغییر دهند، کم می‌باشد و هنوز از نظر علمی، توصیه مقادیر کاربرد مکمل‌های اسیدآسکوربیک در شرایط عملی پرورش و همچنین شرایط پر استرس شیوع بیماریهای عفونی و واکسیناسیون ممکن نیست و نیازمند افزایش دانش ما در زمینه نقش اسیدآسکوربیک در مکانیزم‌های بیوشیمیایی و سلولی و برهمکنش‌های این ویتامین با سایر ریزمغذی‌های ضروری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

برخی از تحقیقات منتشر نشده ارائه شده در این فصل، با استفاده از مشتقات فسفاته اسیدآسکوربیک با حمایت و همکاری BASF آلمان (Ca-AA- منو فسفات)، F. Hoffmann-La Roche سوئیس (منو و پلی فسفاتهای اسید آسکوربیک) و Bioakva Innovation AS نروژ، انجام پذیرفت.

منابع

1. Yamamoto, Y, Sato, M., and Ikeda, S., Existence of L-gulonolactone oxidase in some teleosts, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.,* 44, 775,1978.

2. Soliman, A. K. Jauncey, K., and Roberts, R. J. Qualitative and quantitative identification of L-gulonolactone oxidase activity in some teleosts, *Aquacul. Fish. Manage., 1,* 249,1985.

3. Dabrowski, K., Primitive actinopterigian fishes can synthesize ascorbic acid, *Experientia,* 50, 745,1994.

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

5. Maeland, A. and Waagbo, R., Examination of the qualitative ability of some cold water marine teleosts to synthesise ascorbic acid, *Comp. Biochem. Physiol.,* 121A, 249,1998.

6. Lightner, D. V., Hunter, B., Magarelli, P. C. Jr., and Colvin, L. B. Ascorbic acid: nutritional requirement and role in wound repair in penaeid shrimp, *Proc. World Maricult. Soc., 10,* 513,1979.

7. He, H. and Lawrence A. L., Vitamin C requirements of the shrimp *Penaens van-namei, Aquaculture,* 114,305,1993.

8. Chuang, J. L., Nutrient requirements, feeding and culturing practices of *Penaeus monodon:* a review. F. *Hoffmann-La Roche Ltd., Animal Nutrition and Health,* Switzerland, 1990.

9. Sandnes, K., Vitamin C in fish nutrition—a review, *Fisk. Dir. Skr. Ser. Em.,* 4,3,1991.

10. Dabrowski K. Ascorbate concentration in fish ontogeny,. *Fish Biol.,* 40, 273, 1992.

11. Dabrowski, K. and Blom, J., The effect of ascorbic acid in rainbow trout brood-stock diets on deposition of vitamin C in eggs and and survival of embryos, *Comp. Biochem. Physiol.,* 108A, 129,1994.

12. Waagb0, R., The impact of nutritional factors on the immune system in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: a review, *Aquacult. Fish. Man.,* 25,175,1994.

13. Woodward, B. Dietary vitamin requirements of cultured young fish, with emphasis on quantitative estimates for salmonids, *Aquaculture,* 124,133,1994.

14. Boonyaratpalin, M., Nutrient requirements of marine food fish cultured in Southeast Asia, *Aquaculture,* 151,283,1997.

15. Merchie, G., Lavens, P., and Sorgeloos, P., Optimization of dietary vitamin C in fish and crustacean larvae: a review, *Aquaculture,* 155,165,1997.

16. Blazer, V. S., Nutrition and disease resistance in fish, *Annu. Rev. Fish Dis.,* 2,309, 1992.

17. Hilton, J. W., Ascorbic acid-mineral interactions in fish, in *Ascorbic Acid in Domestic Animals,* Wegger, I., Tagewerker, F. J., and Moustgaard, J. Eds., The Royal Danish Agriculturist Society, Copenhagen, 1984, 218.

18. Hilton, J. W., The interaction of vitamins, minerals and diet composition in the diet of fish, *Aquaculture, 79,223,*1989.

19. Poston, H. A. Effect of dietary L-ascorbic acid on immature brook trout, in *Fisheries Research Bulletin No. 31,* State of New York Conservation Department, Albany, 45,1967.

20. Halver, J. E., Smith, R. R. Tolbert, B. M., and Baker, E. M., Utilization of ascorbic acid in fish, *Ann. N.Y. Acad. Sci.,* 258,81,1975.

21. Hilton, J. W. Cho, C. Y., and Slinger S., Effect of graded levels of supplemental ascorbic acid in practical diets fed to rainbow trout *(Salmo gairdneri),. Fish Res. Board Can.,* 35, 431,1978.

22. Meier, W. and Wahli, T., *Vitamin C deficiency in the rainbow trout,* Animal Nutrition Events # 2242, Animal Nutrition and Health, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland, 1990.

23. Sandnes, K., Torrissen, O., and Waagbo, R. The minimum dietary requirement of vitamin C in Atlantic salmon *(Salmo salar)* fry using Ca ascorbate-2-monophosphate as dietary source. *Fish Physiol. Biochem.,* 10, 315,1992.

24. Tacon, A. G. J., *Nutritional Fish Pathology,* United Nations Development Programme, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 1992.

25. NRC, *'Nutrient requirements offish,* National Research Council, Academy Press, Washington, D.C, 1993.

26. Desj'ardins, L. M. Castell, J. D. and Kean, J. C., *Can. J. Fish Aquat. Sci.,* 42,370,1995.

27. Lightner, D. L., Colvin, L. B. Brand, C., and Danald, D. A. Black death, a disease syndrome of penaeid shrimp related to dietary deficienct of ascorbic acid, *Proc. World Maricult. Soc.,* 8, 611,1977.

28. Magarelli, P. C., Jr., Hunter, B., Lightner, D. V., and Colvin, L. B., Black death: an ascorbic acid deficiency disease in penaeid shrimp, *Comp. Biochem. Physiol.,* 63A, 103,1979.

29. Kanazawa, A., *Prawn Feeds,* American Soybean Association, Taipei, Taiwan, 1985.

30. Tsao, C. S., An overview of ascorbic acid chemistry and biochemistry, in *Vitamin C in Health and Disease,* Packer, L. and Fuchs,., Eds. Marcel Dekker, New York, 1997, 25.

31. Lim, C. and Lovell, R. T, Pathology of the vitamin C deficiency syndrome in channel catfish *(Ictalurus punctatus), J. Nutr.,* 108,1137,1978.

32. Hilton, J. W., Cho, C. Y., and Slinger, S. J., Evaluation of the ascorbic acid status of rainbow trout *(Salmo gairdneri),. Fish. Res. Board Can.,* 34, 2207,1977.

33. Sandnes, K. and Utne, R, Processing loss and storage stability of ascorbic acid in dry fish feed, *Fisk. Dir. Skr. Ser. Ern.,* 11,39,1982.

34. Soliman, A. K., Jauncey, K., and Roberts, R. J., Stability of L-ascorbic acid (vitamin C) and its forms in fish feeds during processing, storage and leaching, *Aquaculture,* 60, 73,1987.

35. NRC, *'Nutrient requirements of coldwater fishes,* 16, National Academy Press, Washington, D.C.1981.

36. NRC, *Nutrient requirements of warmwater fishes,* National Academy Press, Washington, D.C.1983.

37. Waagbo R. 0ines, S., and Sandnes K. The stability and biological availability of different forms of vitamin C in feed for Atlantic salmon *(Salmo salar), Fisk. Dir. Skr. Ser. Ern.,* 4, 95,1991.

38. Dabrowski, K., Matusiewicz, M. and Blom, J. H., Hydrolysis, absorption and bioavailability of ascorbic acid esters in fish, *Aquaculture,* 124,169,1994.

39. Hsu, T. -S. and Shiau S. -Y. Comparison of L-ascorbyl-2-polyphosphate with ascorbyl-2-sulfate in meeting vitamin C requirements of juvenile grass shrimp *Penaeus monodon, Fisheries Science,* 63,958,1997.

40. Sandnes K., Hansen, T, Killie, J.-E. A. and Waagbo R. Ascorbate-2-sulfate as a dietary vitamin C source for Atlantic salmon *(Salmo salar):* 1. Growth bioactivity, haematology and humoral immune response, *Fish Physiol. Bio 8,* 419,1990.

41. Dabrowski, K. El-Fiky, N., Frigg, M., and Wieser, W. Requirement and nutrition of ascorbic acid and ascorbic sulfate in juvenile rainbow trout *Aquac. 91, 317,*1990.

42. Tsujimura, M., Thirty-year history of research about vitamin C activity in naturally occuring ascorbic acid derivative; L-ascorbic acid 2-sulfate. *Ka Nutr. Univ., 28, 31,1997.*

43. Shiau S. Y and Hsu T.-S. Vitamin C requirements of grass shrimp *Penaa odon,* as determined with L-ascorbyl-2-monophosphate, *Acfiiaculture,* 122,345

44. Buddington, R. K., Puchal, A. A., Houpe, K. *L.,* and Diehl.W., Hydrolys absorption of two monophosphate derivatives of ascorbic acid by chanra fish *Ictalurus punctatus* intestine, *Aquaculture,* 114,317,1993.

45. Blom, J. H. and Dabrowski, K., Continuous or "pulse-and-withdraw" SUJ ascorbic acid in the diet: a new approach to altering the bioavailability of bic acid, using teleost fish as a scurvy-prone model. *Internal. Vit. Nutr.* J 68, 88,19.98.

46. Sandnes, K. and Waagbo, R., Enzymatic hydrolysis of ascorbate-2-monoi phate and ascorbate-2-sulphate *in vitro,* and bioactivity of ascorbate-2- m phosphate in Atlantic salmon *(Salrno salar), Fisk. Dir. Skr. Ser. Em.,* 4,33,1

47. Dabrowski, K. and Kock, G. Absorption and interaction with minerals o ascorbic acid and ascorbic sulfate in digestive tract of rainbow trout. *Can Fish. Aquat. Sci.,* 46,1952,1987.

48. Matusiewicz, M. and Dabrowski, K. Characterization of ascorbyl esters hydrolysis in fish, *Comp. Biochem. Physiol.,* HOB, 739,1995.

49. Hamre, K. Berge, R. K., Waagbo, R., and Lie, O., Vitamins C and E inter; juvenile Atlantic salmon *(Salmo salar* L.) *Free Rad. Biol. Med.,* 22,137,199;

50. Cho, C.Y. and Cowey, C. B. Utilization of monophosphate esters of ascorbic acid by rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss),* in *Proceeding from Fish Nut in Practice,* Biarritz, France, 1993,149.

51. Phromkunthong, W. Boonyaratpalin, M., and Storch, V. Different concentrations of ascorbyl-2-monophosphate-magnesium as dietary sources of vitamin for seabass, *Lates calcarifer, Aquaculture, 151, 225,1997.*

52. Shigueno, K. and Itoh, S. Use of Mg-L-ascorbyl-2-phosphate as a vitamil source in shrimp diets,. World Aquacult. Soc., 19, 168,1988.

53. Chen, H. Y, and Chang, C. F.Quantification of vitamin C requirements juvenile shrimps (*Penaeus monodon)* using polyphosphorylated L-ascorbi. *Nutr.,* 124, 2033,1994.

54. Catacutan, M. R. and Lavilla-Pitogo, C. R., L-Ascorbyl-2-phosphate-Mg source of vitamin C for juvenile *Penaeus monodon, Isr. Aquacult.-Bamidg* 35,1994.

55. Dabrowski, K. Gulonolactone oxidase is missing in teleost fish. The dire spectrophotometric assay, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler,* 371,207,1990.

56. Waagb0, R., Glette, J., Nilsen, E. R. and Sandnes, K., Dietary vitamin C, nity and disease resistance in Atlantic salmon *{Salmo salar), Fish Physiol. Biochem.,* 12, 61,1993.

57. Sato, M., Yoshinaka, R., and Ikeda, S., Dietary ascorbic acid requirement rainbow trout for growth and collagen formation. *Bull. Jap. Soc. Scient.* Fi 1029,1978.

58. Waagbe, R., Thorsen, T, and Sandnes, K., Role of dietary ascorbic acid in vitel-logenesis in rainbow trout *(Salmo gairdneri), Aquaculture,* 80, 301 1989.

59. Boonyaratpalin, M., Unprasert, N., and Buranapanidgit,, Optimal supplementary vitamin C level in seabass fingerling diet, in *The Current Status of Fish Nutrition in Aquaculture,* Takeda, M. and Watanabe, T., Eds., Tokyo University of Fisheries, Tokyo, 1989,149.

60. Dabrowski, K., Administration of gulonolactone does not evoke ascorbic acid synthesis in teleost fish, *Fish Physiol. Biochem.,* 9, 215,1991.

61. Merchie, G., Lavens, P., Radull, J., Nelis, H., De Leenheer, A., and Sorgeloos, P., Evaluation of vitamin C-enriched *Artemia* nauplii for larvae of the giant freshwater prawn, *Aquacult. Int.,* 3, 355,1995.

62. Ronnestad, I., Lie, O., Hamre, K., and Waagbo, R., L-Ascorbic acid and a-tocopherol in larvae of Atlantic halibut before and after exogenous feeding, *J. Fish Biol.,* 55, 720,1999.

63. Maeland, A., Rosenlund, G., Stoss, J., and Waagbo, R., Weaning of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., using formulated diets with various levels of ascorbic acid, *Aquacult. Nutr.,* 5, 211,1999.

64. Mangor-Jensen, A., Holm, J. C., Rosenlund, G., Lie, O., and Sandnes, K., Effect of dietary vitamin C on maturation and egg quality of cod *(Gadus morhua* L.),. *World Aquacult. Soc.,* 25, 30,1994.

65. Dabrowski, K., Assay of ascorbic phosphates and *in vitro* availability assay of ascorbic mono- and polyphosphates,. Scin. *Food and Agric.,* 52, 409,1990.

66. Waagbo, R. and Sandnes, K., Effects of dietary vitamin C on growth and parr-smolt transformation in Atlantic salmon, *Salrno salar* L., *Acjuacult. Nutr.,* 2, 65, 1996.

67. Soliman, A. K., Jauncey, K., and Roberts, R. J., The effects of dietary ascorbic acid supplementation on hatchability, survival rate and fry performance in *Oreochromis mossambicus* (Peters), *Aquaculture, 59,*197,1986.

68. Blom, J. H. and Dabrowski, K. Reproductive success of female rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)* in response to graded dietary ascorby mono-phosphate levels, *Biol. Reprod.,* 52,1073,1995.

69. Liu, L., Ciereszko, A., Czesny, S., and Dabrowski, K., Dietary ascorbyl monophosphate depresses lipid peroxidation in rainbow trout sperm,. *Aquatic Animal Health,* 9, 249,1997.

70. Li, Y. and Lovell, R. T. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. *Nutr., 115,123,*1985.

71. Wahli, T., Meier, W., and Pfister, K. Ascorbic acid induced immune-mediated decrease in mortality in *Ichtyopthirius multifiliis* infected rainbow trout *(Salmo gairdneri), Acta Tropica,* 43: 287,1986.

72. Agrawal, N. K., Juneja, C. J., and Mahajan, C. L., Protective role of ascorbic acid in fishes exposed to organochlorine pollution. *Toxicology, 11, 369,*1978.

73. Thomas, P., Bally, M., and Neff, J. M., Ascorbic acid status of mullet, *Mugil cephalus* Linn. exposed to cadmium. *Fish Biol., 20,183,1982.*

74. Thomas, P. and Neff, J. M., Effects of a pollutant and other environmental variables on the ascorbic acid content of fish tissues/ *Marine Environ. Res., 14,* 489,1984.

75. Yamamoto, Y. and Inoue, M., Effects of dietary ascorbic acid and dehydro-ascorbic acid on the acute cadmium toxicity in rainbow trout/ *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.,* 51,1299,1985.

76. Fletcher, T. C., Dietary effects on stress and health in *Fish Stress and Hi Aquaculture,* Iwama, G. K., Pickering, A. D., Sumpter, J. P., and Schreck,! Eds., Cambridge University Press, Cambridge, 223,1997.

77. Packer, L. and Kagan, V. E., Vitamin E: The antioxidant harvesting cent membranes and lipoproteins, in *Vitamin E in Health and Disease,* Packer, Fuchs, J., Eds., Marcel Dekker, New York, 1993,179.

78. Tappel, A. L. Vitamin E as the biological lipid antioxidant *Vit. Horm.* 1962.

79. Meister, A., Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals,. *Chem.,* 269,9397,1994.

80. Winkler, B. S., Orselli, S. M., and Rex, T. S., The redox couple between glutathione and ascorbic acid: a chemical and physiological perspective, J Bio AW., 17,333,1994.

81. Packer, J. E., Slater, T. F., and Willson, R. L., Direct observation of a free interaction between vitamin E and vitamin C, *Nature,* 278, 737,1979.

82. Niki, E., Antioxidants in relation to lipid peroxidation, *Chem. Phys. Lip* 227,1987.

83. Wefers, H. and Sies, H., The protection by ascorbate and glutathione a microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E, *Eur.Bioch 353,*1988.

84. Kagan, V. E., Serbinova, E. A., Forte, T, Scita, G., and Packer, L., Recyc vitamin E in human low density lipoproteins*, J. Lipid Res., 33, 385,*199:

85. Chen, L. H. Interaction of vitamin E and ascorbic acid. *In vivo,* 3,199,

86. Burton, G. W., Wronska, U., Stone, L., Foster, D. O., and Ingold, K. U., Biokinetics of dietary RRR-a-tocopherol in the male guinea pig at thre levels of vitamin C and two levels of vitamin E. Evidence that vitamin not "spare" vitamin E *in vivo, Lipids, 25,*199,1990.

87. Buettner, G. R., The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid per oxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys., 300,*

88. Kagan, V. E., Zhelev, Z. Z., Bakalova, R. A., Serbinova, E. A., Ribarov, Packer, L., Intermembrane transfer of alpha-tocopherol and its homol (*Vitamin E in Health and Disease,* Packer, L. and Fuchs, J., Eds. Marcel D New York, 1993,171.

89. Poston, H. A. and Combs, G. F, Jr., Interrelationships between require dietary selenium, vitamin E and L-ascorbic acid by Atlantic salmon *(Salmo solar)* fed a semipurified diet, *Fish-Health-us,* 8, 6,1979.

90. White, A., Fletcher, T. C., Secombes, C. J., and Houlihan, D. F, The effect of different dietary levels of vitamins C and E and their tissue levels in Atla salmon, *Salmo salar L.,* in *Fish Nutrition in Practice. Proc. IVInternationa Symposium on Fish Nutrition and Feeding,* Kaushik, S. J. and Luquet, P., Colloques 61, INRA Editions, Biarritz, France, 1993, 203.

91. Frankel, E. N., Antioxidants in foods and their impact on food quality, *Chemistry, 57, 51,* 1996.

92. Bowry, V. W., Ingold, K. U. and Stocker, R., Vitamin E in human low-d lipoprotein. When and how this antioxidant becomes a pro-oxidant, *B* 288,341,1992.

93. Frischknecht, R., Wahli, T., and Meier, W, Comparison of pathological due to deficiency of vitamin C, vitamin E and combinations of vitamir and E in rainbow trout, *Oncorhynclius mykiss* (Walbaum),. *Fish Dis., V.* 31,1994.

94. Gatlin, D. M., Poe, W. E., Wilson, R. P., Ainsworth, A. J., and Bowser, P. R., Effects of stocking density and vitamin C status on vitamin E-adequate and vitamin E-deficient fingerling channel catfish, *Aquaculture,* 56,187,1986.

95. Cowey, C. B., Adron, J. W., Walton, M. J., Murray, J., Youngson, A., and Knox, D., Tissue distribution, uptake and requirement for alpha-tocopherol of rainbow trout *(Salmo gairdneri)* fed diets with a minimal content of unsaturated fatty acids, *J. Nutr., Ill,* 1556,1981.

96. Cowey, C. B., Adron, J. W., and Youngson, A., The vitamin E requirement of rainbow trout *(Salmo gairdneri),* given diets containing polyunsaturated fatty acids derived from fish oil, *Aquaculture,* 30, 85,1983.

97. Gatlin, D. M., Poe, W. E., and Wilson, R. P., Effect of singular and combined dietary deficiencies of selenium and vitamin E on fingerling channel catfish *(Ictalurus punctatus), J. Nutr.,* 116,1061,1986.

98. Watanabe, T., Takeuchi, T., Wada, M., and Uehara, R., The relationship between dietary lipid levels and alpha-tocopherol requirement of rainbow trout. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.,* 47,1463,1981.

99. Watanabe, T., Takeuchi, T., and Wada, M., Dietary lipid levels and the alpha-tocopherol requirement of carp. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.,* 47,1585,1981.

100. Horwitt, H. K., Data supporting supplementation of humans with vitamin E,. Nir.,82,424,1991.

101. Hilton, J. W., Cho, C. Y, and Slinger, S. J., Effect of hypervitaminosis A on the development of ascorbic acid deficiency in underyearling rainbow trout *(Salmo gairdneri* R.), *Aquaculture,* 13, 325,1978.

102. Hilton, J. W., Hypervitaminosis A in rainbow trout *(Salmo gairdneri):* Toxicity signs and maximum tolerable level,. *Nutr.,* 113,1737,1983.

103. Cowey, C.B., The role of nutritional factors in the prevention of peroxidative damage to tissues. *Fish Physiol. Biochem.,* 2,171,1986.

104. Christiansen, R., Glette, J., Lie, O., Torrissen, O. J., and Waagbe, R., Antioxidant status and immunity in Atlantic salmon *(Salmo salar* L.) fed semi-purified diets with or without astaxanthin supplementation,. *Fish Dis.,* 18, 317,1995.

105. Rivers, J. M., Safety of high-level vitamin C ingestion, *Ann. New York Acad. Sci.,* 498,445,1987.

106. Duncan, P. L. and Lovell, R. T., Influence of vitamin C on the folate requirement of channel catfish, *Ictalurus punctatus,* for growth, hematopoiesis, and resistance to *Edwardsiella ictaluri* infection, *Aquaculture,* 127, 233,1994.

107. Bai, S. C. and Gatlin, D. M., Ill, Dietary rutin has limited synergistic effects on vitamin C nutrition in channel catfish *(Ictalurus punktatus), Fish Physiol. Biochem.,* 10,183,1992.

108. Kitamura, S., Ohara, S., Suwa, T., and Nakagawa, K., Studies on the vitamin requirements of rainbow trout, *Salmo gairdneri* L., *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 31,* 818,1965.

109. Halver, J. E. and Shanks, W. E., Nutrition of salmonoid fishes. VIII. Indispensable amino acids for sockeye salmon.. *Nutr., 71,* 340,1962.

110. Lynch, S. R. and Cook, J. D., Interaction of vitamin C and iron, in *Micronutrient interactions: Vitamins, minerals and hazardous elements,* Levander, 0. A. and Cheng, L., Eds., *Ann. New York Acad. Sci.* 355,1980, 32.

111. Hallberg L., Brune, M., and Rossander-Hulthen, L., Is there a physiological role of vitamin C in iron absorption, *Ann. N.Y. Acad. Sci.,* 498, 324,1987.

112. Andersen, R, Studies on iron nutrition in Atlantic salmon *(Salmo salar)* respect to requirement, bioavailability, interactions and immunity. PB University of Bergen, Norway, 126 pp., 1997.

113. Maage, A., Waagbo, R., Olsson, P. E., Julshamn, K., and Sandnes, *K.,i* 2-sulfate as a dietary vitamin C source for Atlantic salmon *(Salmo salar)* Effects of dietary levels and immunization on the metabolism of trao *Fish Physiol. Biochem.,* 8, 429,1990.

114. Mazur, A., Mechanism of plasma iron incorporation into hepatic ferr *Chem.,* 135,595,1960.

115. Han, O., Failla, M. L., Hill, A. D., Morris, E. R., and Smith J. C.,Jr., Re Fe(III) is required for uptake of non-heme iron by Caco-2 cells, *Nui 1291,*1995.

116. Andersen, F., Lygren, B., Maage, A., and Waagbo, R., Interaction beh dietary levels of iron and two forms of ascorbic acid and the effect g) antioxidant status and some non-specific immune parameters in Atl salmon *(Salmo salar)* smolts, *Aquaculture,* 161,437,1998.

117. Desjardins, L. M., Hicks, B. D., and Hilton, J. W., Iron atalyzed oxida trout diets and its effect on the growth and physiological response o trout. *Fish Physiol. Biochem.,* 3,173,1987.

118. Andersen, F., Maage, A., and Julshamn, K., An estimation of dietary i requirement of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. parr, *Aquacult. Nutr., 2,*

119. Andersen, F, Lorentzen, M., Waagbo, R., and Maage, A., Bioavailabi interactions with other micronutrients of three dietary iron sources i salmon, *Salmo salar,* smolts, *Aquacult. Nutr., 3, 239,*1997.

120. Hulten, L., Gramatkovski, R., Gleerup, A., and Hallberg, L., Iron abs from the whole diet. Relation to meal composition, iron requiremen stores, *Eur.Clin. Nutr.,* 49, 794,1995.

121. Rorvik, K. A., Salte, R., and Thomassen, M., Effects of dietary iron ai unsaturated fatty acids (omega-3) on health and immunological par farmed salmon. Abstract no. 71, *Proc. Eur. Assoc. Fish Pathol.,* Budap Hungary, 1991.

122. Salte, R., Rorvik, K. A., *Reed,* E., and Nordberg, K., Winter ulcers of Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: pathogenesis and possible aetiology, 17, 661,1994.

123. Ida, T. and Wakabayashi, H., Relationship between iron acquisition virulence of *Edwardsiella tarda,* the etiological agent of paracolo disc;

Japanese eel *Anguilla japonica,* in *Proceedings of the Second Asian Fishe* Hirano, R. and Hanyu, I., Eds., Tokyo, 1990, 667.

124. Rasmussen, K.J., Spray-dried blood in diets to Atlantic salmon *(Sain Fisk. Dir. Skr. Ser. Ern., 6,* 151,1994.

125. Lall, S. P., Naser, N., Olivier, G., and Keith, R., Influence of dietary iro nity and disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar, VII Intern Symposium on Nutrition and Feeding of Fish,* abstract, 11-15. Aug. 1996

126. Davis, D. A., Lawrence, A. L., and Gatlin, D. M., Ill, Evaluation of th iron requirement of *Penaeus vannamei, J. World Aq. Soc., 23,* 15,1992.

127. Lanno, R. P., Slinger, S. J., and Hilton, J. W., Effects of ascorbic acid o copper in rainbow trout *(Salmo gairdneri* Richardson), *Aquaculture,* 4'

128. Julshamn, K., Andersen, K. J., Ringdal, O., and Brenna, J., Effects of (copper on hepatic concentration and subcellular distribution of cop| zinc in the rainbow trout *(Salmo gairdneri), Aquaculture, 73,* 143,1988.

129. Dabrowski, K., Segener, H., Dallinger, R., Hinterleintner, S., Sturmbauer, C., and Wieser, W., Rearing of roach larvae: the vitamin C, minerals interrelationship and nutritional-related histology of the liver and intestine, J. *Anim. Physiol. Anim. Nutr.,* 62,188,1989.

130. Lorentzen, M., Maage, A., and Julshamn, K., Supplementing copper to a fish meal based diet fed to Atlantic salmon parr affects liver and selenium concentrations, *Aquacult. Nutr.,* 4, 67,1998.

131. Berntssen, M.H.G., Lundebye, A.-K., and Hamre, K., Tissue lipid peroxidative responses in Atlantic salmon *(Salmo salar* L.) parr fed high levels of dietary copper and cadmium. *Fish Physiol. Biochem.,* (2000, in press).

132. Yamamoto, Y., Ishii, T., Sato, M., and Ikeda, S., Effect of dietary ascorbic acid on the accumulation of copper in carp, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.,* 43,989,1977.

133. Yamamoto, Y, Hayama, K., and Ikeda, S., Effect of dietary ascorbic acid on the copper poisoning in rainbow trout. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.,* 47,1085,1981.

134. Ikeda, S., Importance of ascorbic acid to fish farming, in *Ascorbic Acid in Domestic Animals, Proc. of the 2nd Symposium,* Kartause, Ittingen, Switzerland 1992, 378.

135. Miller, P. A., Lanno, R. P., McMaster, M. E., and Dixon, D. G., Relative contributions of dietary and waterborne copper to tissue copper burdens and water-copper tolerance in rainbow trout *(Oncorhynchiis mykiss), Can. J. Fish. Aquat. Sci.,* 50,1683,1993.

136. Berntssen, M. H. G., Lundebye, A. K., and Maage, A., Effects of elevated dietary copper concentrations on growth, feed utilisation and nutritional status of Atlantic salmon *(Salmo salar* L.) fry, *Aquaculture,* 174,167,1999.

137. Solomons N. W. and Viteri, R E., Biological interactions of ascorbic acid and mineral nutrients. *Adv. Chem. Series,* 200, 551,1982.

138. Mahajan, C. L. and Agrawal, N. K., The role of vitamin C in calcium uptake by fish, *Aquaculture,* 19, 287,1980.

139. Ishibashi, Y, Ikeda, S., Murata, O., Nasu, T., and Harada, T., Optimal supplementary ascorbic acid level in the Japanese parrot fish diet, *Nippon Suisan Gakkaishi,* 58, 267,1992.

140. Weiser, H., Schlachter, M., Probst, H. P., and Kormann, A. W., The relevance of ascorbic acid for bone metabolism, in *Ascorbic Acid in Domestic Animals. Proceedings of the 2nd Symposium (9th-12th October 1990),* Wenk, C., Fenster, R., and Volker, L., Eds., Kartause, Ittingen, Switzerland, 1992, 73.

141. Winston, G. W. and Di Giulio, R. T., Pro-oxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicol.,* 19,137,1991.

142. Lygren, B. and Waagbe, R., Nutritional impacts on the chemiluminescent response of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) head kidney phagocytes, *in vitro, Fish Shellfish Immunol.,* 9,445,1999.

143. Bell, G. R., Higgs, D. A., and Traxler G. S., The effect of dietary ascorbate, zinc, and manganese on the development of experimentally induced bacterial kidney disease in sockeye salmon *(Oncorhynchus nerka), Aquaculture,* 36, 293,1984.

144. Dabrowska, H. and Dabrowski, K., Influence of dietary magnesium on mineral, ascorbic acid status and glutathione concentrations in tissues of a freshwater fish, the common carp. *Magnesium and Trace Elements,* 9,101,1990.

145. Maage, A., Comparison of cadmium concentrations in Atlantic salmon *(Salmo salar)* fry fed different commercial feeds. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.,* 44, 770, 1990.

146. Fox, M. R. S., Protective effects of ascorbic acid against toxicity of heavy metals, *Ann.* N. Y. *Acad. Sci.,* 335,144,1975.

«فصل ۱۱»

نقش ویتامین ث و مشتقات آن در مقاومت آبزیان نسبت به مسمومیت‌های غذایی و محیطی

Leif Norrgren, Hans Börjeson, Lares Förlin and Nina Akerblom

۱-۱۱- تاریخچه

اغلب، محیطهای آبی دریافت کننده نهایی بسیاری از آلاینده‌های مورد استفاده یا تولید شده در فرآیندهای مختلف صنعتی می باشند. طی چند دهه اخیر، ارتباط بین فاکتورهای محیطی همچون دما، شوری، اکسیژن، فلزات سنگین وآفت کش‌ها و بحث سلامت آبزیان، موضوع بسیاری از مطالعات و برنامه‌های پایش زیست محیطی بوده است. جانوران آبزی گستره وسیعی از گونه‌هایی با سطوح تروفی (غذایی) مختلف می باشند و بنابراین عکس العمل‌های متفاوتی را از خود نشان داده و بدین وسیله جنبه‌های بی‌شماری از آلودگی زیست محیطی را منعکس می‌سازند. اغلب گونه‌های مختلف بی‌مهرگان به عنوان مصرف کننده اولیه سطوح غذایی مطرح هستند و در زمره فیلترکنندگان فعال قرار دارند یا فعالانه از مواد آلی رسوبات تغذیه می کنند و این بدین معنی است که این جانوران در معرض مواد سمی بوده و جذب کننده ترکیبات سمی نامطلوب می باشند. بی‌مهرگان، یعنی صدف‌ها و سخت پوستان از مهمترین گزینه‌های غذایی خیل کثیری از ماهیان به شمار می روند و به همین جهت

می‌توانند به عنوان ناقلین مواد مغذی ضروری و ترکیبات غیر ضروری – که می توانند سمی باشند- مطرح بوده و تجمع دهنده مواد در زنجیره های غذایی آبی باشند.
مطالعات اندکی پیرامون دخالت اسیدآسکوربیک طی استرس سمیت در آبزیان انجام شده است و هدف ما در این فصل، بیان خلاصه‌ای از دانش ما در مورد اسیدآسکوربیک و مشتقات آن با تاکید ویژه بر ارتباط بین این ویتامین و استرس سمیت در جانوران آبزی است.

۲-۱۱- اسیدآسکوربیک در بی‌مهرگان آبزی

با انجام آزمایشهای تغذیه‌ای در مورد میگوی آب شیرین *Macrobrachium rosenbergii*، نشان داده شد که زنده مانی بچه میگوهای تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی اسیدآسکوربیک در غلظت‌هایی تا بیش از mg/kg ۲۰۰ در مقایسه با گروه‌های دریافت کننده غلظت‌های پایین تر، افزایش می یابد (۱) و مرگ و میر بسیار بالا در گروه‌هایی مشاهده می شود که کمتر از mg/kg ۵۰ ویتامین ث را دریافت کرده اند که در ارتباط با ناتوانایی میگوی آب شیرین در جدا نمودن موفقیت آمیز خود از اسکلت خارجی قدیمی طی پوست اندازی می باشد. در مطالعه دیگری، میگوی ببری سیاه *P. monodon*، با جیره‌های غذایی حاوی اسیدآسکوربیک در اشکال مختلف مانند سولفات L- آسکوربیل، مونوفسفات L- آسکوربیل و L- اسیدآسکوربیک در غلظت های بین mg/kg ۰-۲۰۰۰ برای مدت ۸ هفته تغذیه شدند. میگوهایی که با جیره‌هایی غذایی حاوی اسیدآسکوربیک تغذیه شده بودند، به میزان معنی داری افزایش وزن بیشتر و ضریب تبدیل غذایی بهتری را در مقایسه با میگوهای تغذیه شده با جیره‌های غذایی فاقد ویتامین ث، نشان دادند. همچنین مشخص شد که L- سولفات آسکوربیل، تنها به میزان ۲۵ درصد مونوفسفات L - آسکوربیل، در رفع نیاز ویتامینی میگوها، موثر است (۲). نقش اسیدآسکوربیک برای سلامت بی‌مهرگان آبزی در ارتباط با استرس اکسایشی، به میزان کمی بررسی شده است. با این وجود به نظر می رسد که اسیدآسکوربیک دارای عملکردهای مهمی در رشد طبیعی و پوست اندازی باشد (۱).

۳-۱۱- عوامل موثر بر غلظت‌های اسیدآسکوربیک در ماهیان

اثر شوری کم[1]، عمق کم آب، دستکاری، دما و نیتریت بر غلظت‌های اسیدآسکوربیک در اندام‌های مختلف ماهیان توسط تنی چند از محققین بررسی شده است (۳، ٤، ٥، ٦، ٧).

۱-۳-۱۱- دما

غلظت اسیدآسکوربیک در اندام‌های مختلف ماهیان طی سال دارای نوسان است. Thomas و همکاران (۳) نشان دادند که غلظت اسیدآسکوربیک در کبد ماهیان در فصل تابستان – زمانیکه دما بالاست – در حداکثر و در زمستان در حداقل مقدار خود قرار دارد. این امر ممکن است ناشی از کاهش دریافت ویتامین غذا در دمای پایین آب باشد. بالاترین غلظت اسیدآسکوربیک در مغز مشاهده می شود. بر خلاف کبد، غلظت مغزی اسیدآسکوربیک در تابستان کاهش می‌یابد. Thomas نشان داد که با افزایش دمای آب، کاهش میزان اسیدآسکوربیک مغزی در بچه ماهیان کفال خاکستری *Mugil cephalus*، قابل مشاهده است. تولید وابسته به دمای رادیکال O^{2-} در اثر پراُکسیدان چربی، در گربه ماهی آب شیرین *Heteropneustes fossilis*، نشان داده شده است (٦). بعلاوه، در دماهای بالاتر آب، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD)[2] کبدی به طور معنی داری افزایش و غلظت اسیدآسکوربیک کبدی کاهش می یابد. همچنین کاهشی در فسفولیپیدهای اصلی دیده می‌شود که ممکن است به دلیل متابولیت‌های واکنشی تشکیل شده در نتیجه پروکسیداسیون چربی باشد. همچنین دماهای بالاتر سبب کاهش غلظت‌های اسیدآسکوربیک در بافت آبشش و کیسه هوای گربه ماهی آب شیرین می شود (۷). افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و تخلیه اسیدآسکوربیک در بافت‌های مختلف، مبین آن است که سوپراکسید دیسموتاز و اسیدآسکوربیک بر اثر استرس دمایی به عنوان عوامل موثر از بین برنده رادیکال‌های اکسیژنی عمل می‌کنند.

۲-۳-۱۱- شوری

شانک سرطلایی *Sparus aurata*، نگهداری شده تحت شرایط شوری کم، تغییری در غلظت‌های

[1] Hyposalinity
[2] Superoxide dismutase

بافتی آسکوربات یا سولفات آسکوربات خود نشان نداد (٤). با این وجود، غلظت اسیدآسکوربیک در آبششهای ماهی کفال، تحت شرایط شوری کم بسرعت افزایش یافت و یک رابطه معکوس بین غلظت اسیدآسکوربیک آبشش و شوری مشاهده شد (٥). همچنین بررسی اثر ممانعتی اسیدآسکوربیک بر پمپ سدیم پتاسیم آ ت پ آزه[1]، در آبشش، تحت شرایط *in vitro* نشان می دهد که اسیدآسکوربیک در تنظیم فعالیت پمپ مذکور در آبششهای ماهیان استخوانی یوری هالین شرکت دارد. شرایط شوری پایین، سبب تخلیه سریع و آشکار غلظتهای اسیدآسکوربیک در کلیه شده در حالیکه در ابتدا یک افزایش معنی داری در مغز ایجاد می کند (٥).

۳-۳-۱۱- استرس اسارت

استرس عمق کم آب، منجر به کاهش معنی دار غلظت‌های اسیدآسکوربیک در کبد، کلیه و طحال شده و نیز کاهش غلظت سولفات آسکوربات را در کلیه شانک سر طلایی ایجاد می‌کند (٤). هنگامی که این ماهی در معرض دستکاری قرار می‌گیرد، با یک افزایش آشکار غلظت‌های اسیدآسکوربیک و سولفات آسکوربات طحالی، واکنش می‌دهد ولی این نوع استرس، اثری بر غلظتهای این دو ماده، در سایر بافت‌ها ندارد (٤). Thompson و همکاران (٨) در این مورد تحقیق نمودند که آیا مقادیر بالای اسیدآسکوربیک می‌تواند به بهبود سیستم ایمنی تضعیف شده بر اثر استرس کمک کند یا خیر. بچه ماهیان آزادماهی اقیانوس اطلس *Salmo salar*، با جیره‌هایی غذایی حاوی مقادیر کم، متوسط و بالای اسیدآسکوربیک تغذیه شدند (۰/۰۸۲، ۰/٤٤ و ۳/۱۷ گرم در هر کیلوگرم غذا) و سپس در معرض استرس اسارت دو ساعته قرار گرفتند. اگرچه، غلظت‌های مختلف اسیدآسکوربیک در جیره غذایی بر پاسخ افزایش قند خون[2]، فعالیت انفجاری اکسایشی گلبول‌های سفید، فعالیت باکتری کشی، مهاجرت گلبول‌های سفید یا فعالیت باکتر کشی پلاسما، اثری نداشت ولی تولید آنتی بادی‌های اختصاصی پس از ایمن سازی با *Aeromonas salmonicida* در ماهیانی که اسیدآسکوربیک بیشتری را دریافت کرده بودند، بالاتر از ماهیانی بود که میزان اسیدآسکوربیک در جیره غذایی آنها در

[1] Na+, K+ ATPase
[2] Hyperglycemic

حد پایینی قرار داشت. استرس صید[1] اثری بر میـزان اسیدآسـکوربیک مغـز نداشـت. از سـوی دیگـر، استرس صید سبب تخلیه شدید و سریع اسیدآسکوربیک کبدی گردید (۵).

٤-۳-۱۱- آمونیاک

نیتریت یک محصول حد واسط فرایند نیتریفیکاسیون بوده و ممکن است کـه تحـت شـرایط خاصـی مانند شرایط بی اکسیژنی، به غلظت‌های سمی خود برسد. سـمیت نیتریـت مـرتبط بـا توانـایی آن در اکسید کردن هموگلوبین به مت هموگلوبین است که این شکل از هموگلوبین قادر بـه حمـل اکـسیژن نمی باشد. جهت تعیین توانایی اسیدآسکوربیک در کاهش بیماری خون قهـوه‌ای[2]ایجـاد شـده توسـط نیتریت، Wise و همکاران (۹) گربه ماهی روگاهی *Ictalurus punctatus*، مواجه با نیتریت را بـا غلظت‌های مختلفی از اسیدآسکوربیک تغذیه کردند. آنها کـاهش معنـی داری در سـرعت ایجـاد مـت هموگلوبین را در ماهیانی مشاهده کردند که با ۷۷۲۰-۸۰۵ میلی گرم اسیدآسکوربیک در هـر کیلـوگرم غذا تغذیه شده بودند. همچنین همبستگی مثبتی بین اندازه ماهی، دمـای پـایین آب و کـاهش سـمیت نیتریت مشاهده شد (۱۰).

٤-۱۱- بر همکنش‌های بین مواد سمی آلی و اسیدآسکوربیک در ماهیان

مطالعه پیرامون ماهیان وحشی، اغلب به عنوان ابزار مهمی در مطالعات اکوتوکسیکولوژی محسوب می شود. یکی از پارامترهایی که به دفعات جهت برآورد تغییرات فیزیولوژیک در ماهیانی که در آب‌هـای دریافت کننده مواد صنعتی زندگی می‌کند، بکار می‌رود، آنالیز آنزیمهای وابـسته بـه سـیتوکروم P450 است که مسئول تغییر شکل زیـستی[3] بـسیاری از ترکیبـات، ماننـد ارگـانوکلرین‌هـا مـی باشـند (۱۱). همچنین، انواع مختلف نقص‌های پاتولوژیک مانند بدشکلی‌های جمجمه‌ای و اسـکلتی در گونـه‌هـای ساکن در مجاورت منابع نقطه‌ای آلودگی صنعتی مانند مواد حاصل از پالایش خمیر کاغذ گزارش شده است (۱۲). همچنین زخم‌ها جلدی و خوردگی باله نیز بر اثر تماس با ترکیبات سمی دیده شده اسـت

[1] Capture stress
[2] Methemoglobinemia
[3] Biotransformation

(۱۳). اسیدآسکوربیک نقش بنیادی در متابولیسم گزنوبیوتیک(ترکیب خارجی)های خاص یعنی کلروارگانیک‌ها[1] دارد که از طریق سیستم آنزیمی سیتوکروم P450 تغییر شکل می‌یابند. همچنین اسیدآسکوربیک دارای عملکردهای مهمی در طی ساخت کلاژن است که مهمترین ترکیب پروتئینی بافت‌های غضروفی و استخوانی است (۱٤). تصور می شود که ممکن است دو فرآیند هیدروکسیلاتیو[2] تشکیل کلاژن و سمیت زدایی، برای اسیدآسکوربیک فراهم رقابت کنند و ممکن است کاربرد بیش از حد یک ماده (اسیدآسکوربیک) طی یک فرآیند متابولیک، اثر منفی بر سایر فرآیندها داشته باشد (۱٤).

۱-٤-۱۱- آفت کش‌ها

گربه ماهی روگاهی تغذیه شده با غلظت‌های مختلف اسیدآسکوربیک ، طی تماس با توکسافن[3]، کاهش معنی داری غلظت اسیدآسکوربیک مهره ای را از خود نشان می دهد (۱٤). همچنین همیشه نقص های ستون مهره‌ای در گروه هایی مشاهده میشود که جیره های غذایی حاوی ٦۷۰ mg/kg – ٦۳ ویتامین ث را دریافت کرده‌اند ولی چنین زخم‌هایی در گروه تغذیه شده با ۵۰۰۰ mg/kg ویتامین ث، مشاهده نمی شود. این موضوع نشان می‌دهد که ممکن است توکسافن، موجب کمبود اسیدآسکوربیک در بافت استخوانی شده باشد. با این وجود، این موضوع که غلظت اسیدآسکوربیک کبدی تحت تاثیر توکسافن نمی باشد، در تناقض با یافته‌های ما مبنی بر جابجایی اسیدآسکوربیک از کبد به سایر بافت‌ها می باشد. به علاوه، فعالیت AHH کبدی در ماهیانی که در معرض توکسافن بوده‌اند، بالاتر است که سمیت زدایی و در نتیجه مصرف منابع اسیدآسکوربیک را در سلولهای کبدی نشان می‌دهد. نقش اسیدآسکوربیک در ارتباط با سمیت خونی القاء شده توسط آفت کش‌ها در *Calrius batrachus* نشان داد که تماس با آفت کش DDT (۰/۰۵ ppm) باعث کاهش تعداد گلبول‌های قرمز و سفید، کاهش غلظت هموگلوبین و ظرفیت حمل اکسیژنی گلبول‌های قرمز می‌شود. ماهیانی که با جیره غذایی حاوی اسیدآسکوربیک (۵ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن

[1] Chloroorganics
[2] Hydroxylative
[3] Toxaphene

بدن) تغذیه شده بودند، اثرات DDT را کمتر نشان دادند که مبین نقش اسیدآسکوربیک به عنوان یک فاکتور حفاظتی در زمان سمیت خونی ایجاد شده توسط DDT در ماهیان است (۱۵). در تحقیقی مشابه، Agrawal و همکاران (۱٦) گونه *Channa punctatus* را با جیره غذایی حاوی آلدرین[1] یا با یک جیره غذایی حاوی آلدرین و اسیدآسکوربیک (۵۰۰۰ mg/kg) تغذیه نمودند. تماس با آلدرین تنها، مرگ و میر بالا و افزایش معنی دار تعداد گلبول‌های سفید، هموگلوبین و غلظت‌های هماتوکریت را موجب می شود. نقش حفاظتی اسیدآسکوربیک امر مشهودی است و افزودن آن به جیره غذایی کاهش ده برابری نرخ مرگ و میر و کاهش معنی دار پاسخ خون شناختی ناشی از تماس با آلدرین را ایجاد می کند. در مطالعه دیگری، قزل آلای رنگین کمان در معرض حشره کش ارگانوکلره لیندان[2] (۱۰ یا ۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) قرار داده شد (۱۷). ماهیان اسیدآسکوربیک را به صورت پلی فسفات آسکوربات در غلظت‌های ٦۰ mg/kg و ۲۰۰۰ جیره غذایی یک ماه قبل از تماس با لیندان و نیز در سرتاسر دوره آزمایش دریافت کردند. اثرات لیندان تقریبا یک ماه پس از تزریق بروز نمود و اثر خود را بر سطح لیزوزیم و فعالیت سرولوپلاسمین[3] نمایان نمود. به علاوه، کاهش در نسبت لنفوسیتهای B در راس کلیه مشاهده گردید. اسیدآسکوربیک جیره غذایی در میزان بالا، تشدید بیگانه خواری، ازدیاد و تکثیر القاء شده توسط مواد میتوژن[4]، و پاسخ پادتنی را موجب می شود. همچنین بخشی از لنفوسیت‌های B به وسیله اسیدآسکوربیک تغییر می یابند در حالیکه سطح لیزوزیم در ماهیان دریافت کننده دوز بالا، پایین تر بود. این نتایج اثرات تحریک ایمنی توسط اسیدآسکوربیک را ثابت می‌کند.

۲-٤-۱۱- بی فنیل‌های پلی کلرینه

تماس قزل آلای دریاچه‌ای *Salvelinus namaychush*، با پنتا کلرو بیفینیل[5](PCB#126) ،

[1] Aldrin
[2] Lindane
[3] Ceruloplasmin
- یک آلفا- دو گلوبولین که در حمل و نقل مس در سرم نقش دارد.
[4] Mitogen-induced prolifration
[5] Pentachlorobiphenyl

موجب افزایش فعالیت وابسته به غلظت، آنزیمEROD[1] وابسته به سیتوکرم P450 کبدی می شود (۱۸). همچنین به میزان معنی داری، محصولات حاصل از تجزیه[۲] غشاء کبدی (TBARS) را افزایش می دهد که نشان دهنده استرس اکسایشی است. میزان غلظت کبدی اسیدآسکوربیک بین گروه‌ها، اختلافی را نشان نمی دهد. اثرات باهم‌بیشی فلزات و آلاینده‌های آلی بر قورباغه ماهی اقیانوس اطلس *Micropogonias undulatus*، مورد مطالعه قرار گرفت (۱۹). ماهیان در ابتدا برای مدت شش روز در معرض ۵ mg Cd/l وسپس برای مدت ۳۳ روز در معرض ۱ mg Cd/l قرار گرفتند یا با جیره‌های غذایی آلوده به مخلوط صنعتی PCB [3] با غلظت ۰/٤۲ میلی گرم به ازای گرم وزن بدن، تغذیه شدند. هر دوماده PCB و کادمیوم سبب پراُکسیداسیون چربی شدند و تماس با کادمیوم، موجب کاهش مقادیر اسیدآسکوربیک در کبد و تخمدان گردید. همچنین اختلافی در غلظت اسیدآسکوربیک بین دو بافت مذکور، پس از تماس با PCB مشاهده نشد. کاهش غلظت اسیدآسکوربیک ایجاد شده توسط کادمیوم، ممکن است پراُکسیداسیون چربی را تحریک نماید ولی تماس با PCB اختلافی را در غلظت اسیدآسکوربیک ایجاد نکرد که مبین آنست PCB، پروکسیداسیون چربی را در این بافت‌ها تحت یک مکانیزم مختلف تحریک می نماید.

۳-٤-۱۱- نفت

غلظت‌های بافتی اسیدآسکوربیک در کفال خاکستری پس از تماس با فاکتورهای استرسی از قبیل شوری، صید و دما با غلظت‌های بافتی پس از تماس یک هفته‌ای با جزئی از نفت - با ۲۰ درصد قابلیت انحلال در آب - مقایسه گردید (۲۰) و مشاهده میشود که تماس با نفت اثری بر غلظت مغزی اسیدآسکوربیک ندارد ولی غلظت آبششی اسیدآسکوربیک در نتیجه تماس با مواد نفتی، کاهش می یابد و همچنین کاهش چشمگیری در بخش انتهایی کلیه دیده می شود. به علاوه، ذخایر اسیدآسکوربیک کبدی تا ٤۵ درصد بر اثر تماس با نفت کاهش می یابد. کاهش غلظت اسیدآسکوربیک کبدی ممکن است شاخصی از تماس ماهیان با انواع خاصی از آلاینده‌ها باشد.

[1] Etoxy resorufin-O-deethylase
[2] Breakdown
[3] Arochlor 1254

داده‌های حاصله از مطالعات انجام شده در چندین فصل سال، نشان می دهد که بچه ماهیان کفال خاکستری در پایان زمستان به اثرات ایجاد شده توسط آلاینده ها بر اسیدآسکوربیک بی نهایت حساس می باشند زیرا این موقع زمانی است که ذخایر کبدی به حداقل مقدار خود می رسد(۲۰). کفال خاکستری در معرض بخش های محلول درآب دو نمونه از نفت سوختی و یک نمونه نفت خام قرار گرفت (۲۱). در ابتدا کاهش اسیدآسکوربیک در آبشش‌ها و کلیه مشاهده شد. این احتمال وجود دارد که نقص عملکرد سیستم تنظیم یونی و اسمزی بدن مشاهده شده در ماهیانی که در معرض نفت یا سایر محرکهای نامطلوب زیست محیطی قرار گرفته‌اند، مرتبط با فقدان ذخایر اسیدآسکوربیک آبشش‌ها باشد. پس از یک هفته تماس، غلظت اسیدآسکوربیک کبدی کاهش یافت که ممکن است نشان دهنده افزایش نیاز به اسیدآسکوربیک به منظور سمیت زدایی و عملکردهای حفاظتی باشد. افت معنی دار غلظت اسیدآسکوربیک مغزی فقط زمانی مشاهده می شود که ماهیان به صورت مزمن در تماس با غلظت‌های بالای نفتی قرار داده شوند. ممکن است این افت مزمن منجر به نقص عملکرد عصبی شود. تنها بافتی که به کمبود اسیدآسکوربیک پاسخ نمی دهد، ماهیچه است و ذخایر بافتی اسیدآسکوربیک ، به شدت در زمان مواجهه با مواد نفتی کاهش می‌یابند.

۵-۱۱- برهمکنش‌های بین فلزات و اسیدآسکوربیک در ماهیان

۱-۵-۱۱- سرب

لاروهای تازه تفریخ شده قزل آلای رنگین کمان که در معرض غلظت‌های مختلف سرب قرار گرفته و با جیره‌های غذایی فاقد اسیدآسکوربیک تغذیه شده بودند، دچار عوارضی همچون خمیدگی ستون مهره ها شدند که مشابه عوارض گزارش شده در کمبود اسیدآسکوربیک است (۲۲). غلظت‌های سرب در خون ماهیان با توجه به غلظت‌های سرب آب، متفاوت است و هیچ نوع ارتباطی بین میزان سرب بافت‌ها و غلظت اسیدآسکوربیک جیره غذایی گزارش نشده است. بعلاوه، غلظت‌های سرب، ویتامین ث یا بر همکنش بین این دو ماده در جیره غذایی اثری برغلظت‌های آهن خون، تعداد و حجم گلبول‌های قرمز خون ندارد. در نتیجه شواهدی برای اثر مستقیم ویتامین ث بر سمیت سرب در ماهی قزل آلای رنگین کمان وجود ندارد (۲۲).

۲-۵-۱۱- مس

در مطالعه ای پیرامون سمیت مس بر ماهیان در وضعیت‌های مختلف اسیدآسکوربیک ، بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان، با جیره‌های غذایی فاقد یا واجد اسیدآسکوربیک (mg/kg صفر، ۱۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۰۰۰۰) و مس (mg/kg صفر یا ۸۰۰)، برای مدت ۱٦ هفته تغذیه شدند (۲۳). افزودن اسیدآسکوربیک اثر مشخصی بر جذب یا متابولیسم مس ندارد. ماهیانی که با جیره‌های غذایی واجد مس تغذیه شده بودند نسبت به ماهیانی که جیره‌های غذایی فاقد مس تغذیه شده بودند، وزن کمتری را از خود نشان دادند. افزودن اسیدآسکوربیک به میزان mg/kg ۱۰۰۰۰، یک افزایش ناچیز ولی معنی دار وزن بدن را در مقایسه با گروه‌هایی ایجاد می نماید که جیره غذایی حاوی مس را دریافت کرده بودند. از طرفی مقادیر مس جیره غذایی، اثری بر غلظت اسیدآسکوربیک در راس کلیه یا کبد ندارد که نشان میدهد اسیدآسکوربیک جیره غذایی بر میزان مس موجود در راس کلیه و کبد اثری ندارد. مقادیر مس موجود در پلاسما، تحت تاثیر افزودن اسیدآسکوربیک جیره غذایی نبود که نشان می دهد اسیدآسکوربیک جذب مس موجود در جیره غذایی را به درون خون، محدود نمی کند و اثری بر نرخ تصفیه خون از مس ندارد. این موضوع در تضاد مستقیم با اثر اسیدآسکوربیک جیره غذایی بر سمیت مس با منشاء آبی در ماهیان قزل آلای رنگین کمان و کپور معمولی است و نشان می‌دهد که مس موجود در جیره غذایی به روش متفاوتی از مس موجود در آب مورد متابولیسم قرار می گیرد (۲٤، ۲۵). اسید آسکوربیک سبب کاهش جذب مس با منشاء آبی در ماهیان کپور و قزل آلای رنگین کمان می شود (۲٤، ۲۵). ممانعت از تجمع مس با دریافت اسیدآسکوربیک در هپاتونکراس، آبشش‌ها، کلیه، روده، کبد و ستون مهره مشاهده شده است. همچنین افزودن اسیدآسکوربیک به جیره غذایی از کمخونی ناشی از تجمع مس جلوگیری می‌کند.

۳-۵-۱۱-کادمیوم

پارامترهای تنفسی یک جاندار در ارزیابی استرس ناشی از مواد سمی بسیار مهم می باشند، زیرا آنها شاخص‌های با ارزشی از عملکردهای تمام فرایندهای نگهدارنده حیات بدن هستند. تنی چند از محققین، رابطه متقابل کادمیوم و اسیدآسکوربیک را مورد بررسی قرار داده‌اند. در مطالعه ای Sastry و Shukla (۲٦) ماهی آب شیرین *Channa punctatus* را در معرض کادمیوم (۱۱/۲ mg/L)

برای مدت ۹٦ ساعت قرار دارند و اثرات این فلز را بر نرخ جذب اکسیژن بررسی نمودند. مواجهه حاد با کادمیوم موجب کاهش جذب اکسیژن گردید. بر اساس اندازه گیری جذب اکسیژن کل بدن، اسیدآسکوربیک اثری بر کاهش سمیت کادمیوم ندارد. با این وجود افزایش جذب اکسیژن در آبشش، ماهیچه و کبد در ماهیانی که در تماس با ترکیبی از کادمیوم و اسیدآسکوربیک بودند در مقایسه با ماهیانی دیده می شود که فقط در تماس باکادمیوم بودند. کادمیوم تولید انواع اکسیژن واکنشی را در موجودات زنده افزایش می دهد و از فعالیت برخی آنزیم های سیستم آنتی اکسیدانی ممانعت می کند(۲۷، ۲۸). پس از تماس ماهی حوض (*Carassius auratus gibelio*, Bloch) با ۲۰ mg Cd/l برای مدت ۱، ٤، ۷ و ۱۵ روز، فعالیت آنزیم های سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز [1](CAT) به میزان معنی داری کاهش و غلظت اسیدآسکوربیک کبدی افزایش می یابد که نشان می‌دهد با وجود اینکه اسیدآسکوربیک در از بین بردن انواع اکسیژن واکنشی در کبد ماهی حوض با کاهش دادن اثرات پراُکسیداسیون چربی ایجاد شده توسط کادمیوم، نقش دارد، اسیدآسکوربیک کبدی توسط سایر بافت‌ها تامین می‌شود. Thomas و همکاران (۳۰) وضعیت اسیدآسکوربیک را در ماهی کفال خاکستری قرار داده شده در معرض کادمیوم (۱ mg Cd/l یا ۱۰)، بررسی کردند. اسیدآسکوربیک کبدی پس از ٦ هفته تماس با کادمیوم، تا ٦۰ درصد کاهش یافت که ممکن است بر اثر افزایش مصرف یا کاهش انتقال ویتامین به کبد طی تماس با کادمیوم باشد. طی دوره آزمایش، تجمع کادمیوم در کبد (۱۲٦۲ میکروگرم کادمیوم بر گرم وزن خشک) و آبشش‌ها (تقریبا، ۳۵۰ میکروگرم کادمیوم بر گرم وزن خشک) بی نهایت بالا بود و غلظت اسیدآسکوربیک آبشش‌ها تا ۵۰ درصد در گروه شاهد پس از ٤۲ روز تماس کاهش یافت که مبین آن است که در بافت‌های حاوی مقادیر بالای کادمیوم، نیاز بالایی به اسیدآسکوربیک وجود دارد با وجودیکه مقادیر خیلی پایینی از کادمیوم در مغز تجمع می‌یابد. کادمیوم می تواند نوسانات قابل توجهی را در مقادیر اسیدآسکوربیک مغزی ایجاد کند که ممکن است منجر به عدم تعادل شیمیایی- عصبی شود. طی دو هفته آخر تماس با کادمیوم، غلظتهای اسیدآسکوربیک کلیه نیز تا ۳۸ درصد گروه شاهد کاهش می یابد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که مقاومت کل ماهیان و توانایی حفظ بدن در برابر استرس‌های بیشتر، ممکن است به شدت طی کمبود جزئی اسیدآسکوربیک بر اثر تماس با کادمیوم کاهش یابد.

[1] Catalase

قزل آلای رنگین کمان تغذیه شده با جیره‌های غذایی فاقد اسیدآسکوربیک، توکوفرول یا هر دو یا هیچ کدام از آنها، در معرض یکی از ۳ غلظت کادمیوم (µg Cd/l صفر، ۲، ٤) قرار گرفتند، ماهیانی که جیره غذایی فاقد اسیدآسکوربیک را خورده بودند، کادمیوم بیشتری را در کبد خود در مقایسه با ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی واجد اسیدآسکوربیک ذخیره کردند (۳۱). Rambeck و همکاران (۳۲) پیشنهاد نمودند که اسیدآسکوربیک از طریق افزایش جذب آهن - که با کادمیوم برای مکان های باند شدن و انتقال سلولی رقابت می‌کند - از تجمع این فلز ممانعت به عمل می آورد. در نتیجه، ماهیانی که در تماس با کادمیوم قرار دارند، به شکل معنی داری تخلیه اسیدآسکوربیک را در مقایسه با ماهیانی نشان می دهند که جیره غذایی واجد اسیدآسکوربیک را خورده بودند. تماس مزمن با کادمیوم سبب افزایش بیش از حد قند خون در کفال خاکستری می شود زیرا غلظت‌های بالای گلوکز می‌تواند جذب اسیدآسکوربیک را کاهش دهد که ممکن است ذخایر بافتی اسیدآسکوربیک به میزان بیشتر در ماهیان مواجه با کادمیوم کاهش یابد (۳۰). غلظت‌های متالوتیونین[1] در ماهیانی پایین بود که با جیره‌های غذایی فاقد اسیدآسکوربیک تغذیه شده بودند و در تماس با µg Cd/l ٤ قرار گرفته بودند و نیز ماهیانی که جیره غذایی فاقد هر دو ویتامین را دریافت کرده بودند و این ممکن است نشان دهنده نقش اسیدآسکوربیک در ساخت متالوتیونین باشد (۳۱). فعالیت گلوتاتیون پروکسیداز[2] (GPx) در تمام ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی فاقد هر دو ویتامین، پائین تر بود. تحقیقات بیشتری لازم است تا مشخص شود که اسیدآسکوربیک و توکوفرول بطور مستقیم در ساخت یا فعال سازی GPx دخالت داشته یا اینکه این ترکیبات به طور غیر مستقیم در فعالیت آنزیم، بواسطه کنترل سلولی معادلهای آنتی اکسیدانی اثر دارند. Zikic و همکاران (۲۹) نشان دادند که تماس با کادمیوم در ماهی حوض، موجب افزایش میزان اسیدآسکوربیک کبدی می‌شود.

٤-٥-١١- روی

اثرات سمیت روی در ارتباط با اسیدآسکوربیک در ماهی *Channa punctatus* توسط Sen و همکاران (۳۳) مطالعه شده است. گزارش شده است که روی در غلظت‌های mg/L ۱۳/۱۸، ۱۷/۵،

[1] Metallothionein
[2] Glutathione peroxidase

۲۱/۹ و ۲۳/۰۷ سبب کاهش غلظت‌های اسیدآسکوربیک مغز و کبد می‌شود. مقادیر کاهش یافته، تغییر NADP را یا به دلیل استرس کمبود اکسیژن، اسیدوزیس یا سمیت روی نشان می‌دهند. ممکن است غلظت‌های کاهش یافته اسیدآسکوربیک ، سبب عدم مقاومت در برابر استرسهای مزمن گردد.

٦-١١- برهمکنش‌های بین اسیدآسکوربیک و سایر ویتامین‌ها

جهت تعیین اثرات با هم بیشی بیوفلاونوئید و اسیدآسکوربیک ، گربه ماهی روگاهی *Ictalurus punctatus*، با جیره‌های غذایی حاوی غلظت‌های مختلف این دو ترکیب، به مدت شانزده هفته تغذیه شدند. پس از گذشت ۱۲-۱۰ هفته از تغذیه با جیره غذایی فاقد اسیدآسکوربیک، ستون فقرات تغییر شکل یافته، خونریزی‌های خارجی و خوردگی باله در ماهیان مشاهده شد. همچنین ماهیان، کاهش وزن، ضریب تبدیل غذایی بالا، هماتوکریت پایین، کاهش شاخص کبدی و کاهش غلظت‌های اسیدآسکوربیک کبد، ماهیچه و پلاسما را نشان دادند. در نتیجه، این مطالعه فقط اثرات محدود باهمبیشی محدود بین ایزوفلاونوئید[1] معمول جیره غذایی - با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی - و اسیدآسکوربیک را در گربه ماهی نشان می دهد (٣٤). در مطالعه دیگری، قزل‌آلای رنگین کمان با جیره غذایی حاوی ترکیبات مختلف آسکوربیل مونوفسفات و همه اشکال استاته آلفاتوکوفرول (ویتامینE) تغذیه شد (۳۵). جیره‌هایی غذایی فاقد اسیدآسکوربیک ، کاهش نرخ رشد، خونریزی، نقایص آبششی، انواع بدشکلی‌ها و شکستگی را در ستون مهره ایجاد نمودند. جیره‌های غذایی فاقد ویتامین E، خونریزی در طحال، کاهش میزان هماتوکریت و هموگلوبین، کاهش تعداد گلبول‌های قرمز و افزایش همولیز همزمان گلبول قرمز را ایجاد نمودند. ماهیانی که با جیره‌های غذایی فاقد هر دو ویتامین (ث و E) تغذیه شده بودند، مرگ و میر بالایی را نشان دادند و پس از گذشت ۸ الی ۱۲ هفته غذادهی، دچار کم خونی شدند. بررسی ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی فاقد ویتامین ث و E مشخص نمود که این ماهیان دچار دیستروفی[2] عضلانی و خونریزی طحالی شدید شده‌اند. نتایج به وضوح نشان می‌دهد که یک برهمکنش قوی بین اسیدآسکوربیک و توکوفرول در قزل آلای رنگین

[1] Isoflavonoid
[2] Dystrophy

کمان وجود دارد و دیگر اینکه اسیدآسکوربیک می‌تواند از استحاله عضلانی[1] که بر اثر کمبود توکوفرول رخ می‌دهد، ممانعت بعمل آورد. بسیاری از مطالعات اثر سودمند اسیدآسکوربیک جیره غذایی را در افزایش مقاومت ماهیان به بیماری‌های باکتریایی، ویروسی و انگلی نشان داده اند. اثر ویتامین ث و E بر ایمنی غیر اختصاصی و مقاومت در برابر بیماری در قزل آلای رنگین کمان مورد بررسی قرار گرفته است زمانیکه ماهیان در مواجهه عوامل مختلف بیماری زا قرار گرفته و با ترکیبات مختلف ویتامینهای ث و E تغذیه شده اند (۳٦). محققین دریافتند که بالاترین فعالیت انفجار اکسایشی ماکروفاژی[2]، که به وسیله کمیلومینسانس(نورتابی شیمیایی)[3] اندازه گیری شده بود، در ماهیانی دیده می شود که هر دو ویتامین را به مقدار زیاد دریافت کرده بودند و در ماهیان قزل آلای رنگین کمان آلوده شده با ویروس VHS، بهترین نرخ زنده مانی را در ماهیانی مشاهده کردند که هر دو ویتامین را به مقدار زیاد دریافت کرده بودند.

۷-۱۱- اسیدآسکوربیک و نقایص تولید مثلی ماهیان

اثر اسیدآسکوربیک بر گامت زایی و لقاح جنس نر در قزل آلای رنگین کمان بررسی شده است که ماهیان با جیره‌های غذایی حاوی مقادیر مختلف مونوفسفات آسکوربیل تغذیه شده بودند. در این مطالعه اثرات وابسته به غلظت اسیدآسکوربیک بر رشد و شاخص گنادی ماهیان مشاهده نشد. با این وجود غلظت اسیدآسکوربیک در مایع اسپرمی تحت اثر مستقیم غلظت اسیدآسکوربیک جیره غذایی بود. کمبود اسیدآسکوربیک موجب کاهش غلظت و تحرک اسپرم شده و در نتیجه کاهش لقاح را بدنبال خواهد داشت که اهمیت اسیدآسکوربیک را در کیفیت گامت ماهیان نر نشان می‌دهد (۳۷). نقش اسیدآسکوربیک در جیره غذایی در جنس ماده، در ماهیان تیلاپیا *Oreochromis mossambicus*، مورد بررسی قرار گرفت که جیره‌های غذایی فاقد یا واجد اسیدآسکوربیک (۱۲۵۰ mg/kg) را خورده بود (۳۸). نتایج نشان می دهد که قابلیت تفریخ[4] تخمهای حاصله از ماهیانی که غذای فاقد مکمل را خورده بودند، به طور معنی داری نسبت به گروه

[1] Myodegneration
[2] Macrophage oxidative burst activity
[3] Chemiluminescence
[4] Hatchability

دیگر پایین تر بود و همچنین درصد فراوانی لاروهای بدشکل نیز در این گروه از ماهیان، به میزان معنی داری افزایش یافته بود. بعلاوه، لاروهای این گروه از ماهیان، رشد، بهره وری از غذا و نرخ زنده مانی ضعیفی را از خود نشان دادند. اهمیت اسیدآسکوربیک در جیره غذایی طی مراحل اولیه رشد و نمو، با افزودن اسیدآسکوربیک به جیره غذایی ثابت شد که طی این عمل رفتار، رشد، کارایی جیره غذایی و نرخ زنده مانی در مقایسه با ماهیانی بهبود یافت که از کمبود اسیدآسکوربیک رنج می‌بردند. نتایج مشابهی در آزمایشهایی به دست آمد که طی آنها قزل آلای رنگین کمان با جیره‌های غذایی حاوی صفر تا ۱۰۰۰ mg AA/kg تغذیه شده بود (۳۹). تخم‌های به دست آمده از ماهیانی که جیره غذایی فاقد مکمل اسیدآسکوربیک را خورده بودند، کاهش در توانایی تفریخ را در مقایسه با گروه شاهد از خود نشان دادند. به علاوه، میزان مرگ و میر تخم، قبل از مرحله چشم زدگی به طور معنی داری در این گروه بالاتر بود. با این وجود، هم آوری از لحاظ آماری بین گروه‌ها اختلافی نداشت و اختلاف معنی داری نیز بین قطر تخم در گروه‌های آزمایشی مشاهده نشد. در آزمایش دیگری، قزل آلای رنگین کمان با جیر غذایی فاقد اسیدآسکوربیک یا جیره غذایی حاوی مونوفسفات آسکوربات با غلظت ۳۰۰ mg AA/kg طی یک دوره زمانی ۸ ماهه تغذیه شد (٤٠). ماده‌های در حال رسیدگی در گروهی که با جیره غذایی فاقد اسیدآسکوربیک تغذیه شده بودند، به میزان معنی داری افزایش وزن کمتری در مقایسه با گروهی داشتند که مونوفسفات آسکوربات به جیره آنها افزوده شده بود. از تمام مولدین ماده گروه آسکوربات مونوفسفات، تخم استحصال شد، در حالیکه تنها نیمی از مولدین گروه فاقد اسیدآسکوربیک به رسیدگی رسیدند. درصد جنین‌های تفریخ شده و نیز غلظت اسیدآسکوربیک در تخم‌ها و لاروهای تازه تفریخ شده، در گروه تغذیه شده با جیره غذایی فاقد اسیدآسکوربیک کمترین مقدار بود. همچنین در مطالعات پیشین، قابلیت تفریخ پایین در گروه‌هایی که از جیره غذایی فاقد اسیدآسکوربیک تغذیه می کنند، مشاهده شده است (۳۸، ۳۹). Blom و Dabrowski (٤١)، اهمیت نسبی دریافت اسیدآسکوربیک مادر و نتاج را بر عملکرد نتاج قزل آلای رنگین کمان بررسی نمودند. بچه ماهیان نورس حاصله از ماده‌هایی که با جیره غذایی حاوی اسیدآسکوربیک تغذیه و با یک جیره غذایی حاوی مقادیر اندک اسیدآسکوربیک نگهداری شدند، کاهش سرعت رشد را از خود نشان دادند ولی میزان مرگ و میر در آنها حتی پس از پانزده هفته، افزایش نداشت. تغذیه نتاج دچار

کمبود ویتامین ث، با جیره‌های سرشار از اسیدآسکوربیک، نشان داد که کمبود شدید اسیدآسکوربیک در زمان تکامل جنینی و جذب کیسه زرده، آسیب غیر قابل جبرانی را برای اکثر بچه ماهیان نورس ایجاد نمی کند و آنهایی که بتوانند در مرحله بهبود اولیه زنده بمانند، قادر به رشد عادی خواهند بود. بنابراین دریافت اسیدآسکوربیک در بچه ماهیان برای گذراندن مراحل پس از تفریخ، نسبت به مقدار اسیدآسکوربیک اولیه موجود در تخم، مهم تر است. به طور خلاصه این موضوع بیان می‌دارد که افزودن اسیدآسکوربیک، انتقال مادری این ویتامین را به تخم‌ها و در نتیجه کاهش کمبود اسیدآسکوربیک طی مراحل اولیه زندگی را منجر می‌شود.

طی دهه ۱۹۹۰، مرگ و میر بالا در مراحل ابتدایی زندگی در گونه‌های مختلف ماهی در دریاچه بزرگ[1] و دریای بالتیک مشاهده شد. این نوع اختلالات – که بر چندین گونه از آزاد ماهیان اثر گذاشته‌اند – به ترتیب مربوط به سندرم مرگ و میر در مراحل اولیه(زودرس)[2] (EMS) و سندرم M74 این دو مکان بود. هر دو سندرم EMS و M74 در ارتباط با نوزادان حاصله از مولدین ماده خاصی بودند (٤٢). غلظت پایین ویتامین تیامین[3] در تخم آزاد ماهیان و لاروهای واجد کیسه زرده مهمترین مشخصه سندرم‌های EMS و M74 بود و زمانی که نوزادان ماهی دچار سندرم‌های EMS و M74، در محیط آبی غنی از تیامین قرار داده می شدند، هر دو سندرم از بین می رفتند (٤٣، ٤٤). با این حال، علت اولیه EMS و M74 هنوز هم ناشناخته است. سایر فاکتورهایی که در سبب شناسی سندرم M74 دخیل دانسته شده‌اند، استرس اکسایشی ناشی از آلاینده‌های آلی مثل PCB است (٤٥، ٤٦). همچنین سایر ویتامین‌ها یعنی آستازانتین، توکوفرول (ویتامین E) و اوبی کینون[4] (ویتامین Q) در سبب شناسی آن دخیل دانسته شده‌اند (٤٧). دخالت اسیدآسکوربیک در سبب شناسی M74 روی آلوین‌های آزاد ماهی بالتیک *Salmo salar*، از طریق مقایسه گروه‌های خانوادگی سالم با نوزادان دچار M74، مورد مطالعه قرار گرفت. از آنجاییکه گاهی اوقات مولدین در حال مهاجرت به بالادست، یکماه قبل از اوولاسیون برای جلوگیری از بروز M74، با تیامین مورد تزریق قرار می‌گیرند، گروه سومی به وجود می‌آید (٤٨). وضعیت اسیدآسکوربیک در لاروهای دارای کیسه زرده

[1] Great Lake
[2] Early mortality syndrome
[3] Thiamin
[4] Ubiquinon

آزاد ماهی بالتیک به طور معنی داری در لاروهای واجد کیسه زرده کـه دچـار سـندرم M74 بودنـد (A)، در مقایسه با لاروهای دارای کیسه زرده سالم (B)، کاهش می‌یابد (٤٨). نسل حاصل از مولدین ماده که با تزریق داخل صفاقی تیامین قبل از اوولاسیون درمان شـده بودنـد، غلظـت کـم تـا متوسـط اسیدآسکوربیک را بدون بروز بیماری M74 (C)، نشان می دهد (جدول۱-۱۱).

همان طور که توسط Borjeson و همکاران (٤٩) نشان داده شده است، درمان تیامینی مولـدین مـاده موجب غلظت بالای تیامین تخم‌ها و لاروهای واجد کیسه زرده می‌شود و ممکـن اسـت نتـایج نـشان بدهد که کمبود اسیدآسکوربیک تا حد خاصی توسط تیامین، تحمیل شده است. شاید مکانیزم دخیـل، مرتبط با حفاظت در برابر استرس اکسایشی باشد (٤٨). این نتـایج نـشان مـی‌دهـد کـه ممکـن اسـت اسیدآسکوربیک مشابه چندین ویتامین دیگر در سبب شناسی M74 نقش داشته باشد.

جدول۱-۱۱- غلظت متوسط اسیدآسکوربیک و انحراف از معیار (µmol/g وزن تر) در لاروهای دارای کیسه زرده آزادماهی بالتیک با یا بدون سندرم M74.

	M74	سلامتی	تزریق شده با تیامین
میانگین ± انحراف از معیار	۲/۵ ± ۰/۵	۳/٤ ± ۰/۹	۳/۲ ± ۰/۹
دامنه	۱/۸–۳/٤	۲/۳–٤/۹	۱/۹–٤/۳
شاخص P		۰/۰۰٤	۰/۰۱٦

منابع

1. D'Abramo, L.R.D., Moncreiff, C.A., Holcomb, F.P, Montanez, J.L., and Buddington, R.K., Vitamin C requirement of the juvenile freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture, 128, 269-275,1994.

2. Shiau, S.Y. and Hsu, T.S., Vitamin C requirement of grass shrimp, *Penaeus monodon*, as determined with L-ascorbyl-2-monophosphate. Aquaculture, 122, 347-357,1994.

3. Thomas, P., Bally, M.B., and Neff, J.M., Influence of some environmental variables on the ascorbic acid status of mullet, *Mugil cephalus* L., tissues. II. Season fluctuations and biosynthetic ability ,. Fish Biol., 27, 47-57,1985.

4. Henrique, M.M.F., Morris, PC., and Davies, S.J., Vitamin C status and physiological response of the gilthead seabream. *Spams aurata* L., to stressors associated with aquaculture. Aquacul. Res., 27, 405-412,1996.

5. Thomas, P., Influence of some environmental variables on the ascorbic acid status of mullet, *Mugil cephalus* L., tissues. I. Effect of salinity, capture-stress, and temperature. *J. Fish Biol*., 25, 711-720,1984.

6. Parihar, M.S., Dubey, A.K., Javeri, T., and Prakash, P., Changes in lipid peroxidition, superoxide dismutase activity, ascorbic acid and phospholipid content in liver of freshwater catfish Heteropneustes fossilis exposed to elevated temperature. *J. Therm. Biol*., 21 (5/6), 323-330,1996.

7. Parihar, M.S. and Dubey, A.K., Lipid peroxidation and ascorbic acid status in respiratory organs of male and female freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to temperature increase. Comp. Biochem. Physiol., 112C (3), 309-313, 1995.

8. Thompson, I., White, A., Fletcher, T.C, Houlihan, D.F., and Secombes, C.J., The effect of stress on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo solar* L.) fed diets containing different amounts of vitamin C. Aquaculture, 114,1-18,1993.

9. Wise, D.J., Tomasso, J.R., and Brandt, T.M., Ascorbic acid inhibition of nitrate-induced methemoglobinemia in channel catfish. The Progressive Fish-Culturist, 50, 77-80,1988.

10. Blanco, O. and Meade, T., Effect of dietary ascorbic acid on the susceptibility o steelhead trout (*Salrno gairdneri*) to nitrite toxicity. Rev. Biol. Trop., 28 (1), 91-10; 1980.

11. Andersson, T. and Forlin, L., Regulation of the cytochrome P450 enzyme synthesis in fish. *Aq. Tox*., 24,1-20,1992.

12. Lindesjoo, E., Fish diseases and pulp mill effluents; Epidemiological and histological studies. Ph.D. thesis. Uppsala University, ISBN 91-554-2765-0,1992.

13. Murty, A.S., Toxicity of Pesticides to Fish. CRC Press, ISBN 0-8493-6059-5,1986.

14. Mayer, F.L., Mehrle, P.M., and Crutcher, PL., Interactions of toxaphene and vitamin C in channel catfish. *Trans. Am. Fish Soc.,* 107 (2), 326-333,1978.

15. Guha, G., Dutta, K., and Das, M., Vitamin C as antitoxic factor in DDT induced haematotoxicity in *Glorias batrachus. Proc.* Zoo. Soc., Calcutta, 46 (1), 11-15,1993.

16. Agrawal, N.K., Juneja, C.J., and Mahajan C.L., Protective role of ascorbic acid in fishes exposed to organochlorine pollution. Toxicology, 11, 369-375,1978.

17. Dunier, M., Vergnet, C., Siwicki, A.K., and Verlhac, V., Effect of lindane exposure on rainbow trout *(Oncorhynclms mykiss)* immunity; IV. Prevention of nonspecific and specific immunosuppression by dietary vitamin C (Ascorbate-2-polyphos-phate). *Ecotoxicol. Environ. Saf.,* 30, 259-268,1995.

18. Palace, V.P, Klaverkamp, J.R, Lockhart, W.L., Metner, D.A., Muir, D.C.G., and Brown, S.B., Mixed-function oxidase enzyme activity and oxidative stress in lake trout *(Salvelinus namaycush)* exposed to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB-126). *Environ. Toxicol. Chem.,* 15 (6), 955-960,1996.

19. Thomas, P. and Wofford, H.W., Effects of cadmium and Aroclor 1254 on lipid peroxidation, glutathion peroxidase activity, and selected antioxidants in Atlantic croaker tissues. *Aquatic Toxicol.,* 27,159-178,1993.

20. Thomas, P. and Neff, J.M., Effects of a pollutant and other environmental variables on the ascorbic acid content of fish tissues. *Marine Environ. Res.,* 14, 489-491,1984.

21. Thomas, P., Influence of some environmental variables on the ascorbic acid status of striped mullet, *Mngil cephalus* Linn., tissues. III. Effects of exposure to oil. *Fish Biol.,* 30, 485-494,1987.

22. Hodson, P.V, Hilton, J.W., Blunt, B.R., and Slinger, S.J., Effects of dietary ascorbic acid on chronic lead toxicity to young rainbow trout *(Saimo gairdneri). Can. J. Fish Aquat. Sci.,* 37,170-176,1980.

23. Lanno, R.P, Slinger, S.J., and Hilton, J.W., Effect of ascorbic acid on dietary copper toxicity in rainbow trout *(Saimo gairdneri* Richardson). *Aquaculture,* 49, 269-287,1985.

24. Yamamoto, Y., Ishii, T., Sato, M., and Ikeda, S., Effect of dietary ascorbic acid on the accumulation of copper in carp. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.,* 43 (8), 989-993,1977.

25. Yamamoto, Y, Hayama, K., and Ikeda, S., Effect of dietary ascorbic acid on the copper poisoning in rainbow trout. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.,* 47 (8), 1085-1089,1981.

26. Sastry, K.V. and Shukia, V, Influence of protective agents in the toxicity of cadmium to a freshwater fish *(Channa puntatus). Bull. Environ. Contam. Toxicol.,* 53, 711-717,1994.

27. Kostic, M.M., Ognjanovic, B., Dimitrijevic, S., Zikic, R.V, Stajn, A., Rosic, G.L., and Zivkovic, R.V, Cadmium-induced changes of antioxidant and metabolic status in red blood cells of rats: in vivo effects. *Eur.J.. Haematol.,* 51 (2), 86-92, 1993.

28. Ognjanovic, B., Zikic, R.V, Stajn, A., Saicic, Z.S., Kostic, M.M., and Petrovic, V.M., The effects of selenium on the antioxidant defense system in the liver of rats exposed to cadmium. *Pliysiol. Res.,* 44 (5), 293-300,1995.

29. Zikic, R.V, Stajn, A., Saicic, Z.S., Spasic, M.B., Ziemnicki, K., and Petrovic, V.M., The activities of superoxide dismutase, catalase and ascorbic acid content in the liver of goldfish *(Carassius aiiratus gibelio Bloch.)* exposed to cadmium. *Physiol. Res.,* 45, 479-481,1996.

30. Thomas, P., Bally, M., and Neff, J.M., Ascorbic acid status of mullet, *Mugil cephalus* Linn., exposed to cadmium. *J. Fish Biol.,* 20,183-196,1982.

31. Palace, V.R, Majewski, H.S., and Klaverkamp, J.F., Interactions among antioxidant defenses in liver of rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)* exposed to cadmium. *Can. J. Fish Aquat. Sci., 50,*156-162,1993.

32. Rambeck, W.A., Bruckner, C, Meier, S., Zucker, H., and Kollmer, W.E. Cadmium bioavailability and the influence of feed components in chickens, Brattler (Ed.) *Trace Element Analytical Chemistry in Medicine and Biology.* Walte Gruyter, New York, 1988.

33. Sen, G., Behera, M.K., and Patel, P.N., Toxic effects of zinc on liver and brain the fish *Channa punctatus* (Bloch). *Environ. Ecol.,* 10 (3), 742-744,1992.

34. Bai, S.C. and Gatlin, D.M., Dietary rutin has limited synergistic effects on vitamin C nutrition of fingerling channel catfish *(Ictalurus punctatus). Fish Physic Biochem.,* 10 (3), 183-188,1992.

35. Frischknecht, R., Wahli, T., and Meier, W., Comparision of pathological change due to deficiency of vitamin C, vitamin E and combinations of vitamins C in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.,* 17, 31-45,199[1]

36. Wahli, T., Verlhac, V., Gabaudan, J., Schuep, W., and Meier, W., Influence of combined vitamins C and E on non-specific immunity and disease resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) *J. Fish Dis.* 21,127-137,1998.

37. Ciereszko, A. and Dabrowski, K., Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across-season study *Biol. Reprod.,* 52, 982-988,1995.

38. Soilman, A.K., Jauncey, K., and Roberts, R.J., The effect of dietary ascorbic ac supplementation on hatchability, survival rate and fry performance in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Aquaculture, 59,* 197-208,1986.

39. Sandnes, K., Uigenes, Y., Braekkan, O.R., and Utne, F., The effect of ascorbic supplementation in broodstock feed on reproduction of rainbow trout *(Salm gairdneri}. Aquaculture,* 43,167-177,1984.

40. Dabrowski, K. and Blom, J.H., Ascorbic acid deposition in rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)* eggs and survival of embryos. *Comp. Biochem. Physiol.* 108A (1),129-135,1994.

41. Blom, J.H. and Dabrowski, K., Ascorbic acid metabolism in fish: is there a maternal effect on the progeny? *Aquaculture,* 147, 215-224,1996.

42. McDonald, G., Fitzsimons, J.D., and Honeyfield, D.C., Early life stage mortality syndrome in fishes of the Great Lakes and Baltic Sea. *American Fisheries Soc. Symposium* 21, ISBN 1-888569-08-5,1998.

43. Fitzsimons, J.D., The effects of B-vitamins on a swim-up syndrome in Lake Ontario lake trout. *J. Great Lakes Res.,* 21, 286-289,1985.

44. Amcoff, P., Borjeson, H., Eriksson, R., and Norrgren, L., Effects of thiamin treatments on survival of M74-affected feral Baltic salmon. *Am. Fish. Soc*., 21,31-1998.

45. Norrgren, L., Andersson, T., Bergqvist, P.-A., and Bjorklund, I., Studies of adult feral Baltic salmon *(Salrno salar)* and yolksac fry suffering from abnormal mortality, *Env. Tox. Chem.,* 12, 2065-2075,1993.

46. Vourinen, P.J., Paasivirta, J., Keinanen, M., Koistinen, J., Rantio, T., Hyotylai T., and Welling, L., The M74 syndrome of Baltic salmon (*Salmo salar*) and organochlorine concentrations in the muscle of female salmon. *Chemosphere* 1151-1166,1997.

47. Borjeson, H. and Norrgren, L., The M74 syndrome: A review of etiological factors. *Soc. Environ. Tox. Chem.* SETAC ISBN 1-880611-19-8,1997.

48. Borjeson, H., Kallner, A., and Norrgren, L., The role of ascorbic acid in the etiology of M74. Centre for Reproductive Biology, Report 9, Uppsala, Sweden, ISSN 1403-0594,1999.

49. Borjeson, H., Amcoff, P., Ragnarsson, B., and Norrgren, L., Reconditioning of sea-run Baltic salmon *(Salmo solar*) that have produced offspring than with the M74 syndrome. *AMBIO,* 28,1, 30-36,1999.

«فصل ۱۲»

اثر ویتامین «ث» بر پاسخ ایمنی در ماهیان

Chhorn Lim, Craig A.Shoemaker and Philip H.Klesius

چکیده

اکثر ماهیان به علت فقدان آنزیم L-گولونولاکتون اکسیداز فاقد قدرت ساخت ویتامین ث در مقادیر کافی برای تامین نیازهای متابولیک بوده و به همین علت نیازمند دریافت این ویتامین از طریق رژیم غذایی هستند. عوارض ناشی از کمبود این ویتامین شامل بدشکلی‌های ساختاری، اختلال در ساخت کلاژن، کاهش فعالیت آلکالین فسفاتاز[1]، خونریزی، کم خونی، کاهش میزان اسیدآسکوربیک بافتی، بی‌اشتهایی، توقف رشد، ضریب تبدیل بالا و تاخیر در التیام زخم می‌باشد. میزان ویتامین ث مورد نیاز برای ماهیان به منظور پیشگیری از بروز علائم فوق، در محدوده ای بین ۱۰۰-۱۱ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی اعلام شده است. همچنین مشخص شده است که ویتامین ث بر سیستم ایمنی و افزایش مقاومت آبزیان در برابر بیماری‌ها نقش موثری دارد. به طور کلی سیستم ایمنی ماهیان مانند جانوران خشکی زی شامل مکانیزم ایمنی طبیعی[2] و اکتسابی[3] است. اطلاعات منتشره حاکی از آن

[1] Alkaline phosphatase
[2] Innate
[3] Acquired

است که کمبود این ویتامین موجب سرکوب سیستم ایمنی ماهیان می شود و ماهیانی که از جیره‌های غذایی فاقد ویتامین ث تغذیه شده اند نسبت به ماهیان تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی آن، نسبت به بیماری‌های عفونی حساس تر می باشند. اگرچه شواهد در مورد نقش ویتامین ث در بهبود پاسخ ایمنی و مقاومت ماهیان در برابر بیماری‌ها یکسان نیست، ولی مطالعات بیشماری حاکی از آن است که تغذیه ماهیان با مقادیر بالاتری از ویتامین ث نسبت به آنچه برای رشد عادی و جلوگیری از علائم کمبود لازم است، پاسخ ایمنی و مقاومت در برابر عفونت‌های باکتریایی را در آنها تقویت می‌نماید. بدون توجه به شواهد صریح و روشن در مورد اثرات سودمند مقادیر بالای اسیدآسکوربیک بر پاسخ ایمنی و مقاومت در برابر بیماری‌ها، تغذیه ماهیان با ویتامین ث در سطحی پیشنهاد شده است که نیازهای رشد و نیز پیشگیری از علائم کمبود را در آنها مرتفع سازد.

۱-۱۲- مقدمه

اسیدآسکوربیک یا ویتامین ث در انواع عملکردهای فیزیولوژیک جانوران، بویژه ماهیان نقش دارد. ماهیان قدیمی مانند کوسه چسبنده *Mastelusmanazo*، سپرماهی گزنده *Dasyatis akajei*، لامپری *Lampetra japonica* و ماهی شش دار آفریقایی *Protopterus aethiopicus*، می‌توانند L- اسیدآسکوربیک را از D – گلوکز بسازند، ولی ماهیان استخوانی قادر به انجام این کار نمی باشند (۱). ماهیان استخوانی مانند آزادماهی کوهو *Oncorhynchu skisutch*، قزل آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss*، دم زرد *Seriola quinquiradiata*، گربه ماهی روگاهی *Ictalurus punctatus*، تیلاپیای آبی *Oreochromis aureus* وکپور معمولی *Cyprynus carpio*، نیاز به جیره غذایی حاوی ویتامین ث دارند (۲، ۸). فقدان آنزیم L – گولونولاکتون اکسیداز، آنزیمی که مرحله نهایی ساخت اسیدآسکوربیک را از D- گلوکز به عنوان پیش ساز اصلی، کاتالیز می‌کند، یا ناتوانی ساخت اسیدآسکوربیک به میزان کافی جهت رفع نیازهای متابولیک، منجر به نیاز به یک منبع خارجی برای تامین این ویتامین می‌شود (۱، ۹ و ۱۰). بنابراین تغذیه ماهیان با جیره‌های غذایی فاقد ویتامین ث، منجر به برخی از علائم کمبود مانند بدشکلی‌های ساختاری، اختلال در ساخت کلاژن، کاهش فعالیت آلکالین فسفاتاز، خونریزی، کمخونی، کاهش

میزان اسیدآسکوربیک بافتی، بی اشتهایی، توقف رشد، ضریب تبدیل بالا و تاخیر در التیام زخم می‌شود (۱۱). حداقل میزان اسیدآسکوربیک مورد نیاز در جیره غذایی به منظور دستیابی به رشد بهینه و پیشگیری از بروز علائم کمبود این ویتامین، بر اساس عملکرد متابولیک، گونه، سن و اندازه ماهی متفاوت است (۱۰). میزان ویتامین ث مورد نیاز برای گربه ماهی روگاهی ۱۱ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی و برای قزل آلای رنگین کمان در حدود ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم جیره غذایی گزارش شده است (۲، ۱۲).

علاوه بر نیاز به ویتامین ث به منظور رشد معمول و پیشگیری از بروز علائم کمبود آن، این ویتامین نقش مهمی بر پارامترهای مختلف پاسخ ایمنی در افزایش سطح ایمنی و مقاومت به بیماری‌ها در جانوران خشکی زی و ماهیان بر عهده دارد. با این وجود شواهد موجود پیرامون نقش اسیدآسکوربیک در افزایش سطح ایمنی و مقاومت در برابر بیماری‌ها در ماهیان یکسان نیست. در این فصل مروری بر اثر ویتامین ث بر سیستم ایمنی و افزایش مقاومت به بیماری‌ها در ماهیان داریم. همچنین برای آشنا شدن خوانندگان محترم با سیستم‌ها و مفاهیم مختلف ایمنی شناسی، توصیف مختصری از عملکرد سیستم ایمنی ماهیان نیز ذکر می شود.

۲-۱۲- سیستم ایمنی ماهیان

۱-۲-۱۲- ایمنی ذاتی (غیر اختصاصی)

سیستم ایمنی در ماهیان شامل مکانیزم‌های ایمنی اکتسابی (اختصاصی) و ذاتی (طبیعی) می‌باشد، ایمنی ذاتی شامل عملکردهای ایمنی غیر اختصاصی است که ماهی از آن برای مبارزه با عوامل میکروبی و عوامل خارجی موجود در محیط اطراف، استفاده می‌کند. پوست و موکوس اولین سد دفاعی ماهی هستند که از آنها به عنوان بخشی از سیستم دفاعی ماهی نام برده می‌شود. پوست و موکوس مانند سدی از ورود عوامل بیماری زا به داخل بدن ماهی جلوگیری می‌کنند. موکوس تولید شده از سلول‌های جامی[1] دارای مواد ایمنی مانند لیزوزیم، کمپلمان(عامل مکمل) و ایمنوگلوبین‌های غیر اختصاصی می باشد (۱۳). همچنین ماهیان دارای مولکول‌ها و سلول‌های دفاعی طبیعی درونی

[1] Goblet cells

هستند. مولکول‌های ایمنی غیر اختصاصی در خون شامل لکتین[1]ها می باشند که توانایی تشخیص کربوهیدرات‌های موجود بر سطح عوامل بیماری زا یا عوامل بیگانه را دارد. لکتین ها در ارتباطات سلولی، از طریق اتصال به سلول‌ها و کمک به شناسایی آنها نقش دارند (١٤). از سایر ترکیبات می‌توان به ترانسفرین‌ها (مولکول‌های متصل شده به آهن)، پروتئین‌های مرحله حاد[2] و اجزای جریان کمپلمان اشاره نمود. سلول‌های ایمنی غیراختصاصی شامل منوسیت‌ها یا ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها (یا گرانولوسیت‌ها) و سلول‌های سیتوتوکسیک غیر اختصاصی (معادل سلول‌های کشنده طبیعی[3] در پستانداران) می‌باشند. احتمالا منوسیت‌ها و یا ماکروفاژهای بافتی، مهمترین سلول‌های درگیر در پاسخ ایمنی ماهیان هستند (١٥). Clem و همکاران (١٦) پیشنهاد نمودند که اهمیت این سلول‌ها در تولید سیتوکین[4] می باشد که به تنظیم سیستم ایمنی کمک می‌کند. ماکروفاژها مسوول عمل فاگوسیتوز و کشتن عوامل بیماری زا پس از تشخیص اولیه و عفونت حاصله از آنها می‌باشند (١٧). Vallejo و همکاران (١٨)، ابراز داشتند در ماهیان ماکروفاژها مسئول عرضه آنتی ژن به سلول‌های نوع B و T می‌باشند. ماکروفاژ مانند یک پل ارتباطی بین پاسخ ایمنی اکتسابی و غیر اکتسابی عمل می‌کند. نوتروفیل‌ها (گرانولوسیت‌ها) سلول‌های التهاب اولیه در ماهیان محسوب می‌شوند (١٩). عملکرد آنها بیشتر مربوط به تولید سیتوکین و بنابراین بهبود سلول‌های ایمنی در نواحی آسیب یا عفونت است. نوع سوم سلول‌ها، سلول‌های سیتوتوکسیک غیر اختصاصی[5] می‌باشد. این سلول ها در عملکرد مشابه سلولهای کشنده طبیعی می باشند. Evans و Jaso-Freidman (٢٠)، این سلول‌ها را در ماهیان مورد بررسی قرار دادند. عملکرد این سلول‌ها در از بین بردن سلول‌های هدف به دنبال اتصال به

---

1 .Lectin

- پروتئینی که با تمایل و ویژگی بالا به یک کربوهیدرات، معمولا اولیگوساکارید، اتصال یافته و واکنش های متقابل سلول – سلول را وساطت می کند.

2 Acute-phase proteins

3 Natural killer cell

4 Cytokine

- خانواده ای از پروتئینهای ترشحی کوچک (نظیر اینترلوکینها یا اینترفرون ها) که تقسیم سلولی یا تمایز را با اتصال به گیرنده های غشاء پلاسمایی در سلول های حساس تحریک می کنند.

5 Non-speciefic cytotoxic cells

گیرنده و پیام رسانی مسیر لیتیک[1] (لیز سلولی) برای از بین بردن هدف است. سلول‌های سیتوتوکسیک غیر اختصاصی ماهیان مسئول ایمنی در برابر انگل‌ها و ویروس‌ها می باشند (۲۱، ۲۲).

۲-۲-۱۲- ایمنی اکتسابی (اختصاصی)

سیستم ایمنی اکتسابی در ماهیان، همانند پستانداران، متشکل از دو قسمت یعنی ایمنی هومورال(خونی) و سلولی است. ماهیان توانایی افزایش پاسخ ایمنی هومورال یا آنتی بادی را دارند. سلول‌های نوع B مسول تولید آنتی بادی هستند و با ایمنوگلوبین پوشانده شده اند که به عنوان گیرنده برای تشخیص آنتی ژن عمل می‌کند (۲۳). زمانیکه آنتی ژن به سطح ایمنوگلوبین متصل می‌شود، سلول‌های B، تکثیر شده و در نهایت تولید آنتی بادی اتفاق می‌افتد. مولکول‌های آنتی بادی ماهیان، ایمنوگلوبین‌های تترامریک (IgM) هستند، یعنی از لحاظ ساختمانی مشابه IgM پستانداران هستند. Kaattari (۲٤) بررسی جالبی را پیرامون عملکرد سلول‌های B و پاسخ آنتی بادی در ماهیان انجام داد. ایمنوگلوبین‌های اختصاصی (یعنی پادتن متصل به آنتی ژن) در عملکردهای ماهیان در اپسونیزاسیون[2] باکتریها و خنثی سازی ویروس و سموم و در فعال سازی کمپلمان‌ها عمل می‌کند. پاسخ ایمنی هومورال، مسول دفاع بر علیه عوامل بیماری زای خارج سلولی یا سموم است. پاسخ ایمنی سلولی، بر علیه عوامل بیماری زای درون سلولی است و ایمنی سلولی بستگی به حضور سلول‌های همراه عرضه کننده آنتی ژن (مانند ماکروفاژها) برای فعال کردن سلول‌های T دارد. به محض تحریک شدن، جریان کمپلمان‌ها شروع شده و سلول‌های T فعال شده، سیتوکین (فاکتورهای محلول که پاسخ را کنترل می‌کنند) تولید می‌کنند که مسول فعال سازی ماکروفاژها هستند (۲۵). ماکروفاژهای فعال شده توانایی مضاعفی برای کشتن عوامل بیماری زای درون سلولی دارند و به این ترتیب در القای ایمنی اکتسابی موثرند (۱۸، ۲٦).

[1] Lytic
[2] Opsonization

– ارائه کردن و شناساندن باکتریها و سایر سلولها برای فاگوسیتوز

۱-۲-۲-۱۲- روش‌های ایمنی شناختی

سنجش‌های *in vivo* و *in vitro* به منظور تعیین اثر ویتامین ث در پاسخ ایمنی ماهیان استفاده می‌شود و این سنجش‌ها اندازه گیری عملکرد ایمنی غیر اختصاصی و اختصاصی هستند. سنجش‌های انجام شده بصورت *in vitro* از قبیل تثبیت کمپلمان‌ها، کموتاکسی(جاذبه شیمیایی)[1]، فاگوسیتوز و نابودی بوسیله ماکروفاژها، تعیین فاکتورهای خونی (یعنی لیزوزیم) و غیره برای تعیین اثر تغذیه در مقاومت طبیعی یا ایمنی ذاتی به کار میروند. مطالعات ایمنی شناختی طبیعی (*in vivo*) نیز بدین صورت است که جانور با جیره حاوی سطوح مختلف مواد مغذی تغذیه شده و سپس در مواجهه با عوامل بیماری زا قرار داده می‌شود و به دنبال آن میزان مرگ و میر بررسی می‌گردد. پاسخ‌های ایمنی اختصاصی در ماهیان، قبل و بعد از ایمن سازی یا مواجهه ماهی با عوامل بیماری زا و سپس پایش پاسخ آنتی بادی در محیط *in vitro* از طریق آگلوتیناسیون[2] یا ELISA اندازه گیری می شود. آزمایش‌های اختصاصی *in vivo* از طریق واکسیناسیون و بررسی میزان زنده مانی پس از آلوده سازی ماهیان به عوامل بیماریزا انجام می‌گیرد. اغلب بررسی‌های به کار رفته در تغذیه ماهیان و مطالعه میزان سلامت در آنها برگرفته از مطالعات انجام شده در زمینه ایمنی شناسی پستانداران می‌باشد. یک منبع بسیار مناسب از آخرین روشهای ایمنی شناختی در اندازه گیری میزان فعالیت سیستم ایمنی، مربوط به کتاب *Current Protocols in Immonology* می‌باشد که توسط انتشارات Green و Wiley بچاپ رسیده است (۲۷). در حال حاضر، بسیاری از معرف‌های اختصاصی برای بررسی عملکرد ایمنی در ماهیان وجود ندارد. بنابراین یافتن معرف‌هایی با خاصیت شناسایی مناسب، می‌تواند در تسریع و بهبود مطالعات ایمنی شناختی و تغذیه ای مفید واقع شود.

---

1 Chemotaxis

- احساس یک ماده شیمیایی اختصاصی توسط یک سلول و حرکت به طرف آن و یا دور شدن از آن

[2] Agglutination

۳-۱۲- اسیدآسکوربیک و پاسخ ایمنی

از بین تمام مواد ریز مغذی ضروری، اسیدآسکوربیک به جهت اهمیت ویژه در رابطه با برهمکنش با عملکرد سیستم ایمنی و مقاومت در برابر عوامل بیماری زا، بیشترین توجه را بخود جلب کرده است (۲۸). حجم زیاد اطلاعات در این حوزه، در نتیجه تحقیقات بیشمار در مورد انسان و جانوران خشکی زی مستعد ابتلا به اسکوروی می‌باشد. اسیدآسکوربیک برای عملکرد بهینه سلول‌ها، بافت‌ها و اندام ها ضروری است. Bendich (۲۹) پیشنهاد نمود که سیستم‌های ایمنی مانند تیموس، طحال و غدد لنفاوی و همچنین سلول‌های ایمنی که موادی را با خواص باکتری کشی و ویروس‌کشی ترشح می‌کنند، تحت تاثیر میزان دریافت ویتامین ث هستند. در سیستم‌های زیستی، اسیدآسکوربیک به عنوان یک عامل کاهنده و همچنین کوفاکتور در واکنشهای هیدروکسیلاسیون لازم برای شکل گیری هیدروکسی پرولین شرکت می کند(۳۰). این توانایی اسیدآسکوربیک در تسریع شکل گیری هیدروکسی پرولین بسیار مهم است، زیرا این ترکیب جزء مهم کلاژن بوده که از مهمترین سازنده‌های سد طبیعی بدن، یعنی پوست است. همچنین اسیدآسکوربیک نقش مهمی را در عملکرد سلول‌های فاگوسیتوز کننده دارد. پاسخ به مواد شیمیایی و نیز فاگوسیتوز توسط سلول‌های فاگوسیتوز کننده (نوتروفیل‌ها) تحت تاثیر مکمل های غذایی ویتامین ث، تحریک می‌شود (۲۸،۳۰). پیشنهاد شده است که اثر اسیدآسکوربیک بر حرکت و جابجایی فاگوسیت‌ها ممکن است از طریق اثر مستقیم آن بر ساخت و شکل گیری این سلول‌ها باشد (۲۸). میزان بالای ویتامین ث در سلول‌های فاگوسیتوز کننده، سبب محافظت این سلول‌ها و بافت‌های اطراف آنها از اکسایش ناشی از فعالیت شدید رادیکالهای اکسیژنی تولید شده در فرآیند انفجار اکسایشی[1] می‌شود که در زمان هضم سلول‌ها و کشتن ارگانیزم‌های بیماری‌زا رخ می‌دهد (۲۹،۳۰). به علاوه، حضور ویتامین ث در تولید انرژی مورد نیاز برای ترشح موادی مانند ایمنوگلوبین‌ها، اینترفرون‌ها و سایر سیتوکین‌های سلولی موثر است (۲۹).

[1] Oxidative burst

۱-۳-۱۲-گربه ماهی روگاهی

مطالعه پیرامون ارزیابی نقش اسیدآسکوربیک بر پاسخ ایمنی و مقاومت به بیماری در گربه ماهی روگاهی منجر به نتایج متناقضی شده است. Li و Lovell نشان دادندکه تحت شرایط آزمایشگاهی، عیارهای همچسبی آنتی بادی[1] در پاسخ به آنتی ژن *Edwardsiella ictaluri* ، فعالیت همولیتیک کمپلمان سرمی و بلع فاگوسیتوزی[2] *E. ictaluri* بوسیله فاگوسیت‌های محیطی در گربه ماهیان کوچک تغذیه شده با جیره‌های فاقد ویتامین ث، بصورت ناقص انجام می شود. آنها نشان دادند که افزایش اسیدآسکوربیک به میزان ۱۰۰ برابر مقدار مورد نیاز برای رشد و فقدان علائم کمبود (یعنی ۳۰۰۰ mg/Kg) موجب افزایش میزان تولید آنتی بادی و فعالیت کمپلمان‌های خون می‌شود ولی بر فرایند فاگوسیتوز اثری ندارد. توانایی های ایمنی به میزان معنی داری افزایش می یابد ولی در بین ماهیانی که جیره غذایی حاوی۳۰۰-۳۰ میلی گرم اسیدآسکوربیک را دریافت می کردند، یکسان بود. Li و همکاران (۳۲) دریافتند که افزایش مقادیر مکمل ویتامین ث (AsPP) از ۰ تا ۲۵۰ mg/Kg جیره غذایی، اثری بر سطوح آنتی بادی های اختصاصی گربه ماهی، ۲۱ روز پس از آلودگی با *E. ictaluri* نداشت. اگرچه طی مطالعه ای مشاهده گردید زمانیکه ماهیان انگشت قد بزرگ (با میانگین وزنی ۲۱/۸ گرم) بمدت ۹ هفته در استخرهای خاکی پرورش داده شده و سپس به تانک‌های پرورشی برای مدت ٤ هفته انتقال داده شوند، افزایش اسیدآسکوربیک جیره غذایی آنها تا بیش از ٤۰۰۰ mg/Kg، اثری بر عیارهای همچسبی آنتی بادی بر علیه آنتی ژن *E. ictaluri* و فعالیت همولیتیک کمپلمان‌های خونی ندارد (۳۳). شاید دلیل این اختلافها، حضور مقدار کافی ویتامین ث در غذاهای طبیعی موجود در استخرها بوده باشد (۳۱) یا پاسخ ایمنی همورال بوسیله مقدار حیاتی ویتامین ث موجود در بافت تنظیم شده باشد (۳۳).

بلع فاگوسیتوزی *E. ictaluri* بوسیله فاگوسیت‌های محیطی گربه ماهیان روگاهی کوچک پرورش داده شده در آکواریوم تحت اثر افزایش مقادیر اسیدآسکوربیک از ۳۰۰۰ mg/Kg- ۳۰ قرار نداشت (۳۱) Johnson و Ainsworth دریافتند که برای گربه ماهیان بزرگ (٤۲۰-۳۲۰ گرم) پرورش یافته

[1] Agglutinating antibody titers
[2] Phagocytic engulfment

در استخرها، افزایش سطوح AsPP از mg/Kg ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ هیچ اثری بر درصد فاگوسیتوز، شاخص فاگوسیتوزی و فعالیت باکتری کشی نوتروفیل‌های راس کلیه ندارد. Lim و همکاران (۳۵)، کاهش میانگین مهاجرت ماکروفاژی در ماهیانی که جیره غذایی فاقد یا سرشار از ویتامین ث تغذیه شده بودند، مشاهده نمودند ولی در مورد گربه ماهی روگاهی تغذیه شده با جیره غذایی حاوی mg/Kg ۳۰۰۰ ویتامین ث (AsPP) افزایش معنی دار این فاکتور را گزارش نمودند. این نتایج حاکی از آن است که افزایش ویتامین ث جیره غذایی می‌تواند اثر مثبتی بر مهاجرت ماکروفاژها داشته باشد در صورتی که بر فعالیت فاگوسیتوز کنندگی اثری ندارد.

۲-۳-۱۲- آزادماهیان

مطالعاتی که تاکنون پیرامون قزل آلای رنگین کمان انجام شده است، نشان می‌دهد که ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی mg/Kg ۱۲۰ ویتامین ث، ظرفیت کل اتصال آهن و شاخص فاگوسیتوزی به میزان معنی داری کمتر از ماهیانی می باشد که با جیره‌های غذایی حاوی mg/Kg ۱۲۰۰ ویتامین ث تغذیه شده اند (۳٦). در مطالعه دیگری، Blazer و Wolke (۳۷) پاسخ ایمنی قزل آلای رنگین کمان نگهداری شده با جیره تجاری و آزمایشگاهی تهیه شده را تعیین کردند که با گلوبولهای قرمز گوسفند یا *Yersinia ruckeri* مصون شده بودند. ماهیان تغذیه شده با جیره آزمایشگاهی که حاوی مقادیر بالاتری از ویتامین ث و E برای رفع نیازهای معمولی بودند، افزایش سلول‌های B و T را درپاسخ به گلوبولهای قرمز خون گوسفند و همچنین عیار(تیتر) آنتی بادی سرمی بر علیه *Y.ruckeri* را از خود نشان دادند. Navarre وHalver (۳۸) یک افزایش پیش رونده ای را در عیار همچسبی آنتی بادی سرمی در هر سطح افزایشی افزودن اسیدآسکوربیک بصورت مکمل غذایی (mg/Kg صفر، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰) در ماهیان واکسینه شده مشاهده نمودند. آنها پیشنهاد نمودند که افزایش در میزان عیار آنتی بادی در قزل‌آلای رنگین کمان تغذیه شده با مقادیر بالای اسیدآسکوربیک ممکن است نتیجه تحریک فعالیت لمفوسیتی باشد. با این وجود اثرات اسیدآسکوربیک بر تولید آنتی بادی های هموارل قبل از هفته‌های ششم و هشتم پس از واکسیناسیون بود.
همچنین اثر ویتامین ث بر پاسخ های لمفوسیتی قزل آلای رنگین کمان به شکل *in vitro* نیز مشاهده شده است (۳۹). تکثیر و تولید فاکتور فعال کننده ماکروفاژ در ماهی قزل‌آلای

رنگین کمانی که از جیره غذایی فاقد ویتامین ث، تغذیه کرده است، با کاربرد اسیدآسکوربیک خارجی (آسکوربات سدیم[1] و AsPP) در محیط کشت افزایش می یابد. تزریق داخلی[2] ویتامین ث، تکثیر لکوسیتها در قزل آلای رنگین کمان را تشدید می کند که از جیره غذایی فاقد ویتامین ث تغذیه شده بود. افزودن این ویتامین به محیط کشت موجب تحریک تکثیر لکوسیتهای ماهیان قزل‌آلای رنگین کمانی می شود که از جیره تجاری تغذیه کرده بودند ولی هنگامیکه میزان ویتامین ث در بدن ماهیان ۳ یا ٤ برابر بالاتر بود – همانند ماهیانی که به آنها آسکوربات تزریق شده – اثری مشاهده نگردید. در مقابل، Anggawati-Satyabudhy و همکاران (٤٠)، هیچ اختلافی را در تولید آنتی بادی ماهیان قزل آلای رنگین کمان تغذیه شده با مقادیر مختلف AsPP (۲۰ mg/Kg، ۸۰ و ۳۲۰) و ایمن شده به ویروس IHN مشاهده نکردند. به طور مشابه، Verlhac و همکاران (٤١)، بیان نمودند که عیار آنتی بادی ماهی قزل آلای رنگین کمان پس از واکسیناسیون در برابر بیماری دهان قرمز روده ای[3] و نیز فعالیت همولیتیک کمپلمان‌های خونی[4]، تحت تاثیر سطوح منوفسفات L- آسکوربات نمی باشد. اگرچه، کمبود ویتامین ث تکثیر لنفوسیتها را که توسط کانکاناوالین A[5] القاء شده است و همچنین فاگوسیتوز ذرات لاتکس توسط فاگوسیتهای جانبی را کاهش می دهد. در مطالعه دیگری Verlhac و Gabaudan (٤٢) افزایش تعداد گلبولهای سفید، تکثیر القاء شده لمفوسیتها توسط مواد میتوژن و سیتوتوکسی سیتی(مسمومیت سلولی)[6] طبیعی سلول های قزل آلای رنگین کمان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۱۰۰۰ mgAA/Kg، در مقایسه با ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ٦۰ mgAA/Kg، نشان داد.

در آزادماهی سوک آی *Oncorhynchus nerka*، عیار همچسبی آنتی بادی پس از ایمن سازی با *Aeromonas salmonicida*، تحت تاثیر سولفات آسکوربات سدیم[7] جیره غذایی نبود (٤٣). Lall و همکاران (٤٤)، شواهد قاطعی را مبنی بر اثر اسیدآسکوربیک بر تولید آنتی بادی یا فعالیت باکتری کشی سرم آزادماهی اقیانوس اطلس *Salmo salar*، آلوده شده یا نشده با

[1] Sodium ascorbate
[2] Parenteral addition
[3] Entric redmouth disease
[4] Serum heamolytic complement activity
[5] Concanavalin A
[6] Cytotoxicity
7 Na-L-ascorbate-2-sulfate

Vibrio anguillarum و *A.salmonisida* نیافتند. پاسخ آنتی بادی آزادماهی اقیانوس اطلس به آنتی ژن محلول (NIP_{11}-LPH) در ماهیان محروم از اسیدآسکوربیک، کمی پایین تر بود، ولی اختلافی بین ماهیان تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی ۵۰۰ mgAA/Kg و ۵۰۰۰ - به دو صورت اسیدآسکوربیک یا سولفات آسکوربیل - مشاهده نشد (٤٥). Hardie و همکاران (٤٦)، نشان دادند که برخی از پاسخ‌های ایمنی اختصاصی (عیار همچسبی آنتی بادی در مقابل *A.salmonicida* یا گاماگلوبولین انسانی و تولید لمفوکین) و غیر اختصاصی (فعالیت انفجار تنفسی ماکروفاژها[1]، اریتروفاگوسیتوزیس[2]) آزادماهی اقیانوس اطلس تحت تاثیر سطوح ۵۰ mg/Kg، ۳۱۰، یا ۲۷۵۰ اسیدآسکوربیک نبود. اگرچه، میزان فعالیت کمپلمان‌های خونی در ماهیان دچار کمبود ویتامین ث کاهش یافت و در ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۲۷۵۰ mg/Kg ویتامین ث افزایش چشمگیری را از خود نشان داد. Waagbø و همکاران (٤٧)، مشاهده نمودند که آنتی بادی‌های اختصاصی بر علیه *A.salmonicida*، فعالیت لیزوزیم در راس کلیه و فعالیت کمپلمان‌های سرم در ماهیان بازمانده پس از مواجهه با *A.salmonicida*، در گروه‌های تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ٤۰۰۰ mg/Kg ویتامین ث، بالاتر بود. افزایش عیار آنتی بادی در آزادماهی اقیانوس اطلس تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۲۷۷۰ mg/Kg سولفات L- آسکوربیل و ایمن شده به *A.salmonicida* و *Yersina ruckeri* مشاهده شد (٤٨). تکثیر القاء شده توسط مواد میتوژن لمفوسیت ها و سیتوتوکسی سیتی طبیعی در آزادماهی تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۱۰۰۰ mg/Kg اسیدآسکوربیک در مقایسه با ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ٦۰ mg/Kg اسیدآسکوربیک، بالاتر بود (٤٢).

۳-۳-۱۲- سایر گونه‌ها

مشخص شده است که شاخص فاگوسیتوزی سلول‌های کلیه بدوی[3] ماهی شانک قرمز *Pagrus major*، با افزایش مقادیر L- اسیدآسکوربیک یا APM افزایش می‌یابد، ولی ماهیان تغذیه

[1] Macrophage respiratory burst activity
[2] Erythrophagocytosis
[3] Pronephros cells

شده با APM/Kg mg ۱۰۰۰۰ نسبت به ماهیانی که با جیره غذایی حاوی همان مقدار اسیدآسکوربیک تغذیه شده اند، شاخص فاگوسیتوزی بیشتری داشتند. اگرچه، مسیر فرعی فعالیت کمپلمان‌ها تحت تاثیر مقادیر تغذیه ای اسیدآسکوربیک یا APM نمی باشد (٤٩).Robert و همکاران (٥٠)، اثر افزودن اسیدآسکوربیک (mg/Kg صفر، ۳۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰) را بر پاسخ ایمنی غیر اختصاصی توربوتهای جوان *Scophthalmus maximus*، مورد بررسی قرار دادند. آنها دریافتند که میزان لیزوزیم سرم به طور معنی داری در ماهیان تغذیه شده با بیشترین سطح اسیدآسکوربیک، افزایش می یابد درحالیکه شاخصهای بیگانه خواری فاگوسیتهای کلیه و طحال نیز ارتباط مثبتی را با افزایش میزان ویتامین ث از خود نشان می دهند. اگرچه میزان ویتامین ث جیره غذایی، اثری بر پروتئین‌های کل سرم خون نداشت. در مقابل، Nitzan (٥١)، گزارش نمود که عیار آنتی بادی سرم تیلاپیلای دورگه (*O. aureus* × *O. niloticus*) پرورش یافته در استخر خاکی، ١٦ روز پس از ایمن سازی به *Aeromonas hydrophila*، در ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی غنی شده با پلی فسفات اسیدآسکوربیک بیشتر از گروه تغذیه شده با جیره غذایی فاقد مکمل ویتامین ث بود.

٤-١٢- اسیدآسکوربیک و مقاومت در برابر بیماری

١-٤-١٢-گربه ماهی روگاهی

تحقیقات پیشین نشان می‌دهد که گربه ماهیان پرورش یافته در قفس یا استخرهای خاکی که با جیره‌های غذایی فاقد ویتامین ث تغذیه شده اند، در برابر عفونتهای باکتریایی نسبت به ماهیان تغذیه شده با میزان کافی ویتامین ث، حساسیت بیشتری دارند (٥، ٥٢، ٥٣). Durve و Lovell (٥٤) بیان نمودند که تحت شرایط آزمایشگاهی، افزودن mg/Kg ۳۰ ویتامین ث به جیره غذایی، می‌تواند برای رشد طبیعی، فقدان علائم کمبود و همچنین بهبود زنده مانی در برابر باکتری *Edwardsiella tarda* در دمای ۳۳ درجه سانتی گراد مفید باشد (جدول ١٢-١). در دمای آب پایین تر از ۲۳ درجه سانتی گراد، میزان اسیدآسکوربیک لازم برای افزایش مقاومت گربه ماهی روگاهی در مقابل *E. tarda* بیش از پنج برابر (mg/Kg ۱۵۰) حالت عادی خواهد بود. این محققین پیشنهاد نمودند که میزان مورد نیاز ویتامین ث برای مقابله در برابر آلودگی در دمای پایین، به علت ضعیف شدن سیستم ایمنی طبیعی، بیشتر خواهد بود. در تحقیقی، Li و Lovell (٣١) بیان

نمودند که خوراندن مقادیر بالای ویتامین ث (۳۰۰۰ mg/Kg) سبب افزایش مقاومت گربه ماهیان روگاهی نسبت به *E. ictaluri* می‌شود. Liu و همکاران (۳۳)، مشاهده نمودند وقتی گربه ماهیان روگاهی نسبت به *E. ictaluri* مقاوم می‌شوند و سپس در معرض شکل بیماری زای حاد[1] *E. ictaluri* قرار می‌گیرند، LD_{50} این باکتری با افزایش غلظتهای اسیدآسکوربیک افزایش می‌یابد. شدیدترین حالت افزایش زمانی است که مقادیر اسیدآسکوربیک بین ۱۰۰ mg/Kg تا ۱۰۰۰ جیره غذایی می باشد. این درحالی است که غلظتهای بیشتر از ۱۰۰۰ mg/Kg ویتامین ث، به میزان معنی داری LD_{50} را افزایش نمی دهد. Li و همکاران (۵۵)، تلفات شدیدی را در گربه ماهیان تغذیه شده با جیره‌های غذایی فاقد ویتامین ث مشاهده نمودند اما افزایش میزان AsPP بیشتر از حد مورد نیاز برای رشد، اثری بر بهبود مقاومت در برابر بیماری نداشت. اخیرا طی مطالعه ای، Li و همکاران (٥٦) نشان دادند که مرگ و میر تجمعی گربه ماهیان روگاهی، ۲۱ روز پس از مواجهه با *E. ictaluri* در ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی پایه کاربردی (حاوی ۳ mgAA/Kg) نسبت به ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی مکمل ویتامین ث (۵۰ mgAsPP/Kg، ۱۵۰ و ۲۵۰) پایین تر بود.

۲-٤-۱۲- آزاد ماهیان

اطلاعات پیوسته ای در مورد ارتباط متقابل میزان اسیدآسکوربیک و مقاومت در برابر بیماری‌ها در آزادماهیان وجود ندارد (جدول۱-۱۲). در قزل آلای رنگین کمان، خوراندن اسیدآسکوربیک به میزان پنج تا بیست برابر مورد نیاز برای رشد (۲۰۰۰ -۵۰۰ mg/Kg) سبب افزایش مقاومت ماهی نسبت به باکتری *V. anguillarum* می‌شود (۳۸). Anggawati-Satyabudhy و همکاران (٤٠)، دریافتند که میزان زنده مانی قزل آلای رنگین کمان آلوده شده به ویروس IHN مستقیما مربوط به میزان دریافت AsPP است، به طوری که ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی بیشترین مقدار اسیدآسکوربیک (۳۲۰ mg/Kg)، بیشترین میزان زنده مانی را از خود نشان می دهند. غلظت بالای اسیدآسکوربیک (اسیدآسکوربیک پوشانیده شده با سیلیکون یا AsPP) (۲۰۰۰ mg/kg) موجب کاهش معنی دار میزان مرگ و میر در ماهیان قزل آلای رنگین کمانی آلوده به انگل *Ichthyophthirius multifiliis* می شود. اگرچه، کاهش مرگ و میر، ناشی از افزایش و بهبود سلامت عمومی و توانایی جهت مقابله با انواع عوامل استرس زا می باشد (۵۷).

[1] Virulent

جدول ۱-۱۲: اثر اسیدآسکوربیک بر مقاومت طبیعی به بیماری

گونه ماهی	میزان (mg/g) و نوع آسکوربیک اسید	عامل بیماری زا	روش آلوده‌سازی	نوع تاثیر*	منبع
گربه ماهی روگاهی	۰ (L- اسیدآسکوربیک)	*Edwardsiella ictaluri*	غوطه وری	-	۳۱
	۳۰			+	
	٦۰			+	
	۱۵۰			++	
	۳۰۰			++	
	۳۰۰۰			++++	
گربه ماهی روگاهی	۰ (L- اسیدآسکوربیک)	*E.ictaluri*	تزریق داخل صفاقی	-	۳۳
	۱۰۰			+	
	۵۰۰			++	
	۱۰۰۰			+++	
	۲۰۰۰			+++	
	۳۰۰۰			+++	
گربه ماهی روگاهی	۰ (L- اسیدآسکوربیک)	*E. tarda*	تزریق داخل صفاقی	-	٥٤
	۳۰			+	
	٦۰			++	
	۱۵۰			+++	
گربه ماهی روگاهی	(۲ - پلی فسفاتLآسکوربیل)	*E. ictaluri*	غوطه وری	-	٥٥
	۲۵			+	
	۵۰			+	
	۱۰۰			+	
	۱۰۰۰			+	
	۲۰۰۰			+	
گربه ماهی روگاهی	(۲- پلی فسفاتL آسکوربیل)	*E. ictaluri*	غوطه وری	-	٥٦
	۵۰			-	
	۱۵۰			-	
	۲۵۰			-	
قزل آلای رنگین کمان	۰ (L- اسیدآسکوربیک)	*Vibrio anguillarum*	غوطه وری یا تزریق داخل صفاقی	-	۳۸
	۱۰۰			+	
	۵۰۰			++	
	۱۰۰۰			++	
	۲۰۰۰			++	

ادامه جدول ۱–۱۲:

گونه ماهی	میزان (mg/g) و نوع آسکوربیک اسید	عامل بیماری زا	روش آلوده‌سازی	نوع تاثیر*	منبع
قزل آلای رنگین کمان	۰ (۲- پلی فسفاتLآسکوربیل)	ویروس IHN	غوطه وری	–	٤٠
	۸۰			+	
	۳۲۰			++	
آزادماهی سوک آی	۰ (اسیدآسکوربیک پوشش دار شده با سیلیکون یا ۲ پلی فسفات L-آسکوربیل)	*Ichthyophthirus multifiliis*	افزودن ترونت‌های انگل به تانک پرورشی	–	٥٧
	۵۰			–	
	۲۰۰۰			+	
آزادماهی سوک آی	۰ (سولفات سدیمL آسکوربیل)	*Renibacteruim salmoninarum*	تزریق داخل صفاقی	–	٤٣
	۱۰			–	
	۱۰۰			–	
آزادماهی اقیانوس اطلس	۰ (L- اسیدآسکوربیک)	*Aeromonas salmonicida* و یا *V. anguillarum*	تزریق داخل صفاقی	–	٤٤،٥٨
	۵۰			–	
	۱۰۰			–	
	۲۰۰			–	
	۵۰۰			–	
	۱۰۰۰			–	
	۲۰۰۰ یا بیشتر			–	
آزادماهی اقیانوس اطلس	۹۰ (L- اسیدآسکوربیک یا ۲- سولفات آسکوربیل)	*V. salmonicida* یا *Yersinia ruckeri*	تزریق داخل صفاقی	–	٤٨
	۲۹۸۰			–	
آزادماهی اقیانوس اطلس	۵۰ (L- اسید اسکوربیک)	*A. salmonicida*	غوطه وری	–	٤٦
	۳۱۰			+++	
	۲۷۵۰			+++	
آزادماهی اقیانوس اطلس	٤٠ (۲ منو فسفات کلسیم آسکوربیل)	*A. salmonicida*	همزیستی پس از تزریق داخل صفاقی	+	٤٧
	٤۰۰			+	
	۲۰۰۰			+	
	٤۰۰۰			++	

*نوع تاثیر: بدون اثر (–)، کم (+)،خفیف (++)، متوسط (+++)، شدید (++++).

جیره غذایی حاوی سطوح ۱۰ mgAA/Kg یا۱۰۰ اسیدآسکوربیک (سولفات سدیم L- آسکوربیل) بـر مقاومـت آزاد مـاهی سـوک آی بـه عامـل بیمـاری باکتریـایی کلیـه *Renibacterium salmoninarum*، اثری ندارد (٤۳). در آزاد ماهی اقیانوس اطلس، خوراندن مقـادیر بـالای L- اسیدآسکوربیک (۲۰۰۰ mg/Kg یا بیـشتر) موجـب افـزایش مقاومـت ماهیـان در برابـر عوامـل بیماریزای *V. anguillarum* (٤٤، ٥۸)، *A. salmonicida* یا *Y. ruckeri* (٤۸) نمـی شـود. در مقابل، Hardie و همکاران (٤٦)، گزارش نمودند که آزادماهی اقیانوس اطلس تغذیه شـده بـا جیـره غذایی حاوی مقادیر کم ویتامین ث (۵۰ mg/Kg) در مقایسه با ماهیان تغذیه شده با جیره‌های غذایی معمول از لحاظ میـزان ویتـامین ث (۳۱۰ mg/Kg) و میـزان بـالای ویتـامین ث (۲۷۵۰ mg/Kg)، شروع مرگ و میری شدید را در زمان مواجهـه بـا عامـل *A. salmonicida* از خـود نـشان دادنـد. WaagbØ و همکاران (٤۷)، همچنین دریافتند که آزادماهی اقیانوس اطلس تغذیه شده با میزان بالای ویتـامین ث (٤۰۰۰ mg/Kg) در زمـان مواجهـه بـا *A. salmonicida* دارای بازمانـدگی بیـشتری نسبت به ماهیانی است که از جیره غذایی حاوی مقادیر کم ویتامین ث تغذیه کرده است.

۳-٤-۱۲- سایر گونه‌ها

مقادیر بالای ویتامین ث جیره غذایی برای افزایش مقاومت در برابـر عفونـت *Streptococcus sp.* در ماهی دم زرد *Seriola lalandi*، ثابت شده است (٥۹). در مقابل، Nitzan (٥۱)، گزارش نمـود که افزودن میزان ٤۹٥ mgAA/Kg جیره غذایی تیلاپیای پرورش یافته در استخر خـاکی، تـاثیری در افـزایش مقاومـت نـسبت بـه *A. hydrophyla* نداشـت. در مـورد لارو توربـوت *Scophthalmus maximus*، اگرچه نتایج حاصله معنی دار نبود، ولی میزان مـرگ و میـر تجمعـی کمتر و نیز شروع آهسته تر مرگ و میر پس از مواجهـه بـا *V. anguillarum* در ماهیـانی مـشاهده گردیدکه با جیره های غذایی سرشار از ویتامین ث تغذیه شده بودند (٥۰).

۵-۱۲- برهمکنش اسیدآسکوربیک و سایر مواد مغذی

مطالعات اندکی در ماهیان پیرامون برهمکنش بین اسیدآسکوربیک تغذیه ای و مواد مغـذی دیگـر بـر

پاسخ ایمنی و مقاومت نسبت به بیماری‌ها انجام شده است. Duncan و Lovell (٦٠)، گربه ماهی روگاهی را با جیره غذایی حاوی مخلوط اسید فولیک (mg/Kg صفر، ٠/٤، و ٤) و اسیدآسکوربیک (mg/Kg صفر، ٢٠ و ٢٠٠) تغذیه نمودند. آنها دریافتند که پس از مواجهه ماهیان با *E. ictaluri* بیشترین میزان بازماندگی و عیار آنتی بادی در گروهی مشاهده می‌شود که از جیره های غذایی حاوی مقدار بیشتری اسیدآسکوربیک همراه با سطوح ٠/٤ mg/Kg یا ٤ اسید فولیک، تغذیه شده اند. در سطح پایین تر اسیدآسکوربیک، مقدار اسید فولیک مورد نیاز به منظور بهبود زنده مانی، ٤ mg/Kg پیشنهاد گردید. با این وجود افزودن اسید فولیک به جیره غذایی اثری بر عیار آنتی بادی ماهیان تغذیه شده با میزان پایین ویتامین ث نداشت. Lim و همکاران (٣٥)، برهمکنش بین مقادیر اسیدآسکوربیک (mg/Kg صفر، ٥٠ و ٣٠٠٠) و آهن (mg/Kg صفر، ٣٠ و ٣٠٠) بر پاسخ ایمنی غیر اختصاصی و مقاومت نسبت به مواجهه با *E. ictaluri* را در گربه ماهی روگاهی بررسی نمودند. مشخص شد که پاسخ به مواد شیمیایی ماکروفاژها در غیاب یا حضور آنتی ژن‌های خارجی، تحت تاثیر مقادیر خوراکی آهن، ویتامین ث و بر همکنش های آنها قرار دارد. متوسط مهاجرت ماکروفاژها، در ماهیانی بالاتر می باشد که با جیره غذایی حاوی ٣٠ mg آهن تغذیه شده اند. اثر اسیدآسکوربیک بر این پارامتر، فقط زمانی مشاهده می‌شود که اسیدآسکوربیک در بیشترین میزان خود افزوده شد. اگرچه مقادیر خوراکی آهن، اسیدآسکوربیک و بر همکنش آنها، اثری بر میزان زنده مانی گربه ماهی روگاهی پس از مواجهه با *E. ictaluri* ندارد. تاثیر ترکیب گلوکان مخمر و اسیدآسکوربیک جیره غذایی بر پاسخ ایمنی اختصاصی و غیر اختصاصی قزل آلای رنگین کمان، توسط Verlhac و همکاران (٦١) مورد بررسی قرار گرفت. آنها مشاهده نمودند که تغذیه قزل‌آلای رنگین کمان با مخلوط گلوکان (در سطح توصیه شده توسط کارخانه سازنده) و دوزهای بالای اسیدآسکوربیک برای مدت دو هفته، اثر تحریک کنندگی را بر پاسخ کمیلومینسانس (انفجار اکسایشی) در نوترفیل‌ها و ماکروفاژهای راس کلیه، فعال سازی کمپلمان‌ها و تولید آنتی بادی بر علیه *Y. ruckeri* دارد. Wahli و همکاران (٦٢)، اثر توام مقادیر مختلف ویتامین ث (mg/Kg صفر، ٣٠ و ٢٠٠٠) و ویتامین E (mg/Kg صفر، ٣٠ و ٨٠٠) را بر پاسخ ایمنی غیر اختصاصی و مقاومت در برابر بیماری ماهی قزل آلای رنگین کمان، مطالعه نمودند. مشخص شد که تلفیق دوزهای بالای اسیدآسکوربیک و ویتامین E بطور معنی داری

منجر به افزایش تکثیر لمفوسیت‌ها توسط کانکاناوالین A و فعالیت انفجار اکسایشی ماکروفاژها می‌شود (که با روش کمیلومینسانس تعیین شده است). حداکثر میزان زنده مانی قزل آلای رنگین کمان آلوده شده به ویروس عامل گندخونی خونریزی دهنده، در جیره غذایی حاوی مقادیر بالای هر دو ویتامین مشاهده گردید. چنین نتایجی در ماهیان آلوده به *Y. ruckeri* نیز گزارش گردید.

٦-۱۲- نتیجه گیری

به طور کلی، کمبودهای غذایی می‌توانند منجر به افزایش حساسیت ماهیان در برابر عفونت ها شوند. سوء تغذیه طولانی مدت از طریق تضعیف سیستم ایمنی سلولی و تولید آنتی بادی هومورال و همچنین کاهش فعالیت فاگوسیتوز کننده‌ها و فاکتورهای ایمنی غیر اختصاصی، سبب کاهش مقاومت بدن می‌شود. ازسوی دیگر، خوراندن مقادیر مازاد مواد مغذی الزاما منجر به افزایش میزان مقاومت بدن نمی شود. در مورد اسیدآسکوربیک، گزارشهای متعددی حاکی از تاثیر این ویتامین بر تقویت عملکردهای ایمنی و افزایش مقاومت در برابر بیماری ها ارائه شده است. مطالعات نشان می‌دهد که کمبود اسیدآسکوربیک موجب تضعیف شدید سیستم ایمنی می‌شود و جانوران تغذیه شده با جیره‌های غذایی فاقد اسیدآسکوربیک، نسبت به ماهیانی که از جیره‌های غذایی سرشار از آن تغذیه می کنند، در برابر بیماریهای عفونی حساس تر می باشند. شواهد بدست آمده پیرامون تاثیر اسیدآسکوربیک در بهبود پاسخ ایمنی ماهیان و افزایش مقاومت نسبت به بیماری‌ها یکسان نمی باشد. با این وجود، مطالعات بی شماری نشان داده اند که تغذیه ماهیان با ویتامین ث در مقادیری بالاتر از آنچه برای رشد طبیعی و فقدان علائم کمبود لازم است، پاسخ ایمنی و نیز مقاومت آنها در برابر عفونت‌های باکتریایی تقویت می کند. تناقض های موجود بین نتایج این مطالعات، ممکن است مربوط به تفاوت در گونه، نژاد، اندازه یا وضعیت تغذیه ای و اشکال شیمیایی اسیدآسکوربیک باشد. سایر فاکتورهایی که ممکن است در نتایج تاثیرگذار باشند، می‌تواند شامل نوع طراحی آزمایش، مدیریت و طول زمان تغذیه، شرایط و تجهیزات پرورشی، قدرت بیماری زایی میکروارگانیزم‌ها، و روش یا دوزهای مورد استفاده طی مواجهه باشد. بنابراین، مطالعات بیشتری در مورد اثر اسید آسکوربیک بر اجزاء مختلف سیستم ایمنی و مقاومت در برابر بیماری در ماهیان باید انجام شود. اگرچه، در صورت

فقدان اطلاعات صریح در مورد سودمندی مقادیر بالای اسیدآسکوربیک بر پاسخ ایمنی و مقاومت در برابر بیماریها، کاربرد سطحی که نیاز ماهیان برای رشد و فقدان علایم کمبود را مرتفع سازد، پیشنهاد می‌شود. Li و همکاران (۵۵)، نشان دادند که تغذیه گربه ماهی روگاهی با مقادیر بالای اسیدآسکوربیک به منظور افزایش مقاومت به *E. ictaluri*، نباید به صورت مداوم به پرورش دهندگان تجاری ماهی توصیه شود. سطح mgAA/Kg ۱۰۰-۵۰ که بطور معمول در غذاهای تجاری مورد استفاده قرار می گیرد، احتمالا برای رشد طبیعی و حفظ سلامت گربه ماهیان روگاهی، کافی خواهد بود (۳۳، ۵۵ و۵٦).

منابع

1. Touhata, K., Toyohara, H., Tomoaki, M., Kinoshita, M., Satou, M., and Sakaguchi, M., (1995). Distribution of L-Gulono-1, 4-Lactone oxidase among Fishes, Fisheries Science, 61(4), 729.

2. Halver, J. E., Ashley, L. M., and Smith, R. R., (1969). Ascorbic acid requirements of coho salmon and rainbow trout, Transaction of the American Fisheries Society, 98, 762.

3. Kitamura, S., Suwa, T., Ohara, S., and Nakamura, K., (1965). Studies on vitamin requirements of rainbow trout, *Salmo gaidneri*, 1. On the ascorbic acid, Bulletin of the Japanese Society Scientific Fisheries, 33, 1120.

4. Sakaguchi, H., Takeda, G., and Tange, K., (1969). Studies on vitamin requirements by yellowtail, 1. Vitamin B_6 and vitamin C deficiency symptoms, Bulletin of the Japanese Society Scientific Fisheries, 35, 1201.

5. Lovell, R. T., (1973). Essentially of vitamin C in feeds for intensively fed caged channel catfish, Journal of Nutrition, 103, 134.

6. Lim, C., and Lovell, R. T., (1978). Pathology of the vitamin C deficiency syndrome in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Journal of Nutrition, 108, 1137.

7. Stickney, R. R., McGeechin, R. B., Lewis, D. H., Marks, J., Riggs, A., Sis, R. F., Robinson, E. H., and Wurts, W., (1984). Response of *Tilapia aurea* to dietary vitamin C. Journal of the World Mariculture Society. 15. 179.

8. Dabrowski, K., Hinterlietner, S., Sturmbauer, C., El-Fiky, N., and Wieser, W., (1988). Do carp larvae require vitamin C?, Aquaculture, 72. 295.

9. Ikeda, S., sato, M., and kimura, R., (1964). Biochemical studies on L-ascorbic acid in aquatic animals, III. Biosynthesis of L-ascorbic acid by carp, Bulletin of the Japanese Society Scientific Fisheries, 30. 365.

10. Wilson, R. P., and Poe, W. E., (1973). Impaired collagen formation in the scorbutic channel catfish, Journal of Nutrition, 103, 1359.

11. NRC (National Research Council).(1993). Nutrient Requirements of Fish, National Research Council, National Academic Press, Washington, D. C.,114.

12. El Naggar, G. O., and Lovell, R. T., (1991). L-ascorbyl-2-monophosphate has equal anti-scorbutic activities as L-ascorbic acid but L-ascorbyl-sulfate is inferior to L-ascorbic acid for channel catfish, Journal of Nutrition, 121, 1622.

13. Zilberg, D., and Klesius, P. H., (1997). Quantification of immunoglobulin in the serum and mucus of channel catfish at different ages and following infection with Edwardsiella ictaluri, Veterinary Immunology and Immunopathology, 58, 171.

14. Sharon, N., and Lis, H., (1993). Carbohydrates in cell recognition, Scientific American, January, 82.

15. Shoemaker, C. A., Klesius, P. H., and Lim, C., (in press), Immunity and disease resistance in fish, in Nutrition and Fish Health, Lim, C., and Webster, C., Eds, Ha´p´orth Press, Inc.

16. Clem, L. W., Sizemore, R. C., Alastair, C. F., and Miller, N. W., (1985). Monicytes as accessory cells in fish immune response, Developmental and Comparative Immunology. 9, 803.

17. Shoemaker, C. A., and Klesius, P. H., (1997). Protective immunity against enteric septicemia in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), following controlled exposure to *Edwardsiella ictaluri*. Journal of Fish Disease, 20, 361-368.

18. Vallejo, A. N., Miller, N. W., and Chem, L. W., (1992). Antigen processing and presentation in teleost immune response, in Annual Review of Fish Disease. vol. 2. Faisal, M., and Hedrick, F. M., Eds., Pergamon Press, New York, 73- 89.

19. Manning, M. J., (1994). Fishes, in Immunology: A Comparative Approach, Turner, R. J., Ed., John Wiley & sons, Chichester, Great Britain, 69.

20. Evans, D. L., and Jaso-Freidman, L., (1992). Nonspecific cytotoxic cells as effectors of immunity in fish, in Annual Review of Fish Disease, vol, 2, Faisal, M., and Hedrick, F. M., Eds., Pergamon Press, New York, 109.

21. Evans, D. L., and Gratzek, J. B., (1989). Immune defense mechanisms in fish to protozoan and helminth infections. American Zoologist, 29, 409.

22. Hogan, R. J., Stuge, T. B., Clem, L. W., Miller, N. W., and Chinchar, V. G., (1996). Antiviral cytotoxic cells in the channel catfish, Developmental and Comparative immunology, 20 115.

23. Janeway, C. A., Jr. and Travers, P., (1994). Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, Current Biology Ltd., Garland Publishing, New York, Chap 3: 1-46.

24. Kaatari, S. L., (1992). Fish B lymphocytes: defining their form and function, in Annual Review of Fish Disease vol. 2, Faisal, M., and Hedrick, F. M., Eds., Pergamon Press, New York, 161.

25. Lall, S. P., and Olivier, G., (1993). Role of micronutrients in immune response and disease resistance in fish, in Fish Nutrition in Practice, Kaushik, S. J., and Luquent, P., Eds., INRA, Paris, France, 101.

26. Shoemaker, C. A., Klesius, P. H., and Plumb, J. A., (1997). Killing of *Edwarsiella ictaluri* by macrophages from channel catfish immune and susceptible to enteric septicemia of catfish, Veterinary Immunology and Immunopathology, 58, 181.

27. Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M., and Strober, W., (1991). Current Protocols in Immunology, Green Publishing and Associates and Wiley Interscience, John Wiley & Sons, New York.

28. Bessel, W. R., (1982). Single nutrients and immunity, American Journal of Clinical Nutrition, 35, 417.

29. Bendich, A., (1987). Vitamin C and immune response, Food Technology, November, 112.

30. Muggli, R., (1993). Vitamin C and phagocytes, in Nutrient Modulation of the Immune Response, Cunningham-Rundles, S., Ed., Marcle Dekker, New York, 75.

31. Li, Y., and Lovell, R. T., (1985). Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune response in channel catfish, Journal of Nutrition, 115, 123.

32. Li, M. H., Wise, D. J., and Robinsone, E. H., (1998). Effect of dietary vitamin C on weight gain, tissue absorbate concentration, stress response, and disease resistance of channel catfish *Ictalurus punctatus*, Journal of World Mariculture Society, 29, 1-8.

33. Liu, P. R., Plumb, J. A., Guerin, M., and Lovell, R. T., (1989). Effect of mega levels of dietary vitamin C on the immune response of channel catfish *Ictalurus punctatus* in ponds, Disease of Aquatic Organisms, 7, 191.

34. Johnson, M. R., and Ainsworth, A. J., (1991). An elevated dietary level of ascorbic acid fails to influence the response of anterior kidney neutrophils to *Edwardsiella ictaluri* in channel cat fish, Journal of Aquatic Animal Health, 3, 266.

35. Lim, C., Klesius, P. H., Li, M. H., and 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.

36. Blazer, V. S., (1982). The Effect of Marginal Deficiencies of Ascorbic Acid and Alpha-tocopherol on the Natural Resistance and Immune Response of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*), Ph.D. dissertation, University of Rhode Island, Kingston, 113.

37. Blazer, V. S., Wolk, R. E., (1984). Effect of diet on immune response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*), Canadian Journal of Fisheries and aquatic sciences, 41, 1244.

38. Navarre, O., and Halver, J. E., (1989). Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C, Aquaculture, 79, 207.

39. Haddie, L. J., Marsden, M. H., Fletcher, T. C., and Secombes, C. J., (1993). In vitro addition of vitamin C affects rainbow trout lymphocyte response, Fish & Shellfish Immunology, 3, 207.

40. Anggawati-Satyabudhy, A. M. A., Grant, B. F., and Halver, J. E., (1989). Effect if L-ascorbyl-2phosphates (AsPP) on growth and immunoresistance of rainbow trout to infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus, Proceedings, Third International Symposium on Feeding and Nutrition in Fish, Toba, Japan, 411.

41. Verlhac, V., N´ Doye, A., Gabaudan, J., Troutaud, D., and Deschaux, P., (1993). Vitam9in nutrition and fish immunity, influence of antioxidant vitamin (C and E) on immune response of rainbow trout, Fish Nutrition in Practice, Kaushik, S. J., and Luquet, P., Eds., INRA, Paris, France, 167.

42. Verlhac, V., and Gabaudan, J., (1994). Influence of vitamin C on the immune system of salmonids, Aquaculture and Fisheries Management, 25, 21.

43. Bell, G. R., Higgs, D. A., and Traxler, G. S., (1984). The effect of dietary absorbate, zinc, and manages on the development of experimentally induced bacterial kidney disease in sockeye salmon, (*Oncorhynchus nerka*), Aquaculture, 36, 293.

44. Lall, S. P., Oliver, G., Weerakoon, D. E. M., and Hines, J. A., The effect of Vitamin C deficiency and excess on immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar*), Proceedings, Third International Symposium on Feeding and Nutrition in Fish, Toba, Japan, 427.

45. Sandnes, K., Hansen, T., Killie, J. E. A., and Waagbo, R., (1990). Absorbate-2-sulfate as a dietary vitamin C source for Atlantic salmon (*Salmo salar*): I. Growth, bioactivity hematology and humoral immune response, Fish Physiology and Biochemistry, 8, 419.

46. Hardie, L. H., Fletcher, T. C., and Secombes, C. J., (1991). The effect of dietary vitamin C in the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar*), Aquaculture, 95, 201.

47. Waagbo, R., Glette, J., Raa-Nilsen, E., and Sandnes, K., (1993). Dietary vitamin C, immunity and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*), Fish Physiology and Biochemistry, 12, 61.

48. Erdal, J. I., Evensen, O., Kaurstad, O. K., Lillehaug, A., Solbakken, R., and Thorud, K., (1991). Relationship between diet and immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) after feeding various levels of ascorbic acid and omega-3 fatty acids, Aquaculture, 98, 363.

49. Yano, T., Furuichi, M., Nakao, M., and Ito, S., (1990). Effect of L-ascorbyl-2-phosphate Mg on the growth and nonspecific immune system of red sea bream *Pagrus major*, abstracts, World Aquaculture Meeting. June 10-14, Halifax, Canada, T29.12.

50. Roberts, M. L., Davies, S. J., and Pulsford, A. L., (1995). The influence of ascorbic acid (vitamin C) on non-specific immunity in the turbot (*Scophthalmus maximus*), Fish & Shellfish Immunology, 5, 27.

51. Nitzan, S., Angeoni, H., and Gur, N., (1996). Effect of ascorbic acid polyphosphate (AAPP) enrichment on growth, survival and disease resistance of hybrid tilapia. The Israel Journal of Aquaculture- Bamidgeh, 48, 133.

52. Lim, C., (1977). Dietary Ascorbic Acid (Vitamin C) Requirements of Channel Catfish in Ponds and in Controlled Environment, Ph.D. dissertation, Auburn University, Auburn, AL, 76.

53. Lovell, R. T., and Lim, C., (1978). Vitamin C in pond diets for channel catfish, Transactions of American Fisheries Society, 107, 321.

54. Durve, V. S., and Lovell, R. T., (1982). Vitamin C and disease resistance in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 39, 948.

55. Li, M. H., Johnson, M. R., and Robinson, E. H., (1993). Elevated dietary vitamin C concentrations did not improve resistance of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, against *Edwardsiella ictaluri* infection, Aquaculture, 117, 303.

56. Li, M. H., Wise, D. J., and Robinsone, E. H., (1998). Effect of dietary vitamin C on weight gain, tissue absorbate concentration, stress response, and disease resistance of channel catfish *Ictalurus punctatus*, Journal of World Mariculture Society, 29, 1-8.

57. Wahli, T., Frischnecht, R., Schmill, M., and Gabaudan, J., (1995). A comparison of the effect of silicone coated ascorbic acid and ascorbyl phosphate on the source of ichthyophthiriosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), Journal of Fish Disease, 18, 347.

58. Lall, S. P., and Olivier, G., (1993). Role of micronutrients in immune response and disease resistance in fish, in Fish Nutrition in Practice, Kaushik, S. J., and Luquent, P., Eds., INRA, Paris, France, 101.

59. Hosokawa, H., Teishima, H., Shimeno, S., and Takeda, M., (1990). Effect of dietary vitamin C for intensification of immunity on yellowtail, Japanese Society of Fisheries Meeting, October, Abstracts, #437.

60. Duncan, P. L., and Lovell, R. T., (1994). Influence of vitamin C on the folate requirements of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, for growth, hematopoeisis, and resistance to *Edwardsiella ictaluri* infection, Aquaculture, 127, 233.

61. Verlhac, V., Gabaudan, J., Obach, A., Schuep, W., and Hole, R., (1996). Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Aquaculture, 143, 123.

62. Wahli, T., Verlhac, V., Gabaudan, J., Schuep, W., and Meier, W., (1998). Influence of combined vitamins C and E on non-specific immunity and disease resistance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), Journal of Fish Disease, 21, 127.

«فصل ۱۳»

مروری بر غلظت، برهمکنش و انتقال اسیدآسکوربیک در جلبک‌ها، سخت‌پوستان و ماهیان

Malcolm Brown and Patrick Lavens

چکیده

با وجود آنکه نیاز ماهیان و سخت پوستان جوان و بالغ به اسیدآسکوربیک بخوبی شناخته شده است، در مورد نیاز لاروها به این ویتامین، اطلاعات چندانی وجود ندارد. بسیاری از اطلاعات موجود در این زمینه، بر اساس آزمایشهای تغذیه‌ای بوده که با استفاده از غذاهای زنده مانند ریزجلبک‌ها یا زئوپلانکتون‌ها (روتیفرها وانواع آرتمیا) صورت پذیرفته است.

ناپلی آرتمیای غنی نشده (۰/۵-۰/۷ mg AA) به ازای گرم وزن خشک) و روتیفرهای پرورش داده شده با مخمر (۰/۱-۰/٦ mg AA به ازای گرم وزن خشک)، حاوی اسیدآسکوربیک کافی برای رشد معمول و زنده مانی لارو بسیاری از ماهیان و سخت پوستان می‌باشند. بجز این، می توان زئوپلانکتونها را به کمک ریزجلبک‌ها یا محصولات تجاری با اسیدآسکوربیک (برای مثال ۱/۵-۲/۵ mg AA/g) غنی سازی نمود. غنی سازی ممکن است شرایط فیزیولوژیک لاروهای تغذیه کننده از زئوپلانکتون‌های غنی شده را با افزایش غلظت‌های بافتی اسیدآسکوربیک، بهبود بخشد. با وجود اینکه

غنی سازی با استفاده از غنی سازهای تجاری در مقایسه با جلبکها از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه تر است، استفاده از ریزجلبک‌ها به منظور غنی سازی، می‌تواند مزایای دیگری مانند افزایش غلظت دیگر مواد مغذی نادر (مانند سایر ویتامین‌ها) را در زئوپلانکتون‌ها بهمراه داشته باشد که در نهایت بهبود رشد و یا زنده مانی لارو را بدنبال خواهد داشت.

برای لاروهایی که مستقیما از ریزجلبک‌ها تغذیه می‌کنند (مثل لاروهای اسکالوپ، اویستر و میگوهای آب شیرین)، تحقیقات بیشتری جهت ارزیابی میزان اسیدآسکوربیک مورد نیاز لازم است. به رغم اختلافاتی که در غلظت‌های اسید آسکوربیک ریزجلبکها وجود دارد، جیره‌های غذایی جلبکی به طور موفقیت آمیزی به عنوان غذایی مستقیم استفاده می شوند که دارای mg AA ۳-۱ به ازای هر گرم وزن خشک خود می‌باشند و نیاز ویتامینی به روشنی در چنین غلظت‌هایی مرتفع می‌گردد. در مقایسه با ریزجلبک‌ها به نظر می‌رسد که مخمرها و باکتری‌ها، منابع فقیری از لحاظ اسیدآسکوربیک (mg/g ۰/۳ >) باشند و ممکن است غلظت‌های آنها برای رفع نیاز تغذیه‌ای آبزیان کافی نباشد و به دلیل ارزش غذایی پایین بعنوان یک فاکتور کمکی موثر در تغذیه نرمتنان دوکفه‌ای بشمار روند.

۱-۱۳- مقدمه

اسیدآسکوربیک به عنوان یک ریز مغذی ضروری برای پرورش ماهیان و سخت پوستان شناخته شده است و با وجود اینکه تعیین مقدار نیاز آبزیان بالغ وجوان به این ویتامین بخوبی عنوان شده است (۱، ۲، ۳، ٤)، اطلاعات کمی در مورد نیاز لاروها به آن وجود دارد. احتمالا لاروها به دلیل متابولیسم و رشد سریع تر، نیاز بالاتری به اسیدآسکوربیک دارند. نرخ متابولیک، فاکتور اولیه ای درکنترل نیاز به اسیدآسکوربیک است (۵)، همچنین غلظت‌های بالای اسیدآسکوربیک در تخمهای آبزیان نیز بیانگر نیاز بالای لاروها به این ماده می باشد.

بنابراین بر اساس شواهد موجود، دریافت مقادیر کافی اسیدآسکوربیک برای لاروهایی که دارای تکامل سریع هستند، بسیار حیاتی است که منطقا این امر از طریق جیره غذایی خواهد بود. از آنجایی که تولید در تفریخگاه‌های بسیاری از گونه‌های آبزیان منوط به غذاهای زنده است، تعیین غلظتهای اسیدآسکوربیک غذاها و فهم چگونگی دستکاری و بهبود غلظت اسیدآسکوربیک با کشتهای مختلف

از اهمیت بسزایی برخوردار است.

در این فصل، جنبه‌های گوناگون مرتبط با انتقال اسیدآسکوربیک را از طریق سطوح غذایی مختلف به لارو ماهیان پرورشی، سخت پوستان و نرمتنان، مورد بررسی قرار می‌دهیم و به بیان غلظت اسیدآسکوربیک در جیره‌های غذایی میکروارگانیزمی می پردازیم که به عنوان غذای مستقیم برای لاروها و بچه ماهیان و نیز به عنوان غذایی برای زئوپلانکتون‌ها به کار می‌روند. غلظت‌های اسیدآسکوربیک در زئوپلانکتون‌های تغذیه شده با این جیره‌های غذایی و سایر فرآورده‌های غنی ساز فرموله شده مورد مقایسه قرار می‌گیرند. همچنین نیازهای تغذیه‌ای لاروها نیز مورد بررسی قرار می‌گیرد که این مقادیر از آزمایشهای تغذیه ای انجام شده با غذاهای زنده غنی شده با اسیدآسکوربیک بدست آمده اند.

۲-۱۳- غلظت‌های اسیدآسکوربیک در میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در آبزی‌پروری

۱-۲-۱۳- ریزجلبک‌ها

در آبزی پروری، از ریزجلبک‌ها به عنوان غذای زنده برای تمام مراحل رشدی دوکفه‌ای‌ها و مراحل لاروی برخی سخت پوستان و ماهیان استفاده می‌گردد. این ریزجلبک‌ها همچنین توسط زئوپلانکتون‌هایی (روتیفرها، آرتمیا وکوپه پودها) که به عنوان غذا برای مراحل پایانی دوره لاروی و جوانی بسیاری از سخت پوستان و ماهیان پرورش داده می‌شوند، مورد استفاده قرار می‌گیرند. ریزجلبک‌ها با توجه به شکل، اندازه، سمیت، قابلیت هضم و ترکیب بیوشیمیایی، دارای ارزش غذایی متفاوتی هستند (۷، ۸، ۹، ۱۰). تلاشهای صورت گرفته جهت درک ارتباط بین ترکیب مواد مغذی ریزجلبک‌ها و ارزش غذایی آنها (۸، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱٤)، بعلت اختلافات و تنوع موجود در قابلیت هضم آنها، بسیار مشکل است و هنوز اطلاعات موجود در زمینه ترکیب شیمیایی ریزجلبک‌ها نیز ناقص می باشد. با وجود اینکه اسیدهای چرب غیر اشباع با زنجیره بلند 20:5(n-3) و 22:6(n-3) موجود در ریزجلبک‌ها (که در اغلب گونه‌ها به جز کلروفیت‌ها وجود دارد) برای رشد سخت پوستان دریایی، ضروری تشخیص داده شده‌اند (۱۵) اهمیت سایر مواد مغذی موجود در آن‌ها مانند ویتامین‌ها کمتر مورد توجه و مطالعه بوده است.

بنظر می‌رسد که تفاوت در غلظت‌های اسیدآسکوربیک در بین گونه‌های ریزجلبکی در مقایسه با سایر ویتامین‌ها، بیشتر باشد (۱۶، ۱۷). Bayanova و Trubacheva (۱۸) در مطالعه‌ای پیرامون هفت گونه از ریزجلبکها دریافتند که اختلاف در غلظت اسیدآسکوربیک بین گونه‌های مورد بررسی، به ۵۰ برابر می‌رسد. به طور مشابه، Brown و Miller (۱۶) اختلاف بیشتر از ۱۵ برابری غلظتهای اسیدآسکوربیک را بین یازده گونه جلبکی رایج در آبزی پروری، گزارش نمودند. به طورکلی، گزارش شده است که اغلب ریزجلبک‌ها حاوی ۳-۱ میلی گرم اسیدآسکوربیک به ازای هر گرم وزن خشک خود می‌باشند (جدول ۱۳-۱). بالاترین غلظت‌های اسیدآسکوربیک در مورد *Chlorella vulgaris* (۱۵ mg/g) (۱۹)، *Chaetoceros muelleri* (۱۶ mg/g در فاز ثابت) (۱۶) و *Chlorella pyrenoidosa* (تقریبا ۳۰ mg/g، یک نژاد دستکاری شده از لحاظ ژنتیکی که به طور هتروتروف رشد می‌کند) گزارش شده است (۲۰) . Happette و Poulet (۲۱) نیز میزان اسیدآسکوربیک (پیکوگرم در هر سلول) را در پنج گونه از ریزجلبک‌ها آزمایش نمودند ولی غلظت‌های اسیدآسکوربیک را بر پایه وزن خشک بیان نکردند.

حتی مقادیر گزارش شده برای یک گونه نیز می‌تواند متفاوت باشد، برای مثال، گزارش شده است که *Skeletonema costatum* دارای ۰/۰۶ (۱۴)، ۱/۵ (۲۲)، ۵/۳ تا ۸/۷ (۱۶) میلی گرم اسیدآسکوربیک در هر گرم، می‌باشد. برخی از این اختلافات ممکن است تا حدی ناشی از اختلافات موجود در شرایط پرورشی یا روش‌های برداشت، تخلیص و آنالیز ریزجلبک‌ها باشد. برای مثال، Happette و Poulet (۲۳) دریافتند که برای تخلیص اسیدآسکوربیک از پلانکتون‌ها، استونیتریل[1] یا اسید متافسفریک + اسید استیک نسبت به متانول یا اتانول، سه تا چهار برابر کارایی بیشتری دارد. همین محققین دریافتند که مقادیر اسیدآسکوربیک تخلیص شده از پلانکتون که با سنجش HPLC با ستونهای فاز معکوس تعیین شده است، بیش از ده برابر مقادیر تعیین شده با سنجش HPLC با ستونهای تعویض آنیون است. به منظور سنجش HPLC اسیدآسکوربیک، نمونه‌ها باید یا بصورت تازه یا پس از نگهداری در ۸۰- درجه سانتی گراد یا پائین تر از آن مورد آنالیز قرار گیرند زیرا انجماد در دماهایی مانند ۲۰- درجه سانتی گراد منجر به از دست رفتن اسیدآسکوربیک در

[1] Acetonitrile

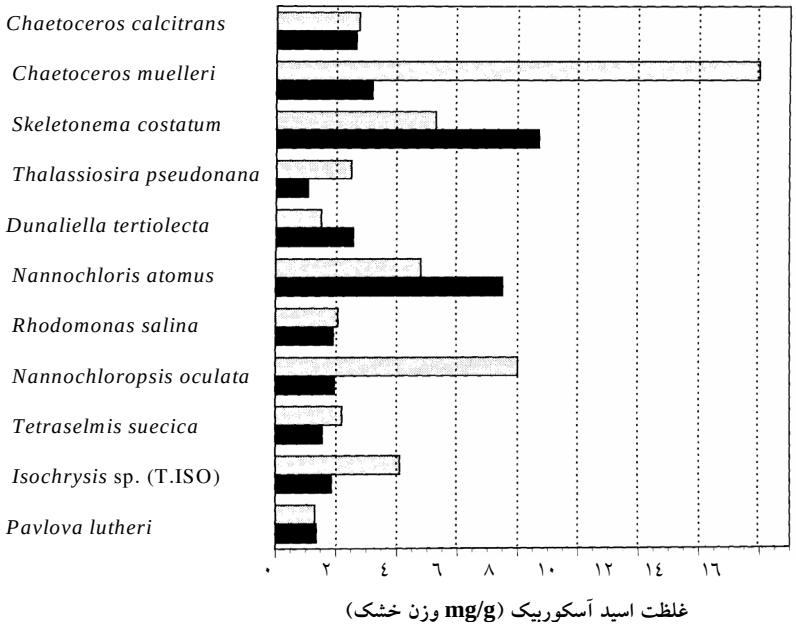
ریزجلبک‌ها (تا بیش از ٤٠ درصد) می شود (۲۳). بـه دلایـل فـوق، مقایـسه مقـادیر اسیدآسـکوربیک تعیین شده در مطالعات مختلف، کار آسانی نخواهد بود.

گسترده ترین مطالعه در این زمینه توسـط Brown و Miller (١٦)، در مـورد فازهـای لگـاریتمی و ثابـت رشـد ١١ ریزجلبـک (٦ رده) انجـام گرفـت (شـکل ١٣-١). دامنـه غلظـت هـای اسیدآسکوربیک از ١ mg/g (*Thalassiosira pseudonana* در فاز ثبات) تـا ١٦ mg/g (*Chaetocerus muelleri* در فاز لگاریتمی) تعیین شد که این غلظت‌هـا بـا رده جلبکـی ارتبـاطی نداشـت و در اغلـب گونـه هـا، غلظتهـای اسیدآسـکوربیک فـاز ثابـت و لگـاریتمی متفـاوت بـود. *Nanochloropsis oculata*، *T. pseudonana*، *Chaetocerus muelleri* و *Isochrysis* sp. (T.ISO) دارای غلظت‌های بالاتری از اسیدآسـکوربیک در فـاز لگـاریتمی رشـد بودنـد، در حالیکـه *Dunaliella tetriolecta* و *Nanochloris atomus*، دارای غلظـت اسیدآسکوربیک بالاتری در فاز ثابت رشد بودند. هیچ نوع ارتباط روشنی بین غلظت اسیدآسـکوربیک در ریزجلبـک‌هـای غـذایی و ارزش غـذایی آنهـا وجـود نداشـت. بـرای مثـال، *D. tertiolecta*، *Nanochloris atomus* و *T. suecica* دارای غلظت‌های مـشابه یـا بیـشتری نـسبت بـه اغلـب گونه‌ها بودند در حالیکه این گونه ها فقیرترین ارزش غذایی را برای نرمتنان دوکفه‌ای دارند (٢٦).

تغییرات در غلظت اسیدآسکوربیک در ریزجلبک‌هایی که از فاز لگاریتمی به فاز ثابت رشد می رونـد، منعکس کننده نوعی پاسخ فیزیولوژیک سلولی بـه محـدودیت ماکرونوترینـت‌هـای معـدنی همچـون نیترات و سیلیکات می باشد. غلظت‌های فلزات نادر در محیط کشت جلبک‌ها، نیز می‌تواند بـر تولیـد اسیدآسکوربیک موثر باشد به طوری که غلظـت‌هـای بـالای آهـن (٨ mg/L) و مـس (١/١ mg/L)، تولید اسیدآسکوربیک را در *Chlorella pyrenoidosa* – که به صورت هتروتروفیک پرورش داده شده بود – کاهش می‌دهند ولی در غلظت ١/١ mg/L آهن و ٠/١١ mg/L مس، تولیـد بهینـه دور از انتظار نخواهد بود (٢٠).

جدول ۱-۱۳: غلظت اسیدآسکوربیک (mg/g وزن خشک) در ریزجلبک‌ها

رده و تعداد ریزجلبک‌های آنالیز شده	شرایط پرورش	میانگین AA (و دامنه)	منبع
۲ کلروفیت، ٤ سیانوفیت، ۱ رودوفیت	نور دائم، دمای ٢٤ الی°C ٥٦، از اواخر فاز کند رشد تا فاز ثابت	۱/٦ (۰/۰٥ الی ۲/٤)	۱۸
۳ کلروفیت، ۱ سیانوفیت	نور دائم، دمای ۱٥ الی°C ۲٥، فاز ثابت	٥/۳ (۲ الی ٥)	۱۹
۱ پرازینوفیت، ۲ پریمنزیوفیت، ۱ دیاتومه	نور دائم، دمای°C ۱۸، زمان برداشت، مشخص نشده است	۰/٦ (۰/۰٦ الی ۰/۸)	۱٤
۲ پریمنزیوفیت، ۱ دیاتومه	نور دائم، دمای°C ۱۸، اواخر فاز کند	۱/٤ (۰/۷ الی ۱/۸)	۲۲
۱ کلروفیت، ۱ پریمنزیوفیت، ۱ یوستیگماتوفیت	نور دائم، دمای°C ۲٥، اواخر فاز کند	۲/۳ (۱/۱ الی ۳/۸)	۲٤
۲ کلروفیت، ۱ پرازینوفیت، ٤ دیاتومه، ۱ پرازینوفیت، ۱ کریپتوفیت، ۱ یوستیگماتوفیت	L:D ۱۲:۱۲، دمای°C ۲۰، فاز کند	٤/٦ (۱/۳ الی ۱٦)	۱٦
۲ کلروفیت، ۱ پرازینوفیت، ٤ دیاتومه، ۱ پرازینوفیت، ۱ کریپتوفیت، ۱ یوستیگماتوفیت	L:D ۱۲:۱۲، دمای°C ۲۰، فاز ثابت	۳/۱ (۱/۱ الی ۸/۷)	۱٦
۱٦ کلروفیت، ۳ دیاتومه، ۲ سیانوفیت، ۱ کریزوفیت، ۱ اوگلنوفیت	رشد در شرایط تاریکی (هتروتروف)، دما °C۳٥، اواخر فاز کند	۰/۹ (۰/۰٥ الی ٥/۷)	۲۰



شکل ۱-۱۳: غلظت اسیدآسکوربیک ریزجلبک‌های مختلف

شدت و دوره نوری نیز از جمله عوامل موثر بر ساخت آسکوربات در ریزجلبک‌ها هستند. در کشت‌های *T. pseudonana* تحت نور مداوم (۲٤:۰ h L:D)، غلظت‌های اسیدآسکوربیک، زمانی که شدت نوری از ۵۰ µmol photon/m^2/s به ۱۰۰ می رسد تا ۳۵ درصد افزایش دارد (۱٦). همان جلبک در شدت نوری ۱۰۰ µmol photon/m^2/s، افزایش ۳۸ درصدی اسیدآسکوربیک را تحت دوره نوری ۲٤:۰ L:D، نسبت به دوره نوری ۱۲:۱۲ L:D، از خود نشان می دهد (۱٦) و در *Nannochloropsis* sp. این اختلاف ۲۸ درصد می‌باشد (۲۷).جلبک *Chlorella pyrenoidosa* که قبلا بصورت هتروتروف در شرایط تاریکی رشد کرده بود، پس از تماس با ۱۲ ساعت روشنایی، افزایش چهار برابری غلظت اسیدآسکوربیک را از خود نشان داد (۲۸). بعلاوه، متوسط مقادیر اسیدآسکوربیک در جلبک‌های پرورش داده شده به صورت هتروتروف، (۰/۹ mg/g،

جدول ۱-۱۳)، به طور مشخصی پائین تر از مقادیر گزارش شده برای جلبک‌های پرورش یافته بصورت فتوتروف بود (جدول۱-۱۳). این اطلاعات محدود، مبین آن است که نور نقش تنظیم کنندگی مهمی در بیوسنتز اسیدآسکوربیک در ریزجلبک‌ها دارد والبته تحقیقات بیشتری در این زمینه مورد نیاز است.

ممکن است ریزجلبک‌ها به طور خارج سلولی اسیدآسکوربیک را رها سازند با وجود اینکه بنظر می‌رسد که این موضوع محدود به تعداد اندکی از گونه‌ها باشد و مشخص نیست که آیا این ویتامین فعالانه یا بر اثر مرگ یا ازهم پاشیدگی سلول رها شده است (۲۹). اسیدآسکوربیک در محیط کشت (خارج سلولی) سه نمونه از ریزجلبک‌های سبز و یک نمونه از سیانوباکتری‌ها مشاهده نمی شود (۲۹). اسیدآسکوربیک در محیطهای کشت فاز ثابت جلبکهای *D. tertiolecta*، (T.ISO) *Isochrysis* sp. و *Rhodomonas salina*، در محدوده ۳۶- ٦ درصد از اسیدآسکوربیک کل (یعنی مجموع اسیدآسکوربیک داخل و خارج سلولی) گزارش گردید (١٦) که محققین پیشنهاد می‌کنند که منشاء این مقادیر ممکن است بر اثر آسیبی باشد که در زمان جمع آوری با فیلتراسیون مکشی به سلول‌های حساس جلبک وارد آمده است.

۲-۲-۱۳- خمیرها و پودرهای ریزجلبکی

برای تفریخگاه‌های آبزی پروری، استفاده از مواد مناسب جایگزین برای غذاهای زنده جلبکی، می‌تواند از لحاظ هزینه، مقرون به صرفه تر باشد و این کارگاه‌ها را قادر بسازد تا آسان تر نوسانات روزانه تغذیه‌ای را تعدیل و نیازهای غذایی آبزیان را برآورده سازند. خمیرها و پودرهای جلبکی توسط تفریخگاه‌ها با موفقیت‌های مختلف طی دهه گذشته، استفاده و بررسی شده‌اند (۳۰). به طور کلی، آنها می‌توانند به عنوان جایگزین‌های نسبی مفیدی برای جلبک‌های زنده مطرح باشند ولی به دلیل اینکه ارزش غذایی آنها به میزان معنی داری کمتر است، نمی توان از آنها به عنوان یک غذای کامل استفاده نمود (۳۰).

چون اسیدآسکوربیک، ویتامینی است که براحتی اکسیده می‌شود، اندازه‌گیری آن در خمیر یا پودر تهیه شده، می‌تواند شاخص حساسی برای تعیین ارزش غذایی آنها باشد. غلظت‌های اسیدآسکوربیک در

خمیرهای جلبکی دیاتومه *Chaetoceros calcitrans*، تهیه شده به روش سانتریفوژ، پس از چهار هفته نگه داری در تاریکی و دمای ٤ درجه سانتی گراد تا ۳۵ درصد کاهش می یابد (۲۵). اگرچه، بیش از ۹۰ درصد از اسیدآسکوربیک باقی مانده، به صورت درون سلولی حفظ می شود. مطالعات صورت گرفته پیرامون سایر ریزجلبک‌های خمیر شده نشان می دهدکه گونه‌هایی که براحتی طی سانتریفوژ آسیب می‌بینند، به سرعت نیز اسیدآسکوربیک خود را از دست می‌دهند (مانند *Isochrysis* sp. [T.ISO] که طی مدت دو هفته اتلاف کامل اسیدآسکوربیک را نشان می دهد) درحالیکه جلبک‌هایی که با دیواره سلولی ضخیمی دارند (*Nannochloropsis* sp. و *Stichococcus* sp.) طی شش ماه ذخیره سازی، اتلاف ناچیز یا عدم اتلاف اسیدآسکوربیک را از خود نشان می دهند (۳۱).

خمیرهای ریزجلبکی منجمد نیز با وجودیکه ارزش غذایی آنها بطور معنی دارتری پایین تر است، به عنوان جایگزین‌هایی برای ریزجلبک‌های زنده، مورد آزمایش قرار گرفتند (۳۲، ۳۳). خمیرهای منجمد شده *Chaetoceros calcitrans*، ۳۹ درصد از محتوای اسیدآسکوربیکی خود را پس از یک هفته ذخیره سازی در ۲۰- درجه سانتی گراد از دست دادند و زمانیکه خمیرها انجمادزدایی شده و در آب دریا دوباره غوطه ور شدند، ۸۵ درصد اسیدآسکوربیک باقیمانده پس از ۱۰ دقیقه، به درون آب دریا تراوش نمود (۲۵).

خشک کردن نیز می‌تواند سبب افت معنی دار اسیدآسکوربیک در ریزجلبک‌ها گردد. زمانی که *Senedesmus acutus* به صورت تازه استحصال گردد، حاوی ۱/٦ mg AA/g خواهد بود ولی وقتی به روش انجماد خشک گردد، ٦٤ درصد و وقتی زیر نور خورشید خشک گردد، ۹۰ درصد اسیدآسکوربیک خود را از دست می‌دهد (۳٤). *Chaetoceros calcitrans* ۳٤ درصد از اسیدآسکوربیک خود را طی خشک کردن به روش انجماد و ۹۷ درصد را پس از خشک نمودن در دمای ٦۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت از دست می‌دهد (۲۵) و زمانیکه این جلبک خشک شده، مجددا در آب دریا به مدت ۱۰ دقیقه غوطه ور شود، بیش از ۹۵ درصد اسیدآسکوربیک باقیمانده خود را به دلیل تراوش از دست خواهد داد (۲۵).

۳-۲-۱۳- سایر میکروارگانیزم‌های مورد استفاده در آبزی پروری

سایر میکروارگانیزم‌هایی که به عنوان جایگزینهایی برای ریزجلبک‌های زنده، مورد آزمایش قرار گرفتند، شامل باکتری‌ها، مخمر و تراستوچیتریدها[1] بوده‌اند (۳۰، ۳۵، ۳٦، ۳۷). دلیل منطقی برای استفاده از آنها این است که آنها می‌توانند بصورت هتروتروف با تخمیر رشد کنند، بنابراین نسبت به ریزجلبک‌های پرورش داده شده به صورت فتوتروف، هزینه تولید کمتری دارند (۳۸).

در مقایسه با ریزجلبک‌ها، مخمر و باکتری‌ها فاقد اسیدآسکوربیک هستند. هیچ اسیدآسکوربیکی (یعنی mg AA/g ۰/۱ >) در ۲۰ نژاد از مخمرها مشاهده نشده است (۲۰). و گزارش شده است *Saccharomyces cerevisiae* (مخمر نانوایی) که غذایی معمول برای روتیفرهاست، تنها حاوی mg AA/g ۰/۳ -۰/۱ است (۲٤، ۳۹). در مورد غلظت اسیدآسکوربیک در باکتریها اطلاعات کمی منتشر شده است اگرچه مشخص شده است که برخی نژادهای *Streptococcus* و *Lactobacillus* می تواند اسیدآسکوربیک را بسازند (٤۰). دو باکتری حاوی اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیره (HUFA)، (*Shewanella* sp. (ACAM 456[*2]، و *Colwellia* sp (ACAM 605) بترتیب دارای mg/g ۰/۰۱ و mg/g ۰/۰۲۵ اسیدآسکوربیک می‌باشند (٤۱).

تراستوچیتریدها یوکاریوت‌های دریایی با تاکسونومی نامشخص می‌باشند. آنالیز توالی RNA آنها نشان داد که آنها یک گروه منحصر به فرد متمایز از قارچها هستند و مربوط به جلبک‌های قرمز و قهوه‌ای می باشند (٤۲). فرآورده تهیه شده به روش اسپری خشک گونه *Schizochytrium* sp. (با نام تجاری AlgaeMac-2000®) به عنوان یک ماده غنی ساز حاوی HUFA برای زئوپلانکتون‌ها بفروش می‌رسد (۳٦). گزارش شده است که AlgaeMac-2000® دارای mgAA/g ۰/۷۱ می‌باشد (٤۳) در حالی که یک تراستوچیترید تازه استحصال شده (گونه نامشخص) حاوی mg AA/g ۰/٤۸، می‌باشد (٤۱).

---

[1] Thraustochytrid

[2] Aquafauna Biomarine, Califoria

[* کد مربوطه نشان می دهد که این باکتری از بانک استرالیایی میکروارگانیزم‌های قطب جنوب، هوبارت، استرالیا تهیه شده است]

٤-۲-۱۳- اهمیت غلظت‌های اسیدآسکوربیک موجود در میکروارگانیزم‌ها برای جانوران مصرف کننده آنها

جانوران پرورشی که از ریزجلبک‌ها و سایر میکروارگانیزم‌ها استفاده می‌کنند، شامل نرمتنان دوکفه‌ای فیلترکننده (اویسترها، اسکالوپ‌ها، ماسل‌ها و کِلم‌ها)، آبالون‌های جوان، لارو تازه تفریخ شده میگوها و زئوپلانکتون‌ها (روتیفرها، آرتمیا و کوپه پودها) می‌باشند. متاسفانه، اطلاعات ناچیزی در مورد نیاز این جانداران به اسیدآسکوربیک وجود دارد و شواهدی مبنی بر توانایی بیوسنتز اسیدآسکوربیک توسط آنها وجود ندارد. بنابراین غلظت‌های اسیدآسکوربیک موجود در جیره غذایی آنها احتمالاً فاکتور تعیین کننده ای در رشد می‌باشد.

Seguineau و همکاران (۱۷، ۲۲)، دریافتند که طی نمو لاروهای اسکالوپ، افزایش غلظت اسیدآسکوربیک کل بدن آنها به میزان ۲۰ درصد مقدار اسیدآسکوربیکی است که آنها از جیره غذایی مخلوط جلبکی جذب می‌کنند (میزان اسیدآسکوربیک در مخلوط جلبکی تقریبا ۱ mg/g می‌باشد). مشخص نشده است که آیا این کارایی پائین بر اثر اشباع شدگی دریافت مقدار اسیدآسکوربیک است (یعنی کاهش جذب) (٤٤) یا بافت لاروهای سریع الرشد، اسیدآسکوربیک را مصرف کرده است. اگرچه، به دلیل افزایش غلظت‌های اسید آسکوربیک لاروها طی زمان، مولفین نتیجه گرفتند که ریزجلبک‌ها به طور کافی نیازهای جانور را برای رشد مرتفع ساخته‌اند (۱۷).

با وجودیکه مقدار نیاز ویتامینی مراحل لاروی و جوانی نرمتنان دوکفه‌ای بخوبی مشخص نشده است ولی غذاهای دستی که بطور معمول برای آنها استفاده می شود با مکمل‌های ویتامینی همچون اسیدآسکوربیک به میزان ۱۰ mg/g مخلوط می‌شود (٤٥، ٤٦). گزارش شده است که ریزجلبک‌هایی که دارای پائین ترین غلظت‌های اسیدآسکوربیک می‌باشند (*Pavlova lutheri* و *pseudonana* *T.* حاوی ۱ mg/g)، به عنوان مهمترین جیره غذایی برای نرمتنان تلقی می‌شوند که به صورت انفرادی یا در ترکیب با سایر جلبک‌ها به کاربرده می‌شوند (۲٦، ٤۷، ٤٦). احتمالا تفاوت غلظت اسیدآسکوربیک بین ریزجلبک‌ها، از لحاظ تغذیه ای برای این جانداران فیلترکننده مهم نبوده و نیاز غذایی آنها در غلظتی معادل ۱ mg AA/g، برآورده می شود. باکتری‌ها و مخمرهایی که دارای کمتر از ۰/۱ mg AA/g می باشند نمی توانند غذای کاملی برای نرمتنان باشند (اگر چه سایر فاکتورها مانند قابلیت هضم ضعیف (٤۹، ۵۰) و فقدان اسیدهای چرب غیراشباع چند زنجیره ضروری (۵۱)

ممکن است فاکتور کمکی مهمی برای ارزش غذایی پایین آنها باشد.
لاروهای میگوی آب شیرین نیازمند اسیدآسکوربیک می‌باشند اگر چه مقدار آن مشخص نیست (٤، ٥٢). دیاتومه‌هایی مانند *Skeletonema* spp. و *Chaetoceros* spp، رشد بهینه مراحل نخست لاروی تعدادی از میگوهای *Penaeus* spp. را تامین می‌کنند (۱۰، ٥۳). بر اساس غلظت اسیدآسکوربیک این جلبک‌ها (شکل۱-۱۳)، به نظر می‌رسد که میزان بیش از ۲ mg AA/g به ازای وزن خشک برای جیره غذایی لاروهای نورس میگوی آب شیرین کافی باشد.
هیچ شواهدی مبنی بر توانایی ساخت اسیدآسکوربیک توسط روتیفرها وجود ندارد و احتمالاً این موجودات نیاز خود را از طریق جیره غذایی جبران می کنند. به نظر می‌رسد که روتیفرها نیاز کمی به اسیدآسکوربیک دارند به طوری که آنها می‌توانند طی چندین نسل با جیرهای غذایی حاوی مقادیر ناچیز اسیدآسکوربیک مانند مخمر نانوایی پرورش یابند (٥٤، ٥٥). آرتمیا نیز می‌تواند در تراکم‌های بسیار بالا تا مراحل تولید مثلی با استفاده از زایدات محصولات کشاورزی فاقد اسیدآسکوربیک ، پرورش داده شود (٥٦). آرتمیای بالغ، مقادیر بالایی از مشتقات اسیدآسکوربیک یعنی سولفات آسکوربیل را در تخم‌های خود ذخیره می‌کند (٥۷). این مشتق ویتامینی در سایر موجودات زنده آبزی مورد بررسی قرار نگرفته است. انتقال اسیدآسکوربیک از میکروارگانیزم‌ها به روتیفرها و سایر زئوپلانکتون‌ها، اهمیت تغذیه‌ای بیشتری برای جاندارانی دارد که بعدها طی زنجیره غذایی از چنین زئوپلانکتون‌هایی تغذیه می‌کنند (بخش۳-۱۳ را ملاحظه فرمائید).

۳-۱۳- انتقال اسیدآسکوربیک به زئوپلانکتون

۱-۳-۱۳- تغییر میزان اسیدآسکوربیک در موجودات زنده زئوپلانکتونی

همانند ریزجلبک‌ها، ترکیب بیوشیمیایی (و بنابراین ارزش غذایی) زئوپلانکتون می‌تواند کاملا متغیر باشد و مشخصا از جیره غذایی اثر پذیرد (٥٨، ٥٩، ٦٠، ٦١، ٦٢). بویژه میزان اسیدهای چرب ضروری بدن زئوپلانکتون‌ها می‌تواند از طریق تغذیه آنها با ریزجلبک‌ها یا امولسیون‌های چربی سرشار از HUFA افزایش یابد (٦۳، ٦٤، ٦٥). انگیزه تحقیقات اخیر پیرامون روش‌های غنی سازی زئوپلانکتون‌ها با اسیدآسکوربیک، با درک عمیق تر نیاز به دریافت کافی اسیدآسکوربیک طی هستی زایی(انتوژنی) لارو ماهیان و سخت پوستان و تشخیص اختلاف معنی دار غلظت اسیدآسکوربیک در

زئوپلانکتونها بوجود آمده است و بنابراین این موجودات می‌توانند به طور بالقوه دارای مقادیری اسیدآسکوربیک در میزانی پایین تر از حد بهینه باشند.

Happette و Poulet (۲۱) دریافتند که غلظت‌های اسیدآسکوربیک در زئوپلانکتون‌های جمع آوری شده از محیط دریایی، در ارتباط با جایگاه غذایی آنها در زنجیره غذایی است. برای مثال، میزان اسیدآسکوربیک در کالانوئیدهای[1] گوشتخوار در حدود یک دهم کالانوئیدهای همه چیز خوار و گیاهخوار می‌باشد. غلظت‌های اسید آسکوربیک بر اساس برآورد ۱۲ درصد وزن خشک در زی توده کوپه پود، در دامنه ۰/٤٤ mg/g –۰/۰۱٦ برحسب وزن تر یا تقریبا ۳/۵ mg/kg– ۰/۱ برحسب وزن خشک می باشد (۲۱، ٦٦) (جدول۲–۱۳). همین محققین، بعدها میزان نفوذ و کاهش اسیدآسکوربیک را در کوپه پودها طی آزمایشهای گرسنگی و تغذیه در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. پس از هشت روز گرسنگی کالانوئیدها، غلظت های اسیدآسکوربیک در *Calanus helgolandicus* ماده تا ٥٤ درصد کاهش یافت. پس از شروع مجدد تغذیه با یک ریزجلبک (*Thalassiosira weissflogii*) به مدت ٦٦ ساعت، غلظت‌های اسیدآسکوربیک تا ٦۲ درصد افزایش یافت. گزارشهای مشابهی نیز در آزمایش با *Acartia clausi* ارائه شده است. Happette و Poulet (۲۱) کارایی انتقال اسیدآسکوربیک را (از جلبک به کوپه پود) بین ۸۰ –٤۰ درصد تخمین زدند. این نتایج، در کنار سایر اطلاعات بدست آمده از این مطالعه و سایر مطالعات (٦۷)، بیان می‌دارد که کوپه پودها فاقد توانایی بیوسنتز اسیدآسکوربیک هستند ولی می‌توانند آن را از جیره غذایی خود دریافت دارند.

روتیفرها حین تغذیه از ریزجلبک‌ها، به طور سریع و کارآمدی از اسیدآسکوربیک غنی می شوند (جدول۲–۱۳). به علاوه، غلظت‌های اسیدآسکوربیک موجود در روتیفرها، نشان دهنده غلظت‌های اسیدآسکوربیک موجود در جیره غذایی آنها می باشد (۲٤، ۳۹، ٦۸). طی یک مطالعه انجام شده در مقیاس آزمایشگاهی، غنی سازی کوتاه مدت پس از ٦ ساعت تغذیه روتیفر با جلبک *Isochrysis* sp. (T.ISO) (که خود حاوی ۳/۸ mg/g اسیدآسکوربیک بود) موجب افزایش غلظت‌های اسیدآسکوربیک روتیفر از ۰/۱۵ mg/g به ۱/٦ mg/g گردید (۲٤). در غنی سازی مشابهی در

[1] Calanoid

روتیفرها پس از خوراندن همان جلبک (با محتوای اسیدآسکوربیکی ٤/۲ mg/g) به مدت سه ساعت میزان اسیدآسکوربیک روتیفر از ۰/٦۲ mg/g به ۱/٦ mg/g رسید (۳۹). با تغذیه طولانی تر، روتیفرهای تغذیه شده با مخمر نانوایی، برای مدت سه روز، میزان ۰/۱۵ mg AA/g را نشان دادند درحالیکه تغذیه روتیفرها برای مدت مشابه با جلبکی که خود حاوی ۳/۸ mg/g اسیدآسکوربیک بود (*Chlorella* sp.)، غلظت اسیدآسکوربیک روتیفر را به ۲/۳ mg/g رسانید (۲٤). غلظت‌های اسیدآسکوربیک در روتیفر (که با مخمر تغذیه می شد) پس از ۳ روز تغذیه با *Isochrysis galbana* (خود دارای ۰/٤ mg/g اسیدآسکوربیک بود) از ۰/۳۷ به ۱/۵ میلی گرم بر گرم افزایش یافت (۳۸). Brown و همکاران (۳۹) سه جیره غذایی (مخمر نانوایی، *Nannochloropsis oculata* و *Isochrysis* sp. [T.ISO] که به ترتیب حاوی ۰/۰۸ mg/g، ۲/٦ و۲/٤ اسیدآسکوربیک بودند) را برای تغذیه روتیفرها مورد استفاده قرار دادند. پس از گذشت ۲٤ ساعت روتیفرها بترتیب دارای ۰/٦۲ mg/g، ۱/۷ و ۲/۵ اسیدآسکوربیک شدند. ۷٦ – ۵٦ درصد از اسید آسکوربیک ریزجلبک‌های جذب شده توسط روتیفرها حفظ شدند. اگرچه مشخص نگردید که سهم اسیدآسکوربیک جذب شده چه میزان بود یا چه مقدار از اسیدآسکوربیک در ریزجلبک‌های هضم نشده (یا تا حدی هضم شده) در روده روتیفر باقی ماند (۳۹).

جدول ۲-۱۳: غلظتهای اسیدآسکوربیک در زئوپلانکتون‌های پرورشی و طبیعی

زئوپلانکتون و ماده غذایی برای پرورش آنها	اسیدآسکوربیک (mg/g وزن خشک)	منبع
روتیفرها		
BY (بیشتر از سه روز)	۰/۱۳ الی ۰/۳۷	۲٤، ۵۸، ٦۸
پرورش با BY + ۳۰ درصد AP برای ۲٤ ساعت	۱/۵	۲٤
پرورش با BY + ۳۰ درصد AP برای ۷۲ ساعت	۲/۰	۲٤
پرورش با BY + *Isochrysis galbana* برای مدت ۲۳ ساعت	۱/۳	٦۸
سه روز پرورش با BY + *Isochrysis* sp. (T.ISO) برای مدت ٦ ساعت	۱/٦	۲٤
سه روز پرورش با *Chlorella* sp.	۲/۳	۲٤
هفت روز پرورش با CS®	۰/۱٤ الی ۰/۲۵	۲٤
هفت روز پرورش با CS® + PS برای مدت ٦ ساعت	۰/۲۱ الی ۰/۲۸	۲٤
هفت روز پرورش با CS® + PS vit C-boosted® برای مدت ٦ ساعت	۰/۹٤	۲٤

ادامه جدول ۲-۱۳:

زئوپلانکتون و ماده غذایی برای پرورش آنها	اسیدآسکوربیک (mg/g وزن خشک)	منبع
هفت روز پرورش با CS® + *Chlorella* برای مدت ۲٤ ساعت	۰/۵۱	۲٤
هفت روز پرورش با CS vit C-boosted®	۰/۳۳	۲٤
هفت روز پرورش با CS vit C-boosted® + *Nanochloropsis* برای ۲٤ ساعت	۰/۷۲	۲٤
هفت روز پرورش با CS vit C-boosted® + *Isochrysis* sp. (T.ISO) برای ۲٤ ساعت	۱/٦	۲٤
هفت روز پرورش با CS vit C-boosted®	۰/۵۷	۲٤
هفت روز پرورش با CS vit C-boosted® + PS vit C-boosted® برای ٦ ساعت	۱/۳	۲٤
هفت روز پرورش با CS vit C-boosted® + PS vit C-boosted® برای ۲٤ ساعت	۱/۷	۲٤
پرورش با ۹۵ درصد BY و ۵ درصد مخلوط جلبکی	۰/٦۲	۳۹
پرورش با ۹۵ درصد BY و ۵ درصد مخلوط جلبکی + *Isochrysis* sp. (T.ISO) برای ۲٤ ساعت	۲/۵	۳۹
پرورش با ۹۵ درصد BY و ۵ درصد مخلوط جلبکی + *N. oculata* برای ۲٤ ساعت	۱/۷	۳۹
آرتمیا		
ناپلی غنی نشده	۰/۳۱ الی ۰/٦٦	۲٤، ۷۰
غنی شده با ۱۰ درصد AP	۱/۱ الی ۱/٦	۷۰
غنی شده با ۲۰ درصد AP	۱/٦ الی ۳/٦	۷۰
پاروپایان (محیط طبیعی)*		
Acartia clausi	۰/۲ الی ۲/۱	۲۱
Temora longicornis	۱/۰ الی ۳/۰	۲۱
Calanus helgolandicus	۰/۷ الی ۳/۵	۲۱
Anomalocera patttersoni	۰/۱	۲۱

* اعداد اصلی بر اساس وزن تر بوده‌اند. این اعداد بر اساس این فرضیه که وزن خشک کوپه پودها تقریبا ۱۲/٤٪ وزن تر آنها است، بدست آمده است (٦٦). مخففها عبارتند از: BY: مخمر نانوایی، CS: سلکوی پرورشی، PS: پروتئین سلکو، AP: آسکوربیل پالمیتات

وقتی روتیفرهای گرسنه بسرعت جلبک را می‌بلعند، بخش اعظم اسیدآسکوربیک موجود در سلول‌های جلبکی دست نخورده، درون روده های روتیفر به صورت کپسول در می‌آید و بصورت بالقوه از دسترس لاروها خارج می‌شوند که دارای لوله گوارشی توسعه نیافته هستند. بویژه این حالت در مورد جلبک‌های دارای دیواره سخت مانند *Nannochloropsis* spp. و *Chlorella* spp.، مشاهده می‌شود که به طور معمول برای تغذیه روتیفرها استفاده می‌شوند. برای مثال، بچه ماهیان نورس خامه ماهی که از ریزجلبک‌ها تغذیه می‌کند، می‌تواند *Isochrysis galbana* را به خوبی مورد استفاده قرار دهند درصورتی که بدلیل دیواره سلولی سخت *Chlorella* sp. نمی‌توانند آن را هضم کنند (٦۹). به طور کلی، روتیفرها قادرند که به نحو مناسبی جلبک‌ها را مورد استفاده قرار دهند، ولی این عمل برای جلبک‌های مختلف، با نرخ‌های متفاوتی انجام می‌گیرد (٥٤). آنها می‌توانند به طور کامل *Pavlova lutheri* را در مدت ٤۰ دقیقه از روده خود پاک کنند (٦۰). پس از تغذیه طولانی مدت از جلبک‌ها (برای مثال بیشتر از ۳ ساعت)، بخش عمده ای از اسیدآسکوربیک ممکن است در بافت روتیفر جذب شود و بنابراین یک منبع فراهم تر جهت تغذیه لارو ماهیان فراهم آید. تحقیقات بیشتری به منظور تعیین میزان فراهمی اسیدآسکوربیک در زئوپلانکتون‌های تغذیه کننده ازجلبکها مورد نیاز است.

غلظت اسیدآسکوربیک در روتیفرهای تولید شده در تفریخگاه‌های تجاری و تغذیه شده با ترکیبات مختلف ریزجلبکی یا فرآورده‌های تجاری غنی سازی نیز گزارش شده است (جدول ۲-۱۳) (۲٤). اسیدآسکوربیک در روتیفرهایی که از *Isochrysis* sp. [T.ISO] تغذیه کرده بودند، ۲٤ ساعت پس از تغذیه در بیشترین مقدار خود (mg/g ۱/٦ – ۰/۳۳) قرار داشت. استفاده از غنی ساز Protein Selco vit C-boosted®[1]، غلظت اسیدآسکوربیک را در روتیفرهای تغذیه شده با آن، پس گذشت شش ساعت، از mg/g ۰/۱٤ به ۰/۹٤ افزایش می دهد. در سایر آزمایشهای انجام شده در مقیاس آزمایشگاهی، غلظت‌های اسیدآسکوربیک در روتیفرهایی که قبلا با Selco vit C-boosted® برای مدت ۷ روز تغذیه شده بودند، پس از تغذیه با Protein Selco vit C-boosted® برای مدت ٦ ساعت، از mg/g ۰/٥۷ به ۱/۳ و بعد از مدت ۲٤ ساعت به

[1] INVE Aquaculture, N.V, Baasrode, Belgium

mg/g ۱/۷ می رسد (۲٤).

اخیرا، فن آوری‌های جدیدی برای غنی سازی زئوپلانکتون‌ها با اسیدآسکوربیک توسعه یافته است که تماما شامل استفاده از امولسیون‌های لیپیدی حاوی پالمیتات آسکوربیل (AP) چربی دوست (۲٤) می‌باشد که بر اساس روش‌های غنی سازی زئوپلانکتون‌ها با HUFA انجام می‌گیرد (٦٤). AP شکل زیست فراهم اسیدآسکوربیک در امولسیون‌ها می باشد که بسرعت پس از جذب توسط زئوپلانکتون‌ها به اسیدآسکوربیک فعال تبدیل می‌شود (۲٤). این روش نه تنها روش موثری برای افزایش غلظت‌های اسیدآسکوربیک در زئوپلانکتون‌ها می باشد تا به صورت بالقوه ارزش غذایی آنها را بهبود بخشد بلکه همچنین امکان تغییر غلظت‌های اسیدآسکوربیک را در غذای زنده به صورت مستقل از سایر مواد مغذی، مقدور می‌سازد. بنابراین، این روش یک فن آوری مفید برای مطالعه اثر غلظت‌های مختلف اسیدآسکوربیک بر رشد، زنده مانی و مقاومت لاروها نسبت به استرس می‌باشد (بخش بعدی را ملاحظه نمایید).

جهت ارزیابی غنی سازی اسیدآسکوربیک در روتیفرها، Merchie و همکاران (۲٤) روتیفرها را با امولسیون‌های حاوی نسبت‌های مختلف AP (از صفر تا ۳۰ درصد) تغذیه نمودند. غلظت‌های اسیدآسکوربیک با گذشت زمان، افزایش یافت و این افزایش مرتبط با درصد AP جیره غذایی روتیفرها بود. غلظت اولیه اسیدآسکوربیک، mg/g ۰/۱۳ بودکه در زمان استفاده از ماده غنی ساز حاوی ۳۰ درصدAP، این مقدار به mg/g ۲ رسید. در آزمایشهای دیگر با استفاده از جلبکها بعنوان غذا، غنی سازی های مشابهی حاصل آمد (جدول ۲-۱۳) (۲٤).

اسیدآسکوربیک در سیست‌های آرتمیا به طور طبیعی به صورت سولفات آسکوربیل وجود دارد اگرچه این شکل ویتامین پس از آبگیری سیست وتفریخ ناپلی سریعا به اسیدآسکوربیک آزاد تبدیل می شود (۵۷). غلظت‌های اسیدآسکوربیک ناپلی آرتمیای تازه تفریخ شده به میزان معنی داری بیشتر از روتیفرهای تغذیه شده با مخمر بوده و چند برابر بیشتر از زئوپلانکتون‌های محیط طبیعی آب شیرین می باشد و این غلظت‌ها می‌تواند با توجه به نوع گله و نژاد آتمیا از mg/g ۰/٦٦- ۰/۲۲ متفاوت باشد (۲٤). دلیل محکم تر در مورد این اختلافات در غلظت اسیدآسکوربیک در ناپلی (و بنابراین سیست‌ها)، تغذیه بالغین آرتمیا طی روند تولید تخم است (۲٤). Poulet و همکاران (٦۷)

اذعان نمودند که اختلاف فصلی در غلظت‌های اسیدآسکوربیک درکوپه پودهای جمع آوری شده از زیستگاه‌های طبیعی، بین سه تا نه برابر بوده و دلیل این اختلاف را به تفاوت‌های فصلی در زی توده فیتوپلانکتونی نسبت می دهندکه غذای این زئوپلانکتون‌ها را تشکیل می‌دهد.

روش‌های مورد استفاده در غنی سازی روتیفر با اسیدآسکوربیک به طور موفقیت آمیزی برای آرتمیا نیز استفاده شده‌اند (جدول۱۳-۲) (۲٤، ۵۷، ۷۱، ۷۲). پس از غنی سازی ۲٤ ساعته با AP، غلظت اسیدآسکوربیک در آرتمیا (ابتدا ۰/۵۵ mg/g بود) در زمان استفاده از محلول حاوی ۱۰درصد AP به ۰/۸۵ mg/g، و در زمان استفاده از محلول حاوی ۲۰ درصدAP به ۲/۰ mg/g و با محلول حاوی ۳۰ درصد AP به ۳/۲ mg/g می رسد. زمانی که محلول غنی ساز ۲۰ درصد AP به جای دو بار، سه بار در روز استفاده شود، غلظت اسیدآسکوربیک در آرتمیا به ۳/٤ mg/g می رسد (۲٤). اندازه گیری همزمان AP در آرتمیا نشان می دهد که پس از ۲٤ ساعت در حدود ۹۰ درصد آن به شکل اسیدآسکوربیک فعال در می‌آید (۲٤).

۲-۳-۱۳- ماندگاری اسیدآسکوربیک در زئوپلانکتون‌ها

اسیدآسکوربیک جذب شده به طور موثری در زئوپلانکتون‌های پرورشی، طی دوره‌هایی که غذادهی انجام نمی گیرد، حفظ می‌شود. طی هشت روز گرسنگی، غلظت‌های اسیدآسکوربیک در کوپه پود *Calanus helgolandicus* با نرخ افت روزانه ۹ درصد - که پنج برابر پائین تر از نرخ جذب اسیدآسکوربیک در زمان غذادهی است – کاهش می یابد (۲۱). غلظت‌های اسیدآسکوربیک در روتیفرهای غنی شده به وسیله تغذیه با ریزجلبک‌های *Isochrysis* sp. (T.ISO) و *Nannochloropsis oculata*، طی ۲٤ ساعت عدم غذادهی در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد، به میزان معنی‌داری تغییر نمی یابد (۳۹) و همچنین غلظت‌های اسیدآسکوربیک در روتیفرهای غنی شده با AP که برای مدت ۲٤ ساعت در آب دریای تازه در ۲۵ درجه سانتی گراد تغذیه نمی شوند نیز تغییر نمی یابد. در حقیقت غلظت‌های اسیدآسکوربیک بوضوح افزایش ناچیزی را نشان میدهد که مربوط به افزایش تجزیه و جذب AP در لوله گوارشی روتیفرها می باشد (۲٤). علاوه بر این، غلظت‌های اسیدآسکوربیک در آرتمیای غنی شده با AP پس از یک دوره ۲٤ ساعته گرسنگی (عدم

غذادهی) در آب دریای تازه در دمای ٤ یا ۲۸ درجه سانتی گراد، تغییری نمی کند (۲٤). نگاه کلی به این مطالعات نشان می‌دهد که زئوپلانکتون‌های غنی شده، ارزش غذایی خود از لحاظ اسیدآسکوربیک را طی زمانهای نگهداری یا ماندن کوتاه مدت در مخازن پرورش ماهی حفظ می‌کنند (یعنی حداقل برای ۲٤ ساعت پس از غنی سازی).

٤-۱۳- انتقال اسیدآسکوربیک از زئوپلانکتون و نیاز لاروها

نیاز ماهیان و سخت پوستان بالغ و جوان به اسیدآسکوربیک، با استفاده از جیره‌های غذایی نیمه خالص تعیین شد که این جیره ها با درجات مختلفی از اسیدآسکوربیک همراه بودند. ماهیان به mg/kg ۳۰-۲۰ (۳، ۷۳، ۷٤) و میگوها به mg/kg ۲۰۰ -۱۰۰ اسیدآسکوربیک نیاز دارند (۲). اطلاعات کمتری در مورد نیاز مراحل لاروی آبزیان به اسیدآسکوربیک وجود دارد زیرا تا حدی تعداد لاروهای تولید شده در تفریخگاه‌ها، متغیر(و پائین) است و تا حدی به فقدان جیره‌های غذایی مصنوعی (یعنی جیره‌ای با ترکیب مشخص) مربوط می‌شودکه رشد و زنده مانی پایداری را برای لاروها فراهم آورد. بنابراین تفریخگاه‌ها بر جیره‌های غذایی زئوپلانکتونی زنده تاکید دارند که دارای ترکیب متغیر و (برای برخی مواد مغذی) ارزش غذایی نامشخص هستند. غذاهای زنده نیز دارای غلظت‌های اسیدآسکوربیک هستند که ممکن است بالاتر از میزان نیاز لاروها باشد. در نتیجه، ایجاد کمبود در لارو ماهیان یا سخت پوستان و تعیین اسیدآسکوربیک مورد نیاز آنها با استفاده از جیره‌های غذایی زئوپلانکتونی زنده، مشکل است.

شواهدی قوی وجود دارد که نیاز لاروها به اسیدآسکوربیک ، نسبت به بچه ماهیان و ماهیان بالغ بیشتر است و احتمالا این مهم مربوط به نرخ متابولیسمی و سرعت رشد بالاتر آنها نسبت به بچه ماهیان و ماهیان بالغ است. مشخص شده است که نیاز ماهیان به اسیدآسکوربیک در ارتباط با نرخ متابولیسمی آنها می‌باشد (۷۵). بچه گربه ماهی *Ictalurus punctatus*، به کمبود اسیدآسکوربیک جیره غذایی نسبت به ماهیان بزرگتر، حساس تر می باشند (۷٦). اطمینان بیشتر از لحاظ تامین اسیدآسکوربیک، از طریق بکارگیری غلظت‌های بالاتر اسیدآسکوربیک در تخم‌های قزل آلای رنگین کمان، برای مثال، mg/g ۰/۳۲- ۰/۲۸ وزن تر، می‌تواند صورت پذیرد (٦)، به طوری که پس از

تفریخ، طی هستی زایی (انتوژنی) با یک کاهش عمومی اسیدآسکوربیک در بدن ماهیان مواجه هستیم (به عنوان مثال، میزان اسیدآسکوربیک که در لاروها به اندازه mg/g ۰/۸- ۰/۱۵ وزن تر بدن می‌باشد، به میزان mg/g ۰/۰۱ – ۰/۰۰۵دربچه ماهیان چند ماهه می‌رسد) (۷٦). در ماهی توربوت *Scophthalmus maximus*، مقادیر بالایی از اسیدآسکوربیک را می‌توان در تخم‌ها بدنبال تغذیه مولدین با جیره‌های غذایی سرشار از اسیدآسکوربیک، انتظار داشت (mg/g ۰/۳۲ وزن تر تا بیش از مقادیر اشباع بافتی mg/g ۱/۱۵ وزن تر) (۷۷). این مقادیر در ماهیان جوان دگردیس کرده فقط تا مقدار mg/g ۰/۸۹کاهش می یابند که با غذای غنی نشده تغذیه شده‌اند (۸۳). در مطالعهPlanas و همکاران (۷۸) پیرامون لارو تازه به تغذیه افتاده توربوت، مشخص گردید وقتی غلظت‌های اسیدآسکوربیک در لاروها کاهش می‌یابد که آنها با روتیفرهای غنی نشده (دارای mg/g ۰/۳٦ اسیدآسکوربیک) تغذیه شوند. Dabrowski (۷۹) طی مراحل هستی زایی (انتوژنی) لارو سفیدماهی*Coregonus lavaretus*، پاسخ‌های مختلفی را نسبت به مقدار اسیدآسکوربیک جیره غذایی مشاهده نمود به گونه ای که (الف) ماهیانی که غذای زنده به مدت ۲٤ روز خورده بودند، کاهش آهسته و تدریجی اسیدآسکوربیک را نشان دادند (که بر پایه وزن تر بیان شد)، (ب) ماهیانی که از جیره غذایی فاقد اسیدآسکوربیک تغذیه کرده بودند، کاهش شدید اسیدآسکوربیک را نشان دادند و (ج) ماهیانی که با مقدار بالای اسیدآسکوربیک تغذیه شده بودند، قادر به حفظ غلظت‌های بدنی اسیدآسکوربیک بودند. این مطالعات و مطالعات دیگران (۸۰، ۸۱) نشان می‌دهد که اسیدآسکوربیک جذب شده به آسانی توسط لاروهایی که از جیره غذایی فاقد اسیدآسکوربیک با نیمه عمر۱۰ – ٤ روز تغذیه کرده بودند در سرعتی مشابه پستانداران مستعد ابتلا به اسکوروی کاتابولیز می شود (۸۲). بنابراین به نظر می‌رسد که اسیدآسکوربیک یک ماده مغذی مهم و پر نیاز برای توسعه و تکامل لاروهای تازه تفریخ شده باشد. Dabrowski عنوان می‌کند که غلظت بهینه اسیدآسکوربیک جیره غذایی، غلظت ثابت و پایدار اسیدآسکوربیک بافت را حفظ خواهد کرد (۷۹).

مطالعات دیگر، حاکی از آن است غلظت‌های اسیدآسکوربیک در لارو برخی از ماهیان یا سخت پوستان زمانی افزایش می یابد که آنها با جیره‌های غذایی حاوی مقادیر بالای اسیدآسکوربیک تغذیه می‌شوند. Merchie و همکاران اثرات خوراندن زئوپلانکتون‌های غنی شده با اسیدآسکوربیک (با

استفاده از پالمیتات آسکوربیل) را بر چند گونه از ماهیان آب شیرین و دریایی (گربه ماهی آفریقایی *Clarias gariepinus* (۷۲)، باس دریایی اروپایی *Dicentrarchus labrax* (۷۲)، توربوت *Scophthalmus maximus* (۸۳)) و همچنین میگوی بزرگ آب شیرین *Macrobrachium rozenbergii* (۷۱) مورد ارزیابی قرار می دهند. در مروری بر این مطالعات (۷۰)، گزارش شد که غلظت‌های اسیدآسکوربیک لاروهایی که آرتمیای غنی شده را مصرف کرده اند، به میزان معنی داری افزایش داشت که نشان دهنده انتقال خالص اسیدآسکوربیک از جیره غذایی به لاروهای مصرف کننده است (جدول ۳-۱۳). میزان اسیدآسکوربیک در لاروها مطابق با غلظت‌های آن در آرتمیا افزایش می یابد. اگرچه افزایش مقادیر اسیدآسکوربیک جیره غذایی از ۱/٤ mgAA به ۲/۸ به ازاء گرم (یعنی از گروه‌های ۱۰ درصد و ۲۰درصد پالمیتات آسکوربیل) به میزان معنی داری مقادیر اسید آسکوربیک را در بافت لاروها افزایش نمی دهد. درنتیجه، مولفین ابراز داشتند که بافت لاروی، در زمان تغذیه آنها با جیره‌های حاوی ۱/٤ mg AA/g، اشباع می شود. با توجه به مطالعه Dabrowski (۷۹) ، مشخص می شود که نیاز غذایی بهینه مقداری است که می‌تواند غلظت پایدار اسیدآسکوربیک را در لاروها و بچه ماهیان ممکن سازد. طبق گزارش Merchie و همکاران (۷۰، ۷۱، ۷۲، ۷٤، ۸۳)، از آنجائیکه غلظت اسیدآسکوربیک بافتی در تمام لاروهایی که آرتمیای غنی نشده را مصرف کرده بودند، افزایش داشت، بنابراین، آرتمیای غنی نشده (دارای ۰/٥٦ mgAA/g) می بایست نیاز لارو ماهیان را مرتفع سازد. این مورد نشان می‌دهد که افزودن اسید آسکوربیک به جیره غذایی لاروها به صورت غذای زنده غنی سازی شده با AP، رشد و زنده مانی لارو بسیاری از ماهیان را بهبود نخواهد بخشید. مورد استثنایی این مورد گربه ماهی آفریقایی مناطق حاره است که رشد آن به میزان معنی داری در ۳ آزمایش از ٤ آزمایش بهبود یافته بود (۷۰، ۷۲) و این افزایش رشد مرتبط با اسیدآسکوربیک جیره غذایی دانسته شد که در محدوده ۰/۱-۲/٦ mg/kg قرار داشت (۷۰). این اختلاف در گربه ماهی با سایر ماهیان، ممکن است ناشی از این موضوع باشد که گربه ماهی نسبت به سایر گونه‌ها از رشد سریعتری برخوردار بوده و غذای بیشتری مصرف می‌کند. مصرف غذا احتمالا با مقدار رادیکال‌های آزاد تولید شده طی فرآیند هضم، تنظیم می‌شود و در این زمان، اسیدآسکوربیک به طور موثری با از بین بردن این رادیکال‌ها در سطح روده، می‌تواند از توقف فرآیند تغذیه جلوگیری

کرده و بدین نحو رشد سریع‌تر را مقدور سازد. این فرضیه زمانی صحت می یابد که از فسفات آسکوربیل به جای پالمیتات آسکوربیل (AP) استفاده شود که ترکیب اول قبل از جذب، خنثی شود. Merchie و همکاران (۷۰) نشان دادند که مقادیر بالای مکمل اسیدآسکوربیک، اثر مثبتی را بر افزایش مقاومت نسبت به استرس و یا بیماری در لاروهای باس دریایی اروپایی (۷۲)، گربه ماهی آفریقایی (۷۲)، توربوت (۸۳) و میگوی بزرگ آب شیرین دارد (۷۱) زمانی که گونه های مذکور با جیره‌های غذایی حاوی مقادیر بالای اسیدآسکوربیک تغذیه شوند، مقاومت بالایی را در برابر استرس (استرس شوری) از خود نشان می دهند. همچنین برای لارو توربوت، به دنبال تغذیه از جیره غذایی حاوی مقادیر بالای اسیدآسکوربیک ، تحریک سیستم ایمنی (مرگ و میر کمتر به دنبال مواجهه با باکتری *Vibrio anguillarum*)، و بهبود در رنگدانه سازی[1] گزارش شده است (۸۳). ممکن است غنی سازی غذای زنده زئوپلانکتونی با اسیدآسکوربیک – و متقابلا افزایش اسید آسکوربیک بافت‌های لاروی تا بیش از نقطه اشباع – زمانی که شرایط پرورشی تفریخگاه‌ها زیر حد بهینه قرار دارد، در افزایش مقاومت ماهیان نسبت به استرس و بیماری با ارزش باشد (۷۰).

بجز عوامل استرس زایی که مربوط به شرایط فیزیکی محیط می‌باشند (مانند دستکاری، حمل و نقل، تراکم، کیفیت پائین آب)، دگردیسی نیز یک دوره حساس و پر استرسی است که لاروها در این دوره زمانی تحت تاثیر تغییرات شدید ریختی و بیوشیمیایی قرار دارند و ممکن است نیاز به اسیدآسکوربیک بیشتری در جیره غذایی خود داشته باشند (۷۰). در همین راستا Merchie و همکاران (۷۰) غلظت اسیدآسکوربیک را در لاروهای میگوی آب شیرین، به میزان معنی داری کمتر از میگوهای جوان گزارش نمودند. این نتایج و نتایج حاصله از مطالعات دیگران (۸٤) فرضیه Dabrowski (۸٦) مبنی بر افزایش نیاز لارو ماهیان به اسیدآسکوربیک طی استرس را تائید می‌کنند. Dabrowski عنوان می‌کند که غلظت‌های بدنی اسیدآسکوربیک بافتی، می‌تواند شاخص مناسبی از شرایط فیزیولوژیک بوده و پتانسیل زنده مانی لاروها را بهتر از اختلاف نرخ رشد منعکس سازد (۸٦).

[1] Pigmentation

جدول۳-۱۳ : غلظت اسیدآسکوربیک (mg/g وزن خشک) در لاروهای سخت‌پوستان و ماهیان، قبل از تغذیه آغازین و پس از تغذیه با روتیفر یا آرتمیای غنی شده با غلظتهای مختلف پالمیتات آسکوربیل (AP)

گونه‌های مورد آزمایش	قبل از تغذیه آغازین	سطوح غنی‌سازی روتیفر و آرتمیا (میلی گرم اسیدآسکوربیک به ازاء گرم وزن خشک)		
		۰/۶۰	۱/۴۰	۲/۸۰
سخت پوستان:میگوی بزرگ آب شیرین				
آزمایش ۱، لارو	۰/۱۵	۰/۳۷^{a}	–	۰/۵۵^{b}
آزمایش ۱، پست لارو		۰/۲۹^{a}	–	۰/۳۳^{a}
آزمایش ۲، لارو	۰/۲۹	۰/۳۵^{a}	۰/٤۵^{b}	۰/۵۱^{b}
آزمایش ۲، پست لارو		۰/۲٦^{a}	۰/۳۹^{b}	۰/٤۳^{b}
ماهی: گربه ماهی آفریقایی				
آزمایش ۱	–	۰/٤۷^{a}	۰/۵٤^{b}	۰/۵۵^{b}
آزمایش ۲	۰/۲۹	۰/٤۱^{a}	۰/٤۹^{ab}	۰/۵۵^{b}
آزمایش ۳	۰/۲٤	۰/٤۳^{a}	۰/٦۲^{b}	۰/۷۵^{b}
آزمایش ٤	/٤٦	۰/۵۱^{a}	–	۰/۸۲^{b}
ماهی: باس دریایی اروپایی	–	۰/۷٦^{a}	۱/٦۰^{b}	۱/٦۲^{b}
ماهی: توربوت				
آزمایش ۱	۰/۵۰	۰/۸٦^{a}	۱/۲۲^{b}	۱/۲۰^{b}
آزمایش ۲	۰/٤۷	۰/۸۹^{a}	۱/۱۲^{b}	۱/۲۳^{b}

توجه: تمام آزمایشها تقریبا یک ماه بطول انجامید (به غیر از آزمایشات گربه ماهی آفریقایی، ۲۰ روز برای آزمایش یکم و ۱۰روز برای آزمایش دوم تا چهارم) . اعداد در یک ردیف با حروف یکسان، فاقد اختلاف معنی دار هستند. میانگین وزن خشک (درصد) برای نمونه‌های لاروی (قبل از شروع تغذیه و در پایان آزمایش) به ترتیب برای میگوی آب شیرین: ۱۵ و ۲۰ درصد، گربه ماهی آفریقایی: ۹ و ۱٦ درصد، باس دریایی اروپایی:
سنجش نشده و ۱۵ درصد، توربوت: ۹ و ۱۷ درصد، (اقتباس از Merchie, G., Lavens, P., and Sorgeloos, P., Aquaculture, 155, 165, 1997)(۱٦۵)

حدود ۲۰-۵ درصد از اسیدآسکوربیک آرتمیای غنی نشده جذب شده توسط لاروماهی، در بدن آنها حفظ می شود (۸٦). درحالیکه ماهیان بالغ ۹۰ -۸۰ درصد اسیدآسکوربیک را جذب می‌کنند و به نظر می‌رسد که ماندگاری پایین در لارو ماهیان، عمدتا در اثر کاتابولیسم سریع طی مرحله سریع

الرشد لاروی یا جوانی باشد (۸٦). اگرچه تخریب اسیدآسکوربیک در لوله گوارش نیز به اختلافات بین مراحل زندگی و گونه‌ای در انتقال اسیدآسکوربیک اختصاص می یابد. تقلیل غلظت‌های اسیدآسکوربیک طی نمو لاروی در ماهیان (برای مثال، کلمه *Rutilus rutilus*، سفیدماهی *Coregonus lavartus* و چار قطبی *Salvelinus alpinus*) منطبق با فیزیولوژی لوله گوارش است (۸٦).کاهش اسیدآسکوربیک جیره غذایی در کپورماهیان فاقد معده که غذا طی حرکت در لوله گوارشی در تماس با pH قلیائی قرار دارد، در بالاترین مقدار خود است (۸٦). همچنین، همانطور که جذب اسیدآسکوربیک یک فرایند اشباع پذیر است (٤٤)، بنابراین کارایی انتقال اسیدآسکوربیک در زمان تغذیه لاروها با جیره‌های غذایی سرشار از آن(یعنی آرتمیای غنی شده) کاهش می یابد (۷۰).

۵-۱۳- برهمکنش با سایر مواد مغذی

اغلب اثرات زیستی مواد مغذی به صورت مجزا از سایر مواد مغذی مورد مطالعه قرار می گیرد و درست است که آنها به عنوان واحدهای مستقل عمل می‌کنند ولی از لحاظ عملکرد و متابولیسم، می‌توانند با یکدیگر برهمکنش داشته باشند. بنابراین مقدار اسیدآسکوربیک مورد نیاز، ممکن است تحت تاثیر مقادیر سایر مواد مغذی موجود در جیره غذایی (۸۷) یا بصورت متابویک در بدن جانور باشد. به طور اختصاصی تر، نقش اسیدآسکوربیک به عنوان آنتی اکسیدان با غیر فعالسازی آسیب رسانی رادیکال‌های آزاد تولید شده بر اثر فعالیت عادی سلول و نیز عوامل استرس زا، می‌تواند از سایرآنتی اکسیدان‌ها مانند ویتامین E (α–tocopherol; α-T) و کاراتنوئیدها (مانند آستازانتین ASX، اثر پذیرد (۸۸). برای مثال، مطالعات متعددی (۸۹) توانایی اسیدآسکوربیک را در کاهش رادیکال‌های آلفا توکوفروکسیل[1] و تبدیل آنها به آلفاتوکوفرول، ثابت نمودند. پیشنهاد شده است که عملکرد آنتی اکسیدانی این ریزمغذی‌ها، می‌تواند در نرخ جذب (بخش قبلی را در مورد گربه ماهی ملاحظه فرمائید)، ایجاد چندین بیمار (مانند زردی[2] (۹۰)) دخالت داشته باشد یا می‌تواند ایمنی غیر اختصاصی را با حفظ انسجام عملکردی و ساختاری سلول‌های ایمنی، تقویت کند. با این وجود مطالعات اندکی در این زمینه پیرامون موجودات زنده مورد استفاده در آبزی پروری انجام شده است و

[1] α-tocopheroxyl
[2] Jaundice

تقریبا هیچ مطالعه‌ای نیز روی لاروها صورت نپذیرفته است. با توجه به توسعه نیافتن کامل سیستم آنزیمی آنتی اکسیدانی در لاروها، استفاده از مقادیر زیاد لیپیدهای مستعد اکسایش (HUFA) در جیره غذایی لاروها، می‌تواند آنها را با اثرات شدیدی مواجه کند. اخیرا Ruff و همکاران (۹۱)، بر همکنش اسیدآسکوربیک، آلفا توکوفرول و HUFA را در پست لاروهای میگوی *Penaeus vannamei*، مورد بررسی قرار دادند. اختلاف معنی داری در زنده مانی، رشد و خاصیت آنتی اکسیدانی برای ترکیبات مختلف ویتامین‌ها مشاهده نشد. مقادیر بالاتر اسیدآسکوربیک جیره غذایی، به میزان معنی داری منجر به غلظت پائین تر بافتی آلفا توکوفرول شدکه ممکن است در تضاد با نقش کلی باشد که به عنوان تولید کننده مجدد آلفا توکوفرول برای اسیدآسکوربیک، در نظر گرفته شده است. Merchie و همکاران (۹۲) بر همکنش اسیدآسکوربیک و آستازانتین را بر مقاومت در پست لارو *Penaeus monodon* به استرس مورد بررسی قرار دادند. سه تیمار غذایی حاوی ۲۳۰ mg/kg آستازانتین در ترکیب با ۱۰۰ mg/kg، ۱۷۰۰ یا ۳٤۰۰ اسیدآسکوربیک و دو تیمار غذایی حاوی ۸۱۰mg/kg آستازانتین در ترکیب با ۲۰۰ mg/kg و ۱۷۰۰ اسیدآسکوربیک به میگوها داده شدند. برای تیمارهای با مقدار بالای آستازانتین، اثر سودمند اسیدآسکوربیک در مقدار بالا، بر مقاومت در برابر استرس، معنی دار نبودکه علت آن می‌تواند مربوط به عدم افزایش معنی دار اسیدآسکوربیک در بافت‌های میگو باشد و می‌تواند اثر هضم و جذب را بر هر دو ماده مغذی نشان دهد.

٦-۱۳- اهمیت اکولوژیک اسیدآسکوربیک و انتقال آن بین سطوح غذایی

در این بخش، مروری بر انتقال اسیدآسکوربیک بین سطوح غذایی از منظر آبزی پروری خواهیم داشت. در خصوص نیاز بالای لارو ماهیان به اسیدآسکوربیک، بحث شدکه بافت آنها می‌تواند بر اثر استرس‌های محیطی و غذایی از اسیدآسکوربیک تخلیه گردد و این کمبود می‌تواند آنها را بیش از پیش با خطر مرگ مواجه کند. از دیدگاه اکولوژیک، اسیدآسکوربیک می‌تواند دارای نقش تنظیم کنندگی باشد و بنابراین تغییرات در انتقال آن در زنجیره غذایی، می‌تواند منجر به تغییرات عمده در اکوسیستم‌های آبی گردد (۸٦). به نظر می‌رسد به رغم اینکه زئوپلانکتون‌ها فاقد توانایی ساخت اسیدآسکوربیک می باشند (۲۱)، فیتوپلانکتون‌ها منبع غنی این ویتامین بوده (۱٦) و سهم مهمی را در

تامین اسیدآسکوربیک در زنجیره غذایی لاروها به عهده دارند. Hapette و همکاران (۲۱، ٦۷، ۹۳) دریافتند که غلظت‌های اسیدآسکوربیک در زئوپلانکتون‌های طبیعی و لارو ماهیان در ارتباط با جایگاه آنها درون زنجیره غذایی فیتوپلانکتون – زئوپلانکتون – لارو ماهی می‌باشد. آنها همچنین گمان نمودند که ممکن است این ویتامین در تولیدمثل کوپه پودها دخیل باشد (۲۱). Dabrowski (۸٦) پیشنهاد نمود که می‌توان اسیدآسکوربیک را در سیستم‌های آبی، به منظور ارزیابی کیفیت غذای فراهم برای لارو ماهیان و وضعیت تغذیه‌ای آنها، پایش نمود و بیان نمود که غلظت‌های اسیدآسکوربیک می‌توانند شاخص مناسبی برای بررسی وضعیت زنده مانی لاروها باشد و می‌تواند در بازسازی ذخایر ماهیان به عنوان یک شاخص ساده و ابتدایی مورد استفاده قرار گیرند (۸٦).

۷-۱۳- نتیجه گیری

ناپلی آرتمیای غنی نشده (۰/۷۵-۰/۵ mg به ازای هر گرم وزن خشک) و روتیفرهای پروش یافته با مخمر (۰/۱ mg/g الی ۰/٦ وزن خشک) مشخصا دارای اسیدآسکوربیک کافی برای رشد و زنده مانی لارو اغلب ماهیان و سخت پوستان می‌باشند. با این وجود، جیره‌های غذایی زئو پلانکتونی با غلظت‌های بالایی از اسیدآسکوربیک (برای مثال ۲/۵-۱/۵ mg AA/g) ممکن است با تشدید غلظت‌های اسیدآسکوربیک بافتی، شرایط فیزیولوژیک لاروها را بهبود بخشند. این موضوع بویژه از نظر نقش حفاظتی اسیدآسکوربیک در ارتباط با استرس‌ها (که گاها اجتناب ناپذیر هستند) در محیط تفریخگاهی، بسیار مهم است. به علاوه، در زمانهای ایجاد استرس، به دلیل افزایش کاتابولیسم و مصرف اسیدآسکوربیک، نیاز لارو ماهیان به این ماده مهم افزایش می‌یابد اگرچه شواهد مستقیمی برای این موضوع وجود ندارد. حداقل در مورد برخی از ماهیان، هزینه اضافی در استفاده کردن از مکمل‌های اسیدآسکوربیک، با افزایش خروجی نهایی و تولید پایدارتر جبران می‌شود.

در حال حاضر، غنی سازی غذاهای زئوپلانکتونی با اسیدآسکوربیک، می‌تواند براحتی انجام شود. غنی سازی با ترکیبات حاوی پالمیتات آسکوربیل ، می‌تواند بسیار موثر باشد و به عنوان روش مناسبی برای ارزیابی اثرات اسیدآسکوربیک بر لاروها بکار برده شود. اگرچه، چنین ترکیباتی از لحاظ تجاری، مقرون به صرفه نیستند. ریزجلبک‌های زنده و Protein Selco vitC-boosted® دو منبع مناسب برای غنی سازی زئوپلانکتون‌ها با اسیدآسکوربیک به شمار می روند و می‌توانند غلظت اسیدآسکوربیک زئوپلانکتون را به بیش از ۱ mg/g برسانند. Protein Selco vit C- boosted®

به دلیل سهولت تهیه و نیز مقرون به صرفه تر بودن نسبت به تولید پیوسته ریزجلبک‌ها، می‌تواند یک گزینه مورد توجه باشد. از سوی دیگر، به منظور مقرون به صرفه کردن تولید ریزجلبک‌ها به عنوان منبع اسیدآسکوربیک برای غنی سازی، باید از طریق (۱) درک بهتر چگونگی تنظیم تولید اسیدآسکوربیک در ریزجلبک‌ها به دنبال توانایی به حداکثر رسانیدن میزان تولید اسیدآسکوربیک در آنها، طی نگهداری در شرایط خاص و نیز (۲) اتخاذ فن آوری جدید برای کشت انبوه ریزجلبک‌ها (مانند فتوبیوراکتورها[1]، دستگاه‌های تخمیرکننده هتروتروفیک) که هزینه‌های تولید را کاهش داده و تولید را منطقی تر می‌سازد، عمل نمود. غنی سازی زئوپلانکتون با ریزجلبک‌ها می‌تواند مزایای دیگری نیز داشته باشد. در مورد برخی لاروها، ریزجلبک‌ها می‌توانند منجر به افزایش غلظت‌های سایر مواد مغذی نادر (مانند سایر ویتامین‌ها) شوند و رشد یا زنده مانی را بهبود بخشند.

برای گونه‌های مورد استفاده در آبزی پروری که از ریزجلبک‌ها تغذیه می‌کنند، مانند اسکالوپ یا اویستر در مراحل لاروی و جوانی، لاروهای نورس میگوی آب شیرین، مطالعات بیشتری جهت ارزیابی نیاز تغذیه‌ای آنها به اسیدآسکوربیک لازم است. به رغم اختلافات موجود در غلظت‌های اسیدآسکوربیک بین ریزجلبک‌ها (که می‌تواند به بیش از ده برابر برسد)، جیره‌های غذایی جلبکی که حاوی ۳-۱ mg/g اسیدآسکوربیک برحسب وزن خشک هستند، به عنوان غذاهای مستقیم به طور موفقیت آمیزی استفاده می‌شوند. نیاز به اسیدآسکوربیک در این غلظتها، مرتفع شده است. اینکه آیا با تغذیه این جانوران با جیره‌های غذایی حاوی مقادیر بالای اسیدآسکوربیک (برای مثال بیشتر از ۱ mg/g)، می‌توان مزایایی افزون بر افزایش مقاومت به استرس را انتظار داشت، هنوز مشخص نشده است. کاهش غلظت و افزایش شدت تراوش اسیدآسکوربیک در غذاهای جلبکی فرآوری شده (خمیرها و پودرها) ممکن است به کاهش ارزش غذایی آنها کمک کند. در مقایسه با ریزجلبک‌ها، بنظر می‌رسد که مخمر و باکتری‌ها منابع فقیری از لحاظ اسیدآسکوربیک باشند (پایین تر از ۰/۳ mg/g) که شاید غلظت‌های آنها برای رفع نیازهای غذایی کافی نبوده و بدلیل ارزش غذایی پایین، بعنوان یک فاکتور کمکی برای نرمتنان دوکفه ای مطرح باشند.

[1] Photobioreactor

منابع

1. Halver, J. E., Ashley, L. M., and Smith, R. R., Ascorbic acid requirements Coho salmon and rainbow trout, *Trans. Amer. Fish. Soc.,* 4, 762,1969.

2. Conklin, D. E., Vitamins, in *Crustacean Nutrition: Advances in World Aquacultl* D'Abramo, L. R., Conklin, D. E., and Akiyama, D. M., Eds., World Aquaculti Society, Baton Rouge, LA, 1997,123.

3. Stickney, R. R., McGeachin, R. B., Lewis, D. H., Marks, J., Riggs, A., Sis, R. R, Robinson, E. H., and Wurts, W., Response of *Tilapia aurea* to dietary vitamin , *J. World Maricult. Soc.,* 15,179,1984.

4. Kanazawa, A., Nutrition of penaeid prawns and shrimps, in *Proceedings of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns,Shrimps,* Taki,Y, Primavera, J. H., and Llobrera, J. A., Eds., Iloilo City, Philippines, 123,1985.

5. Dabrowski, K., Administration of gulonolactone does not evoke ascorbic acid synthesis in teleost fish. *Fish Physiol. Biochem., 9,* 215,1991.

6. Dabrowski, K. and Blom, H., Ascorbic acid deposition in rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)* eggs and survival of embryos, *Comp. Biochem. Physiol* 108 A, 129,1994.

7. Epifanio, C. E., Valenti, C. C, and Turk, C. L., A comparison of *Phaeodactylum cornutum* and *Thalassiosira pseudonana* as foods for the oyster, *Crassostrea vir-ginica, Aquaculture,* 23: 347,1981.

8. Enright, C.T., Newkirk, G. F., Craigie, J. S. and Castell, J. D., Evaluation of pi plankton as diets for juvenile *Ostrea edulis* L., *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.,* 96,1,19.

9. Webb, K. L. and Chu, F. E., Phytoplankton as a food source for bivalve larva *Proceedings of the 2nd International Conference of Aquaculture Nutrition, World Mariculture Society, Spec. Publ. No.* 2, Pruder, D. G., Langdon, C. J., and Cont D. E., Eds., Louisiana State University, Baton Rouge, 1982, 272.

10. Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., and Dunstan, G. A., Nutritional properties ofmicroalgae for mariculture, *Aquaculture,* 151, 315,1997.

11. Whyte, J. N.C., Biochemical composition and energy content of six species o phytoplankton used in mariculture of bivalves, *Aquaculture,* 60, 231,1987.

12. Thompson, P. A., Harrison, P. J., and Whyte, J. N. C., Influence of irradiance the fatty acid composition of phytoplankton, *J. Phycol.,* 26, 278,1990.

13. Brown, M. R., The amino-acid and sugar composition of 16 species of micro gae used in mariculture, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.,* 145, 79,1991.

14. De Roeck-Holtzhauer, Y, Quere, I., and Claire, C., Vitamin analysis of five planktonic microalgae and one macroalga, *J. Appl. Phycol.,* 3, 259,1991.

15. Langdon, C. J. and Waldock, M. J., The effect of algal and artificial diets on 1 growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat*, J. Mar. Biol. Ass. U.K.,* 61, 431,1981.

16. Brown, M. R. and Miller, K. A., The ascorbic acid content of eleven species c microalgae used in mariculture, *J. Applied Phycol,,* 4, 205,1999.

17. Seguineau, C, Laschi-Loquerie, A., Moal, J.*,* and Samain, J. F., Vitamin requi ments in great scallop larvae, *Aquacult. Int.,* 4, 315,1996.

18. Bayanova, Y. I. and Trubachev, I. N., Comparative evaluation of the vitamin composition of some unicellular algae and higher plants grown under artifi conditions, *Appl. Biochem. Microbiol.,* 17*,* 292,1981.

19. Aaronson, S., Dhawale, S. W, Patni, J., DeAngelis, B., Frank, O., and Baker, The cell content and secretion of water-soluble vitamins in several freshwaf algae. *Arch. Microbiol.,* 112, 57,1977.

20. Running, J. A., Huss, R. J., and Olson, P. T., Heterotrophic production of ascorbic acid by microalgae, *J. Applied Phycology,* 6, 99,1994.

21. Hapette, A. M. and Poulet, S. A., Variation of vitamin C in some common species of marine plankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.,* 64, 69,1990.

22. Seguineau, C., Laschi-Loquerie, A., Leclercq, M., Samain, J. R, Moal, J., and Fayol, V., Vitamin transfer from algal diet to *Pecten maximum* larvae, *J. Mar. Biotechnol.,* 1, 67,1993.

23. Hapette, A. M. and Poulet, S. A., Application of high-performance liquid chromatography to the determination of ascorbic acid in marine plankton, *J. Liquid Chromatogr.,* 13, 357,1990.

24. Merchie, G., Lavens, P., Dhert, Ph., Dehasque, M., Nelis, H., De Leenheer, A., and Sorgeloos, P., Variation of ascorbic acid content in different live food organisms, *Aquaculture,* 134, 325,1995.

25. Brown, M. R., Effects of storage and processing on the ascorbic acid content of concentrates prepared from *Chaetoceros calcitrans, J. Applied Phycology,* 7,495,1995.

26. Brown, M. R., Jeffrey, S. W., and Garland, C. D., Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: a literature review, *CSIRO Mar. Lab. Rep.,* No. 205, Hobart, Tasmania, Australia, 1989.

27. Brown, M. R., Mular, M., Miller, I., Farmer, C., and Trenerry, C., The vitamin content of microalgae used in aquaculture, 11,247,1998.

28. Renstrem, B., Grun, M., and Loewus, F. A., Biosynthesis of L-ascorbic acid in *Chlorella pyrenoidosa, Plant Sci. Lett.,* 28,299,1982,83.

29. Borowitzka, M., Vitamins and fine chemicals from microalgae, in *Micro-algal Biotechnology,* Borowitzka, M. A. and Borowitzka, L. J., Eds., Cambridge University Press, Cambridge, 1988,153.

30. Robert, R. and Trintignac, P., Substitutes for live microalgae in mariculture: a review. *Aquatic Living Resour.,* 10, 315,1997.

31. Knuckey, R., Australian Microalgae and Microalgal Concentrates for use as Aquaculture Feeds, Ph. D. thesis. University of Tasmania, Australia, 1998.

32. Brown, A., Jr., Experimental techniques for preserving diatoms used as food for larval *Penaeus aztecus, Proc. Natl. Shellfisheries Assn.,* 62,21,1972.

33. Lubzens, E, Gibson, O., Zmora, O., and Sukenik, A., Potential advantage of frozen algae (*Nannochloropsis* sp.) for rotifer *(Brachionus plicatilis)* culture, *Aquaculture,* 133,295,1995.

34. Venkataraman, L. V, Becker. H. E., and Shamala, T. R., Studies on the cultivation and utilisation of the alga *Scenedesmus acutus* as a single cell protein. *Life Sci.,* 20, 223,1977.

35. Nell, J. A., MacLennan, D. G., Allan, G. L., Nearhos, S. P., and Frances, J., Evaluation of new microbial foods as partial substitutes for microalgae in a diet for Sydney rock oyster *Saccostrea commercialis* larvae and spat, in *New Microbial Foods for Aquaculture, Final Report to Fisheries Research Development Corporation (FRDC),* Nell, J. A., MacLennan, D. G., Allan, G. L., Nearhos S. P., and Frances, J., Eds., NSW Fisheries, Brackish Water Fish Culture Research Station, Salamander Bay, New South Wales, 1994.

36. Barclay, W. and Zeiler, S., Nutritional enhancement of n-3 and n-6 fatty acids in rotifers and *Artemia* by feeding spray-dried *Schizochytrium* sp., *J. World Aquacult. Soc.,* 27, 314,1996.

37. Nichols, D. S., Hart, P., Nichols, P. D., and McMeekin, T. A., Enrichment of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed an Antarctic bacterium containing polyunsaturated fatty acids, *Aquaculture,* 147,115,1996.

38. Glaudue, R. M. and Maxey, J. E., Microalgal feeds for aquaculture, *J. Applied Phycol., 6,131,*1994.

39. Brown, M. R., Skabo, S., and Wilkinson, B., The enrichment and retention of ascorbic acid in rotifers fed microalgal diets, *Aquaculture 'Nutrition,* 4, *151,1998.*

40. Kalashyan, A. T. and Magakyan, A. T., Relationship between vitamin-synthesizing properties and acid production in thermophilic lactic acid bacteria, *Molochnaya Promyshlennost*., 7,18,1975.

41. Brown, M. R. and Lewis, T. E., unpublished data, 1998.

42. Mannella, C. A., Frank, J., and Delihas, N., Interrelatedness of 5S RNA sequences investigated by correspondence analysis, *J. Mol. Evol.,* 24,375,1987.

43. Bio-Marine Inc. Aquafauna—Product information sheet for nutritional profile of AlgaMac—2000.

44. Gaby, S. K., Bendich, *A.,* Singh, V. N., and Machlin, L. *J., Vitamin Intake and Health,* Marcel Dekker, New York,1991.

45. Langdon, C. J. and Bolton, E. T., A microparticulate diet for a suspension-feeding bivalve mollusc, *Crassostrea virginica* (Gmelin), *J. Exp. Mar. Biol. Ecol,,* 82,239,1984.

46. Langdon, C. J. and Siegfried, C. A., Progress in the development of artificial diets for bivalve filter feeders, *Aquaculture,* 39,135,1984.

47. Ferreiro, M. J., Perez-Camacho, A., Labarta, U., Beiras, R., Planas, M., and Fernandez-Reiriz, M. J., Changes in the biochemical composition of *Ostrea edulis* larvae fed on different food regimes. *Marine Biology,* 106, 395,1990.

48. Thompson, P. A., Guo, M-X., and Harrison, P. J., Nutritional value of diets that vary in fatty acid composition for larval Pacific oysters *(Crassostrea gigas), Aquaculture,* 143, 379,1996.

49. Epifanio, C. E., Comparison of yeast and algal diets for bivalve molluscs, *Aquaculture,* 16,187,1979.

50. Crosby, M. P., Newell, R. I. E., and Langdon, C. J., Bacterial mediation in the utilisation of carbon and nitrogen from detrital complexes by *Crassostrea virginica, Limnol. Oceanogr.,* 35, 625,1990.

51. Brown, M. R., Barrett, S. M., Volkman, J. K., Nearhos, S. P., Nell, J. A., and Allan, G. L., Biochemical composition of new yeasts and bacteria evaluated as food for bivalve aquaculture, *Aquaculture,* 143,341,1996.

52. Jones, D. A., Yule, A. B., and Holland, D. L., Larval nutrition, in *Crustacean Nutrition: Advances in World Aquaculture,* D'Abramo, L. R., Conklin, D. E., and Akiyama, D. M., Eds., World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 1997,353.

53. Wilkenfeld, J. S., Lawrence, A. L., and Kuban, F. K., Survival, metamorphosis and growth of penaeid shrimp larvae on a variety of algal and animals foods, *J. World Aquacult. Soc.,* 15, 31,1984.

54. Lubzens, E., Raising rotifers for use in aquaculture, *Hydrobiologia,* 147,245,1987.

55. Nagata, W. D. and Whyte, J. N. C., Effects of yeast and algal diets on the growth and biochemical composition of the rotifer *Brachionus plicatilis* (Muller) in culture, *Aquaculture and Fisheries Management,* 23,13,1992.

56. Lavens, P., De Meulemeester, A., and Sorgeloos, P., Evaluation of mono- and mixed diets as food for intensive *Artemia* culture, in *Artemia Research and its Application, Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture,* Sorgeloos, P., Begtson, D.A., Decleir, W., and Jaspers, E., Eds., Universa Press, Wetteren, Belgium,1987, 309.

57. Dabrowski, K., Some aspects of ascorbate metabolism in developing embryos of the brine shrimp *(Artemia salina), Can. J. Aquat. Sci.,* 48,1905,1991.

58. Sandnes, K., Lie, O., Haaland, H., and Olsen, Y., Vitamin content of the rotifer *Brachionus plicatilis, Fisk. Dir. Skr. Ermering,* 6,117,1994.

59. Whyte, J. N. C. and Nagata, W. D., Carbohydrate and fatty acid composition of the rotifer, *Brachionus plicatilis,* fed monospecific diets of yeast or phytoplankton, *Aquaculture,* 89,*263,*1990.

60. Frolov, A. V., Pankov, S. L., Geradze, S. A., Pankova, S. A., and Spektorova, L. V, Influence of the biochemical composition of food on the biochemical composition of the rotifer *Brachionus plicatilis, Aquaculture,* 97,181,1991.

61. Dhont, J. and Lavens, P., Tank production and use of ongrown *Artemia,* in *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture,* Lavens, P. and Sorgeloos., P. Eds., FAO Fisheries Technical Paper No. 361, Rome, Italy, 1996,161.

62. Fukusho, K., Arakawa, T., and Watanabe, T., Food value of a copepod, *Tigriopus japonicus,* cultured with yeast for larvae and juveniles of mud dab *Limanda yokohamae, Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.,* 46, 625,1980.

63. Watanabe, T., Kitajima, C., and Fujita, S., Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review, *Aquaculture,* 34: 115,1983.

64. Leger, P., Bengtson, D. A., Simpson, K. L., and Sorgeloos, P., The use and nutritional value *of Artemia* as a food source, *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.,* 24, 521, 1986.

65. Nichols, P. D., Holdsworth, D. G., Volkman, J. K., Daintith, M., and Allanson, S., High incorporation of essential fatty acids by the rotifer *Brachionus plicatilis* fed on the prymnesiophyte alga *Pavlova lutheri, Aust.J. Mar. Freshwater Res.,* 40, 645, 1989.

66. Dabrowski, K. and Rusiecki, M., Content of total and free amino acids in zoo-planktonic food of fish larvae, *Aquaculture,* 30,31,1983.

67. Poulet, S. A., Hapette, A. M., Cole, R. B., and Tabet, J. C., Vitamin C in marine copepods, *Limnol. Oceanogr.* 34,1325,1989.

68. Lie, O., Haaland, H., Hemre, G.-L, Maage, A., Lied, E., Rosenlund, G., Sandnes, K., and Olsen, Y., Nutritional composition of rotifers following a change in diet from yeast and emulsified oil to microalgae, *Aquaculture International, 5, 427,* 1997.

69. Juario, J. V. and Storch, V, Biological evaluation of phytoplankton *(Chlorella* sp., *Tetraselmis* sp., and *Isochrysis galbana)* as food for milkfish *(Chanos chanos)* fry, *Aquaculture,* 40,193,1984.

70. Merchie, G., Lavens, P., and Sorgeloos, P., Optimization of dietary vitamin C in fish and crustacean larvae: a review, *Aquaculture,* 155,165,1997.

71. Merchie, G., Lavens, P., Radull, J., Nelis, H. Ollevier, F., De Leenheer, A., and Sorgeloos, P., Evaluation of vitamin C-enriched *Artemia nauplii* for larvae of the giant freshwater prawn, *Aquacult. Int.,* 3, 355,1995.

72. Merchie, G., Lavens, P., Dhert, Ph., Pector, R., Mat Soni, A. F, Nelis, H. Ollevier, F., De Leenheer, A., and Sorgeloos, P., Live food mediated vitamin C transfer to *Dicentrarchus labrax* and *Glorias gariepinus, J. Appl. Ichthyol., 11,* 336,1995.

73. Tacon, A. G. J., Vitamin nutrition in shrimp and fish, in. *Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop, Thailand and Indonesia, September 1991,* Akiyama, D. M. and Tan, R. K. H., Eds., American Soybean Association, Singapore, 1991,10.

74. Merchie, G., Lavens, P., Storch, V., Ubel, U., Nelis, H., De Leenheer, A., and Sorgeloos, P., Influence of dietary vitamin C dosage on turbot *(ScophtJwImus maximus)* and European sea bass *(Dicentrarchus labrax)* nursery stages, *Comp. Biochem. Physiol.* 114,123,1996.

75. Matusiewicz, M., Dabrowski, K., Volker, L., and Matusiewicz, K., Regulation of saturation and depletion of ascorbic acid in rainbow trout, *J. Nutr. Biochem., 5,* 204,1994.

76. Dabrowski, K., Moreau, R., and El-Saidy, D., Ontogenetic sensitivity of channel catfish to ascorbic acid deficiency, *J. Aquatic Animal Health, 8,* 22,1996.

77. Lavens P., Lebegue, E., Jaunet, H., Brunei, A., Dhert, Ph., and Sorgeloos P., Effect of dietary essential fatty acids and vitamins on egg quality in turbot *(Scophthalmus maximus* L.) broodstocks. Submitted to *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*

78. Planas, M., Carnero, D. G., Munilla, R., Merchie, G., and Lavens, P., Enrichment in ascorbic acid of the rotifer *Brachionus plicatilis O.* F. Muller for the rearing of marine fish larvae, in *Proceedings Fifth Spanish Aquacultural Congress, May 1995,* Castello, F., Orvay, I., Calderer, A., and Reig, I., Eds., University of Barcelona, 1995,137.

79. Dabrowski, K., Ascorbic acid status in the early life of whitefish *(Coregonus lavaretus* L.), *Aquaculture,* 84, 61,1990.

80. Dabrowski, K., Hinterleitner, S., Sturmbauer, C, El-Fiky, N., and Weisner, W., Do carp larvae require vitamin C?, *Aquaculture,* 72, 295,1988.

81. Dabrowski, K., Segner, H., Dallinger, R., Hinterleitner, S., Sturmbauer, C., and Wieser, W., Rearing of roach larvae; The vitamin C, minerals interrelationship and nutrition-related histology of the liver and intestine, *J. Animal Physiology and Animal Nutrition,* 62,188,1989.

82. Levine, M., New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *New England J. Med.,* 314, 892,1986.

83. Merchie, G., Lavens, P., Dhert, Ph., Garcfa Ulloa Gomez, M., Nelis, H., De Leenheer, A., and Sorgeloos, P., Dietary ascorbic acid requirements during the hatchery production of turbot larvae, *J. Fish Biol.,* 49, 573,1996.

84. Ishibashi, Y., Kato, K., Ikeda, S., Murata, O., Nasu, T., and Kumai, H., Effect of dietary ascorbic acid on tolerance to intermittent hypoxic stress in Japanese parrot fish, *Nippon Suisan Gakkaishi,* 58, 2147,1992.

85. Dabrowski, K. and Kock, G., Absorption and interaction with minerals of ascorbic acid and ascorbic sulphate in digestive tract of rainbow trout, *Canadian J. Fish. Aquat. Sci.,* 46,1952,1989.

86. Dabrowksi, K., Ascorbate concentration in fish ontogeny, *J. Fish Biol.,* 40, 273, 1992.

87. Hilton, J. W., The interaction of vitamins, minerals and diet composition in the diet of fish, *Aquaculture,* 79, 223,1989.

88. Chew, B.P, Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health, *J. Nutr.,* 124,2033,1995.

89. Lambelet P., Saucy F., and Loliger, J., Radical exchange reactions between vitamin E, vitamin C and phospholipids in autoxidizing polyunsaturated lipids, *Free Rad. Res.,* 20,1,1994.

90. Sakai, T, Murata, H., Endo, M., Yamauchi, K., Tabata, N., and Fukudome, M., 2-Thiobarbituric acid values and contents of a-tocopherol and bile pigments in the liver and muscle of jaundiced yellowtail, *Seriola quinqueradiata, Agric. Biol. Chem.,* 53,1739,1989.

91. Ruff, N., Lavens, P., Huo, J. Z., Sorgeloos, P., Nelis, H.J., and De Leenheer, A. Antioxidative effect of dietary tocopherol and ascorbic acid on production performance of *Penaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture International,* in press.

92. Merchie, G., Kontara, E., Lavens, P., Robles, R., Kurmaly, K., and Sorgeloos, P., Effect of vitamin C and astaxanthin on stress and disease resistance of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius), *Aquaculture Res.,* 29, 579,1998.

93. Hapette, A. M., Coombs, S., Williams, R., and Poulet, S. A.,Variation in vitamin C content of sprat larvae *(Sprattus sprattus)* in the Irish Sea, *Marine Biol.,* 108,39, 1991.

«فصل ١٤»

انتقال ویتامین «ث» به باس‌دریایی *Dicentrarchus labrax*، از طریق غذای زنده

Genciana Terora, Stefano Cecchini, Marco Saroglia, Gaetano Caricato and Zsigmond Jeney

١-١٤- مقدمه

در حال حاضر نیاز بسیاری از گونه‌های آبزیان به ویتامین ث طی مراحل رشد بخوبی شناخته شده است که این نیاز از گونه‌ای به گونه دیگر و همچنین بر حسب شرایط محیطی و وضعیت فیزیولوژیک ماهی دارای تفاوت است. با این وجود، گزارشهای بسیار اندکی در مورد نیازهای ویتامینی ماهیان در مراحل ابتدائی زندگی از جنین در حال تفریخ تا شروع تغذیه از غذای دستی وجود دارد. همچنین علائم کمبود همچون بدشکلی‌های مهم نخاعی و توقف رشد در ماهیان جوان نیز گزارش شده است (١، ٢).

در مرحله لاروی، هر نوع کمبود تغذیه ای، خود را به صورت خیلی سریع و شدیدتر نسبت به مرحله بلوغ نشان می‌دهدکه علت آن پایین بودن وزن اولیه و متعاقب آن کمبود ذخایر بدنی و رشد سریع لاروها می‌باشد (٣). عوامل مذکور، دلایلی برای بروز تسریع در نشانه‌های کمبود ویتامین ث در

لاروها نسبت به ماهیان است و شاید ممکن است به دلیل نیاز بالاتر ویتامینی طی این مرحله حساس تکاملی باشد.

اسیدآسکوربیک علاوه بر فعالیت ضد اسکوروی، یکی از ریزمغذی‌های حیاتی لازم برای کاهش اثرات منفی عوامل استرس‌زا بر سلامت ماهیان و مقاومت آنها در برابر بیماری‌ها می باشد (٤، ٥). مقادیر مورد نیاز ویتامین ث برای رشد ماهیان کمتر از مقادیری است که برای غلبه بر آسیب حاصله توسط فاکتورهای استرسی لازم است ولی اغلب منابع علمی میزان مورد نیاز برای رشد را ذکر شده اند. برای مثال نشان داده شده است که افزودن ۳۰ mg/kg ویتامین ث، جهت تضمین رشد طبیعی و فقدان علایم کمبود در گربه ماهی کافی است ولی دوزهای ٥ برابر این مقدار برای مقاومت در برابر باکتری *Edwardsiella tarda*، لازم است (٦). ماهیان پرورش یافته در سیستم‌های پرورشی متراکم ممکن است با محیط سرشار از استرسی مواجه شده و دچار سرکوب ایمنی شوند. جیره‌های غذایی فاقد ویتامین ث، حساسیت ماهیان نسبت به استرس را می‌افزایند. Scarano و همکاران (۷) اثرات ضد استرسی ویتامین ث را نسبت به نیتریت نشان دادند. عمل حفاظتی ویتامین ث در مقابل نیتریت در باس دریایی، با افزودن بیش از ٤۰۰ mg AA/kg جیره غذایی در مقایسه با میزان مورد نیاز برای رشد (حدود ۲۰۰mg) صورت می پذیرد.

همچنین به نظر می‌رسدکه ویتامین ث نقش حفاظتی در مقابل استرس‌های رایج ایجاد شده توسط محیط پرورش متراکم دارد. مطالعات پیرامون اثر مکمل‌های خوراکی مختلف ویتامین ث بر شانک سرطلایی جوان که از کمبود اکسیژن و استرس دمایی رنج می‌برد، نشان می‌دهد که افزودن ۹۰۰ mg اسیدآسکوربیک به ازای کیلوگرم جیره غذایی، عملکرد فیزیولوژیک ماهی را بهبود می‌بخشد (۸).

یکی از مشکلات افزودن ویتامین ث در جیره‌های غذایی ماهیان این است که اسیدآسکوربیک ناپایدار است و بنابراین ممکن است که ماهیان از کمبود ویتامین ث رنج ببرند حتی زمانی که قبل از عمل آوری غذا این ویتامین در مقادیر کافی به غذای آنها افزوده شود. در بین مشتقات پایدارتر و از لحاظ زیستی فعال اسیدآسکوربیک، می‌توان به منو سولفات آسکوربات (AMS)، منو فسفات آسکوربات (AMP)، پلی فسفات آسکوربات (APP) و پالمتیات آسکوربیل (AP) اشاره نمود. فعالیت زیستی پالمتیات آسکوربیل در مطالعات مختلف ثابت شده و مشخص شده است که نسبت به سایر مشتقات

مذکور، پایداری کمتری دارد ولی این ترکیب به عنوان یک مکمل ویتامینی مناسب در آرتمیا *Artemia salina*، مطرح است و می‌تواند در زمان پرورش لاروها مورد استفاده قرار بگیرد ولی در مقابل هیدرولیز AMS برای ماهیان مشکل یا غیر ممکن است (۹).

در آزادماهیان، از زمان جذب کیسه زرده، جیره دستی می‌تواند به عنوان غذای آغازین به کار گرفته شود ولی در ماهیان دریایی تا زمان نموکافی لاروها و تکامل سیستم آنزیمی آنها این عمل مقدور نخواهد بود (۱۰). مطالعات بسیاری نشان داده اند که نمی توان غذای زنده زئوپلانکتونی را به عنوان منبع غذایی آغازین کنار گذاشت و پس از این دوره، غذای دستی می‌تواند با جیره غذایی بر حسب گونه، دما و تکنیک پرورش، تلفیق شود.

در بین مطالعات انجام شده برای نشان دادن نیازهای لارو ماهیان به ویتامین ث که هنوز از غذای زنده تغذیه می‌کنند، مطالعه Merchie و همکاران (۱۱) پیرامون باس دریایی و گربه ماهی آفریقایی *Clarias garipinus*، از اهمیت بسزایی برخوردار است. محققین، روتیفر *Brathionus plicatilis* و ناپلی آرتمیا را به عنوان غذای زنده برای باس دریایی و آرتمیا را به صورت مجزا برای گربه ماهی و AMP را به عنوان منبع ویتامین ث به کار بردند و نشان دادند که AMP توسط زئوپلانکتون‌ها جذب و متابولیزه می‌شود و به شکل فعال از لحاظ زیستی تبدیل می شود (۱۲) محققین اثبات نمودند که نیاز ویتامینی مختص به گونه بوده و در حالیکه غلظت‌های ویتامینی موجود در آرتمیا برای باس دریایی کافی هستند، در گربه ماهی آفریقایی بهبود در عملکرد تولید (زنده مانی، طول و وزن خشک بیشتر) متناسب با میزان ویتامین ث مکمل موجود در جیره غذایی است. نتایج مشابه زمانی بدست آمد که لاروها بر اساس روش‌های Dhert و همکاران (۱۳) در معرض استرس شوری قرار گرفتند. در گربه ماهی آفریقایی زنده مانی پس از مواجهه با استرس به میزان ویتامین ث بستگی داشت در حالی که در باس دریایی همیشه بهبود معنی داری در زنده مانی بوجود نمی آمد. با وجودیکه غلظت‌های ویتامین ث موجود در آرتمیا (۵۸۱ میلی گرم به ازای هر گرم وزن خشک) برای رشد و مقاومت در برابر استرس باس دریایی کافی بودند، در مورد گربه ماهی آفریقایی این موضوع صحت نداشت. در گربه ماهی آفریقایی این مقدار ویتامین کاملا ناکافی بود و بهبود عملکرد فقط با چهار برابر نمودن میزان ویتامین ث حاصل می آمد.

می توان نتیجه گرفت که غلظت‌های ویتامینی موجود در روتیفر و آرتمیا و بنابراین لاروهایی که از آنها تغذیه می‌کنند، می‌تواند بر حسب نژاد مورد استفاده روتیفر و حتی نژاد جلبکی که برای پرورش آنها استفاده شده است، افزایش یابد (۱۱). همچنین شکل شیمیایی ویتامین ث در آرتمیا، متناسب با مرحله زندگی ناپلی متفاوت است (۱٤) و در حقیقت در مرحله سیست، آسکوربات به صورت شکل غیرفعال سولفات وجود دارد. زمانی که سیست‌ها در شوری و دمای مناسب انکوباسیون می‌شوند، سولفات آسکوربیل، هیدرولیز شده و به شکلی که از لحاظ زیستی فراهم باشد، تبدیل می شود.

جهت اثبات این موضوع که جیره غذایی زنده در پرورش لارو باس دریایی دارای میزان کافی آسکوربات برای ماهی است و این که عملکرد لارو با افزودن ویتامین ث مکمل افزایش می‌یابد، لارو باس دریایی با آرتمیای غنی شده تغذیه شده و تولید و جنبه های فیزیولوژیکی عملکردهای ماهیان مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۱٤- مواد و روش‌ها

گروه ۱۷۰۰۰۰ تایی از تخم های یک روزه باس دریایی را که از تفریخگاه تجاری[1] تهیه شده بود، در شش مخزن استوانه‌ای – مخروطی فایبرگلاس با ۲۸۰۰۰ قطعه در هر مخزن در تراکم ۱۰۰ عدد در هر لیتر در آزمایشگاه آبزی پروری دانشگاه Basilicata توزیع گردید. مخازن به یک دستگاه تصفیه کننده مدار بسته متصل بودند. تخم‌ها در دمای ۱٤ درجه سانتی‌گراد (۰/۵±) و شوری ۳۵ گرم در لیتر حدود ۷۲ ساعت پس از لقاح، تفریخ شدند. با در نظر داشتن میزان مرگ و میر جنینی به میزان ۱۵ درصد، تراکم تفریخ در حدود ۸۵ لارو در هر لیتر بود. دما برای مدت ۳۰ روز در حدود ۱۷-۱۵ درجه سانتی‌گراد حفظ شد و پس از این مدت، با افزایش تدریجی به ۲۰ درجه سانتی‌گراد در روزهای پایانی آزمایش رسید. تغذیه لاروها در روز هشتم پس از تفریخ با استفاده از ناپلی آرتمیا[2] شروع شد و اندازه ناپلی تفریخ شده در حدود٤۱۰ میکرومتر بود.

نخستین گروه‌های لارو باس دریایی در سه مخزن با ناپلی آرتمیای غنی شده با پالمیتات آسکوربیل با یک امولسیون خالص از سوپرسلکو (SS) (INVE) تغذیه شدند که منبع اسیدهای چرب بلند

[1] Nuova Acquazzurra (Civitavecchia, Roma)
[2] Bass entrée (INVE, Belgium)

زنجیره چند غیر اشباع (HUFA و PUFA) بود در حالی که دومین گروه با سه مخزن، همان غذا را در حالیکه با سوپرسلکو غنی شده بود، دریافت می کردند که میزان غنی سازی مشابه تفریخگاه‌های مدیترانه بود. تا زمان تفریخ و مراحل بعدی، دمای آب بطور منظم ثبت می‌شد تا نمو لاروها بر حسب دمای آب پیگیری شود. با استفاده از طرح مشابه غذادهی، از روز یازدهم تا روز بیست و چهارم زندگی، لاروها با ناپلی‌آرتمیا AF480 (INVE) - با اندازه ٤٨٠ میکرومتر- تغذیه شدند که بتدریج از روز بیست و چهارم با آرتمیای EG (INVE) - با اندازه۷۰۰ - ٦۰۰ میکرومتر - جایگزین شد که در مرحله متاناپلی پس از ۱۲ ساعت غنی سازی با سوپر سلکو برای لاروها توزیع می شوند.

۲۰ روز پس از تفریخ، لاروهای باس دریایی به درون مخازن دیگری با حجم و اشکال مختلف منتقل شدند. پس از وقوع تلفات مورد انتظار طی ۲۰ روز اول و همچنین در زمان انتقال، لاروها در هر تیمار در یک مخزن مکعبی مجزا با حجم ۵۰۰ لیتر، قرار داده شدند. تراکم ماهیان در این مخازن ۵۰ لارو در هر لیتر بود. در فاز دوم پرورش، مقدار غذا بیشتر از آنچه در طرح پیش بینی شده بود، فراهم گردید تا به لاروها امکان تغذیه در شرایط *ad libitum* را بدهد. زمانیکه آرتمیای Bass Entree و AF480 در سرتاسر آب در زمانهای غذادهی توزیع شده بودند، EG برای لاروها در نقاط خاصی از مخازن بوسیله لوله پلاستیکی توزیع می شد که توسط سیفون به ظرف استوانه ای۲۰ لیتری حاوی متاناپلی آرتمیا متصل بود. جریان سیفون کنترل می شد و متاناپلی بطور دائم تامین می شد.

دوره تغییر رژیم غذایی همراه با استفاده از غذاده تجاری[1] بودکه در روز ٤١ ام پس از تفریخ با توزیع غذای پست لارو شماره ٦ (با قطر کمتر از ۲۰۰ میکرون) شروع شد. سپس از روز ٤٨ اُم، غذای شماره ۵ (با قطر۳۰۰-۲۰۰ میکرون) توزیع می شد. طی اولین روزهای شروع تغذیه فعال، این غذای دستی توام با ناپلی آرتمیا داده می‌شد که بمرور زمان، درصد غذای زنده کاهش می یافت. در روز ٦١ ام پس از تفریخ، تغذیه توام قطع شد و پست لاروها یا بچه ماهیان تنها با غذای شماره ٤ شرکت مذکور (در اندازه ۵۰۰ -۳۰۰ میکرون) تغذیه می شدند. نمونه‌های لاروها، پست لاروها و بچه ماهیان

[1] Scattered pelleted feed (PerlaMarine, Hendrix, Italy)

– تغذیه شده با آرتمیای غنی شده با سوپرسلکو – با یا بدون افـزودن پالمیتـات آسـکوربیل، ۲۰، ۳۰، ٤٠ و ٥٠ روز پس از تفریخ، برداشته شدند. میزان آسـکوربات کـل و شـاخص‌هـای اسـید آمینـه ای کلاژن، هیدروکسی پرولین و هیدروکسی لیزین و ارتباط نـسبی بـا اشـکال فاقـد هیدروکـسیل، مـورد سنجش قرار گرفت.

نمونه‌های ماهیان برای گروه‌های آزمایشی و شـاهد در ۲۵، ۳۵، ٤٥ و ٥٥ روز پـس از تفـریخ بـرای بررسی طول و وزن تر و خشک، برداشته شدند.

به علاوه جهت ارزیابی اثر ضد استرسی و تحریک کنندگی سیستم ایمنی ویتامین ث، در روزهای ٤٠ و ٥٠ام پس از تفریخ، نمونه‌های گرفته شده از دو تیمار آزمایشی با استرس شوری و بیمـاری مواجـه شدند.

۱-۲-۱٤- غنی سازی آرتمیا

اشکال متفاوتی از غنی سازی برای انواع مختلف آرتمیا وجود دارد. پس از حصول نتایج نامطلوب بـا سایر اشکال ویتامین ث، پالمیتات آسکوربیل به عنوان منبع مناسب ویتامین ث جهت غنـی سـازی در نظر گرفته شد.

۱-۱-۲-۱٤- غنی سازی ناپلی آرتمیا با Bass Entrée و AF

سیست‌های آرتمیا، پس از ضد عفونی و کپسول زدایـی، در دو مخـزن جداگانـه بـرای انکوباسـیون و تفریخ غوطه ور شدند. ناپلی تفریخ شده در نخستین تانک با ۱۲۰ میلی گرم به ازای هر لیتر پالمیتـات آسکوربیل یا ٦۰۰ میلی گرم به ازای هر لیتر سوپرسلکو - یـک فـرآورده تجـاری دارای PUFA بـا ٤۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم اسیدآسکوربیک - غنی سازی شدند. نـاپلی مخـزن دوم فقـط بـا ٦۰۰ میلی گرم به ازای هر لیتر سوپر سلکو غنی سازی شدند. در هر دو مورد، غنی‌سـازی ۱۲ سـاعت قبل از توزیع ناپلی به درون مخازن صورت گرفت و این بـدین معنـی اسـت کـه بـه محـض تفـریخ ناپلی‌ها، آنها در معرض ماده غنی ساز قرار می‌گرفتند. ناپلی غنی شده با تور پلانکتون گیـری مناسـب جمع آوری و تمام آنها در آب دریای سرد و تمیز مورد شستشو قرار گرفتند. قبل از توزیع آرتمیـا بـه درون ۲ تیمار، نمونه ای از ناپلی غنی شده توزین و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد به منظـور تعیـین

غلظت ویتامین ث نگهداری شد.

۲-۱-۲-۱٤- غنی سازی متاناپلی آرتمیا EG

ناپلی آرتمیای EG، در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و شوری ۲۵ گرم در لیتر تفریخ شد و در تراکم ۳۰۰۰۰۰ عدد در لیتر به مخازن آب با شوری ۲۵ گرم در لیتر و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد معرفی گردید و به خوبی هوادهی شد. یک گروه از ناپلی‌ها با ٦۰۰ میلی گرم در لیتر سوپرسلکو و ۱۲۰ میلی گرم در لیتر پالمیتات آسکوربیل غنی شدند در حالی که غنی سازی گروه دوم فقط با سوپرسلکو انجام گرفت. غنی سازی به مدت ۱۲ ساعت و قبل از توزیع متاناپلی‌ها برای لاروها صورت گرفت. متاناپلی غنی شده با یک تور پلانکتونی جمع آوری و کاملا در آب دریایی خنک و عاری از باکتری شستشو داده شد. پس از شست و شوی یک نمونه از متاناپلی های غنی شده، عمل توزین انجام و سپس برای سنجش میزان ویتامین ث در ۸۰- درجه سانتی گراد نگه‌داری شدند.

۲-۲-۱٤- سنجش ویتامین ث

جهت آزمایش غلظت‌های اسیدآسکوربیک غذای دستی، ۳ نوع غذای خشک ٦، ۵ و ٤ Hendrix [1] سنجش شد.

نمونه‌های ماهی که در فواصل ده روزه برداشته شده بودند، فورا با یخ خشک منجمد و در ۸۰- درجه سانتی گراد، نگهداری شدند. میزان آسکوربات کل با HPLC، فاز معکوس، الوشن ایزوکراکتیک[2] و استفاده از از ردیاب UV یا DAD [3] وستون C18 آنالیز شدند (۵).

۳-۲-۱٤- تعیین میزان اسیدهای آمینه در لاروها

روش به کار رفته روش Pico Tag بود که بوسیلهٔ شرکت Waters (١٦) ایجاد شده بود. در این

[1] Trout Perla Marine
[2] Isocratic
[3] Diode array datector

روش از فنیل ایزوتیوسیانات[1] (PITC) جهت اشتقاق اسیدهای آمینه با یک واکنش ساده یک مرحله‌ای استفاده می شود. سپس تمامی معرفها به آسانی از طریق خلا حذف شده و اسیدهای آمینه فنیل تیوکاربامیل[2] (PTC-AA) حاصله بسرعت روی ستون[3] فاز معکوس جدا می‌شدند. برای هیدرولیز، پروتئین‌ها یا پپتیدها، در معرض بخار اسیدکلریدریک (٦نرمال) در حضور فنل ۰/۵ درصد به مدت یک ساعت در دمای ۱۵۰ لیتری درجه سانتی گراد قرار می گرفتند. استانداردهای هیدرولیز کلاژن، معرف‌ها و ستون آنالیز آسید آمینه از شرکت Waters خریداری شدند. استانداردهای خارجی قبل از هیدرولیز جهت محاسبه نسبتهای مولی اسیدهای آمینه مورد نظر افزوده شد و آنالیزها در سه تکرار انجام پذیرفت.

٤-۲-١٤- زیست سنجی لاروها

۱-٤-۲-١٤- نمونه برداری از لاروها

لاروهای هر تیمار غذایی توسط سطل که مستقیما به درون مخزن پرورشی منتقل می‌شد، برداشته می‌شدند تا استرس وارده به لاروها تقلیل یابد و نیز نمونه گیری به صورت تصادفی انجام شود. پست لاروها با استفاده از یک تور پلانکتونی با چشمهٔ ۵۰۰ میکرومتر نمونه گیری می‌شدند.

پست لاروها با فروبری در محلول ۱۰۰ میلی گرم در لیتر MS_{222}[4] بیهوش می شدند. در هنگام بیهوشی، پست لاروها روی اسلاید مناسب – طراحی شده به منظور بیومتری - قرار می‌گرفتند تا طول کل آنها محاسبه شود. سریعاً پس از اندازه گیری طول، ۵۰ قطعه لارو، خشک می شوند و برای اندازه گیری وزن تر به سبدهای پلاستیکی انتقال داده می شوند تا با ترازوی آزمایشگاهی[5] توزین شوند. همان ۵۰ عدد لاروی که برای تعیین طول کل و وزن تر استفاده می شدند، به منظور تعیین وزن خشک نیز مورد استفاده قرار می گرفتند. لاروها در ۵ زیر نمونه ۱۰تایی توزین شدند. نمونه‌ها در آون در ۱۰۵درجه سانتی گراد به مدت ٢٤ ساعت قرار داده شده و سپس تا خنک شدن درون یک خشک

[1] Phenylisothiocyanate
[2] Phenylthiocarbamyl
۳- ستون Waters Pico. TagTM برای اسیدهای آمینه آزاد، ۳۰ cm × ۳/۹
[4] Sandoz
[5] Sartorius, BP210

کن سیلیکاژلی قرار داده شدند.

۵-۲-۱٤- آزمایش ارزیابی کیفی لاروها

پس از گذشت ٤۰ و۵۰ روز از آزمایش، گروه‌های ۱۰ تایی از هر مخزن آزمایش به صورت تصادفی برداشته شدند و در معرض آزمایش استرس شوری قرار گرفتند.

آزمایش متشکل از ارزیابی زنده مانی پست لاروها حین انتقال از شوری ۳۵ گرم در لیتر به شوری ٤۲ گرم در لیتر، از شوری ۳۵ گرم در لیتر به شوری ۵۰ گرم در لیتر (بعنوان استرس هیپراسموتیک) و پس از شوری ۳۵ گرم در لیتر به شوری یک گرم در لیتر، از شوری ۳۵ گرم در لیتر به شوری صفر در آب یون زدایی شده (بعنوان استرس هیپواسموتیک) بود.آب از دستگاه فیلتراسیون گردشی مطابق با شوری مورد نیاز، شور یا رقیق می شد و برای آزمایش استرس شوری استفاده می شد که سه بار در ظروف یک لیتری انجام می‌گرفت. جهت اندازه گیری شوری از شوری سنج[1] استفاده گردید. میزان مرگ و میر تجمعی در دقایق ۱۵،۳۰ ، ٤۰، ٦۰ و ۹۰ اندازه گیری شد.

۱-۵-۲-۱٤- پاسخ به استرس مواجهه

سویه‌ای از باکتری *Vibrio anguillarum*، سروتیپ ۱ که از قزل آلای قهوه‌ای در مزرعه ای حوالی Centallo[2] ایتالیا جدا شده بود و توسط موسسه Peidmont و Liguria در Turin، تامین می شد، برای آزمایش مواجهه در سه مرتبه استفاده شد. کشتهای باکتری در محیط کشت BHIA[3] با افزودن ۲ درصد نمک و انکوباسیون در دمای ۱±۲٤ درجه سانتی گراد انجام گرفت. باکتری‌ها در شرایط استریل توسط سوآپ جمع آوری شده و سپس در محلول فیزیولوژیک استریل رقیق می شدند. غلظت باکتریایی در کشت پایه، بر اساس CFU[4] به ازای میلی لیتر بیان شد که بر مبنای منحنی رگرسیون ارزیابی شدند (جذب در ٦۰۰nm بوسیله رقیق سازی‌های متوالی کشت پایه در غلظت‌های معلوم). سپس دوزهای عفونی با رقیق سازی متوالی حاصل آمد.

---

[1] EUROMEX, RF360
[2] EUROMEX , RF360
[3] Brain Heart Infusion Agar
[4] Column forming units

سه نمونه تصادفی از ده ماهی جوان از هر گروه آزمایشی در روزهـای ٤٠ و ٥٠ اُم آزمـایش برداشـته شد. ماهیان در ٥٠٠ میلی لیتر محلول عفونی برای مدت ١٥ دقیقه قـرار داده شـدند. دوزهـای عفـونی شامل موارد ذیل بود: ١٠١، ١٠٢ و ١٠٣ CFU در هر میلی لیتـر در روز ٤٠ و ١٠١، ١٠٢ ،١٠٣، ١٠٤، ١٠٥ اُم و ١٠٦ CFU در میلی لیتر در روز ٥٠ اُم. پس از حمام عفونی، ماهیان بـا دقـت جمـع آوری شده و به ظروف یک لیتری مجزا منتقل شدند که حاوی آب دریـای تـازه بـود. میـزان مـرگ و میـر تجمعی در ساعات ١، ٢ ،٣،٦، ١٢ و ٢٤ ساعت پس از مواجهه ارزیابی شد.

٢-٥-٢-١٤- تجزیه و تحلیل آماری

تمام دادههـا بـه صـورت میـانگین ارائـه شـدند و تحـت آنـالیز واریـانس یـک طرفـه (ANOVA) (P<0.01, P<0.05) قرار گرفتند.

٣-١٤- نتایج

جدول ١٤-١ غلظت اسیدآسکوربیک کل (TAA) را در نـاپلی آرتمیـا غنـی شـده بـا سوپرسـلکو و پالمیتات آسکوربیل و ناپلی که تنها با سوپرسلکو غنی شده بود، نشان میدهد. غلظـت ویتـامین ث در غذای دستی پرورشی مورد استفاده، (٢/٨)١٩٧/٥ میکروگرم به ازای گرم بود.

جدول ١٤-٢ و شکل١٤-١ غلظتهای اسیدآسکوربیک کل را در لاروهـایی نـشان مـیدهـد کـه در معرض ٢ رژیم غذایی متفاوت قرار گرفته بودند. در تمام مراحل ارزیابی، اختلاف در اسیدآسکوربیک کل به ازای وزن مرطوب بین گروههای لاروی معنی دار بود که با ناپلی آرتمیا غنی شده با سوپرسلکو و پالمیتات آسکوربیل یا ناپلی غنی شـده بـا سوپرسـلکو تغذیـه شـده بودنـد (P<0.05, P<0.01). شاخص هیدروکسی پرولین (درصدHYP) در گروهی از لاروهـای بـاس دریـایی بـالاتر بـود کـه بـا آرتمیای غنی شده با سوپرسلکو و پالمیتات آسکوربیل تغذیه شده بودند (جدول ٣-١٤) و در گروهی که فقط با آرتمیای غنی شده با سوپرسلکو تغذیه شده بودند، ایـن شـاخص در مقـادیر کمتـری قـرار داشت. شکل ٢-١٤ نشاندهنده نسبت درصد هیدروکسی پرولین به پرولین در لاروهای بـاس دریـایی است که ٢ جیره غذایی را دریافت نموده اند. در تمام سنین، مقادیر حاصله برای لاروهای تغذیه شـده با آرتمیا غنی شده با سوپرسلکو + پالمیتات آسکوربیل، به میزان معنی داری بالاتر از لاروهایی بود که با آرتمیای غنی شده با سوپرسلکو تغذیه شده بودند.

جدول۱-۱٤: ذخیره سازی ویتامین ث در متا ناپلی *Artemia salina* پس از روش‌های مختلف غنی سازی (میانگین ± انحراف از معیار)

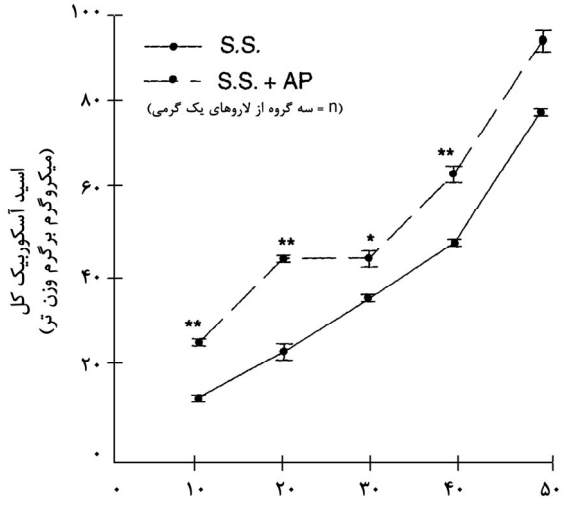
نمونه	AA (µg/g وزن تر)	DHA (µg/g وزن تر)	TAA(µg/g وزن تر)
Artemia EG® + S.S.® (600 mg/l) + AP (120 mg/l)	۱۹۹/۹۸ (٥/٥۷)	۲۷/۸٤ (۱۸/٦۱)	۲۲٦/۸۲ (۱۸/۱۱)
Artemia EG® + S.S. ® (600 mg/l) + AP (120 mg/l) + AA (120 mg/l)	۱۷۱/۱۲ (٦۷/۲٤)	٥۷/۳۰ (٤۲/۱٦)	۲۲۸/٤۲ (٤۱/۰٥)
Artemia EG® + S.S. ® (600 mg/l)	۸/۳۸ (٦/۸۲)	۱۷/۷۲ (۱٥/۲۹)	۲٦/۱ (۹/۲٥)
Artemia EG® + S.S. ® (600 mg/l) + AA (120 mg/l)	۱۹/۸۱ (۹/۱٥)	۲۲/۳٤ (۱۱/۲٤)	۲۸/۹۳ (۲۱/۰۸)
Artemia BE®	۲/۲۹ (۱/٥۸)	۳۹/۷۲ (۱۹/۰٤)	٤۱/۹۱ (۱۳/۹۷)
Artemia AF®	۱٦/۰۱ (۸/٦۸)	۲٥/۱۳ (۷/۹۲)	۳۸/۷۳ (۱٦/۹۲)

AA: اسیدآسکوربیک، AP: پالمیتات آسکوربیل، .S.S: سوپرسلکو®، TAA: میزان اسیدآسکوربیک کل، DHA: اسید دهیدروآسکوربیک
آرتمیای, BE, AF ,EG : نژادهای مختلف Artemia salina تهیه شده از شرکت INVE

جدول۲-۱٤: ذخیره سازی ویتامین ث در لاروهای باس دریایی اروپایی، پس از تغذیه با دو رژیم غذایی (میانگین ± انحراف از معیار)

نمونه	روزهای پس از تفریخ	AA (µg/g وزن تر)	DHA (µg/g وزن تر)	TAA (µg/g وزن تر)
لاروهای تغذیه شده با *Artemia salina* غنی شده با S.S	۱۰	۰	۱۱/۷ (۱/۱)	۱۱/۷ (۱/۱)
	۲۰	۰	۲۱/۱ (۱/۸)	۲۱/۱ (۱/۸)
	۳۰	۰	۳۳/۷ (۱/۰)	۳۳/۷ (۱/۰)
	٤۰	۲۷/۹ (٤/٥)	۱٦/۸ (۳/٦)	٤٦/۳ (۱/۰)
	٥۰	۳٤/۹ (۱/۳)	٤۰/۳ (۱/۰)	۷٥/۲ (۰/٦)
لاروهای تغذیه شده با *Artemia salina* غنی شده با S.S. + AP	۱۰	۲/۲ (۰/۱)	۲۱/۹ (۱/۱)	۲٤/۱ (۰/۹)
	۲۰	۲۲/۱ (۳/۱)	۱۸/۹ (۰/٤)	٤۲/٦ (۰/۹)
	۳۰	۲۹/۹ (۳/٥)	۱۱/۰ (۱/٤)	٤۲/٤ (۲/۰)
	٤۰	٤۲/٦ (۸/۳)	۱٦/۸ (۱۰/٤)	٦۱/۱ (۲/۲)
	٥۰	٦۷/۹ (٤/۳)	۲۳/۰ (٦/۳)	۹۰/۹ (۲/۷)

توجه: اختلاف معنی دار بین دو گروه لاروی، در تمام سنین مشاهده شد. برای مخففها به جدول ۱٤-۱مراجعه نمائید.



شکل۱-۱٤: غلظت‌های ویتامین ث در لاروهای باس دریایی تغذیه شده با آرتمیای غنی شده با S.S یا S.S + AP

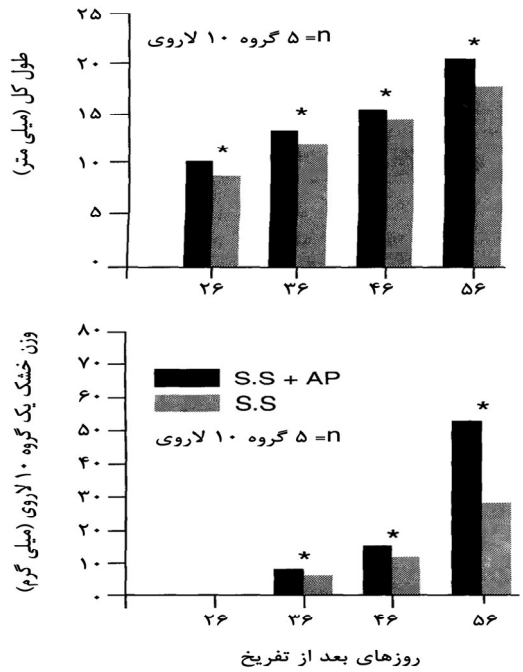
جدول۳-۱٤ : الگوهای اسید آمینه ای کلاژن در لاروهای باس دریایی تغذیه شده با آرتمیایی غنی نشده و غنی شده با AP

		روزهای پس از تفریخ				
	اسیدآمینه	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰
لاروهای تغذیه	HP	۰/۵۹ ± (۰/۰۸)^{b}	۱ ± ۰/۰۵^{d}	۱ ± ۰/۵۸^{e}	۵/۲۱± ۰/۱۲ ^{c}	۵/۳۸ ±۰/۲۲^{f}
شده با آرتمیای	P	۳/۸٦ ± ۰/۰٦	۳/٦۷ ± ۰/۰۷	۵/۹۱ ± ۱/۷٤	۷/۹٦ ±۰/۱٦	٦/۳۹± ۰/۲۷
غنی نشده	HP/P	۰/۱۵ ± ۰/۰۲^{a}	۰/۲۷± ۰/۰۱^{c}	۰/۳۲± ۰/۰۱ ^{d}	۰/٦۵± ۰/۰۳^{a}	۰/۸٤± ۰/۰٤^{e}
لاروهای تغذیه	HP	۱/۰٦ ± ۰/۰۹^{c}	۲/۸۳± ۰ /۲۳^{g}	۳/۵۸± ۰/٤۸^{d}	٤/۲٦ ±۰/۰۵^{e}	۳/٤۷ ±۰/۱^{b}
شده با آرتمیای	P	٤/۸۸ ± ۰/۷۵	۸/٦۵ ± ۰/٤۷	٦/۵۳± ۰/۷۵	۵/٤۵ ± ۰/۱۲	۳/٦۹ ±۰/۰۵
غنی شده با AP	HP/P	۰/۲۲ ± ۰/۰۲^{b}	۰/۳۳± ۰/۰۱ ^{f}	۰/۵۵± ۰/۰۱^{e}	۰/۷۸± ۰/۰۳^{c}	۰/۹٤ ±۰/۰۲^{f}

توجه: برای اسیدهای آمینه مشابه و نسبت‌ها، اعداد با حروف مختلف در یک ستون، دارای اختلاف معنی دار هستند. HP: هیدروکسی پرولین، P: پرولین، HP/P: نسبت هیدروکسی پرولین به پرولین. اعداد به صورت میانگین ± انحراف از معیار برحسب درصد بیان شده اند.

۱-۳-۱٤- زیست سنجی لاروها

برای گروهی از لاروها که با هر دو مادهٔ غنی ساز در ۳٦، ٤٦ و ٥٦ روز پس از تفریخ تغذیه شده بودند، میانگین اختلاف وزن خشک بین دو گروه لاروی در تمام مراحل سنجش شده، معنی دار بود ($P<0.01$) (شکل۲-۱٤)



شکل۲-۱٤: رشد لارو باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*) تغذیه شده با ناپلی آرتمیای غنی سازی شده با سوپرسلکو (S.S) یا پالمیتات آسکوربیل + سوپرسلکو

۲-۳-۱٤- آزمایش استرس اسمزی

۱-۲-۳-۱٤- آزمایش در روز ٤۰ام زندگی

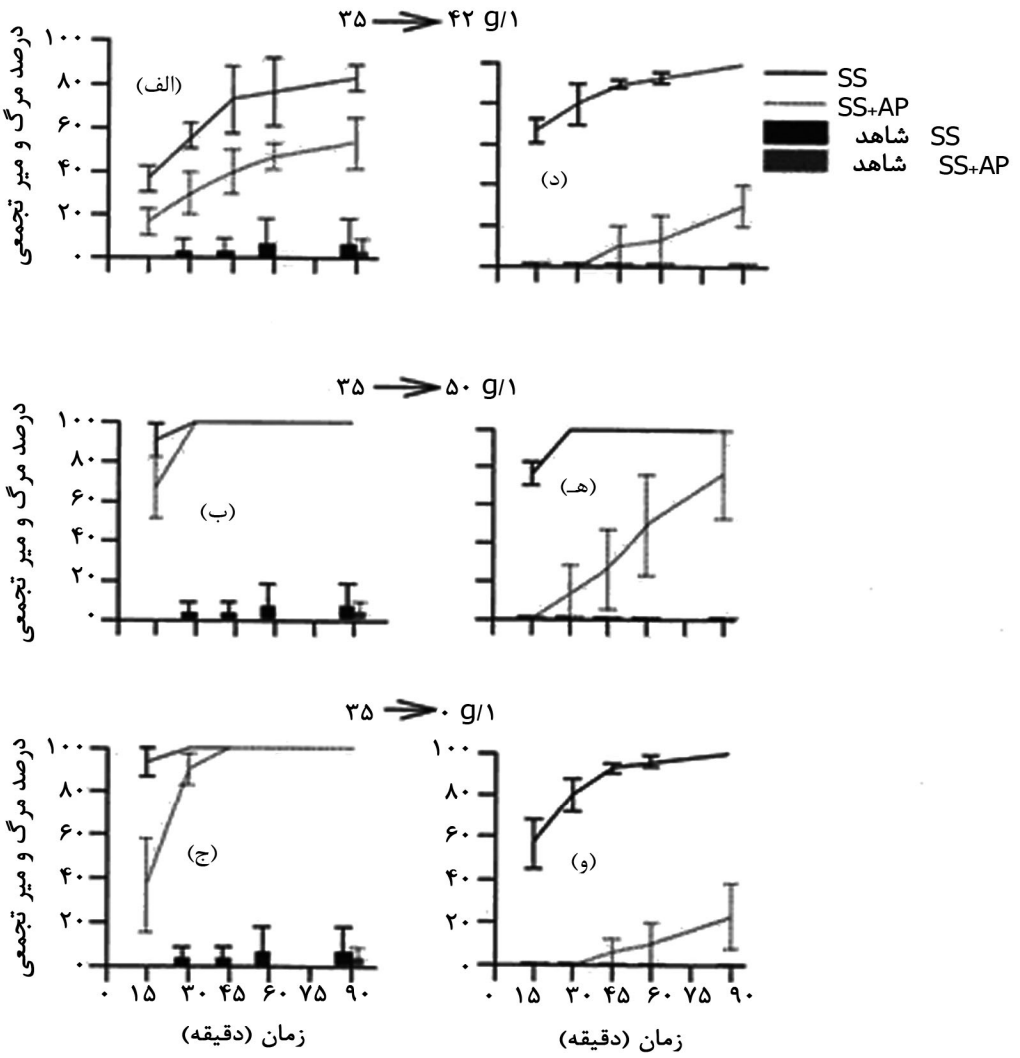
در شرایط هیپراسمتیک - ٥۰ گرم به ازای هر لیتر نمک (شکل ۱٤- ۳ ب) - پس از ۱٥ دقیقه از شروع آزمایش، میزان مرگ و میر برای تیمار تغذیه شده با مکمل ویتامینی، ٦٦/۷ درصد بود در حالی که در گروهی که از مکمل ویتامینی در جیره غذایی آنها استفاده نشده بود، ۹۰ درصد مرگ و میر

مشاهده گردید ولی اختلاف بین دو تیمار معنی‌دار نبود. در دقیقه ۳۰ ام آزمایش، مرگ ومیر تجمعی ۱۰۰درصد بود. در شرایط هیپراسمتیک با شوری ٤۲ گرم در لیتر (شکل ۳-۱٤ الف) پس از ۱۵ دقیقه از شروع آزمایش، مرگ و میر برای گروهی که با آرتمیای غنی شده با سوپرسلکو و پالمیتات آسکوربیل تغذیه شده بودند، ۱٦/۷ درصد (۵/۷) بود در حالیکه مرگ و میر برای گروه لاروی تغذیه شده با آرتمیای غنی شده با سوپرسلکو ۳٦/۷ درصد (۵/۸) بود ولی اختلاف بین دو تیمار معنی‌دار نبود ولی اختلاف موجود در مرگ و میر تجمعی پس از گذشت ٦۰ و ۹۰ دقیقه، معنی دار بود ($P<0.05$). تیمارهایی که در معرض استرس در آب یون زدایی شده، قرار داده شده بودند (شکل ۳-۱٤ ج) - با جیره غذایی غنی شده با پالمیتات آسکوربیل - پس از گذشت ۱۵ دقیقه، ۳٦/۷ درصد (۲۰/۸) مرگ و میر را نشان دادند که به طور معنی داری ($P<0.05$) پایین تر از مقدار مشاهده شده برای لاروهایی بود که از غذای فاقد مکمل تغذیه کرده بودند (مرگ ومیر ۹۳/۳درصد). پس از گذشت ۳۰ دقیقه، نرخ مرگ و میر برای گروهی که با مکمل‌های ویتامینی تغذیه شده بودند، ۹۰ درصد (۱۷/۳) بود و از آزمایشی تا آزمایش دیگر ثابت باقی می ماند. در تیمارهایی با بچه ماهیان - بدون مکمل های ویتامینی- مرگ و میر تجمعی ۱۰۰ درصد بود.

مرگ و میر تجمعی در هر دو گروه در آزمایش شوری ۳۵ گرم در لیتر به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد (شکل۳-۱٤ الف، ب، ج) که بی نهایت ناچیز بوده که علت آن تنها می تواند استرس دستکاری بوده باشد.

۲-۲-۳-۱٤- آزمایش در روز ۵۰ اُم زندگی

در شوری۵۰ گرم در لیتر (شکل ۱٤-۳ د) در شرایط هیپراسمتیک – تلفاتی در ماهیانی که از جیره‌های غذایی حاوی مکملهای ویتامین ث تغذیه کرده بودند، مشاهده نشد و میزان مرگ و میر در گروهی که فاقد مکمل های غذایی بودند، ۷٦/۷ درصد (۵/۸) بود. مرگ و میر در گروهی که از مکمل های ویتامینی تغذیه کرده بودند بتدریج پس از گذشت ٤۵ دقیقه، به ۲٦/۷ درصد (۲۰/۸) و پس از گذشت ٦۰ دقیقه به ۵۰ درصد (۲٦/۵) و سرانجام پس از گذشت ۹۰ دقیقه به ۷٦/۷ درصد (۲۳/۱) رسید و اختلاف معنی داری بین گروه‌ها مشاهده شد ($P<0.05$).



شکل۳-۱٤: مقاومت در برابر استرس شوری در لاروهای ٤۰ (الف، ب، ج) و ۵۰ (د، ه، و) روزه باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*) تغذیه شده با ناپلی آرتمیای غنی شده با سوپرسلکو (S.S) یا سوپرسلکو+ پالمیتات آسکوربیل

در آزمایش انجام شده با آب یون‌زدایی شده (شکل ۱٤-۳ ه) همه لاروهایی که با مکمل های ویتامینی تغذیه شده بودند، در ۳۰ دقیقه نخست زنده ماندند در حالی که در گروهی که از غـذای فاقـد تغذیـه

کرده بودند، مرگ و میر تجمعی پس از گذشت ۱۵ دقیقه، ٥٦/٦ درصد (۱۱/۵) و پس از گذشت ۳۰ دقیقه،۸۰ درصد (۱۱/۵) بود. در دقیقه ۹۰، مرگ و میر در گروه تغذیه شده با مکمل های ویتامینی ۲۳/۳ درصد (۱۵/۳) بود درحالیکه در گروهی که فاقد چنین مکملهایی بود، ۱۰۰ درصد مرگ و میر مشاهده گردید که نتایج حاصله دارای اختلاف معنی دار بودند ($P<0.05$).

در گروه‌شاهد با شوری۳۵ گرم در لیتر (شکل۳-١٤ د، ه، و) تمام گروه‌ها تا پایان آزمایش زنده ماندند.

۳-۳-١٤- آزمون مواجهه

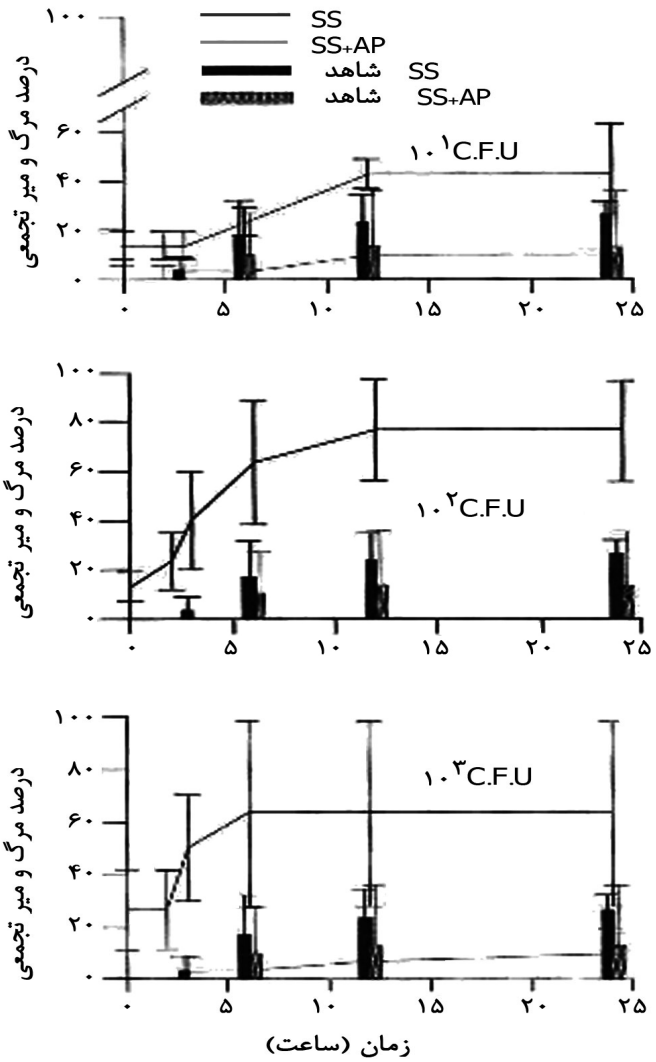
۱-۳-۳-١٤- آزمایش در روز ٤٠ اُم زندگی

شکل ٤- ١٤ نتایج آزمایشهای مواجهه انجام شده با غلظت های مختلف باکتری *Vibrio anguillarum*، را در لارو باس دریایی نشان می‌دهد. در دو گروه شاهد، مرگ و میر تجمعی بر اثر دستکاری در گروه تغذیه شده با پالمیتات آسکوربیل، ۱۳/۳درصد (۲۳/۱) و در گروه بدون آن، ٢٦/٧ درصد (۵/۸) بود.

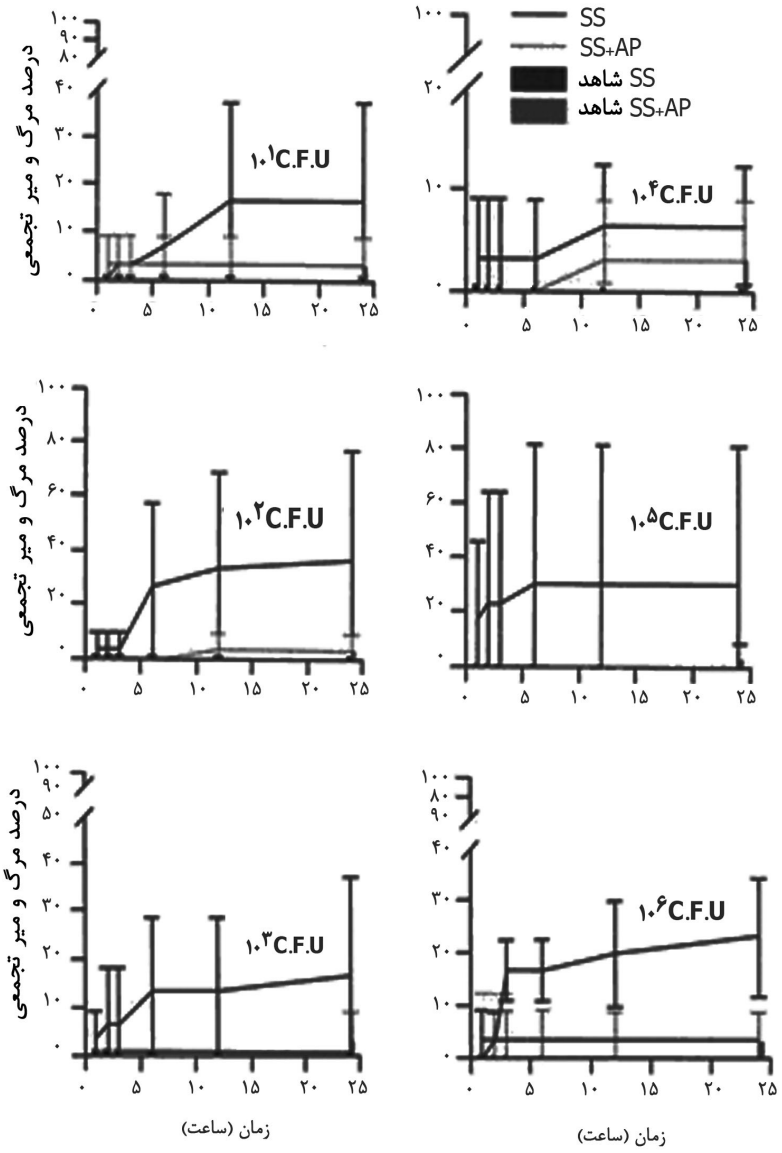
تلفاتی در بچه ماهیان باس دریایی که از آرتمیای غنی شده با سوپرسلکو و پالمیتات آسکوربیل تغذیه کرده بودند و در معرض حمام باکتری با غلظت $۱۰^{۱}$ (CFU/ml) قرار گرفتند، مشاهده نشد. ماهیان جوان تغذیه شده با ناپلی غنی شده با سوپرسلکو، پس از ۱ ساعت ۱۳/۳ درصد (۵/۸) مرگ و میر داشتند و این مقدار در ۳ ساعت بعدی آزمایش تغییری نکرد.

۲-۳-۳-١٤- آزمایش در روز ۵۰ اُم زندگی

بچه ماهیان باس دریایی که جیره غذایی حاوی هر دو ماده غنی سازی را دریافت کرده بودند و در معرض آزمایش حمام عفونت $۱۰^{۱}$ CFU/ml قرار گرفتند، مرگ و میر ۳/۳ (۵/۸) را پس از گذشت نخستین ساعت آزمایش نشان دادند، در حالی که مرگ و میر در بچه ماهیان تغذیه شده با ناپلی غنی شده با سوپرسلکو مشاهده نشد. در حالی که نتایج تیمار تغذیه شده با پالمیتات آسکوربیل نشان داد که مرگ و میر در سراسر مدت آزمایش ثابت باقی مانده و در تیمار فاقد پالمیتات آسکوربیل، پس از گذشت ساعت دوم و سوم آزمایش به ۳/۳ درصد (۵/۸) و سپس طی مراحل پایانی آزمایش به ٦/٨ درصد (۱۱/۵) می‌رسید. اگرچه، اختلاف بین ۲ گروه معنی دار نبود.



شکل٤-١٤: مقاومت لاروهای ٤٠ روزه باس دریایی به آزمون مواجهه با *Vibrio anguillarum* تغذیه شده با ناپلی آرتمیای غنی شده با سوپر سلکو(S.S) یا پالمیتات آسکوربیل + سوپر سلکو



شکل۵-۱٤: مقاومت لاروهای ۵۰ روزه باس دریایی به آزمون مواجهه با *Vibrio anguillarum*، تغذیه شده با ناپلی آرتمیای غنی شده با سوپرسلکو (S.S) یا پالمیتات آسکوربیل + سوپرسلکو

٤-١٤- بحث و نتیجه گیری

غلظت‌های اسیدآسکوربیک در ناپلی آرتمیا غنی شده با سوپرسلکو و پالمیتات آسکوربیل به میـزان ۹ برابر بیشتر از ناپلی غنی شده با سوپرسلکو است. Merchie و همکاران (۱۱)، مقادیر غنی سازی تـا بیش از ۳۵۸۱ میکروگرم به ازای هر گرم در یک نژاد آرتمیا بدست آوردند که این نژاد به طور طبیعـی دارای ۵۸۱ میکروگرم به ازای هر گرم ویتامین ث بود. غلظت‌های ویتـامینی در نـاپلی آرتمیـا پـس از تفریخ می‌تواند بیش از حد متفاوت باشدکه این مسئله به نژاد و منشاء آن بستگی دارد. Merchie و همکاران (۱۱) غلظت آسکوربات کل را در سه نژاد مختلف از نامیبیا، برزیل و ویتنام بررسی نمودند و دریافتند که میزان ویتامین ث از ۳۱۰ میکروگرم در هر گرم تا ۵۸۱ میکروگرم در هر گرم، نوسان دارد. Dabrowski (١٤)، غلظت آسکوربات کل نژادهای آمریکای شمالی، فرانسه، ایتالیا و چین آرتمیـا را بررسی نمود و غلظت‌های کمتری – حتی اگر بزرگنمایی شده باشد – از ١٦٢/٤ تا ٤٢٨/٥ میکروگـرم به ازای هر گرم را تعیین نمود.

عرضه ناچیز ویتامین در دوره بی نهایت حساس آغاز نمو انتوژنیک، مـی‌توانـد اختلالاتـی را در نمـو لاروی و همچنین آسیب‌های برگشت ناپذیری را در ساختار آناتومیک خاص مانند سرپوش آبششی و مهره‌ها ایجاد کند (۱۱ ،۱۲) و این آسیبها در مرحله بعدی رشد در مـزارع پـرورش مـاهی، غیـر قابـل جبران است. ماهیان دچار نقص سرپوش آبششی، به دفعات در مزارع پـرورش ماهیـان یـوری هـالین مدیترانه‌ای بویژه مزارع شانک سرطلایی یافت می‌شوند. این ماهیان، بازار پسند نبوده و بنابراین قیمت پایینی دارند. با این وجود می دانیم که نقص در سرپوش آبششی در شانک سرطلایی و بـاس دریـایی تنهـا بـه ویتـامین ث مربـوط نمـی باشـد (Saroglia.M، مـصاحبه). بدشـکلی در سـتون مهـره‌هـا (اسکولیوزیس، کیفوزیس، لوردوزیس) از نظر زیبایی شناختی و زنده مانی شانک سـرطلایی مهـم تـر است و به همین دلیل تفریخگاه‌های تجاری، ماهیانی را که نیاز غذایی آنها رفع نشده باشد، حذف مـی کنند.

پرنشدن کیسه شنا نیز بد شکلی مهمی است که تا چند سال پیش معضل عمده ای در تفریخگـاه‌هـای شانک سرطلایی بود و اثبات شده است که این موضوع نمی تواند با کمبود ویتـامین ث مـرتبط باشـد (۱۱)، بلکه عدم مدیریت صحیح مخازن در روزهای نخست پرورش لاروها و احتمالا کمبود در میزان

اسیدهای چرب غیر اشباع چند زنجیره در غذای مولدین از علل آن می‌باشد(۱۷).
غلظتهای ویتامین ث در لاروهایی که در جیره غذایی آنها پالمیتات آسکوربیل وجود داشته است، بیشتر از لاروهایی است که در جیره غذایی آنها مکمل ویتامینی وجود نداشته است. این موضوع زیست فراهمی ویتامین ث را در ناپلی آرتمیا ثابت می‌کند زمانی که به عنوان غذای آغازین لاروی استفاده می‌شود.
توانایی لاروها جهت هضم اشکال استری شده آسکوربات موضوع مهمی است. لارو باس دریایی و ماهی توربوت پس از آنکه با منوفسفات آسکوربیک (AMP) تغذیه شدند، مورد آنالیز قرار گرفتند و غلظت‌های بدنی پایین تری از آسکوربات کل را نسبت به آنچه در کار اخیر مشاهده شد، نشان دادند که به نظر می‌رسد که لاروها قادر به هضم استر ویتامینی نبوده اند (۱۸) در مقابل، Dabrowski و Blom (۱۹) طی مطالعه ای بر قزل آلای رنگین کمان پی بردند که آلوین‌های حاصله از مولدین ماده پرورش یافته با جیره غذایی فاقد ویتامین ث یا دارای ۳٦۰ میلی گرم AMP به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی و نیز تغذیه خود آلوین‌ها با ۵۰۰ میلی‌گرمAMP، افزایش غلظتهای آسکوربات بدنی را از نخستین روز تغذیه نشان می دهد که این مطلب موید حضور آنزیم های فسفاتاز در روده آنها می باشد و شاید این موضوع به دلیل انتقال مقادیر مختلف زرده به تخمک باشد. همچنین حضور فسفاتازها در روده گونه‌های یوری هالین مدیترانه‌ای از نخستین روزهای حیات ثابت شده است (۲۰). Merchie و همکاران (۱۲) غلظت‌های آسکوربات را بیشتر از آنچه ما در لارو غنی نشده با پالمیتات آسکوربیل (٦۱۰ – ۳٤٦ میکروگرم به ازای گرم برحسب مرحله زندگی) و لاروهای تغذیه شده با پالمیتات آسکوربیل (۱٦۲٤– ۱۲٤٤ میکروگرم به ازای گرم وزن خشک) بدست آوردیم، نشان دادند و باید تاکید نمود که طرح آزمایشی ما از آنچه که توسط سایر محققین استفاده کرده بودند، متفاوت بود. به طور خلاصه، آنها لارو باس دریایی را در تراکم ۳۰ قطعه لارو در لیتر در مخازن ٦۰ لیتری در دمای ۱۹ درجه سانتی گراد نگه داری نمودند در حالی که ما، از شرایط مشابه تفریخگاه‌های تجاری استفاده کردیم و لاروها را در ۱٦ درجه سانتی گراد در تراکم ۱۰۰ قطعه لارو در لیتر در مخازن ۲۸۰ لیتری نگهداری کردیم و لاروهای باس دریایی با ناپلی آرتمیا از روز هشتم تا روز شصتم حیات تغذیه شدند که شروع تغذیه با غذای دستی در روز ٤۱ اُم بود.

درمقابل، Merchie و همکاران (۱۲)، در ابتدا لاروها را بـا روتیفـر *Brachionus plicatilis*، (در روزهای چهارم تا چهاردهم) تغذیه نمودند و سپس از ناپلی آرتمیا (در روزهـای سـیزدهم تـا چهلـم حیات) تا پایان دوره تغییر رژیم غذایی استفاده نمودند. این عمل در روز ۳۵- ٦ روز زودتر- در نتیجه دماهای بالاتر- شروع شد که ضمنا در مرحله نخست تکامل اندام زایی نامناسب است.

احتمالاً متابولیسم بالاتر لاروی ایجاد شده توسط دمای ۱۹ درجه سانتی گراد، ظرفیت جذبی لاروها را افزایش داده و بنابراین نیاز ویتامینی بالاتری را ایجاد کرده است. اگرچه ممکن است که چنین اختلاف بارزی را توجیه نکند و پذیرش این حقیقت مشکل است که غلظت ویتامین موجود در بـدن لارو کـه توسط Merchie و همکاران مشاهده شده است، بیشتر از مقدار آسکوربات موجود در جیـره غـذایی باشد، از آنجاییکه علایم تجمع زیستی[1] ویتامین ث - که نسبتا به سرعت متابولیزه مـی‌شـود - وجـود ندارد. احتمالاً دلایل دیگر این اختلاف، دقت روش‌های آنالیزی مورد استفاده یا تعداد بیشتر لاروهـای موجود در هر نمونه می باشد. اختلاف در افزایش وزن در دو گروه قرار گرفته در معرض رژیـم‌هـای غذایی مختلف، قابل توجه است و نشان می دهد که افزودن مکمـل ویتـامین ث، شـرایط پرورشـی را بهبود بخشیده است. رشد در گروه شاهد (بدون مکمل ویتامین ث) در محدوده گزارش شده در منابع علمی است (۲۱). این محقق نشان داد که طول بدن ماهی بیست و پنج روزه ۹/۵ میلی متر مـی باشـد. در مطالعه اخیر میانگین طول بدنی لارو ۲٦ روزه بدون مکمل‌های ویتامینی حدود ۹ میلی متر بـود در حالی که لاروهایی که پالمیتات آسکوربیل را دریافت کرده بودند، ۱۰/۲ میلـی متـر بودنـد. در مقابـل، Merchie و همکاران (۱۲)، اختلافاتی در وزن و رشد بین گروه‌های لاروی مشاهده نکردنـد کـه بـا جیره‌های غذایی حاوی مقادیر مختلف ویتامین ث تغذیه شده بودند. در حالیکه آنها چنـین اختلافـاتی را در گربه ماهی آفریقایی مشاهده کردند. آنها متوسط طول بدنی را برای لارو باس دریایی پس از ۳۵ روز، ۱۵/۵ میلی متر ذکر نمودند، در حالیکه آزمایش های ما میانگین طول بدن را به ترتیـب ۱۳/۳۸ و ۱۲/۱ میلی متر برای لاروهای تغذیه شده با و یا بدون مکمل ویتامین در ۳٦ روز پس از تفـریخ نـشان داد. دلیل این اختلاف می‌تواند در تفاوت دمای آب و نرخ افزایش دماهای روزانه باشد. در حقیقت، از تفریخ تخم‌ها تا روز ۳۸ اُم، درجه حرارت در مطالعه اخیر در ۱٦ درجه سانتی‌گراد حفظ شد، در حالی

[1] Bioaccumulation

که آزمایش Merchie در درجه حرارت متوسط ۱۹ درجه سانتی گراد به مدت ۳۵ روز انجام گرفت. شایان ذکر است که تفریخگاه‌های تجاری در مدیترانه به دلیل کیفیت بالاتر بچه ماهیان باس دریایی در دمای ۱۶-۱۵ درجه سانتی گراد، تمایل به این دما دارند.

لاروهایی که با مکمل های ویتامینی تغذیه شده بودند در مقایسه با لاروهایی که مکمل ویتامینی دریافت نکرده بودند، از لحاظ وزنی همگن تر بودند. اختلاف رشد در گله ماهیان، یکی از فاکتورهایی است که می‌تواند تلفات سنگین را بر اثر کانی بالیسم (همجنس خواری) و ایجاد عفونتهای ثانویه به دنبال داشته باشد. بنابراین تا زمانیکه انتخاب بر حسب اندازه می‌تواند انجام شود، بهتر است اندازه همگن باشد.

ما مشاهده نمودیم در روزهای ٤٦ تا ٥٦ اُم زندگی، متوسط وزن ماهیان از ١٥/٦ و ١٢/٢ میلی گرم به ترتیب به ٥٣/٣ و ٢٨/٦ میلی گرم در تیمارهایی افزایش یافت که با یا بدون مکمل ویتامینی تغذیه شده بودند .

افزون ویتامین ث به جیره غذایی لاروها، باعث افزایش مقاومت آنها به استرس شوری می‌شود. نتایج آزمایشها برای مرگ و میر تجمعی در روزهای ٤٠ و٥٠ اُم حیات، به طور معنی داری در گروه‌هایی از لاروها بالاتر بود که بدون مکمل پالمیتات آسکوربیل تغذیه شده بودند. به نظر می‌رسد که آزمایش استرس هیپرتونیک ٤٢ گرم در لیتر به مدت ٩٠ دقیقه در روز٤٠ زندگی برای ارزیابی مقاومت لاروها به استرس، فوق العاده مناسب باشد چرا که این تیمار، مرگ و میر تجمعی در حال ازدیادی را در هر دو گروه از آغاز تا پایان آزمایش ایجاد می کند. آزمایش استرس که در شوری٥٠ گرم بر لیتر و در آب یون زدایی شده انجام شد، منجر به مرگ تمام ماهیان گردید که ممکن است این آزمایش فقط برای تعیین حدود مقاومت در برابر شوری مفید باشد.

در روز ٥٠ام زندگی، آزمایش های استرس شوری در ٥٠ و ٤٢ گرم در لیتر و در آب یون زدایی شده، اطلاعات زیادی را نشان داد. در شوری ٤٢ گرم در لیتر، هیچکدام از لاروهایی که جیره غذایی فاقد مکمل‌های ویتامینی را خورده بودند، زنده نماندند، در حالی که در سایر گروه‌ها میزان مرگ و میر تجمعی فقط (١٠ ±)٣٠ درصد بود. روند مشابهی نیز در آزمایش انجام شده با آب یون زدایی شده مشاهده شد.

Merchie و همکاران (۱۲)، اختلاف معنی داری را در زنده مانی لاروهای۳۵ –۱۸ روزه‌ای مشاهده نکردند که در معرض استرس شوری قرار گرفته بودند. تنها در آزمایش انجام شده بر ماهی ۲۷ روزه، نتایج مرگ و میر دارای اختلاف معنی دار بود. با این وجود، از اطلاعات ارائه شده می‌توان نتیجه گرفت که مرگ و میر در ماهیانی که مکمل‌های ویتامین ث را دریافت نکرده بودند، به میزان غیر معنی داری بالاتر بود. نتایج آزمایش استرس برای لاروهای گربه ماهی آفریقایی نشان داد که این نتایج تحت تاثیر مقدار ویتامین ث موجود در جیره غذایی می باشند (۱۱).

نقش ضد استرسی ویتامین ث در مراحل لاروی ثابت شده است، همان طور که این ویتامین برای بسیاری از گونه‌ها در مرحله رشد ضروری تشخیص دانسته شده است (۵ الی۸ ،۲۲). به نظر می‌رسد که عمل ضد استرسی منجر به ممانعت از هورمونهای کورتیکواستروئیدی همچون هیدروکورتیزون – از طریق پراُکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع – شود و بنابراین از تبدیل آنها به اجزای کلسترولی هیدروکورتیزون جلوگیری کند (٤).

آزمایش هایی که با هدف بررسی اثر کاربرد مکمل ویتامینی در جیره غذایی لاروها انجام شده است، اختلاف معنی داری را موجب نشده اند ولی روند مشخصی از مقاومت در لاروهایی مشاهده می شود که مکمل ویتامینی را دریافت کرده اند. فقدان اختلاف معنی دار در نتایج ناشی از انحراف معیار بالاست. مرگ و میر تجمعی وابسته به دوزهای ویتامین ث نبوده و گمان می‌رود که دوره زمانی مشاهده باید تا یک هفته پس از عفونت افزایش یابد.

منابع

1. Soliman, A. K., Jauncey, K., and Roberts, R. J. (1986a). The effect of varying forms of dietary ascorbic acid on the nutrition of juvenile tilapias *(Oreochromis niloticus). Aquaculture,* 52:1-10.

2. Dabrowski, K., Segner, H., Dallinger, R., Hinterleitner, S., Sturmbauer, C., and Wieser, W., (1989). Rearing of cyprinid fish larvae: the vitamin C-minerals interrelationship and nutrition-related histology of the liver and intestine of roach *(Rutilus rutilus* L.). *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.,* 62:188-202.

3. Dabrowski, K. (1984). The feeding of fish larvae: present "state of the art" and perspectives. *Reprod. Nutr. Develop.,* 24(6): 807-833.

4. Thompson, I., White A., Fleeter, T. C., Houlihan, D. F., and Secombes, C. J. (1993). The effect of stress on the immune response of Atlantic salmon *(Salmo salar* L.) fed diets containing different amounts of vitamin C. *Aqua culture.* 114:1-18.

5. Mazik P. M., Brandt T. M., and Tomasso, J. R. (1987). Effects of dietary vitamin C on growth, caudal fin development, and tolerance of aquaculture-related stressors in channel catfish. *Prog. Fish. Cult.,* 49:13-16.

6. Durve, V. S. and Lovell, R. T. (1982). Vitamin C and disease resistance in Channel Catfish *(Ictaliirus punctatus). Can. J. Fish. Aquat. Sci.,* 39: 948-951.

7. Scarano, G., Saroglia, M., and Sciaraffia, R, (1991). Ruolo protettivo dell'acido ascorbico verso intossicazioni da nitriti in spigola (D. *labrax,* L.). *Riv. Ital. Acquacult.,* 26: 95-102.

8. Nunes G. D., Ninis, M. T., and Bucke, D. (1996). The response to environmental stress in juvenile *Sparus aurata* L. fed diets supplemented with high doses of vitamin C. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.,* 16(6): 208.

9. Dabrowski, K., Matusiewicz, M., and Blom, J. H. (1994). Hydrolysis, absorption and bioavailability of ascorbic acid esters in fish. *Aquaculture,* 124:169-192.

10. Dabrowski, K. and Glogowski, J. (1977). Studies on the role of exogenous proteolytic enzymes in digestion processes in fish. *Hydrobiologia,* 54:129-134.

11. Merchie, G., Lavens, P., Dhert, Ph., Pector, R., Mat Soni, A. F., Nelis, H., Ollevier, K, De Leenheer, A., and Sorgeloos, P. (1995a). Live food mediated vitamin C transfer to *Dicentrarchus labrax* and *Clarias gariepinus. Appl. Ichthyol.,* 11:336-341.

12. Merchie, G., Lavens, P., Dhert, Ph., Dehasque, M., Nells, H., De Leenheer, A., and Sorgeloos, R (1995b). Variation of ascorbic acid content in different live food organisms. *Aquaculture,* 134: 325-337.

13. Dhert, P., Lavens, P., and Sorgeloos, P. (1992). Stress evaluation: a tool for quality Control of hatchery-produced shrimp and fish fry. *Aquaculture Europe (EAS),*17(2): 6-10.

14. Dabrowski, K. (1991). Some aspects of ascorbate metabolism in developing embryos of the brine shrimp *(Artemia salina). Can. Fish. Aquat. Sci.,* 48:1905-1908.

15. Zs. Gy., Papp, Saroglia, M., and Terova, G., (1998). An improved method for assay of vitamin C in fish feed and tissues. *Chromatographia,* Vol. 48, No. 1,2, July :43-47.

16. Cohen, S. A., Meys, M., and Tarvin, T. L. (1990) Section 1.4. Protocols for Unusual Samples; in: Waters, Milford, MD, 35-39.

17. Kitajima, C., Watanabe, T., Tsukashima, Y., and Fujita, S. (1994). Lordotic defor mation and abnormal development of swim bladders in some hatchery-bred marine physoclistous fish in Japan. *J. World Aquacult. Soc.,* 25:64-77.

18. Merchie, G., Lavens, P., Storch, V, Ubel, U., Nelis, H., De Leenheer, A., and Sorgeloos, P. (1996). Influence of dietary vitamin C dosage on turbot *(Scophthalmus maximus)* and European sea bass *(Dicentrarchus labrax)* nursery stages. *Comp. Biochem. Physiol.,* Vol. 114A, No. 2:123-133.

19. Blom, J. H. and Dabrowski, K. (1996). Ascorbic acid metabolism in fish: is there a maternal effect on the progeny, *Aquaculture,* 147:215-224.

20. Yufera, M., Fernadez-Diaz, C., Pascual, E., Sarasquete, M. C., Moyano, F. J., Diaz, M., Alarcon, F. J., Garcia-Gallego, M., and Parra, G. (1998). Towards an inert diet for first-feeding gilthead sea bream *(Sparus aurata* L.) larvae, in *You can Bet on Aquaculture-Book of Abstracts.* World Aquaculture Society, pp 596.

21. Barnabe, G. (1990). Aquaculture. Vol. 2 Ellis Horwood, Chichester, West Sussex, pp. 1104.

22. Lim, C. and Lovell, R. T. (1978). Pathology of the vitamin C deficiency syndrome in channel catfish *(Ictalurus punctatus). J. Nutr.,* 108: 1137-1146.

«فصل ۱۵»

روش‌های آزمایشگاهی و نتایج جذب اسیدآسکوربیک در بافت‌های اپیتلیالی ماهیان

Michele Maffia, T.Verri and C.Storelli

چکیده

L- اسیدآسکوربیک یک ماده مغذی ضروری برای تعداد زیادی از ماهیان استخوانی می باشد. این ماده مغذی نقش مهمی را در بسیاری از واکنش‌های آنزیمی برای حفظ یون های فلزی افزایشی[1] در شکل احیاء شده خود بازی می کند (برای مثال Fe^{2+}, Cu^{+}) و موجب از بین رفتن رادیکال‌های آزاد می شود تا بافت را از آسیب اکسیدانی مصون نگه دارد. اخیراً در پستانداران، مشخص شده است که ناقلین تسهیل کننده قند از نوع GLUT ($GLUT_1$ و $GLUT_3$) می‌توانند شکل اکسید شده ویتامین ث یعنی L- اسید دهیدروآسکوربیک (DHA) را براحتی انتقال دهند. با این وجود، بخش اعظم ویتامین موجود در پلاسما که اساسا در شکل احیاء شده آن وجود دارد، از طریق ناقلین اسیدآسکوربیک وابسته به سدیم[2]، $SVCT_1$ و $SVCT_2$، انتقال می یابند که از لحاظ عملکردی در تخمکهای *Xenopus*، بیان، کلون و تعیین توالی شده‌اند (۷۸). $SVCT_1$ عمدتاً محدود به بافت‌های

[1] Prosthetic
[2] Sodium dependent vitamin C transporter

اپیتلیالی همچون روده، کلیه و کبد است. در ماهیان، نتایج فراوان حاصله از تکنیک‌های مختلف آزمایشگاهی، حاکی از وجود مکانیزم الکتروژنیک انتقال اسیدآسکوربیک متصل به سدیم در غشای حاشیه پرزکی[1] انتروسیت ها می باشد و هنگامیکه با استفاده از رهیافتهای آزمایشی مشابه اندازه گیری می شود، خصوصیات کینتیکی مشابه پستانداران دارد (K_m ظاهری بین ۰/۲۲ تا ۰/۷۵ mM است). در سطح قاعده ای جانبی سلول‌های اپیتلیالی جذب کننده روده ای در ماهیان، انتقال اسید دهیدروآسکوربیک (DHA)[2] به واسطه مسیر انتقالی مستقل از سدیم انجام می‌شود که احتمالاً مربوط به خانواده GLUT است که در پستانداران نیز وجود دارد، اگرچه هنوز این موضوع بدرستی تایید نشده است. در این فصل به بیان مطالبی پیرامون خصوصیات کینتیکی انتقال ویتامین ث از غشاهای زیستی سلولهای اپیتلیال و رهیافتهای آزمایشگاهی که طی زمان برای مطالعه جذب اسیدآسکوربیک در ماهیان استفاده می شده است، می پردازیم. همچنین مطالبی پیرامون امکان بدست آوردن اطلاعات نظری جدید در مورد جذب و متابولیسم ویتامین ث در ماهیان با استفاده از سیستم بیان *Xenopus laevis* و چشم انداز توسعه کاربردهای فناوری زیستی در آبزی پروری از طریق انتقال ژن بیان می شود.

۱-۱۵- مقدمه

اسیدآسکوربیک نقش‌های مهم و حیاتی را در تمام جانوران برعهده دارد. این ویتامین از لحاظ متابولیک، به عنوان یک آنتی اکسیدان سیستم‌های زیستی دارای اهمیت بوده و در هیدروکسیلاسیون پرولین و لیزین در کلاژن و در نتیجه جلوگیری از ایجاد اسکوروی نقش مهمی دارد. همچنین این ویتامین منجر به سمیت زدایی مواد خارجی(گزنوبیوتیکها)، داروها و مواد سمی شده و در متابولیسم استروئیدها نقش دارد (۱، ۲).

در اغلب جانوران، اسید آسکوربیک از اسید L- گولونیک که یکی از متابولیت‌های حد واسط مسیر اسید D- گولوکورونیک است، از طریق L -گولونو-γ- لاکتون تولید می‌شود. اگرچه اغلب مهره داران توانایی ساخت این ویتامین از D-گلوکز را دارند، ولی گروه‌های ویژه‌ای از پستانداران مانند

[1] Brush border
[2] Dehydro-L-ascorbic acid

انسان، نخستیان، خوکچه هندی، خفاش‌ها (۳، ٦)، پرندگان (۷) و نیز ماهیان (۸) قدرت ساخت این ویتامین را ندارند. در حقیقت، این جانوران آنزیم L-گولونو-γ- لاکتون اکسیداز (EC1.1.3.8, GLO) را ندارند که آخرین مرحله از ساخت اسیدآسکوربیک را کاتالیز می‌کند و در نتیجه این دسته از جانوران باید ویتامین مورد نیاز بدن خود را از طریق غذا دریافت دارند. اخیراً، تغییر ژن GLO در سطح نوکلئوتیدی در انسان و خوکچه هندی (۹، ۱۰) تبیین گردید و مشخص شد که در گونه‌های مستعد ابتلا به اسکوروی، این تغییر بعلت فقدان ژن مذکور نیست، بلکه علت آن، وقوع جهشهایی در توالی نوکلئوتیدها می باشد که ممکن است چندین بار طی روند تکامل اتفاق افتاده باشد و این نکته سبب روشن شدن این موضوع می‌شود که چرا ارتباط تکاملی مشخصی بین گروه‌های مختلف جانوری نیازمند ویتامین ث وجود ندارد.

حدود پنج دهه است که هموستازی، جذب و متابولیسم اسیدآسکوربیک در پستانداران، مطالعه می‌شود (۲، ۱۱). در مقابل، تاکنون فرآیندهای مولکولی مربوطه در ماهیان، بدرستی مطالعه نشده است. اسیدآسکوربیک یک ماده مغذی برای اکثر گونه‌های ماهیان استخوانی مانند قزل آلای رنگین کمان (۱۲، ۱۳)، قزل آلای جویباری (١٤)، ماهی آزاد کوهو (۱۳)، گربه ماهی (١٦)، کپورماهیان مهم هندی (۱۷) و تیلاپیا (۱۸)، می‌باشد. همانند پستانداران مستعد ابتلا به اسکوروی، در این گونه‌ها نیز اسیدآسکوربیک بطور عمده در ساخت کلاژن دخیل می باشد، به طوری که ماهیان پرورش یافته با جیره‌های غذایی فاقد ویتامین ث، علائم قابل ردیابی نقص در بیوسنتز کلاژن (یعنی لوردوزیس و اسکولیوزیس حاد، انحراف مهره‌ها، بدشکلی غضروف‌های محافظ و تاخیر در بهبود زخم‌ها) و کاهش سرعت رشد، بدشکلی غضروف آبششی، کوتاه شده سرپوش آبششی و خونریزی در باله‌ها، دم و چشم‌ها را نشان می‌دهند (۱۹، ۲۰). با توجه به گونه‌های مذکور، ادعا شده است که برخی از کپور ماهیان قادر به ساخت اسیدآسکوربیک در کبد یا کلیه‌های خود هستند (۲۱). بیشتر ماهیان قدیمی، چندین گونه از ماهیان غضروفی – استخوانی مانند تاسماهی سیبری (۲۲)، تاسماهی سفید و تاسماهی دریاچه‌ای، و پاروپوزه (۲۳) قادر به ساخت اسیدآسکوربیک در کلیه‌های خود هستند.

در این فصل، سعی داشته ایم که به روش‌های آزمایشگاهی(*in vitro*) مورد استفاده در ماهیان برای تشخیص چگونگی پدیده های انتقال اسیدآسکوربیک، DHA و بسیاری از مشتقات اسیدآسکوربیک

مانند استرهای سولفاته و فسفاته از سلول‌های غشای پلاسمایی سلولهای اپیتلیالی، بپردازیم. اطلاعـاتی که تاکنون در این زمینه وجود دارد مربوط به متابولیسم اسیدآسکوربیک در مهره داران پست و پایین‌تر می‌باشد و اطلاعاتی در مورد چگونگی عبور اسیدآسکوربیک و مشتقات آن از غـشاهای انـدامک‌هـای درون سلولی ماهیان وجود ندارد. بیشتر جنبه های جدید ناقلین اسیدآسکوربیک موجود در پستانداران نیز بحث می شود چرا که می‌تواند به درک مکانیزمهای انتقال روده ای ویتـامین ث در ماهیـان کمـک کند. در بخش چشم انداز، پیشرفت‌های اخیر در زمینه استفاده از تکنیک‌های زیست شناسی مولکـولی و تکنولوژی انتقال ژن را بحث خواهیم کرد که می‌تواند نقطه شروع مناسبی برای پیـشرفتهای آتـی در زمینه جذب، هموستازی و متابولیسم اسیدآسکوربیک در ماهیان باشد.

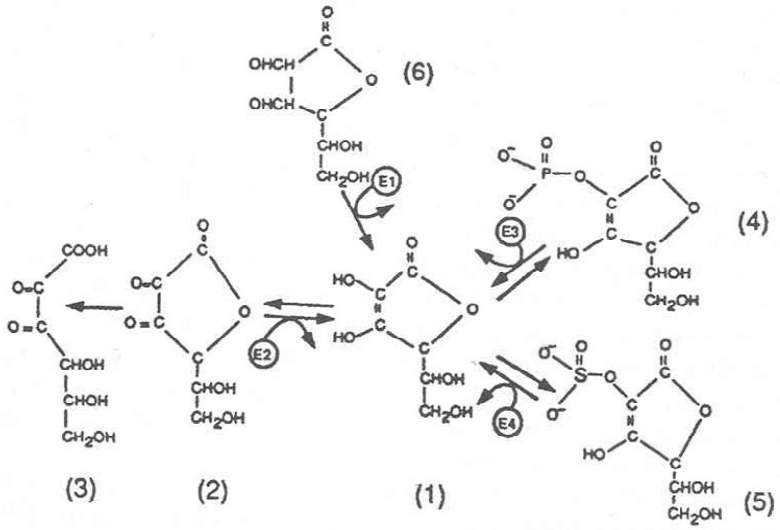
۲-۱۵- اسیدآسکوربیک و مشتقات آن

اسیدآسکوربیک (شکل ۱۵-۱) دارای وزن مولکولی ۱۷٦ دالتون اسـت کـه در کـربن شـماره ۲ یـا ۳ دارای گروه هیدروکسیل می باشد و در pH فیزیولوژیک به صورت آنیون تک ظرفیتی دیده می‌شـود. از آنجایی که این ویتامین حلالیت بالایی در آب دارد، از ترکیبات لیپیدی غشاهای زیستی، انتشار نمی یابد. علاوه بر این، به دلیل بزرگ بودن، قادر به عبور سریع از منافذ غشاها نبوده و بنـابراین انتقـال آن بین بخشهای بدن جانور از طریق انتشار ساده بـا سـرعت کـم صـورت مـی پـذیرد. بنـابراین، انتقـال اسیدآسکوربیک از طریق غشاهای زیستی، نیازمند مکانیزم خاصی، مانند انتـشار تـسهیل شـده (یعنـی انتقال مواد به کمک ناقل و در جهت شیب الکتروشیمیایی) یا انتقال فعال (انتقال و جابجایی مـواد بـه کمک ناقل و در خلاف جهت شیب الکتروشیمیایی) می باشـد چـون شـکل غالـب اسیدآسـکوربیک دارای بار منفی است و این مولکول باید در خلاف اختلاف پتانـسیل الکتریکـی ۹۰- ۳۰ میلـی ولتـی حرکت کند که در دو طرف غشای سلولی وجود دارد. بنابراین فرآینـد انتقـال فعـال بـرای بـالا بـردن غلظت ویتامین ث در محیط داخلی سلول به میزان برابـر یـا بیـشتر از محـیط خـارج سـلولی، لازم و ضروری است.

DHA از اکسایش اسیدآسکوربیک تولید می‌شود (شکل ۱-۱۵) که فاقد پروتون (بار مثبت)های قابل تجزیه در موقعیت کربن ۲ و ۳ بوده و بنـابراین در شـرایط فیزیولوژیـک دارای بـار الکتریکـی خنثـی

می‌باشد. در پستانداران، مقدار بسیار کمی از اسیدآسکوربیک کل بدن، به شکل اکسید شده وجود دارد (٤). DHA در غلظت‌های بالا برای اریتروسیت‌ها (۲۵)، لکوسیت‌ها (۲٦)، جزایر پانکراس در *in vitro* (۲۷) و کلیه (۲۸) سمی می باشد. این ماده یک ترکیب نسبتاً ناپایدار (با نیمه عمر چند دقیقه) است و با افزایش دما و pH از پایداری آن کاسته می‌شود (۲۹). این ماده از طریق منفذ حلقه لاکتونی تجزیه می شود تا اسید ۳,۲ – دی کتوگلونیک ایجاد شود (شکل ۱-۱۵) که از طریق ادرار دفع شده یا به ترکیباتی با سمیت کمتر تجزیه می‌شود. تعادل بین فرآیند احیاء و جداسازی لاکتون از DHA عامل مهمی در حفظ اسیدآسکوربیک در بدن است. اکثر گزارشها نشان می‌دهد که کاهش DHA به اسیدآسکوربیک، به شکل خودبخودی اتفاق نمی افتد و نیازمند یک واکنش آنزیمی یا شیمیایی است (۲). اخیرا تبدیل خودبخودی DHA به اسیدآسکوربیک نیز شناسایی شده است (۳۰).

در مقایسه با اسیدآسکوربیک، مشتقات اسیدآسکوربیک با استرهای سولفاته (AS)، فسفاته (AP شکل۱۵-۱) و گلوکز (AG) در موقعیت کربن شماره ۲ و پالمیتات در موقعیت کربن شماره ٦ در حلقه لاکتونی، نسبت به اکسایش مقاوم هستند اگرچه پالمیتات چنین مقاومتی را ندارد. استرهای آسکوربیل، به رغم این که دارای فعالیت‌های زیستی متفاوتی هستند، به عنوان منبع ویتامین ث به جیره‌های غذایی تجاری افزوده می‌شوند. نکته مهم این است که به منظور تبدیل AS و AP به اسیدآسکوربیک، نیاز به هیدرولیز سولفات و فسفات می‌باشد که به ترتیب از طریق آنزیم‌های سولفاتاز و آلکالین فسفاتاز انجام می‌گیرد.



شکل ۱-۱۵ : اسیدآسکوربیک (۱)، اسید دهیدروآسکوربیک (۲)، و اسید ۲، ۳- دی کتوگلونیک (۳)، و مشتقات آن، منوفسفات آسکوربیل (٤)، و سولفات آسکوربیل (٥) و پیش ساز L- اسیدآسکوربیک گولونو-γ- لاکتون (٦). آنزیم‌های دخیل در واکنش‌های جداگانه نشان داده شده است: L-گلونولاکتون اکسیداز (E1)، دهیدروآسکوربات ردوکتاز (E2)، آلکالین فسفاتاز (E3)، و آسکوربیل ۲- سولفات سولفاتاز (E4)

۳-۱۵- هموستازی اسیدآسکوربیک

به عنوان یک قاعده کلی، مهره دارانی که قادر به ساخت اسیدآسکوربیک نمی باشند، نیازمند وجود فرایند کارآمد انتقال غشایی در روده، به منظور جذب ویتامین ث حین عبور کیموس از درون روده هستند. مکانیزم‌های پیچیده‌ای در رابطه با استخراج اسیدآسکوربیک از غذاها، نگهداری آن در کلیه‌ها و ذخیره سازی و انتقال آن به تمام بافت‌های نیازمند، شناسایی شده است. به محض جذب، اسیدآسکوربیک بایستی بسرعت در بدن پخش شده و سرانجام در بافت‌های مختلف بدن تجمع یابد. در انسان، اسیدآسکوربیک نسبت به پلاسما، به میزان بیشتری در لکوسیت‌ها، شش‌ها، غدد فوق کلیوی، هیپوفیز، نقاط خاصی از چشم و به میزان کمتری در پلاکتها، گرانولوسیت‌ها، مغز، کلیه و کبد، ذخیره می‌شود (۲). در ماهیان، اسیدآسکوربیک به راحتی توسط کلیه، کبد، مغز، روده و طحال جذب

می شود و ارزیابی غلظت اسیدآسکوربیک در بافت‌های ماهی، می‌تواند مهمترین شاخص قابل اطمینان در تعیین وضعیت ویتامین ث در بدن ماهی باشد (۳۳، ۳٤). برای حفظ حالت هموستازی اسیدآسکوربیک، میزان آن باید ثابت نگه داشته شود. بنابراین، هدررفت اسیدآسکوربیک از طریق ادرار که براحتی در گلومرول‌های کلیه ماهیان دارای قدرت بیوسنتز ویتامین ث و نیز ماهیان وابسته به جیره غذایی، فیلتر می‌شود، بایستی از طریق مکانیزم بازجذب این ویتامین در لوله‌های پیچیده نزدیک کلیه، جبران گردد. بنابراین، بطور معمول بازجذب کامل اسیدآسکوربیک فیلتر شده، ممکن است انجام شود. معمولا جذب، بازجذب و انتقال بین اندامی اسیدآسکوربیک به این معنی است که ویتامین ث حداقل باید از غشای دو سلول عبور کند. به همین دلیل، محققین توجه خود را به تشخیص مکانیزم‌های انتقال اسیدآسکوربیک در بافت‌های اپیتلیالی (مانند روده و کلیه) و غیر اپیتلیالی (مانند سلول‌های خونی، غدد فوق کلیوی، شش‌ها) معطوف کرده‌اند. در مهره داران عالی، کشف این مکانیزم‌ها، مستلزم توسعه روش‌های آزمایشگاهی و رهیافتهای بیوشیمیایی بوده است. نتایج حاصل از این تحقیقات، بطور گسترده ای مورد بررسی قرار گرفته اند (۲، ۱۱، ۳۵). بر اساس بیشتر اطلاعات موجود در زمینه جذب روده ای و بازجذب کلیوی اسیدآسکوربیک در پستانداران مستعد ابتلا به اسکوروی که نیازمند دریافت این ویتامین از طریق غذا هستند، مدل ذیل پیشنهاد شده است. انتقال اپیتلیالی اسیدآسکوربیک بر اساس مدل Crane توصیف گردیده (۳٦) که در آن انتقال فعال وابسته به سدیم برای جذب سوبسترا از حاشیه پرزکی بدرون سلولهای جاذب اپیتلیالی روده و کلیه توجیه شده است. فرایند جذب بستگی به متابولیسم کامل سلولی دارد. اسیدآسکوربیک در داخل انتروسیت‌ها یا سلول‌های بازجذب کننده لوله پیچیده نزدیک تجمع می‌یابد و بنابراین شیب غلظت به داخل خون افزایش می یابد. همچنین، DHA جیره غذایی از طریق انتشار تسهیل شده به داخل سلول راه یافته (۳۷) و با کمک فرآیند آنزیمی (DHA ردوکتاز) بسرعت به اسیدآسکوربیک تبدیل می‌شود. سپس خروج اسیدآسکوربیک از طریق انتشار تسهیل شده دنبال می‌شود. بوسیله این فرآیندها، اسیدآسکوربیک در پستانداران به شکل موثری در روده جذب یا در لوله پیچیده کلیوی بازجذب شده و میزان آن در پلاسما در مقدار مناسبی حفظ می‌گردد. از زمانی که ویتامین ث وارد پلاسما می‌شود، اسیدآسکوربیک در بافت‌های مختلف توزیع می‌شود که این عمل در بافت‌های غیر اپیتلیالی از طریق مکانیزم یا مکانیزم‌های مستقل از یون سدیم (۳۸) و در بافت‌های اپیتلیالی مانند بافت پوششی رنگدانه‌دار شبکیه

از طریق مکانیزم‌های وابسته به یون سدیم انجام می شود (۳۹). گونه‌هایی از پستانداران، مانند موش صحرایی و خرگوش که اسیدآسکوربیک را از D- گلوکز می سازند، نیازی به دریافت این ویتامین از طریق جیره غذایی ندارند و این گونه‌ها، کاهش ناقل وابسته به سدیم اسیدآسکوربیک را در حاشیه پرزکی روده نشان می دهند (٤٠). اگرچه، در این گونه‌ها سایر خصوصیات لازم برای فرآوری اسیدآسکوربیک، مانند آنزیم‌های درون سلولی برای کاهش DHA و ناقلی که DHA را از سطح سروزی جذب می کند، حفظ شده اند.

در خصوص ماهیان استخوانی، مطالعه چنین ویژگی بیوشیمیایی از مکانیزم‌های انتقالی دخیل در جذب ویتامین ث در سطح غشا، هنوز در مراحل ابتدایی است. اغلب اطلاعاتی که تاکنون به وسیله روش‌های بیوشیمیایی از تحقیقات بدست آمده است، محدود به روده گونه‌های مهم تجاری می‌باشد. در عوض، هیچ نوع اطلاعات خاصی در خصوص سایر بافت‌های اپیتلیالی مانند کلیه و بافت پوششی رنگدانه دار شبکیه چشم و یا بافت‌های غیر اپیتلیالی وجود ندارد.

٤-۱۵- جذب اسیدآسکوربیک در روده ماهیان: روش‌های آزمایشگاهی

روش تحقیق جذب ویتامین‌ها توسط لوله گوارشی، توسط روشهای طبیعی و آزمایشگاهی توسعه یافته است. روش‌های آزمایشگاهی که براساس استفاده از روش‌های مختلف آماده سازی روده می‌باشند، امکان درک بیشتر مکانیزم‌های سلولی جذب اسیدآسکوربیک در روده مهره داران و آنالیز دقیق ناقلین غشای سلولی و آنزیم‌های درون سلولی دخیل در انتقال این ویتامین را فراهم آورده است.

۱-٤-۱۵- قطعات جداشده روده

در گذشته به منظور بررسی جذب و متابوبولیسم اسیدآسکوربیک و DHA در ماهیانی مانند قزل آلای رنگین کمان، از حلقه(لوپ)های جدا شده روده، استفاده می‌شد (٤١). این تکنیک، برای اولین بار برای بررسی و تعیین ویژگی فرآیند جذب روده ای خوکچه هندی و موش صحرایی استفاده گردید (٤٢). انتقال ویتامین، در مسیر جذب و ترشح، به ترتیب از طریق حلقه‌های برگردانده شده و طبیعی تعیین می‌شود. جریان انتقالی اپیتلیالی اسیدآسکوربیک از طریق پر نمودن هر حلقه با حجم

مشخصی از بافر فیزیولوژیک با دارا بودن مواد آنتی اکسیدان مانند تیـواوره[1] یـا دی تیوتریتـول[2]کـه از اکسایش خودبخودی اسیدآسکوربیک جلوگیری می کنند و سپس انکوباسیون بافتهـای روده (حـداقل به مدت ۱ ساعت) در محلول حاوی ویتامین ث رادیواکتیو ([^{14}C]- اسیدآسـکوربیک) انـدازه گیـری می‌شـود. در پایـان زمـان انکوباسـیون، حلقـه‌هـا بـاز شـده و محلـول بازیافـت شـده، بـا HPLC و اسپکترومتری جرقه‌ای سنجش می‌شود. در مطالعات مربوط به نقل و انتقال، به کمک [^{14}C]-DHA ، مدت زمان تماس به منظور جلوگیری از تخریب سوبسترا، به ۲۰ دقیقه کاهش داده مـی‌شـود. جـذب سـلولی ویتـامین ث در حلقـه‌هـای جـدا شـده روده، از طریـق انکوباسـیون بافتهـا در [^{14}C]- اسیدآسکوربیک برای مدت حداقل ۱ ساعت در محلول‌های حمام دهنده موکوسـی و سـروزی انجـام می‌گیرد (٤١). در پایان زمان انکوباسیون، بافت به وسیله اسید متافـسفریک تخلـیص شـده و مقـدار و وجود کربن رادیواکتیو تجمع یافته در بافت، تعیین می‌شود.

۲-٤-۱۵- حلقه‌های[3] روده ای

در پستانداران، جذب ویتامین ث، بـا اسـتفاده از بخـشهای خاصـی از روده بـصورت حلقه ها (۵-۱میلی متر) تعیین می‌شود که از بخشهای طبیعـی و برگردانـده شـده روده، بریـده شـده است. انقباض پوششهای عضلانی حلقوی و طولی که پس از بریدن حلقه‌هـا از روده اتفـاق مـی‌افتـد، سبب جدایی و پراکندگی مژک‌ها از هم به شکل مطلوب گردیده که منجـر بـه افـزایش دسترسـی بـه سوبسترا و اکسیژن می‌شود. مزیت بریدن حلقه‌ها از کیسه‌های برگردانده شده روده این است که مژه‌ها در داخل حلقه‌ها در اصطلاح نمی خوابند و عیب این روش این است کـه بـرای برگردانـدن نیـاز بـه دستکاری بیش از حد بافت داریم. حلقه‌ها در پستانداران مستعد ابـتلا بـه اسـکوروی، ماننـد خوکچـه هندی، آسکوربات را برخلاف شیب غلظت جذب می‌کنند (٤٣). جـذب ویتـامین ث بوسـیله سـموم متابولیک، شرایط بی‌هوازی یا حذف یون سدیم از محلول حمام دهنده، محدود می‌شود.

[1] Tiourea
[2] Dithiothreitol
[3] Ring

۳-٤-۱۵- محفظه‌های Schultz

اطلاعات موجود پیرامون جریانهای تک مسیره اسیدآسکوربیک از حاشیه موکوسی روده خوکچه هندی و انسان، از طریق کاربرد روش محفظه Schultz بدست آمد (٤٤). این روش حتی به شکل موفقیت آمیزی برای بررسی انتقال اسیدآسکوربیک در روده ماهیان، بکارگرفته شده است (٤١). چنین تکنیکی، شامل قرار دادن مقاطع (۸-٤سانتی متری) روده ای همراه با سطوح موکوسی، در محفظه‌های نفوذ پذیر با تعداد ثابتی مجرا (۸-٦ عدد) است که سطح معینی را (۰/۷۵– ۰/۲سانتی متر مربع به ازای هر مجرا) در معرض قرار می دهد و سپس با محلول غنی از اکسیژن (۹۵ درصد اکسیژن و ۵ درصد دی اکسید کربن) حمام داده می‌شود. پس از مدت معین انکوباسیون با $[^{14}C]$- اسیدآسکوربیک ، و $[^{14}C]$- مانیتول[۱] یا $[^{3}H]$- اینولین[۲] به عنوان نشانگرهای مکانی غیر نفوذ کننده خارج سلولی، بافت‌های تیمار شده، در HNO_3 تخلیص می‌شودکه این فرآیند سبب حذف بخش عمده فعالیت رادیواکتیو می‌شود. نیمی از عصاره استخراج شده برای بررسی فعالیت رادیواکتیو و جذب بافتی اسیدآسکوربیک مورد استفاده قرار می‌گیرد و میزان جذب اسیدآسکوربیک بافت، پس از تصحیح فضای$[^{14}C]$- مانیتول یا $[^{3}H]$- اینولین محاسبه می‌گردد.

٤-٤-۱۵- وزیکول‌های غشایی

پیشرفت در مطالعه انتقال و متابولیسم درون سلولی اسیدآسکوربیک، از طریق به کارگیری بافت‌های روده ای توسعه یافت که بوسیله استرس‌های مکانیکی یا اسمزی مختل شده بود. بویژه، ظهور و استفاده گسترده از تکنیک‌های تخلیص وزیکول‌های غشایی پلاسما، سبب توانایی بررسی و توصیف دقیق خصوصیات انتقال موادی مانند شکر، اسیدهای آمینه، یا ویتامین‌ها از غشاهای سلولی اپیتلیالی راسی[۳] و قاعده ای جانبی گردید. قدیمی ترین کاربردهای تکنیک خالص سازی وزیکول غشایی حاشیه پرزکی[٤](BBMV) برای بافت اپیتلیالی گوارشی ماهیان، روشهای رسوب کلسیم یا منیزیم را به کار بردند و بعدها برای مطالعه انتقال مواد مغذی در سگ ماهی (٤٧)، کفشک ماهی اقیانوسی (٤٨)،

---

[1] $[^{14}C]$ -mannitol
[2] $[^{3}H]$-inulin
[3] Apical
[4] Brush border membrane vesicle

مارماهی اروپایی (۴۹) و تیلاپیا (۵۰) استفاده شدند. به علاوه، روش‌های مورد استفاده در خالص سازی وزیکولهای غشایی قاعده ای جانبی[1](BLMV) از سلولهای اپیتلیالی پستانداران، شامل سانتریفوژ شیب چگالی بوده (۵۱) و به صورت موفقیت آمیزی برای بررسی مکانیزم انتقال مواد غذایی (۵۲) و ویتامین‌ها (۵۳) در بافت پوششی روده ای ماهیان مورد استفاده قرار گرفته است. وقتی که وزیکول‌ها در زیر میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار می‌گیرند، وزیکول‌های آماده شده با روش‌های مختلف، با قطعات کروی دارای فعالیت اسمزی از غشاهای اصلی به قطر تقریبی ۰/۲ میکرومتر ترکیب می‌شوند (۵۰). آخرین قطعه حاوی BBMV در آنزیم‌های نشانگر محور راسی سلول مانند آلکالین فسفاتاز، لوسین آمینو پپتیداز[2] و مالتاز[3] غنی می‌شود، در حالیکه قطعه نهایی BLMV، در آنزیم‌های محدود به محور سروزی غنی می‌شوند که شامل سدیم – پتاسیم- آ ت پ آزه و فسفاتاز وابسته به یون پتاسیم است. خصوصیات آنزیمی قطعات BBMV و BLMV مارماهی گوشتخوار در جدول ۱۵-۱ نشان داده شده و می‌تواند نشاندهنده نتایج حاصله باشد زمانیکه این تکنیکهای آماده سازی برای بافت پوششی روده ای سایر ماهیان استخوانی استفاده شود. مهمترین مزیت استفاده از آن، ایجاد امکان آنالیز دقیق سیستم انتقال بصورت خصوصیات کینتیکی، اثر نیروهای رانشگر (یعنی شیب یونی، وابستگی به ATP، پتانسیل الکتریکی غشا و...)، مکانیزم‌های واکنشی، انتخابگری و اختصاصی بودن سیستم انتقالی است. آنالیز داده‌های آزمایشگاهی حاصله از این تکنیک با نداشتن اندامکهای سلولی، اجزاء سیتوزولی و متابولیسم سلولی نسبت به سایر روشهای طبیعی و آزمایشگاهی، بی نهایت آسان است چرا که متابولیسم سلولی درک پدیده های انتقالی را مشکل می سازد. به طور کلی، شیبهای یونی ایجاد شده به صورت آزمایشی، در مدت ۱ تا ۳ دقیقه طی انتشار تخلیه می‌شود. از آنجائیکه مدت زمانهای کوتاه انکوباسیون، مشکلات مرتبط با اکسایش و تجزیه سوبسترا را تقلیل می‌دهند، این موضوع ویژگی مهمی در مطالعه جذب اسیدآسکوربیک می باشد. اگرچه محاسبه میزان سوبسترای انتقال یافته در مدت ۲۰ ثانیه از لحظه آغاز واکنش (یعنی دوره زمانی که حداکثر شیب یونی وجود دارد) ممکن است گاهی برای ایجاد تجمع بزرگ داخل وزیکولی یک

[1] Basolateral membrane vesicle
[2] Leucine amoino peptidase
[3] Maltase

سوبسترای نشاندار شده با مواد رادیواکتیو، برخلاف شیب غلظت، کافی نباشد. این اثر، به علت پایین بودن تعداد ناقلین ویتامین در غشای پلاسمایی، می‌تواند سبب محدود شدن اطلاعات در زمینه فرآیندهای مولکولی دخیل در انتقال سوبستراها مانند ویتامین ث و سایر ویتامین‌های محلول در آب مانند میواینوزیتول شود (۵۳، ٥٤).

۵-۱۵- جذب اسیدآسکوربیک در روده ماهیان: فرآیندهای انتقال

در قزل آلای رنگین کمان، تمام اندام‌های دستگاه گوارشی، جذب ویتامین ث را نشان می‌دهند. بویژه، این نقاط شامل معده (۲۰/۷ درصد)، زوائد پیلوریک (۲۳/٤ درصد)، روده میانی (۲۱/۹ درصد) و روده خلفی (۲۰/۱ درصد) می باشد (۵۵). در مورد کپور معمولی که فاقد معده است و pH در طول دستگاه گوارشی آن قلیایی است، مهمترین محل جذب اسیدآسکوربیک در نواحی ابتدایی دستگاه گوارشی می‌باشد (٥٦). انتقال و متابولیسم ویتامین ث در روده ماهی قزل آلای رنگین کمان، با کمک روش‌های *in vitro* و کاربرد قطعات جدا شده روده، مورد بررسی قرار گرفته است.

جریانهای انتقال اپیتلیالی [^{14}C]- اسیدآسکوربیک با غلظت ۱۰ میکرومولار سوبسترا تعیین شد. با حضور اسیدآسکوربیک در هر دو محلول مورد استفاده، جریان از لایه موکوس[1] به لایه سروز[2] چهار برابر جریان سروز به موکوس تعیین شد. این انتقال ویژه سلولی ویتامین، نتیجه تجمع درون سلولی اسیدآسکوربیک در انتروسیتها، برخلاف شیب غلظت است که نسبت بافت به محیط کشت ۱/٦٤ را بدست می دهد (٤١). اگرچه، این شاخص عددی به میزان معنی داری پایین تر از میزانی است که در خوکچه هندی مشاهده شده است و میزان جذب [^{14}C]- اسیدآسکوربیک بر اساس نسبت بافت به محیط کشت، در حدود ۵ می باشد (۵۷). در حلقه(لوپ)های روده ای قزل آلای رنگین کمان، جریان اسیدآسکوربیک به علت حضور همپارش فضایی D و L گلوکز، کاهش نمی یابد ولی در محیط کشت مورد استفاده به شدت وابسته به حضور سدیم است. این نتایج نشان از وقوع پدیده انتقال فعال ثانویه اسیدآسکوربیک در سطح غشاء حاشیه پرزکی ماهیان دارد ولی محققین (٤١)، بررسی دقیقی در مورد خصوصیات عمده این سیستم انتقالی انجام نداده اند.

---

[1] Mucosa
[2] Serosa

جدول ۱-۱۵ : ترکیب آنزیمی وزیکول‌های غشای حاشیه پرزکی جدا شده از روده مارماهی

	شاخص	فاکتور غنی‌سازی	هموژن (mU/mgprotein)	BBMV (mU/mgprotein)	بازیافت آنزیمی (٪ فعالیت هموژن)
لیوسین آمینوپپتیداز	غشای حاشیه پرزکی	۱۵/٦ ± ۱/۵	٦/۳ ± ۰/٦	۹۷/۹ ± ۱۰/۹	۳۹/۸ ± ٦/٦
مالتاز	غشای حاشیه پرزکی	۱۱/۸ ± ۱/۱	۸۲/٦ ± ٦/۰	۸۹۸ ± ۹۳/۵	۲۵/۲ ± ۷/۱
آلکالین فسفاتاز	غشای حاشیه پرزکی	۱۲/۸ ± ۰/٦	۷۲/۵ ± ۲/۵	۹۲۷/۳ ± ۷۱/۱	۲۸/۲ ± ۷/۰
سدیم-پتاسیم=آت پ آزه	غشای قاعده ای جانبی	± ۰/۰۲ ۰/٤۰	۱۲/۸ ± ۱/۳	۵/۱ ± ۰/٦	۱/۳ ± ۰/۱
سوکسینات سیتوکروم C اکسیدوردوکتاز	میتوکندری	ND	۹/۰ ± ۱/٤	ND	ND
KCN-resistant NADH oxidoredoctase	شبکه آندوپلاسمی	۰/٤ ± ۰/۱	۲۷۸/۳ ± ۲٦/۷	۸٦/۹ ± ۹/٦	٤/۸ ± ۰/۸

ترکیب آنزیمی وزیکول‌های غشای قاعده ای جانبی جدا شده از روده مارماهی

	شاخص	فاکتور غنی‌سازی	هموژن (mU/mgprotein)	BBMV (mU/mgprotein)	بازیافت آنزیمی (٪ فعالیت هموژن)
سدیم-پتاسیم-آ ت پ آزه	غشای قاعده ای جانبی	۱٤/۹ ±۲/۱	۱۵/۵ ± ۰/٦	۲۹٦ ± ٦۵	۲۳/۰ ± ۷/۱
فسفاتاز القاء شده توسط پتاسیم	غشای قاعده ای جانبی	۱۱/۲ ± ۱/۵	۱/۲ ± ۰/۱	۱۳/۱ ± ۱/٦	۳۷/۸ ± ٦/۰
آلکالین فسفاتاز	غشای حاشیه پرزکی	۱/۱ ± ۰/۱	۱٤۹ ± ۲۲	۱۵۷ ± ۱٤	۲/۵ ± ۰/۹
لیوسین آمینوپپتیداز فسفاتاز	غشای حاشیه پرزکی	۱/۲ ± ۰/۲	۱۲۳ ±۱۹	۱۲٦ ± ٦	۱/۷ ± ۰/٦
سوکسینات سیتوکروم C اکسیدوردوکتاز	میتوکندری	۱/۱ ± ۰/۱	۱۵/۹ ± ۲/٦	۱۳/۱ ± ۱/۱	۱/۸ ± ۰/۱
KCN-resistant NADH oxidoredoctase	شبکه آندوپلاسمی	۱/٦ ± ۰/۳		۱٤/٦ ± ۱/٤	۳/٦ ± ۱/۵

توجه: اعداد به صورت میانگین ± انحراف معیار استاندارد ارائه شده‌اند. فعالیتهای آنزیمی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد اندازه گیری گردید. ND به معنی غیرقابل ردیابی می‌باشد. BBMV: وزیکولهای غشای حاشیه پرزکی، BLMV: وزیکول‌های غشای قاعده ای جانبی، فاکتور غنی سازی عبارت است از نسبت فعالیت ویژه قطعات غشای حاشیه پرزکی یا قاعده ای جانبی در مقابل فعالیت ویژه هموژن. بازیافت آنزیمی نمایانگر نسبت بین فعالیت آنزیمی BBMV در مقابل فعالیت کل هموژن‌ها،آ ت پ آزه، آ ت پ است.

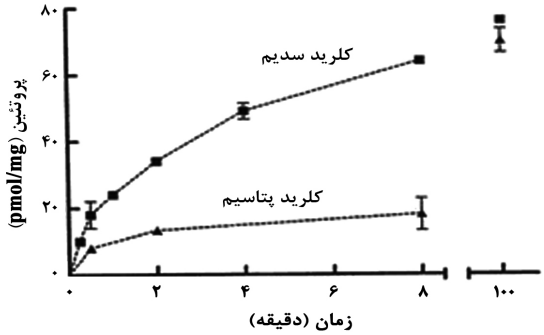
اطلاعات پیرامون وجود و خصوصیات کینتیکی سیستم انتقال اسیدآسکوربیک در غشاهای راسی روده ای ماهیان از طریق به کارگیری BBMV جدا شده از روده مارماهی مهاجر *Anguilla anguilla*، بدست آمده است (۵۸). این مطالعات نشان می دهد که انتقال [^{14}C]- اسیدآسکوربیک بوسیله BBMV به خصوص تحت تاثیر شیب سدیم است (شکل۲-۱۵ الف). اگرچه در مقایسه با نتایج بدست آمده از بررسی BBMV روده ای در خوکچه هندی (۵۹)، حضور شیب سدیم سبب افزایش جذب درون وزیکولی اسیدآسکوربیک بیشتر از مقدار تعادل، نمی شود (شکل ۲-۱۵ الف). احتمالا این نتیجه می‌تواند مربوط به پایین بودن شاخص J_{max} سیستم انتقال وابسته به سدیم اسیدآسکوربیک باشد (۰/۳۳±۰/۳ pmol/mg protein×min). برای اثبات این که آیا تحت شرایط فیزیولوژیک سدیم به عنوان یک عامل فعال کننده خارجی یا بعنوان یک نیروی محرکه واقعی در انتقال اسیدآسکوربیک نقش دارد، جذب درون شریانی [^{14}C]- اسیدآسکوربیک به مدت یکساعت در ۲۱ درجه سانتی گراد با سوبسترای نشاندار شده در BBMV روده مارماهی تحت پیش انکوباسیون اندازه گیری شد. تحت این شرایط، شیب سدیم می تواند بطورگذرا تجمع درون وزیکولی [^{14}C]- اسیدآسکوربیک را القاء کند (شکل۱۵-۲ب)، بنابراین این فرضیه که شیب فیزیولوژیک جهت دار سدیم درون سلولی می تواند انتقال اسیدآسکوربیک از غشاهای راسی روده ماهیان را انرژی ببخشد، حمایت می شود. این نتایج، با حضور مکانیزم ثانویه انتقال فعال سازگار می باشند (۳٦) و مشابه نتایج گزارش شده در روده انسان و خوکچه هندی است (٤۰، ۵۹). ولی مغایر با نتایج گزارش شده در روده موش صحرایی است که می تواند اسیدآسکوربیک را بسازد و در این موجود، جذب خالص روده ای اسیدآسکوربیک انجام نمی شود (٦۰).

۱-۵-۱۵- انتقال وابسته به یون سدیم: خصوصیات کینتیکی

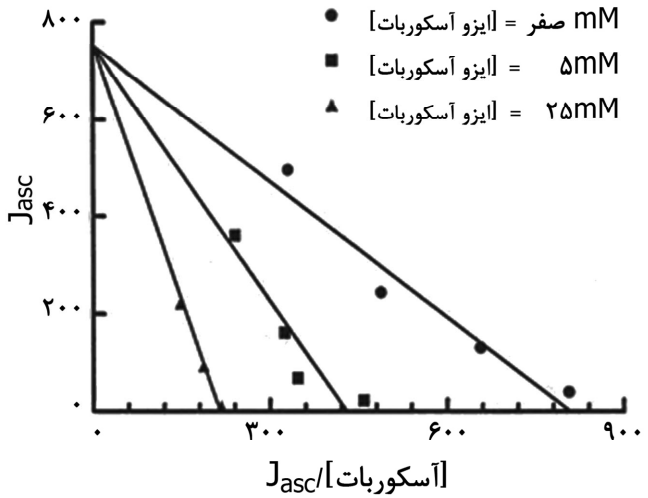
جریانهای اسیدآسکوربیک وابسته به سدیم که در حلقه(لوپ)های جدا شده (٤۱) یا در وزیکول‌های غشایی حاشیه پرزکی (۵۸)، اندازه گیری شدند، پدیده های اشباع پذیری هستند که دارای مقادیر ثابت ظاهری مکائیلیس - منتن[1] (Km_{app})، ۰/۲۲ mM در ماهی قزل آلای رنگین کمان و ۰/۷۵ mM در مارماهی در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد می باشند. اگرچه، این مقادیر تحت شرایط آزمایشی مختلف بدست آمده‌اند، در مقایسه با اعداد گزارش شده از خوکچه هندی که غلظتهای اسیدآسکوربیک برای

[1]Michaelis-Menten(Km_{app})

شکل ۲-۱۵ الف: اثر کاتیون های خارجی بر دوره زمانی جذب اسیدآسکوربیک توسط BBMV روده مارماهی. وزیکول‌ها با ۳۰۰ mM مانیتول و ۲۰ mM ماده HEPES بارگذاری شدند و با N -متیل-D-گلوکامین (NMDG) به pH ۷/٤ رسانده شدند و در محیط کشت حاوی ۱۰۰ mM مانیتول و ۲۰ mM HEPES که با ماده NMDG به pH ۷/٤ رسانده شده بود با ۰/۰۷۵ mM اسیدآسکوربیک، ۰/۰۱۹ دی تیوتریتول و با ۱۰۰ mM کلرید سدیم یا ۱۰۰ mM کلرید پتاسیم، تحت انکوباسیون قرار گرفتند.



شکل۲-۱۵ ب: اثر شیب سدیم بر دوره زمانی جذب اسیدآسکوربیک توسط BBMV روده مارماهی. وزیکول ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۱ درجه سانتی گراد، با ۵۰ mM کلرید پتاسیم، ۱۰۰ mM مانیتول، ۰/۱ mM [^{14}C] L-اسیدآسکوربیک، ۰/۰۲۵ mM دی تیوتریتول، ۰/۰۲٤٤ mM والینومایسین، ۲۰ mM HEPES که با هیدروکسیدپتاسیم به pH ۷/٤ رسانده شدند و همچنین با ۱۰۰ mM کلریدسدیم یا choline Cl پیش بارگذاری شدند. وزیکول ها در محیط کشت با همان pH حاوی ۱۰۰ mM کلرید سدیم، ۱۰۰ mM مانیتول، ۰/۱ mM L [^{14}C]- اسیدآسکوربیک، ۰/۰۲۵ دی تیوتریتول، ۵۰ mM کلرید پتاسیم تحت انکوباسیون قرار گرفتند.



شکل ۳-۱۵ : ممانعت از جریان اسیدآسکوربیک بوسیله D-ایزواسیدآسکوربیک در BBMV مارماهی. وزیکول ها با ۳۰۰ mM مانیتول، ۵۰ mM کلرید پتاسیم و ۲۰ mM HEPES بارگذاری و بوسیله هیدروکسید پتاسیم به pH ۷/٤ رسانده شدند و در محیط کشت حاوی ۱۰۰ mM مانیتول، ۱۰۰ mM کلریدسدیم، ۲۲/٤ µM والینومایسین[1] در اتانول، ۲۰ mM HEPES که بوسیله هیدروکسید پتاسیم به pH ۷/٤ رسانده شدند با غلظتهای L-آسکوربات بین ۱ mM - ۰/۰۵ و اسید D- ایزوآسکوربیک با غلظتی معادل mM صفر، ۵، ۲۵، تحت انکوباسیون قرار گرفتند. مقادیر ترسیم شده، نشان دهنده اختلافات موجود بین جریانات برای هر غلظت اسیدآسکوربیک در محیط حاوی کلرید سدیم و choline Cl می‌باشد. بهترین منحنی ها توسط هر مجموعه از داده ها، بوسیله برنامه رایانه ای رگرسیون بدست آمدند.

رسیدن به میزان نصف حداکثرجریان، mM ۱ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد (٤۰) یا تقریبا mM ۰/۳ در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد (۳۷، ۵۹) می باشد، با توجه به رهیافت آزمایش، تفاوت معنی داری را از خود نشان نمی دهد. این نتایج نشان می دهد که Km_{app} انتقال همزمان سدیم/ اسیدآسکوربیک – که پارامتر کینتیکی دارای نسبت عکس با میل ترکیبی آنزیم – سوبسترا می باشد- بوسیله عوامل فیزیولوژیکی مانند دما، فشار هیدروستاتیک، غلظت اسمزی و pH بهم می‌ریزد و در

[1] Valinomycin

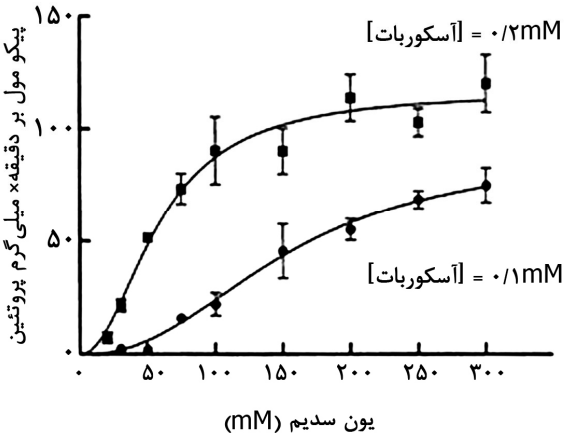
تمام مهره داران مستعد ابتلا به اسکوروی مشاهده می‌شود. حفظ میل ترکیبی سوبسترا – حامل، نه تنها به منظور حفظ حداکثر پاسخ دهی ناقل به تغییرات غلظتهای روده ای اسیدآسکوربیک، بلکه به منظور کنترل تجمع ویتامین بدرون انتروسیت دارای اهمیت است. فرض این که نیاز فضایی انتقال همزمان یون سدیم و اسیدآسکوربیک، در بین مهره داران حفظ شده است، بوسیله یافته‌های حاصل از آنالوگ‌های ساختاری مثل D- ایزوآسکوربات ثابت می شود که جذب [^{14}C]- اسیدآسکوربیک را به شیوه کاملا رقابتی در BBMV روده مارماهی (شکل۱۵-۳) با ثابت ممانعت (K_i) K mM ۸/۲۱±۰/۶۳ و در خوکچه هندی با ثابت ممانعت (K_i) حدود ۱۹/۷ mM (۵۹) ممانعت می کند.

۲-۵-۱۵- جذب وابسته به یون سدیم: الکتروژنسیتی

یکی از خصوصیات جالب انتقال همزمان سدیم و اسیدآسکوربیک در روده مارماهی، وابستگی آن استفاده از یک پتانسیل الکتریکی غشا می باشد. جذب اسیدآسکوربیک در حضور یک اختلاف پتانسیل الکتریکی (بار منفی در داخل) در عرض BBMV روده ای مارماهی به میزان معنی داری افزایش می‌یابد (۵۸). از آنجائیکه در pH ۷/٤ اسیدآسکوربیک یک مولکول دارای بار منفی است، چنین پتانسیل الکتریکی بر حسب انتقال همزمان سدیم/ اسیدآسکوربیک می‌تواند توسط نسبت استویکیومتری[1] جریان یون سدیم به اسیدآسکوربیک بیشتر از واحد (شکل۱۵-٤) توجیه شود. جریان اسیدآسکوربیک به صورت سیگموئیدی با افزایش غلظت سدیم در خارج افزایش می‌یابد که این رفتار توسط معادله Hill برای مشارکت چندگانه دارای ضریب Hill، بزرگتر از واحد می باشد. این معادله بیان می دارد که دو یا تعداد بیشتری یون سدیم، ممکن است برای انتقال هر مولکول اسیدآسکوربیک از عرض غشاء جابجا می شود. در این خصوص، ناقل روده ای اسیدآسکوربیک در ماهیان استخوانی شباهت زیادی به ناقلین کلیوی پستانداران (٦۱) و بافت پوششی رنگدانه دار شبکیه چشم (۳۹) دارد که الکتروژنیک می باشند و تبادل آشکار دو مولکول سدیم به جای یک مولکول اسیدآسکوربیک را نسبت به فرایند دارای بار الکتریکی خنثی دستگاه گوارش پستانداران نشان می‌دهد (۵۹).

با مقایسه توانایی‌های فیزیولوژیک ناقلین اسیدآسکوربیک روده و کلیه پستانداران، نتیجه گرفته می‌شود که الکتروژنسیتی و نسبت جریان سدیم به اسیدآسکوربیک در کلیه، با انجام جذب ویتامین در

[1] Stoichiometry



شکل ٤-١٥ : اثرات غلظت سدیم خارج بر جریان اسیدآسکوربیک اندازه گیری شده در فواصل جذب ۳۰ ثانیه‌ای. وزیکول ها با ٤۰۰ mM choline Cl، ۵۰ mM کلرید پتاسیم و ۲۰ mM HEPES که بوسیله هیدروکسید پتاسیم به pH ۷/٤ رسانده شد، بارگذاری شده و در محیط کشت حاوی ۵۰ mM مانیتول، ۵۰ mM کلرید پتاسیم، ۲۲/٤ µM والینومایسن در اتانول، همراه ۰/۱ mM یا ۰/۲ L- آسکوربات و غظت هایی از کلرید سدیم از صفر الی ۳۰۰ mM (choline Cl به صورت ایزواسموتیک، جایگزین کلرید سدیم گردید) انکوباسیون شدند.

لوله پیچیده نزدیک، بزرگتر از واحد است (٦١). افزایش نیروی رانش برای تجمع اسیدآسکوربیک در سلول‌های اپیتلیالی کلیه، توسط تلفیق شیب شیمیایی عرض غشا برای یون سدیم و پتانسیل الکتریکی بوجود می آید و مکانیزم کارآمدی از جذب را برای ویتامین طی عبور سریع آن در طول این بخش از نفرون کلیوی پستانداران فراهم می‌کند. ناقل کلیوی با بار الکتریکی خنثی نسبت استوکیومتری جریان یک یون سدیم در ازای یک مولکول اسیدآسکوربیک را ایجاد می‌کند که برای بازجذب مقدار فیزیولوژیکی کافی ویتامین از لوله‌های پیچیده نزدیک بسیار کند خواهد بود. از سوی دیگر، حضور سیستم انتقال اسیدآسکوربیک با بار الکتریکی خنثی در روده کوچک پستانداران، با زمان نسبتا کوتاه انتقال (در مقایسه با جریان فیلتراسیون اولیه در نفرون‌ها) می‌تواند برای تضمین جذب گوارشی کافی ویتامین اندازه باشد. مارماهی و سایر ماهیان استخوانی گوشتخوار، در مقایسه با گونه‌های همه

چیزخوار و گیاه خوار که ممکن است طول روده آنها چندین برابر طول بدن باشد، روده کوتاهی دارند (٦٢). شاید انتقال الکتروژنیک دو مولکول سدیم در ازای یک مولکول اسیدآسکوربیک موجود در دستگاه گوارش مارماهی، نوعی سازش برای تضمین جذب سریع و کافی ویتامین ث طی عبور مواد غذایی از روده کوتاه این ماهیان گوشتخوار باشد. این موضوع برای بازجذب ویتامین در کلیه پستانداران نیز مطرح شده است. الکتروژنسیتی ناقل سدیم / اسیدآسکوربیک روده، سبب تقویت پتانسیل الکتریکی فیزیولوژیک به عنوان یکی از نیروهای مهم رانشی دخیل در جذب مواد مغذی همچون شکر، اسیدهای آمینه یا پپتیدها در روده ماهیان، می شود (٤٩، ٦٣).

۳-۵-۱۵- انتقال تسهیل شده اسید دهیدروآسکوربیک

یکی از یافته‌های مهم در نتیجه تحقیقات *in vivo*، حضور معنی دار DHA - شکل اکسید شده اسیدآسکوربیک – در محتویات لوله گوارشی ماهیان فاقد یا واجد معده است (۳۱). بخشی از ویتامین ث کل موجود در غذا که به شکل احیاء شده حضور دارد، بستگی به مدت و شرایط انبارداری غذا دارد. با این وجود جانوران نیازمند به اسیدآسکوربیک، از DHA جذب شده از جیره غذایی نیز منتفع می شوند بشرط اینکه در سلولهای موکوزی مسیرکافی جهت جذب این سوبسترا وجود داشته باشد تا آن را به شکل فعال از لحاظ زیستی ویتامین ث تبدیل کنند.

شواهد به دست آمده از حضور مکانیزم انتقال بواسطه ناقل در غشاهای حاشیه پرزکی جدا شده بصورت وزیکولها از روده خوکچه هندی، نشان می دهد که آنها در جذب DHA به داخل انتروسیت‌ها نقش دارند (۳۷). جنبه‌های اصلی این سیستم انتقال این است که این سیستم مستقل از سدیم بوده و دارای قابلیت اشباع پذیری با K_m در حدود ۰,۱۷ میلی مولار و حداکثر نرخ انتقالی در حدود ۱۰ برابر کمتر از سیستم ناقل همزمان سدیم / اسیدآسکوربیک می باشد. در ماهیان، چنین مشاهدات آزمایشی مستقیمی وجود ندارد، اگرچه تجمع درون سلولی ^{14}C-DHA در حلقه(لوپ)های جدا شده قزل آلای رنگین کمان، نشان داده شده است (٤١). به محض جذب، انتروسیتهای ماهیان، DHA را به اسیدآسکوربیک - همانند پستانداران توسط آنزیم DHA ردوکتاز با استفاده از گلوتاتیون واحتمالا NADPH – تبدیل می کنند (۱۱).

یک ناقل اضافی نیز برای ویتامین ث در سطح قاعده ای جانبی سطح سلول روده خوکچه هندی

شناسایی شده است و به نظر می رسد که مخصوص انتقال DHA باشد. فعالیت انتقالی این سیستم بوسیله وزیکولهای غشایی قاعده ای جانبی ارزیابی شده است و شامل خصوصیاتی همچون مستقل بودن از شیب سدیم، قابلیت اشباع پذیری (K_m= ۰,۲۲۸mM) و ممانعت بوسیله آنالوگ‌های ساختاری (مشابه به آنچه که توسط انتقال تسهیل شده DHA در غشاهای حاشیه پرزکی نشان داده شده) می باشد. تنها تحقیق انجام شده در روده ماهیان، بیان می دارد که وجود انتقال بواسطه حامل DHA در سطح قاعده ای جانبی در قطعه های جدا شده روده قزل آلای رنگین کمان انجام می شود (٤١) و هیچ اطلاعاتی در خصوص خصوصیات کینتیکی این ناقل ویتامین ث وجود ندارد. استفاده از این مسیر تسهیل شده واقع در سمت قاعده ای جانبی بافت پوششی روده ای مهره داران، در حال حاضر به شدت محتمل دانسته شده است. به عنوان یک فرضیه ممکن است که این مسیر در تنظیم حالت ردوکس[1] ویتامین ث کل بدن کمک کند. یک ایده مورد قبول این است که اسیدآسکوربیک در بدن در نتیجه عملکردهای مختلفی همچون خاصیت آنتی اکسیدانی، اکسید می شود. اسیدآسکوربیک انواع اکسیژنی واکنشی را از بین می برد که بالقوه برای سلول‌ها و بافت‌ها خطرناک می باشند (۲). متابولیت حاصله، DHA، می‌تواند از طریق جریان خون به نقاط مختلفی مانند سلول‌های موکوسی توسط ناقل قاعده ای جانبی انتقال یابد و سپس توسط همان آنزیمی که بر DHA موجود در جیره غذایی عمل می کند، بازیابی شود. خلاصه ای از انتقالات ویتامین ث در روده ماهیان استخوانی در مقایسه با آنچه در مهره داران عالی اتفاق می‌افتد، در جدول ۲-۱۵ آورده شده است.

٤-٥-١٥- هیدرولیز و جذب مشتقات اسیدآسکوربیک

از آنجاییکه شکل طبیعی اسیدآسکوربیک بسیار ناپایدار می‌باشد، کارخانه خوراک آبزیان به منظور اطمینان از وجود سطح کافی اسیدآسکوربیک در جیره غذایی ماهیان، مجبور به افزودن اسیدآسکوربیک به میزان بیشتر از میزان مورد نیاز می باشند (٦٤)، تلاش‌های زیادی اخیراً روی ساخت اشکال پایدار شیمیایی اسیدآسکوربیک از طریق افزودن گروه‌های فسفات یا سایر گروه‌های آنیونی (مانند سولفات) به اسیدآسکوربیک، صورت گرفته است. اذعان شده است که وزیکول‌های غشای حاشیه پرزکی حاصله از روده گربه ماهی روگاهی، می‌تواند گروه فسفات را از دو شکل استر

[1] Red-ox

جدول۲-۱۵: خصوصیات جذب ویتامین ث در روده کوچک مهره داران

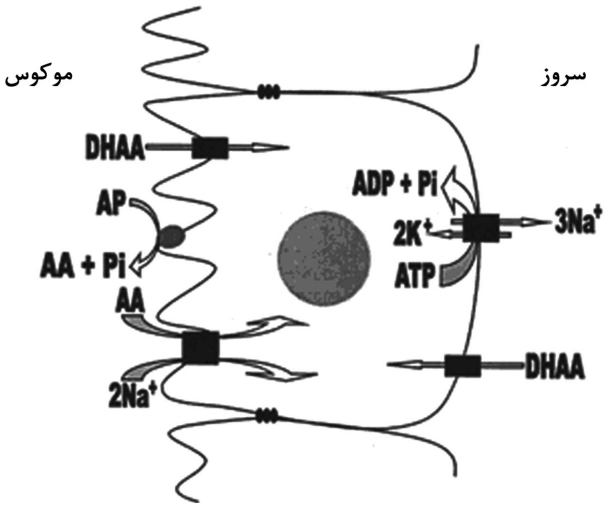
ویتامین	گونه	محل جذب	فرایند دخیل	وابستگی به Na^+	الکتروژنسیتی	K_m (mM)	روش بررسی	منبع
L-اسید آسکوربیک	انسان	انتهای روده باریک	انتقال فعال	بلی		۰/۳	قطعات روده ای	۴۳
	خوکچه هندی	انتهای روده باریک، حاشیه موکوسی	انتقال فعال	بلی	-	۱	محفظه‌های Schultz	۴۰
		روده باریک، حاشیه موکوسی	انتقال فعال	بلی	خیر	۰/۳	BBMV	۵۹
		انتهای روده باریک، حاشیه موکوسی	انتقال فعال	بلی	خیر	۰/۳۳	BBMV	۳۷
		انتهای روده باریک، حاشیه قاعده ای جانبی	انتقال تسهیل شده	خیر	خیر	۰/۲۲	BLMV	۳۷
	ماهی	روده، حاشیه موکوسی	انتقال فعال	بلی	بلی	۰/۷۵	BBMV	۵۸
	قزل‌آلای رنگین‌کمان	روده، حاشیه موکوسی	انتقال فعال	بلی	-	۰/۲۲	حلقه‌های روده ای	۴۱
اسید دهیدرو آسکوربیک	خوکچه هندی	انتهای روده باریک، حاشیه موکوسی	انتقال تسهیل شده و احیای درون سلولی	خیر	خیر	۰/۱۷	BBMV	۳۷
		انتهای روده باریک، حاشیه قاعده ای جانبی	انتقال تسهیل شده و احیای درون سلولی	خیر	خیر	۰/۲۸	BLMV	۳۷
	قزل آلای رنگین کمان	روده، حاشیه موکوسی	انتقال تسهیل شده و احیای درون سلولی	خیر	خیر	-	حلقه‌های روده ای	۴۱
		روده، حاشیه قاعده ای جانبی	انتقال تسهیل شده و احیای درون سلولی	خیر	خیر	-	حلقه‌های روده ای	۴۱

توجه: BBMV: وزیکول‌های غشای حاشیه پرزکی، BLMV: وزیکول‌های غشای قاعده ای جانبی

اسیدآسکوربیک آزاد کنند که با مونوفسفات پایدار شده‌اند و این فعالیت بوضوح در قسمت ابتدایی روده از بخش انتهایی آن بیشتر است (٦٥). در این خصوص BBMV ماهی مارماهی *Anguilla anguilla* (جدول ۱۵-۱) و سایر ماهیان مانند ماهی استخوانی گوشتخوار قطب جنوب *Termatomus bemacchi* (٦٦) و ماهی استخوانی گیاهخوار *Oreochromis mossambicus*، فعالیت قابل توجه (٦٧) آلکالین فسفاتاز را از خود نشان دادند. جذب راسی اسیدآسکوربیک از طریق استوانه های برگردانده شده روده ای، در قسمت روده قدامی گربه ماهی بالاتر می باشد و نرخ های حداکثر جذب برای اشکال پایدار شده با فسفات در حدود ٤٠ درصد اشکال طبیعی اسیدآسکوربیک می باشد (٦٥). این نتیجه نشان می دهد که زیست فراهمی اشکال منوفسفات پایدار اسیدآسکوربیک، بستگی به فعالیت آنزیمی آلکالین فسفاتاز موجود در غشای حاشیه پرزکی دارد. این آنزیم قادر است گروه فسفات را هیدرولیز کرده و شکل طبیعی اسیدآسکوربیک را آزاد کند. سپس اسیدآسکوربیک آزاد شده قادر است از طریق سیستم انتقالی راسی وابسته به سدیم جذب شود. در مقابل، نرخ های پایین جذب روده ای، تجمع بافتی و پتانسیل پایین اثر ضد کمبود ویتامین ث در اشکال سولفاته اسیدآسکوربیک که بطور خوراکی داده می‌شود (مثل سولفات آسکوربیل) (٦٨) به احتمال زیاد در اثر فعالیت ناچیز آنزیم سولفاتاز در حاشیه پرزکی روده است (٦٩). این نتایج در تضاد با مطالعات قبلی می باشد (۱) که پیشنهاد می‌کند که سولفات اسیدآسکوربیک ، مهمترین شکل ذخیره‌ای ویتامین ث در ماهیان است. بر اساس اطلاعات فوق، مدلی در شکل۵-۱۵ ارایه شده است.

٦-۱۵ - بازجذب کلیوی اسیدآسکوربیک در ماهیان استخوانی

در پستانداران، اسیدآسکوربیک در ناحیه لوله مارپیچ نزدیک در کلیه بازجذب می‌شود. این بازجذب، بوسیله ناقل وابسته به یون سدیم مختص اسیدآسکوربیک که در حاشیه پرزکی سلول‌های بازجذب کننده قرار دارد (٦١) و نیز یک ناقل مستقل از سدیم مختص DHA (۲۸)، انجام می‌گیرد. اسیدآسکوربیک بازجذب شده به شکل احیاء شده نگه داری می‌شود (۷۰). بعلاوه، اغلب DHA جذب شده به درون لوله‌های کلیوی موش در شکل احیاء شده آن قابل مشاهده است. فعالیت آنزیم شبه ردوکتاز DHA در حدود ۷۰-۵۵ درصد بخش سولفات آمونیوم هموژنهای کلیه موش است.



شکل۵-۱۵ : مدل وقایع شناخته شده در مورد جذب اشکال احیاء شده، اکسید شده و استرهای فسفاته ویتامین ث، در روده ماهیان. L-اسیدآسکوربیک در طول غشای حاشیه پرزکی در روده، برخلاف شیب غلظت سدیم جذب می‌شود که با انتشار سدیم، شیب پتانسیل الکتروشیمیایی ورودی به سلول کاهش می‌یابد. دهیدرواسیدآسکوربیک به صورت انتشار تسهیل شده از مجرا یا فضاهای موجود، وارد سلول می‌شود و بایستی بصورت آنزیمی، احیاء شود. استرهای فسفاته، در حاشیه پرزکی بصورت آنزیمی هیدورلیز شده و ویتامین ث احیاء شده را تشکیل دهد که می‌تواند از عرض غشاهای راسی توسط یک انتقال همراه سدیم، منتقل شود.

خواص متابولیک و انتقالی متابولیسم برای آسکوربات اکسید شده یا احیاء شده مشابه مواردی است که قبلا برای جابجایی روده ای اسیدآسکوربیک تشریح شده است. در پستانداران، اسیدآسکوربیک همچنین تحت شرایط خاصی به داخل ادرار- شاید بوسیله انتقال غیر مستقیم وابسته به یون سدیم در عرض غشای قاعده ای جانبی – ترشح می شود که این افزایش اتلاف ادراری حین افزایش مقادیر پلاسمایی آن، به تعادل غلظت ویتامین کمک می کند (۷۱). بر اساس مطالعات ما، تا کنون هیچ نوع اطلاعاتی در زمینه بررسی مکانیزمهای انتقال غشایی دخیل در بازجذب و ترشح لوله ای

اسیدآسکوربیک و DHA، وجود ندارد. اگرچه، با توجه به این حقیقت کـه کلیـه ماهیـان اسـتخوانی، یکی از اندام‌هایی است که ممکن است در آن غلظتهای بالای اسیدآسکوربیک – عمدتا پس از افزودن این ویتامین به جیره غذایی دارای آن – تجمع یابد (۳۱) پیشنهاد می شود که شاید سیستم‌های انتقـالی ویژه‌ای در انتقال اسیدآسکوربیک از عرض غشاهای پلاسمایی راسی و قاعده ای جـانبی کلیـه دخیـل باشند.

۷-۱۵- دیدگاه مطالعات جذب اسیدآسکوربیک در ماهیان: رهیافت کلونینگ

۱-۷-۱۵- ساختار مولکولی سیستم انتقالی غشاء پلاسمایی

پروتئین‌های غشای پلاسمایی، معمولا در مقدار کم ظاهر می‌شوند که این مسئله سبب مشکل سـاختن جداسازی پروتئین‌های غشای پلاسمایی از طریق تکنیک‌های مرسـوم خـالص سـازی پـروتئین شـده است. به عنوان جایگزینی برای تخلیص بیوشـیمیایی، محققـین اخیـرا اسـتراتژی تظـاهر کلـونی را بـا استفاده از تخمک‌های *Xenopus laevis* برای به دست آوردن اطلاعات مولکولی پروتئین‌های ناقـل غشای پلاسمایی، اتخاذ نموده‌اند. پس از اولین کلون ناقل همزمان سدیم/ D–گلـوکز روده (۷۲)، ایـن دیدگاه برای شناسایی تعدادی از ناقلین غـشاء و تـشخیص سـاختار و مکـانیزم‌هـای مولکـولی مـورد استفاده قرار گرفت (۷۳-۷٦).

شکل ٦-۱۵ مراحل اصلی استراتژی کلونینگ را خلاصه نموده که بر اساس آنـالیز عملکـرد انتقـال در H_2O یا mRNA/cRNA تزریق شده به تخمک‌های *Xenopus laevis* می باشـد. مرحلـه یـک شامل جداسازی mRNA و تزریق آن به تخمک هـا مـی باشـد (بیـشتر از ۵۰ ng در حجمـی بیشتر از ۵۰ nl آب) که آنالیز عملکرد انتقال در تخمک‌ها با استفاده از مواد رادیواکتیو انجام می‌شود و میزان بیان عملکردی از مقدار mRNA تزریق شده و زمان پس از تزریق، آنالیز می‌شود. مرحله دوم، شامل جدا نمودن RNA بر اسـاس انـدازه بوسـیله الکتروفـورز روی ژل یـا سـانتریفیوژ روی شـیب چگالی ساکاروز است. مجددا بیان فعالیت ناقل تخمین زده می‌شود. در ایـن مرحلـه، مقایـسه فعالیـت ذاتی (تخمک‌های تزریق شده با H_2O) و فعالیت جـذب بیـان شـده (تخمـک‌هـای تزریـق شـده بـا mRNA منهای تخمک‌های تزریق شده بـا H_2O) بـرای بـه دسـت آوردن اطلاعـات پیرامـون ایـن موضوع دارای اهمیت است که آیا سیستم انتقال مدنظر به راستی بیان شده است و آیا امکـان تحریـک

یا تقویت فعالیت ذاتی وجود دارد. بدین منظور، مطالعه خواص کینتیکی یا آزمایشهای ممانعت انتقال (از طریق سوبستراهای سایر ناقلین غشایی شناخته شده) مورد نیاز است. بر اساس اطلاعات فوق، در مرحله سوم، جدا نمودن بر اساس اندازه می‌تواند آغاز گردد. رونویسی معکوس (ساخت cDNA) از mRNA سایزبندی شده (فعال از لحاظ عملکرد) با انتخاب اندازه مناسب (حداقل با قطع نسخه های کوتاهتر) مجددا ادامه می‌یابد و با اتصال cDNA به ناقل مناسب، اتصال جهت دار به پلازمید می‌تواند امکان رونویسی *in vitro*، cDNA برای تزریق تخمکی پس از خطی شدن پلازمید را فراهم آورد. مرحله سوم شامل مراحل نخست غربالگری است (برای بیان پروتئین های انتقال)؛ کتابخانه قبل از انجام هرگونه مرحله تکثیر در گنجینه های مختلف از هم جدا می شود که هر یک حاوی ۳۰۰۰ -۱۰۰۰ کلونی منحصر به فرد است. cRNA از پلازمیدهای رشد یافته مجزا ازاین گنجینه ها، ساخته می شود. اگر تزریق یکی از این cRNAها منجر به افزایش فعالیت انتقال شود، تقریبا موفقیت در استراتژی کلونینگ تضمین شده است. مراحل بعدی برای ایزوله کردن یک کلونی مجزا مشتمل بر پروتکل های معروف به انتخاب *sib*، بکارگیری dilution/ replating/ replicas و همچنین رشد یا جداسازی پلازمید و نسخه برداری *in vitro* از cRNA در تمام مراحل مختلف است.

۲-۷-۱۵- بیان ناقلین وابسته به +Na اسیدآسکوربیک در غشای پلاسمایی سلول‌های اپیتلیالی

از بین اطلاعات موجود در زمینه خصوصیات عمومی جذب روده ای اسیدآسکوربیک و بازجذب کلیوی در مهره داران، در مورد ویژگی‌های مولکولی سیستم (های) انتقال اسیدآسکوربیک از غشای پلاسمایی، اطلاعات زیادی در دسترس نمی باشد. اطلاعات در زمینه ویژگی‌های مولکولی مفروض در زمینه مکانیزم (های) وابسته به سدیم، شامل جذب اسیدآسکوربیک در مهره داران، تا کنون در دسترس نبوده است. اگرچه، اخیرا بیان ناقل اسیدآسکوربیک کلیه خرگوش در تخمکهای *Xenopus laevis* توصیف شده است (۷۷). تزریق RNA واجد دنباله پلی A استخراج شده از بخش قشری کلیه خرگوش به تخمک ها، موجب افزایش میزان جذب

[^{14}C]- اسیدآسکوربیک به میزان ۵ برابر (570µM) در مقایسه با تخمک‌های تزریق شده با آب، می شود. جداسازی mRNA های بخش قشری کلیه بر اساس شیب ساکاروز، نشان می دهد که نوع mRNA که بیان ناقل اسیدآسکوربیک را در تخمکها القاء می‌کند، دارای اندازه‌ای در حدود ۲ کیلوباز (kb) (بین ۱/۸ الی ۳/۱ کیلوباز) می باشد. تزریق قطعه فعال به درون تخمکها سبب افزایش بیش از ٤٠ برابر جذب اسیدآسکوربیک در مقایسه با گروه شاهد می شود. جذب القاء شده [^{14}C]- اسیدآسکوربیک پس از تزریق mRNA به تخمک‌ها وابسته به سدیم است و به میزان معنی داری بوسیله شکل غیر رادیواکتیو اسیدآسکوربیک و نیز ساختار مشابه آن یعنی ایزواسیدآسکوربیک، ممانعت می‌شود ولی D-گلوکز اثر منفی بر آن ندارد. اشباع سازی در نتیجه افزایش غلظت اسیدآسکوربیک در محیط کشت طی انکوباسیون (۱۰۰۰-۱۰۰ میکرومولار) با Km ظاهری ۷۲/۵ ± ۲۵۸ میکرومولار و حداکثر سرعت $Pmol \times oocyte \times 2h^{-1}$ ۲/۸ ± ۲۹/٦ مشهود است. با توجه به این ویژگیها، به نظر می رسد که ناقل بیان شده اسیدآسکوربیک جزء غشای حاشیه پرزکی سلول‌های بازجذب کننده کلیه باشد جائیکه واجد یک مکانیزم جذب عمده می باشد (که بوسیله مطالعات وزیکول غشایی حاشیه پرزکی تشخیص داده شده است) (٦١).

یافته‌های اخیر جداسازی دو ناقل وابسته به سدیم، یعنی $SVCT_1$ و $SVCT_2$، را نشان می‌دهد. $SVCT_1$ از طریق غربال کتابخانه cDNA کلیوی موش برای فعالیت انتقال [^{14}C] L- اسیدآسکوربیک وابسته به سدیم در تخمکهای *Xenopus laevis* که با RNA تزریق شده بودند، کلون گردید. غربالگری بر اساس شباهت مبتنی بر PCR، منجر به جداسازی cDNA مرتبط با این ژن در مغز موش صحرایی می شود که واجد ٦٥ درصد همگونی با $SVCT_2$ است (۷۸). $SVCT_1$ و $SVCT_2$ از لحاظ هیدروپاتی[1] دارای پروفیل مشابهی هستند که هر یک واجد ۱۲ دومن احتمالی در عرض غشاء هستند. این کلون‌ها با توالی‌هایی با عملکرد نامشخص - گزارش شده در بانک‌های اطلاعاتی - تشابه دارند. آزمایشها نشان می دهد که در هر دوی این کلونها، انتقال اسیدآسکوربیک، هیپربولیک[2]، الکتروژنیک، وابسته به سدیم و با تمایل بالا می باشد. پارامترهای

[1] Hydropathy

- مقیاسی برای بیان تمایلات آبگریزی و آبدوستی یک گروه شیمیایی

[2] Hyperbolic

کینتیکی برای ایزوفرم های$SVCT_1$، که توسط روش‌های ردیابی رادیواکتیو تعیین شده است عبارت بودند از:

ظاهری$K^{AA}_{0/5}=18.7\pm2.7\mu M, V^{AA}_{max}=3.5\pm0.1 pmol\times oocyte^{-1}\times min^{-1}, K^{Na}_{0.5}= 2.8\pm3.8 mM$

در صورتی که پارامترهای کینتیکی برای $SVCT_2$ عبارت بودند از:

ظاهری$K^{AA}_{0.5}=9.4\pm1.9\mu M, V^{AA}_{max}=0.2\pm0.01 pmol\times oocyte^{-1}\times min^{-1}, K^{Na}_{0/5}=10.4\pm0.6 mM$

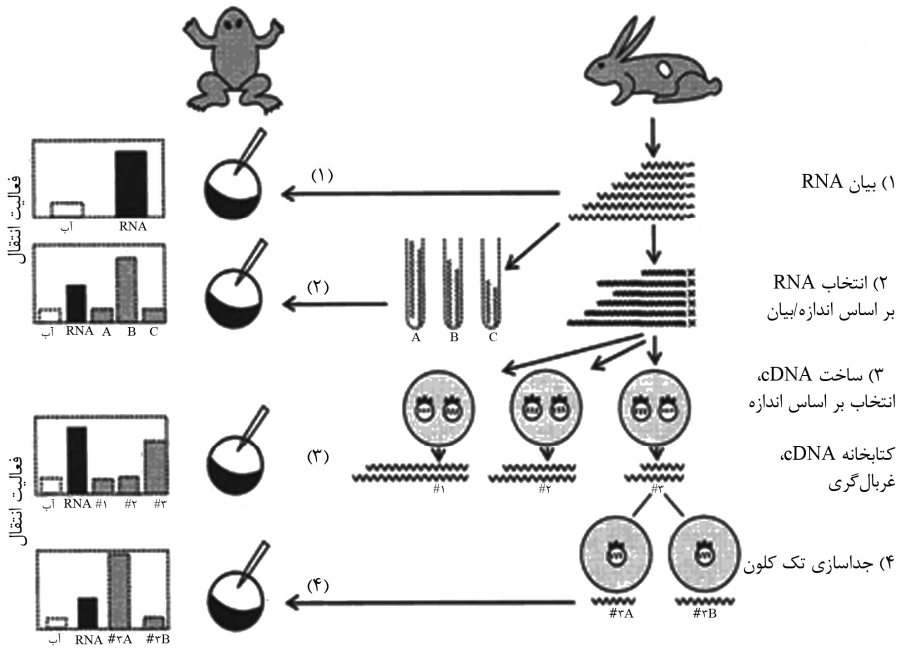
نسبت استوکیومتری سدیم به اسیدآسکوربیک برای$SVCT_1$ و $SVCT_2$ در حدود ۲ بود.

کینتیک‌های مشابهی به وسیله اندازه‌گیری‌های گیره ولتاژ[1] به دست آمد (۷۸). $SVCT_1$ اغلب محدود به سیستم‌های اپیتلیالی مانند روده، کلیه (ردیف بند S3 از لوله پیچیده نزدیک) و کبد می باشد، در صورتی که $SVCT_2$ در مجموعه ای از سلول‌های فعال از لحاظ متابولیک و بافت‌های تخصص یافته مغزی، چشم و چندین اندام دیگر انجام وظیفه می کند (۷۸). به طور کلی این نتایج نشان دهنده توانایی تخمک‌های *Xenopus laevis* به عنوان یک سیستم بیان بالقوه ناقلین اسیدآسکوربیک غشای حاشیه پرزکی و بصورت تئوریک در بافت‌ها و سطوح مختلف، می باشد.

۳-۷-۱۵- ناقلین مستقل از +Na دخیل در جذب DHA در سلول‌های جانوری

اخیرا مدل مولکولی برای درک چگونگی توزیع اسیدآسکوربیک در سلول‌های غیر قطبی توصیف شده است (۳۸). تا سال ۱۹۹۳ چگونگی جذب اسیدآسکوربیک در سلول‌های غیر قطبی، مشخص نبود. کینتیک تجمع بافتی و سلولی ویتامین ث به صورت *in vitro* نشان می دهد که این فرایند از طریق یکسری ناقلین خاص موجود در غشای سلولی انجام می‌گیرد (۳۵). برخی مشاهدات آزمایشگاهی، ارتباط انتقال ویتامین ث با سیستمهای انتقال هگزوز در سلول‌های پستانداران را نشان می‌دهد، اگرچه هنوز اطلاعات روشن و محکمی در مورد نقش ویژه این ناقلین در این پروسه در دسترس نمی باشد (۱۶، ۳۷، ۵۹، ۶۱، ۷۰، ۷۹-۸۳). اخیرا، در سیستم بیان تخمک‌های *Xenopus laevis*، نشان داده شده است که ناقلین تسهیل کننده هگزوز در پستانداران عمدتا $GLUT_1$ (۸۴، ۸۵)، $GLUT_2$ و $GLUT_4$ حساس به انسولین (۸۴-۸۷)، ناقلین کارآمدی برای DHA هستند (۳۸). این ناقلین هگزوز در اغلب بافت‌های پستانداران یافت می شوند. در این بین $GLUT_1$ دارای توزیع گسترده بوده و بویژه در سلول‌های اریتروئیدی و مغزی، $GLUT_2$ در کبد، سلول‌های B، کلیه و روده کوچک

[1] voltage-clamp



شکل ٦-١٥ - استراتژی برای بیان ژن های کلون شده سیستم های انتقال. چهار مرحله مهم ترسیم شده است. مرحله اول، شامل جداسازی mRNA (برای مثال از کلیه یا روده)، و تزریق آن به تخمک های مرحله ٤ یا ٥ رسیدگی جنسی قورباغه *Xenopus laevis*، و سپس بررسی انتقال با کمک یک تکنیک ردیابی (برای مثال -$[^{32}P]$ PO_4) است. مرحله دوم، شامل جداسازی mRNA ها براساس اندازه و تزریق این قطعات mRNA به تخمک ها و سپس بررسی انتقال است. مرحله سوم، شامل ساخت cDNA از قطعات mRNA جداشده بر اساس اندازه (که واحد عملکرد می باشند) می باشد. جداسازی مجدد بر اساس اندازه و اتصال آنها به یک ناقل پلازمیدی مناسب می باشد. در این مرحله آزمایشهای مربوط به غربال گری برای بررسی فعالیت انتقال، پس از تزریق cRNA رونویسی شده از گنجینه پلازمیدی بدست آمده از بخشهای کتابخانه جداشده قبل از مرحله تکثیر بصورت *in vitro* انجام می شود. مرحله چهارم، از یک بخش مثبت (فعالیت انتقال بیان شده، مرحله سوم را ملاحظه نمائید) آغاز می گردد و مشتمل بر جداسازی بیشتر (انتخاب sib) کتابخانه تا جداسازی یک تک کلون کدکننده فعالیت انتقال می باشد. چنین فرآیندی برای شناسایی پروتئین های غشایی احتمالی دخیل در انتقال غشایی در چندین گونه مختلف مشتمل بر ماهیان استخوانی، انجام شده است (Werner *et al.*, 1994). الف، ب و ج نشان دهنده گنجینه های مختلف mRNA های سایز بندی شده گونه های مختلف می‌باشد که برای مثال از سانتریفوژ شیب ساکاروز بدست آمده اند. 1≠، 2≠ و 3≠ نشاندهنده گنجینه های مختلف کتابخانه می‌باشند، 3A≠ و 3B≠ نشانگر تک کلون های بدست آمده از فرآیند انتخاب *sib* است. این تصویر به کمک Werner تهیه شده است.

و $GLUT_4$ در چربی و ماهیچه قرار دارد (۸۸). دو مسیر انتقال، یکی با میل ترکیبی کم (شاخصK_m در حدود ۳/۵ mM و V_{max} در حدود ۱۹۰ $pmol \times oocyte^{-1} \times min^{-1}$) و دیگری با میل ترکیبی بالا (K_m در حدود ٦۰ µM و Vmax در حدود ٤/۸ $pmol \times oocyte^{-1} \times min^{-1}$) برای DHA در تخمکهای بیان کننده $GLUT_1$ پستانداران شناسایی شده است و این اووسیتها ویتامین ث را برخلاف شیب غلظت انباشته می کنند هنگامیکه DHA در دسترس باشد. همچنین، این مولفان فعالیت انتقال DHA را به اووسیتهای بیان کننده $GLUT_1$ و $GLUT_4$ نسبت می‌دهند (۳۸). اگرچه، اطلاعات اخیر به دست آمده از تخمک‌های *Xenopus laevis* و سلول‌های تخمدان همستر چینی که ایزوفورم $GLUT_{1-5}$ را بیش از حد بیان می کنند نشان می‌دهد که DHA بسرعت توسط $GLUT_1$ و $GLUT_3$ و تا حد کمتری توسط $GLUT_4$ جذب می‌شود(۸۹). پارامترهای کینتیکی، برای $GLUT_1$، که با $[^{14}C]$- اسیدآسکوربیک تعیین شد، به صورت مقابل بود (K_m در حدود ۱/۱ mM و V_{max}در حدود ۱۰۸ $pmol \times oocyte^{-1} \times min^{-1}$) در صورتی که برای $GLUT_3$، K_m در حدود ۱/۷ mM وV_{max} ۲٤۱ $pmol \times oocyte^{-1} \times min^{-1}$ بود (۸۹). این مشاهدات نشان می‌دهد که ناقلین هگزوز تسهیل کننده در پستانداران به صورت فیزیولوژیک، مسیرهای مهمی را برای جذب و تجمع ویتامین ث توسط سلولها تشکیل می‌دهند و بیان می دارد زمانیکه DHA به داخل سلول وارد می شود به اسیدآسکوربیک تبدیل می‌شود، بنابراین اسیدآسکوربیک برخلاف شیب غلظت در داخل سلول انباشته می شود. در ماهیان بخوبی نشان داده شده است که نسبت DHA به اسیدآسکوربیک در هر بافت، مشخصه آن بافت می باشد و بستگی به وضعیت ویتامین ث دارد (۹۰)

۸-۱۵- دیدگاه مطالعات اسید آسکوربیک در ماهیان - رهیافت انتقال ژن

۱-۸-۱۵- روش‌های انتقال ژن در ماهیان

جانورانی که ژن‌های خارجی را به شکل مصنوعی دریافت می‌دارند، جانوران تراریخت نامیده می‌شوند. در مهره داران عالی تر مانند موش، DNA می‌تواند بوسیله میکروپیپت‌های خاصی به پیش هسته تخمک‌های لقاح یافته تزریق شود و جنین‌های تزریق شده یا در محیط *in vitro* دوره انکوباسیون خود را می‌گذرانند یا در داخل تخمدان مولدین ماده به صورت مصنوعی قرار داده می‌شوند تا مراحل بعدی تکامل خود را سپری نمایند. به وسیله این روش، نسخه‌های متعددی از

ژن‌های خارجی ممکن است در موقعیتهای تصادفی به درون ژنوم جانور تراریخت، به صورت آرایه های پشت سر هم سر به دم یا سر به سر تلفیق شوند. اگر ژن خارجی با پروموتور عملکردی ارائه شود، بیان پروتئین مربوطه در برخی از تراریخت‌ها قابل انتظار است. در نهایت، ژن خارجی از طریق سلولهای مولد سلولهای جنسی[1] به نسل بعد منتقل می‌شود. جانوران تراریخت ممکن است فنوتیپ‌های تغییریافته‌ای را بروز دهند. برای مثال، موش‌های تراریخت شده با ژن‌های هورمون رشد انسانی یا موشهای صحرایی، سطح بالاتری از هورمون رشد را نشان می دهند که در نهایت شاهد رشد بیشتر و سریعتر این گروه نسبت به گروه شاهد خواهیم بود (۹۱).

از طریق ریزتزریق، ژن‌های خارجی، حتی به ژنوم ماهیان نیز معرفی شده است. کپور معمولی، گربه ماهی، ماهی طلایی، سگ ماهی، مداکا، آزادماهی، تیلاپیا، قزل آلای رنگین کمان و گورخر ماهی تراریخت، تولید شده‌اند (۹۲، ۹۳). از آنجاییکه، پیش هسته تخمک اغلب ماهیانی که تا به امروز مورد مطالعه قرار گرفته اند، به آسانی مشاهده نمی شود، معمولا DNA مورد نظر، به داخل سیتوپلاسم تزریق می‌شود. تخمک‌ها و اسپرم از مولدین بالغ جمع آوری گردیده و عمل لقاح با افزودن آب و اسپرم به تخمک آغاز و به آرامی با ترکیبات فوق مخلوط می‌شوند. در حدود 10^6 الی 10^8 مولکول خطی یا پیچ خورده DNA در حجمی معادل ۰/۲-۲۰nl به صورت ریزتزریق به تخم‌های مرحله یک تا چهارانتقال داده می‌شوند. از آنجائیکه اغلب ماهیان استخوانی دارای لقاح خارجی هستند، جنین های تزریق شده نیازی به دستکاری های پیچیده مورد نیاز در سیستمهای پستانداران از قبیل نگهداری جنین ها در محیط *in vitro* و انتقال جنین ها به درون مادران رضایی[2] ندارند. به علاوه، تزریق سیتوپلاسمی در ماهیان نسبت به تزریق هسته‌ای برای جنین‌ها خطرکمتری دارد و لذا میزان زنده مانی جنین‌های مورد تزریق قرار گرفته ماهیان خیلی بالاتر از پستانداران است. بسته به نوع گونه، میزان زنده مانی جنین ماهیان تزریق شده، بین ۸۰-۳۵ درصد است. اگرچه، میزان تلفیق DNA از ۷۰-۵ درصد متغیر است (۹۳). یک استثناء در این زمینه تزریق سیتوپلاسمی ماهی مداکا می باشد که در این ماهی، پیش هسته کاملا مشخص است و قبل از عمل لقاح می‌توان ژن خارجی را به داخل تخمک این ماهی تزریق نمود (۹٤، ۹۵). برای بدست آوردن اطلاعاتی در مورد انتقال پایدار ژن‌های خارجی،

[1] Germ Line
[2] Foster

DNA جانوران تراریخت مذکور، از تکه‌های بافتی آنها استخراج و با استفاده از تکنیک لکه گذاری ساترن (با استفاده از ژن خارجی نشاندار با مواد پرتوزا بعنوان پروب) و یا با استفاده از تکنیک PCR (با استفاده از الیگونوکلئوتیدهای خاص) مورد بررسی قرار می گیرد. سپس جانوران تراریخت احتمالی می توانند برای آزمایش های بعدی پرورش داده شوند و نهایتا برای تولید گله مولدین تراریخت استفاده شوند. روش‌های متعددی از قبیل الکتروپوراسیون (ریزفضاهای الکتریکی) (۹۶)، لیپوزوم‌ها (۹۷) و استفاده از ناقلین رتروویروسی[1] (۹۸) به عنوان جایگزینی برای روش‌های مرسوم دست و پا گیر و زمان بر ریزتزریق DNA توسعه یافته اند ولی هنوز با مشکلاتی از قبیل پایین بودن کارایی در انتقال حجم بالای ژن و ناپایداری انتقال ژن مواجه هستند.

۲-۸-۱۵- بیان ژن L-گولونو- γ – لاکتون اکسیداز در مداکای تراریخته

به طور نظری و عملی ممکن است که القاء خصوصیات ژنتیکی مفید (مثل افزایش رشد، مقاومت در برابر بیماری، مقاومت به سرما و غیره) به گونه های مهم تجاری ماهی جایگزین یا مکمل دیدگاه اصلاح نژاد باشد. همانطوری که قبلا اشاره شد، در ماهیان مستعد ابتلا به اسکوروی، فقدان حضور آنزیم GLO به دلیل نبود ژن مربوطه نبوده و دلیل آن ایجاد جهش در توالی‌های نوکلئوتیدها می‌باشد. اصلاح این نقص اخیرا بوسیله انتقال ژن فعال GLO به سلولهای مولد سلولهای جنسی گونه ای از ماهیان استخوانی مستعد ابتلا به اسکوروی، مداکا *Oryzias latipes*، ممکن شده است. cDNA ژن GLO کبد موش صحرایی در پلازمید pSVL – ناقل ویروسی میمونی ۴۰ بازه مورد استفاده در بیان سلولهای یوکاریوت – بصورت ریز تزریق به سیتوپلاسم تخم‌های لقاح یافته در مرحله تک سلولی، انتقال یافت. چهار مولد نر F_0 که دارای ژن مورد نظر در سلولهای مولد سلولهای جنسی خود بودند، تا رسیدن به مرحله بلوغ نگه داری شدند. نسل F_1 حاصله از یکی از ماهیان نسل F_0 که دارای فعالیت ژن GLO بود، نشان داد که ژن انتقال یافته به صورت عملکردی نیز بیان شده است. بوسیله آنالیز لکه گذاری ساترن، ژن مذکور بصورت تلفیق شده در کروموزوم و خارج از آن مشاهده شد. این تلاش موفقیت آمیز، قابل ملاحظه است. در حقیقت، به کارگیری تکنولوژی انتقال ژن در آبزی‌پروری،

[1] Retroviral

بیشتر در زمینه افزایش رشد و بهبود آن (۹۹، ۱۰۰) بجای درمان کمبود برخی آنزیم‌ها بوده است. این اولین گزارش از انتقال ژن به ماهیان برای یک آنزیم می باشد که این آنریم طی روند تکامل تغییر یافته است. این یافته علمی، موجب باز شدن درهای جدیدی در زمینه طراحی آزمایش های انتقال ژن به ماهیان و ژن درمانی در آبزیان خواهد شد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه، به وسیله بخشی از برنامه تحقیقاتی مشترک دانشگاه Lecce ایتالیا و دانشگاه هاوایی امریکا حمایت شد. بودجه لازم برای این برنامه تحقیقاتی توسط وزارت علوم و تحقیقات تکنولوژی و دانشگاهی ایتالیا، وزارت کشاورزی، غذا و جنگل داری (چهارمین طرح آبزی پروری و صیادی در آب‌های لب شور و دریایی) و مرکز بیوتکنولوژی Progetto Finalizzato موسسه تحقیقات ملی ایتالیا، تامین گردید.

منابع

1. Tucker, B. W. and Halver, J. E., Ascorbate-2-sulfate metabolism in fish. *Nutrition Rev.,* 42,173,1984.

2. Rose, R. C. and Bode, A. M., Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate, *FASEB., 7,* 1135,1993.

3. Chatterjee, I. B., Evolution and the biosynthesis of ascorbic acid. *Science,* 182:1271,1973.

4. Chatterjee,. B., Majumder, A. K., Nandi, B. K., and Subramanian, N., Synthesis and some major functions of vitamin C in animals, *Ann. N.Y. Acad. Sci.,* 258, 24, 1975.

5. Nakajima, Y., Shanta, T. R., and Bourne, G. H., Histochemical detection of L-gulonolactone: phenazine methosulfate oxidoreductase activity in several mammals with special reference to synthesis of vitamin C in primates, *Histochemie,* 18, 293,1969.

6. Birney, E. C., Jenness, R., and Ayaz, K. M., Inability of bats to synthesise L-ascorbic acid, *Nature,* 260, 626,1976.

7. Chaudhuri, C. R. and Chatterjee, I. B., L-ascorbic acid synthesis in birds: phylo-genetic trend. *Science,* 164,435,1969.

8. Touhata, K., Toyohara, H., Mitani, T., Kinoshita, M., Sato, M., and Sakaguchi, M., Distribution of L-gulono-l,4-lactone oxidase among fishes. *Fisheries Sci.,* 61, 729,1995.

9. Nishikimi, M., Fukuyama, R., Minoshima, S., Shimizu, N., and Vagi, K., Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulono-'y-lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man,. *Biol. Chem.,* 269,13685,1994.

10. Nishikimi, M., Kawai, T., and Yagi, K., Guinea pigs possess a highly mutated gene for L-gulono-lactone oxidase, the key enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in this species, J. Bio. *Chem.,* 267, 21967,1992.

11. Rose, R. C., Intestinal absorption of water soluble vitamins, Proc. Soc. *Exp. Biol. Med.,* 212,191,1996.

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

13. Kitamura, S., Suwa, T., Ohara, S., and Nakamura, K., Studies on vitamin requirements of the rainbow trout *Salmo gairdneri.* I. On the ascorbic acid, *Bull., Jpn. Soc. Sci. Fish.,* 33,1120,1965.

14. Poston, H. A., Effect of dietary L-ascorbic acid on immature brook trout. Fish. Res. *Bull.,* Cortland, New York, 30,46,1967.

15. Halver, J. E., Ashley, L. M., and Smith, R. R., Ascorbic acid requirements of coho salmon and rainbow trout, *Trans. Am. Fish. Soc.,* 90, 762,1969.

16. Wilson, R. R and Poe, W. E., Impaired collagen formation in the scorbutic channel catfish, J. Nutr., 103,1359,1973.

17. Agrawal, N. K. and Mahajan, C. L., Nutritional deficiency disease in an Indian major carp, *Cirrhina mrigala* Hamilton, due to avitaminosis C during early growth, J. Fish. *Dis.*, 3,231,1980.

18. Soliman, A. K., Jauncey, K., and Roberts, R. H., The effect of dietary ascorbic acid supplementation on hatchability, survival rate and fry performance in *Oreochromis mossambicus* (Peters), *Aquaculture,* 59,197,1986.

19. Lim, C. and Lovell, R. T., Pathology of the vitamin C deficiency syndrome in channel catfish *(Ictalurus punctatus), J. Nutr.,* 108,1137,1978.

20. Soliman, A. K., Jauncey, K., and Roberts, R. H., The effect of varying forms of dietary ascorbic acid on the nutrition of juvenile tilapias *(Oreochromis niloticus), Aquaculture,* 52,1,1986.

21. Yamamoto, Y., Sato, M., and Ikeda, S., Existence of L-gulonolactone oxidase in some teleosts. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.,* 44,775,1978.

22. Moreau, R., Stockage tissulaire et utilisation de 1'acide ascorbique. Evaluation des symptomes de carence en vitamine C chez 1'esturgeon siberien *(Acipenser baeri),* Diplome d'Etudes Approfondies Biologie et Agronomic, Universite de Rennes I, France, 1992.

23. Dabrowski, K., Primitive Actinopterigian fishes can synthesize ascorbic acid, *Experientia, 50,* 745,1994.

24. Patterson, J. W. and Lazarow, A., Sulphydryl protection against dehydroascor-bic acid diabetes. *J. Biol. Chem.,* 186,141,1950.

25. Bianchi, J. and Rose, R. C., Dehydroascorbic acid and cell membranes: possible disruptive effects. *Toxicology,* 40, 75,1986.

26. Raghoebar, M., Huisman, J. A. M., van den Berg, W. B., and van Ginneken, C. A. M., Characteristics of the transport of ascorbic acid into leukocytes. *Life Sci.,* 40, 499,1987.

27. Pillsbury, S., Watkins, D., and Cooperstein, S. J., Effect of dehydroascorbic acid on permeability of pancreatic islet tissue *in vitro, J. Pharmacol. Exp. Ther.,* 185, 713,1973.

28. Bianchi, J. and Rose, R. C., Na+-independent dehydro-L-ascorbic acid uptake in renal brush-border membrane vesicles, *Biochim. Biophys. Acta,* 819, 75,1985.

29. Bode, A. M., Cunningham, L., and Rose, R. C., Spontaneous decay.of oxidized ascorbic acid (dehydro-L-ascorbic acid) evaluated by high pressure liquid chro-matography, *Clin. Chem.,* 36,1807,1990.

30. Jung, C. H. and Wells, W. W., Spontaneous conversion of L-dehydroascorbic acid to L-ascorbic acid and L-erythroascorbic acid. *Arch. Biochem. Biophys.,* 355, 9,1998.

31. Dabrowski, K., Matusiewicz, M., and Blom, J. H., Hydrolysis, absorption and bioavailability of ascorbic acid esters in fish, *Aquaculture,* 124,169,1994.

32. Dabrowski, K., Lackner, R., and Doblander, C., Effect of dietary ascorbate on the concentration of tissue ascorbic acid, dehydroascorbic acid, ascorbic sulfate and activity of ascorbate sulfate sulfohydrolase in rainbow trout *(Oncorynchus mykiss), Can. J. Aquat. Sci., 47,*1518,1990.

33. Hilton, J. W., Cho, C. Y., and Slinger, S. J., Effect of graded levels of supplemental ascorbic acid in practical diets fed to rainbow trout *(Salmo gairdneri), J. Fish. Res. Board Can.,* 35, 431,1978.

34. Dabrowski, K., Hinterleitner, S., Sturmbauer, C., El-Fiky, N., and Wieser, W., Do carp larvae require vitamin C, *Aquaculture, 71,* 295,1988.

35. Rose, R. C., Transport of ascorbic acid and other water-soluble vitamins, *Biochim. Biophys. Acta,* 947, 335,1988.

36. Crane, R. K., Hypothesis for mechanism of intestinal active transport of sugars, *Fed. Proc.,* 21,891,1962.

37. Bianchi, J., Wilson, F. A., and Rose, R. C., Dehydroascorbic acid and ascorbic acid transport systems in the guinea pig ileum. Am. *J. Physiol.,* 250, G461,1986.

38. Vera, J. C., Rivas, C.I., Fischbarg, J., and Golde, D. W., Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dedydroascorbic acid. *Nature,* 364, 79,1993.

39. Helbig, H., Korbmacher, C., Wohlfarth., Berweck, S., Kuhner, D., and

Wiederholt, M., Electrogenic Na-ascorbate cotransport in cultured bovine pig-mented ciliary epithelial cells. *Am. J. Physiol.,* 256, C44,1989.

40. Mellors, A. J., Nahrwold, D. L., and Rose, R. C., Ascorbic acid flux across

mucosal border of guinea pig and human ileum. *Am J. Physiol.,* 233 E374,1977.

41. Rose, R. C. and Choi J. L., Intestinal absorption and metabolism of ascorbic acid in rainbow trout. Am.,. *Physiol.,* 258, R1238,1990.

42. Rose, R. C., Li, J. K., and Koch, M. J., Intestinal transport and metabolism of oxidized ascorbic acid (dehydroascorbic acid). Am. *Physiol.,* 254, G824,1988.

43. Stevenson, N. and Brush, M., Existence and characteristics of Na^+dependent active transport of ascorbic acid in guinea pig. Am. *Clin. Nutr.,* 22,318,1969.

44. Schultz, S. G., Curran, P. R, Chez, R. A., and Fuisz, R. A., Alanine and sodium fluxes across the mucosal border of rabbit ileum, J. *Gen. Physiol.,* 50,1241,1967.

45. Schmitz, *J.,* Preiser, H., Maestracci, D., Ghosh, B. K., Cerda, J., and Crane, R. K., Purification of the human intestinal brush border membrane, *Biochim. Biophys. Acta,* 323,98,1985.

46. Kessler, M., Acuto, O., Storelli, C., Murer, H., Muller, H., and Semenza, G., A I modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles i from small intestinal brush border. Their use in investigating some properties of D-glucose and choline transport systems, *Biochim. Biophys. Acta,* 506,136,1978.

47. Crane, R. K., Boge, G., and Rigal, R., Isolation of brush border membranes in vesicular form from the intestinal spiral valve of the small dogfish *(Scyliorhinus canicula), Biochim. Biophys. Acta,* 554, 264,1979.

48. Eveloff, J., Field, M., Kinne, R., and Murer, H., Sodium-cotransport systems in intestine and kidney of the winter flounder,. *Comp. Physiol.,* 135,175,1980.

49. Storelli, C., Vilella, S., and Cassano, G., Na-dependent D-glucose and L-alanine transport in eel intestinal brush border membrane vesicles. Am. *Physiol.,* 251, R463,1986.

50. Reshkin, S. J. and Ahearn, G. A., Effects of salinity adaptation on glucose transport by intestinal brush border membrane vesicles of a euryhaline teleost. *Am. J. Physiol., 252,* R567,1987.

51. Scalera, V., Storelli, C., Storelli-Joss, C., Haase, W., and Murer, H., A simple and fast method for the isolation of basolateral plasma membranes from rat small intestinal epithelial cells, *Biochem. J.,* 186,177,1980.

52. Reshkin, S. J., Vilella, S., Cassano, G., Ahearn, G. A., and Storelli, C., Basolateral amino acid and glucose transport by the intestine of the teleost *Anguilla anguilla, Comp. Biochem. Physiol.,* 91A, 779,1988.

53. Reshkin, S. J., Vilella, S., Ahearn, G. A., and Storelli, C., Basolateral inositol transport by intestines of carnivorous and herbivorous teleosts. *Am. Physiol., 256,* G509,1989.

54. Vilella, S., Reshkin, S. J., Storelli, C., and Ahearn, G. A. Brush border inositol transport by intestines carnivorous and herbivorous teleosts. Am. *Physiol.,* 256, G501,1989.

55. Dabrowski, K. and Kock, G., Absorption of ascorbic acid and ascorbic sulfate and their interaction with minerals in the digestive tract of rainbow trout *(Onchorhynchus mykiss), Can. J. Fish. Aqua. Sci.,* 46,1952,1989.

56. Dabrowski, K., Gastrointestinal circulation of ascorbic acid, *Comp. Biochem. Physiol.,* 95A, 481,1990.

57. Patterson, L. T., Nahrwold, D. L., and Rose, R. C., Ascorbic acid uptake in guinea pig intestinal mucosa. *Life Sci.,* 31,2783,1982.

58. Maffia, M., Ahearn, G. A., Vilella, S., Zonno, V, and Storelli, C., Ascorbic acid transport by intestinal brush-border membrane vesicles of the teleost *Anguilla anguilla, Am. J. Physiol.,* 264, R1248,1993.

59. Siliprandi, L., Vanni, P., Kessler, M., and Semenza, G., Na^+-dependent, elec-troneutral L-ascorbate transport across brush border membrane vesicles from guinea pig small intestine, *Biochem. Biophys. Acta,* 552,129,1979.

60. Hornig, D., Weber, R, and Wiss, 0., Site of intestinal absorption of ascorbic acid in guinea pigs and rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun., 52,*168,1973.

61. Toggenburger, G., Hausermann, M., Mutsch, B., Genoni, G., Kessler, M., Weber, E, Homig, D., O'Neill, B., and Semenza, G., Na^+-dependent, potential-sensitive L-ascorbate transport across brush-border membrane vesicles from kidney cortex, *Biochim. Biophys. Acta,* 646,422,1981.

62. Kapoor, B. G., Smit, H., and Verghira, I. A., The alimentary canal and digestion in teleosts, in *Advances in Marine Biology,* Russell, F.S. and Younge, C.H., Eds., Academic, London,1975, vol. 13,102.

63. Maffia, M., Verri, T., Danieli, A., Thamotharan, M., Pastore, M., Ahearn, G.A., and Storelli, C., H^+-glycyl-L-proline cotransport in brush-border membrane vesicles of eel *{Anguilla anguilla)* intestine. *Am. J. Physiol., 272,* R217,1997.

64. Robinson, E. H., *Vitamin C studies ivith catfish: requirement, biological activity, and stability,* Mississippi Agricultural and Forestry Experimental Station, Tech. Bull. 182, Mississippi State, MS, 1992, 8.

65. Buddington, R. K., Puchal, A. A., Houpe, K. L., and Diehl, W. J. Ill, Hydrolysis and absorption of two monophosphate derivatives of ascorbic acid by channel catfish *Ictalurus punctatus* intestine, *Aquacnitnre,* 114, 317,1993.

66. Maffia, M., Acierno, R., Cillo, E., and Storelli C., Na^D-glucose cotransport by intestinal BBMVs of the Antarctic fish *Trematomus bernacchii, Am. J. Physiol.,* 271, R1576,1996.

67. Ahearn, G.A. and Storelli, C., Use of vesicle techniques to characterize nutrient transport processes of the teleost gastrointestinal tract, in *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes,* Hochachka, P.W. and Mommsen, T.P., Eds, Elsevier Science, New York, 1994, vol. 3, chap. 43, 513.

68. El Naggar, G. O. and Lovell, R. T., L-ascorbyl-2-monophosphate has equal antiscorbutic activity as L-ascorbic acid but L-ascorbyl-2-sulfate is inferior to L-ascorbate for channel catfish, *J.Nutr.,121,1622,*1991.

69. Dabrowski, K., Lackner, R., and Doblander, C., Ascorbate-2-sulfate sulfohydro-lase in fish and mammal. Comparative characterization and possible involvement in ascorbate metabolism, *Comp. Biochem. Physiol. B,* 104, 717,1993.

70. Rose, R. C., Ascorbic acid transport in mammalian kidney. *Am. J. Physiol.,* 250, F627,1986.

71. Friedman, G., Sherry, S., and Ralli, E., The mechanism of the excretion of vitamin C by the human kidney at low and normal plasma levels of ascorbic acid, *J. Clin. Invest.,* 19, 685,1940.

72. Hediger, M. A., Coady, M. J., Ikeda T. S., and Wright, E. M., Expression cloning and cDNA sequencing of the Na glucose cotransporter. *Nature,* 330, 379,1987.

73. Hirayama, B. A., Wong, H. C., Smith, C. D., Hagenbuch B. A., Hediger, M. A., and Wright, E. M., Intestinal and renal Na glucose cotransporters share common structures. *Am. J. Physiol.,* 261, C296,1991.

74. Hagenbuch, B., Stieger, B., Fogere, M., and Mejer, P. J., Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na bile acid cotransport system, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* 88,10629,1991.

75. Kanai, Y. and Hediger, M. A., Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter, *'Nature,* 360, 467,1992.

76. Werner, A., Moore, M. L., Mantel, N., Biber, J., Semenza, G., and Murer, H., Cloning and expression of cDNA for a Na P;-cotransport system of kidney cortex, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* 88, 9608,1991.

77. Dyer, D. L., Kanai, Y, Hediger, M. A., Rubin, S. A., and Said, H. M., Expression of a rabbit renal ascorbic acid transporter in *Xenopus laevis* oocytes. *Am. J. Physiol.,* 267, C301,1994.

78. Tsukaguchi, H., Tokui, T., MacKenzie, B., Berger, U. V., Chen, H. Z., Wang, Y, Brubaker, R. R, and Hediger, M. A., A family of mammalian Na-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature,* 399, 70,1999.

79. Bigley, R., Wirth, M., Layman, D., Riddle, M., and Stankova, L., Interaction between glucose and dehydroascorbate transport in human neutrophils and fibroblasts. *Diabetes,* 32, 545,1983.

80. Ingermann, R. L., Stankova, L., and Bigley, R. H., Role of monosaccharide transporter in vitamin C uptake by placental membrane vesicles. *Am. J. Physiol.,* 250, C637,1986.

81. Padh, H. and Aleo, J. J., Characterization of the ascorbic acid transport by 3T6 fibroblasts, *Biochim. Biophys. Acta,* 901, 283,1987.

82. McLennan, S., Yue, D. K., Fisher, E., Capogreco, C., Heffernan, S., Ross, G. R., and Turtle, J. R., Deficiency of ascorbic acid in experimental diabetes. Relationship with collagen and polyol pathway abnormalities. *Diabetes,* 37, 359, 1988.

83. Washko, R and Levine, M., Inhibition of ascorbic acid transport in human neutrophils by glucose,;. *Biol. Chem.,* 267,23568,1992.

84. Birnbaum, M. J., Haspel, H. C., and Rosen, 0. M., Cloning and characterization of a cDNA encoding the rat brain glucose-transporter protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* 83,5784,1986.

85. Vera, J. C. and Rosen, 0. M., Functional expression of mammalian glucose transporters in *Xenopus laevis* oocytes: evidence for cell-dependent insulin sensitivity, *Mol. "'I. Biol.,* 9,4187,1989.

86. Vera, J. C., and Rosen, 0. M., Reconstitution of an insulin signaling pathway in *Xenopus laevis* oocytes: coexpression of a mammalian insulin receptor and three different mammalian hexose transporters, *Mol. Cell. Biol., 10,* 743,1990.

87. Thorens, B., Sarkar, H. K., Kaback, H. R., and Lodish, H. F., Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. *Cell,* 55,281,1988.

88. Hediger, M. A. and Rhodes, D. B., Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters, *Physiol. Rev.,* 74,993,1994.

89. Rumsey, S. C., Kwon, 0., Xu, G. W., Burant C. F., Simpson, I., and Levine, M., Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid, J. *Biol. Chem.,* 272,18982,1997.

90. Dabrowski, K., Absorption of ascorbic acid and ascorbic sulfate and ascorbate metabolism in common carp *(Cyprinus carpio* L.), *J. Comp. Physiol. B,* 160,549, 1990.

91. Palmiter, R. D., Brinster, R. L., Hammer, R. E., Trumbauer, M. E., Rosenfeld, M. G., Birnber, N. C., and Evans, R. M., Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes, *Nature,* 300, 611,1982.

92. Chen, T. T. and Powers D. A., Transgenic fish. *Trends Biotechnol.,* 8, 209,1990.

93. Hew, C. L. and Fletcher, G. L., *Transgenic fish,* World Scientific, Singapore, 1992.

94. Ozato, K., Inoue, K., and Wakanatsu, Y, Transgenic fish: biological and technical problems, Zoo. *Sci.,* 6, 445,1989.

95. Ozato, K., Kondoh H., Inohara H., Iwamatsu T., Wakamatsu Y., and Okada T. S., Production of transgenic fish: introduction and expression of chicken delta-crystallin gene in medaka *(Oryzias latipes)* embryos. *Cell Differ.,* 19, 237,1986.

96. Shigekawa, K. and Dower, W. J., Electroporation of eukaryotes and prokaryotes:a general approach to the introduction of macromolecules into cells, *BioTechniqiies,* 6,742,1988.

97. Feigner, P. L., Gadek, T. R., Holm, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrup, J. P., Ringold, G. M., and Danielsen, M., Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 7413,1987.

98. Varmas, H., RNA Tumor Viruses, Weiss, R. and Coffin, J., Eds., Cold Spring Harbor, 1982,363.

99. Maclean, N., Penman D., and Zhu Z., Introduction of novel genes into fish, Flo,Technology, 5,257,1987.

100. Brem, G., Brenig, B., Horstgen-Schwark, G., and Winnacker, E.L., Gene transfer in tilapia (Oreochromis nlloticus), Aquaculture, 68,209,1988.

«فصل ١٦»

اثرات ویتامین «ث» بر رفتار ماهیان

Shunsuke Koshio

١-١٦- مقدمه

تولید انواع بچه ماهیان به منظور رهاسازی به دریا و نیز تامین بچه ماهی مورد نیاز مزارع پرورشی از سابقه طولانی در کشور ژاپن برخوردار است (جدول ١-١٦). از آنجایی که انتقال لاروها و بچه ماهیانی که به طور مصنوعی در تفریخگاه‌ها پرورش یافته‌اند به زیستگاه‌های طبیعی امر بسیار مهم و حساسی می باشد، بچه ماهیان باید دارای برخی از خصوصیات مانند وضعیت ظاهری طبیعی، متابولیسم استاندارد پایین، تطابق سریع نسبت به تغییرات محیطی، سلامت کافی و مقاومت در برابر بیماری‌ها باشند تا توان فرار از دست شکارچیان را داشته باشند که این موضوع در ارتباط قوی با رفتارهای عادی مختص گونه‌ای - به منظور حفظ نرخ بالای زنده مانی و رشد در محیط‌های آبی پس از رهاسازی- می باشد (١).

اخیراً مطالعات چندی پیرامون ارتباط بین کیفیت بچه ماهیان و الگوهای رفتاری، جهت تعیین چگونگی بهبود کیفیت آنها انجام شده است. این مطالعات نشان می‌دهد که کارایی بازسازی ذخایر به طور قابل توجهی از الگوهای رفتاری ماهیان به جای عملکرد عمومی آنها اثر می پذیرد(٢).

جدول۱-۱٦: تولید بچه ماهیان گونه‌های مهم پرورش یافته به منظور بازسازی ذخائر و پرورش در ژاپن (۱۹۹٦)

تعداد بچه ماهیان تولید شده × ۱۰۰۰				
نام متداول	نام علمی	باز سازی	پرورش	مجموع
شانک قرمز	*Pagrus major*	۳۰۳۳۰	۸۸۷٦۲	۱۱۹۰۹۲
سیم سیاه دریایی	*Acanthopagrus schlegeli*	۱۱٦۳۰	٦٤۹	۱۱۰۱۹
Striped knifejaw	*Oplegnathus fasciantus*	٥٥	۲۱٦	۲۷۱
کفشک ماهی ژاپنی	*Parralichthys olivaceus*	۳۳٤۲۷	۱٤۲٤۰	٤۷٦٦۷
جک مخطط	*Caranx delicatissimus*	٦۰٥	۲۰۳۸	۲٦٤۳
دم زرد	*Seriola quinaueradiata*	٤٦٥	٤	٤٦۹

گزارش شده است که فاکتورهای محیطی همچون دما، شرایط تغذیه، شدت نور، عمق آب، ریتم های شبانه روزی (٥)، و تراکم ماهی (٤)، الگوی رفتاری ماهیان را کنترل می‌کنند. برای مثال، در شانک قرمز، بیشترین میزان زنده مانی پس از رهاسازی بچه ماهیان، در گروهی مشاهده شد که به عمل ترسانیدن بهترین پاسخ را می‌دادند. این رفتار سرعتی[1] منجر به افزایش میزان زنده مانی برای مدت طولانی تر در محیط شده یا تناوب بالای این رفتار می تواند اجتناب از شکارشدن را منجر شود (٥، ٦). به علاوه، Furuta (۷) بیان نمود که توانایی پرهیز از شکارچی در ماهی کفشک ماهی ژاپنی وحشی در مقایسه با ماهیان پرورشی، بالاتر است. بنابراین تولید بچه ماهیانی با توانایی های مناسب تغذیه ای و همچنین پرهیز از شکارچی، مانند هم گونه‌های وحشی خود، طی مدت تولید بچه ماهیان، بسیار حایز اهمیت است.

مغز یکی از اندام‌های بسیار مهم در کنترل رفتار ماهیان می‌باشد و بسیاری از مواد مغذی مسئول حفظ عملکردهای رفتاری طبیعی در جانوران هستند. ریز مغذی ها مانند اسیدآسکوربیک، DHA (اسید دکوزاهگزانوئیک) و فسفولیپیدها در مقادیر زیادی نسبت به سایر مواد مغذی در مغز وجود دارند (۸). با این وجود، اطلاعاتی در مورد فاکتورهای تغذیه‌ای وجود ندارد که الگوهای رفتاری ماهیان را کنترل

[1] Tilting

می‌کنند. مطالعات انجام شده روی پستانداران حاکی از آن است که آسکوربات به عنوان یک میانجی عصبی عمل نموده و بر انتقال عصبی، نورآدرژیک، دوپامینرژیک و کلینرژیک اثر می‌گذارد (۹- ۱۱). در اینجا اثر دو ماده مغذی اسیدآسکوربیک و DHA را بر تغییرات الگوهای رفتاری ماهیان بررسی می کنیم.

مطالعات انجام گرفته بر ماهیان آیو *Plecoglossus altivelis*، دم زرد *Seriola quinaueradiata* و شانک قرمز *Pagrus major* بررسی می شوند و نظریات و مشکلات موجود در این زمینه به مورد بحث گذارده می شود. همچنین نکاتی پیرامون بهبود کیفیت لارو عنوان می شود که این مورد را می توان با خوراندن ریز مغذی ها کنترل نمود.

۲-۱۶- تاریخچه

این فصل، پیشرفت‌های اخیر در زمینه نقش اسیدآسکوربیک در ارتباط با الگوهای رفتاری ماهیان بررسی می‌کند که ممکن است بر کارایی بازسازی ذخایر موثر باشد. میزان زنده مانی و تطابق پذیری به زیستگاه‌های طبیعی پس از رهاسازی، منوط به رفتار طبیعی ماهیان است. آزمایشهای مربوطه جهت بررسی این موضوع انجام شدند که آیا میزان اسیدآسکوربیک جیره غذایی قادر به تغییر الگوهای رفتاری ماهیان آیو، دم زرد ژاپنی و شانک قرمز می‌باشد.

در ماهیان آیو کوچکتر، رفتار شنای دسته جمعی(اسکولینگ)[1] و فاصله از نزدیک ترین ماهی مجاور در ماهیانی که با جیره‌های غذایی حاوی ۱٤٤ mg AA/kg تغذیه شده بودند، بالاترین میزان را نشان داد. رفتار تهاجمی و فاصله تا نزدیک ترین ماهی مجاور در ماهیان آیو بزرگتر، در ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی مکمل اسیدآسکوربیک بیشتر از ماهیانی بود که از جیره‌های فاقد اسیدآسکوربیک تغذیه نموده بودند. اگرچه، ماهی آیو تغذیه شده با جیره‌های غذایی فاقد اسیدآسکوربیک، رفتار شنای دسته جمعی را نشان ندادند ولی ماهیان انگشت قد دم زرد ژاپنی با بالاترین میزان اسیدآسکوربیک مغزی، الگوهای رفتاری مشابه ماهیان وحشی را از خود نشان دادند و مقاومت بالاتری در برابر استرس ها داشتند. شانک قرمز، الگوهای رفتاری تهاجمی مختلفی را تحت

[1] Schooling

دریافت میزان متغیر اسیدآسکوربیک از خود نشان داد، ولی این موضوع، با توجه به میزان DHA جیره غذایی متفاوت بود. درصد رفتار تهاجمی با افزایش میزان اسیدآسکوربیک افزایش یافت ولی این رفتار زمانی که میزان DHA جیره غذایی در حدود ۳/۲ درصد بود، تحت تاثیر اسیدآسکوربیک دریافتی نبود. مقادیر DHA جیره غذایی بر طول مدت رفتار تهاجمی اثری نداشت ولی طی تغذیه با جیره غذایی فاقد ویتامین ث، این زمان در کوتاه ترین مقدار خود قرار داشت. به علاوه پس از یک آزمایش ٦ هفته‌ای، رفتار تهاجمی تحت تاثیر میزان اسیدآسکوربیک تغذیه ای نبود و میزان آن در ماهیانی که با جیره غذایی حاوی بیش از ٤٠mg AA/kg و۳/۲ درصد DHA تغذیه شده بودند، بیشترین میزان بود.

۳-١٦- مطالعات انجام شده پیرامون اثرات جذب ویتامین ث بر رفتار ماهیان

ما از ۲- منوفسفات منیزیم L- آسکوربیل (AMP) به عنوان منبع ویتامین ث به دلیل زیست فراهمی مناسب، کارایی بالا و کاربرد آسان آن در جیره غذایی استفاده نمودیم.

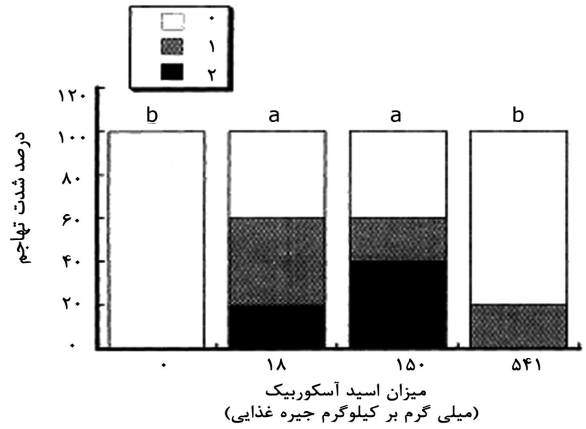
۱-۳-١٦- ماهی آیو جوان (*Plecoglossus altivelis*)

ما آزمایشهای مربوط به رفتارشناسی ماهیان را جهت بررسی اثرات اسیدآسکوربیک بر ماهیان آیو با وزن ۱۰ گرم انجام دادیم (۱۲). چهار جیره غذایی آزمایشی حاوی AMP - به عنوان منبع ویتامین ث - با مقادیر صفر، ۳۹، ۳۲۷ و ۱۱۷٦ میلی گرم در هر کیلوگرم جیره غذایی (معادل صفر، ۱۸، ۱۵۰ و ٥٤١ میلی گرم اسیدآسکوربیک به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی) تهیه نمودیم. در آزمایش غذادهی، ۲۵۰ قطعه ماهی را در یک مخزن گرد پلی اتیلنی ۵۰۰ لیتری با سیستم آب جاری شیرین، قرار دادیم وآنها را برای مدت ۳٦ روز با جیره‌های غذایی مورد نظر تغذیه نمودیم. در پایان مدت مذکور، به طور تصادفی چند ماهی را برای آزمایش رفتاری انتخاب نمودیم و رفتار شنای دسته جمعی آنها را با استفاده از دوربین فیلم برداری با ده قطعه ماهی از هر تکرار آزمایشی، بررسی نمودیم.

هیچ نوع ارتباطی بین رفتار پرشی[1] (۱۳) و نگه داری در هوا[2] (میزان زنده مانی بعد از تماس با هوا)،

[1] Jumping behavior
[2] Air dive

و فعالیت شنا (١٤) در ماهی آیو با دریافت ویتامین ث وجود نداشت. اگرچه ماهیانی که جیره غـذایی فاقد ویتامین ث را خورده بودند، فاقد رفتار شنای دسـته جمعـی بودنـد. رفتـار تهـاجمی و فاصـله از نزدیک ترین ماهی مجاور در ماهیانی که از جیره های غذایی حـاوی مکمـل اسیدآسـکوربیک تغذیـه نموده بودند، نسبت به ماهیان تغذیه شده با جیره‌های فاقد اسیدآسکوربیک، بیشتر بـود. بـویژه ماهیـان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی mgAA/kg ۱۵۰، بیشترین میـزان رفتـار تهـاجمی را نـشان دادنـد (شکل١٦-١). از آنجایی که ماهی آیو وحشی با وزن بیشتر از ۱۰ گرم رفتار تهاجمی را به منظور حفظ محیط قلمروی خود نشان می‌دهند، خوراندن میزان بالای ویتـامین ث بـه مـاهی آیـوی پرورشـی بـه صورت مصنوعی، می‌تواند رفتار تهاجمی مشاهده شده ماهیان وحشی را در ماهیـان اهلـی پرورشـی ایجاد نماید.



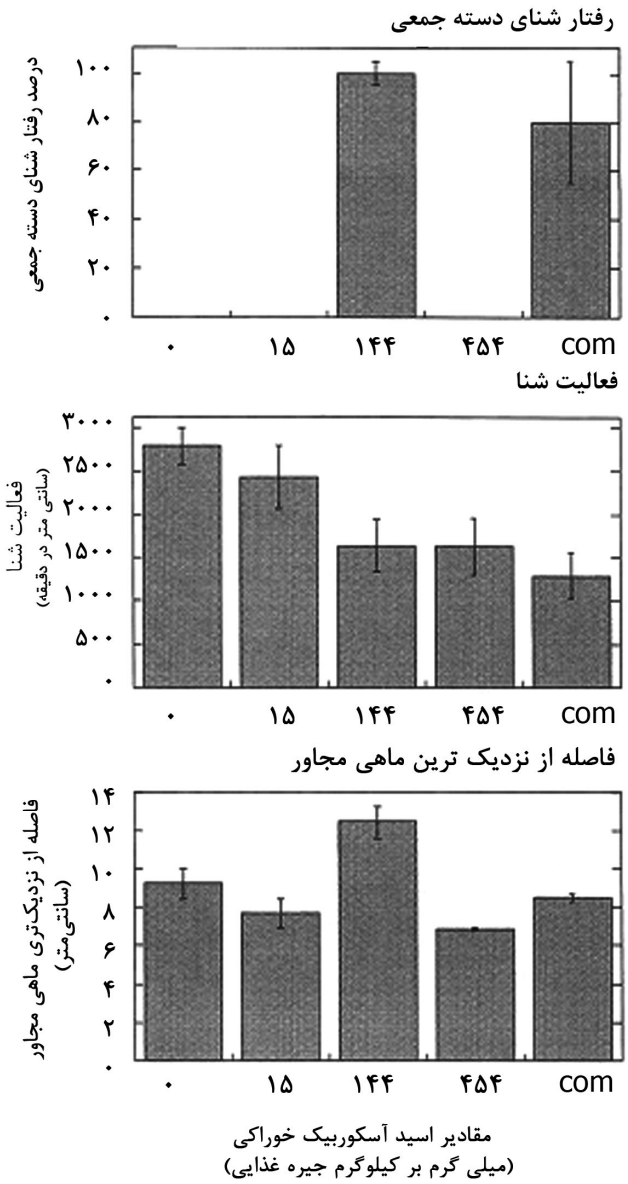
شکل ١-١٦ : رفتار تهاجمی ماهی آیو تغذیه شده با جیره‌های حـاوی مقـادیر مختلـف اسیدآسـکوربیک، برای مدت ٣٦ روز. ستون‌ها با حروف یکسان فاقد اخـتلاف معنـی دار هـستند (P>٠/٠٥). ٠: فاقـد رفتـار تهاجمی، ١: رفتار تهاجمی کم، ٢: رفتار تهاجمی شدید

۲-۳-۱۶ - بچه ماهیان آیو (*Plecoglossus altivelis*)

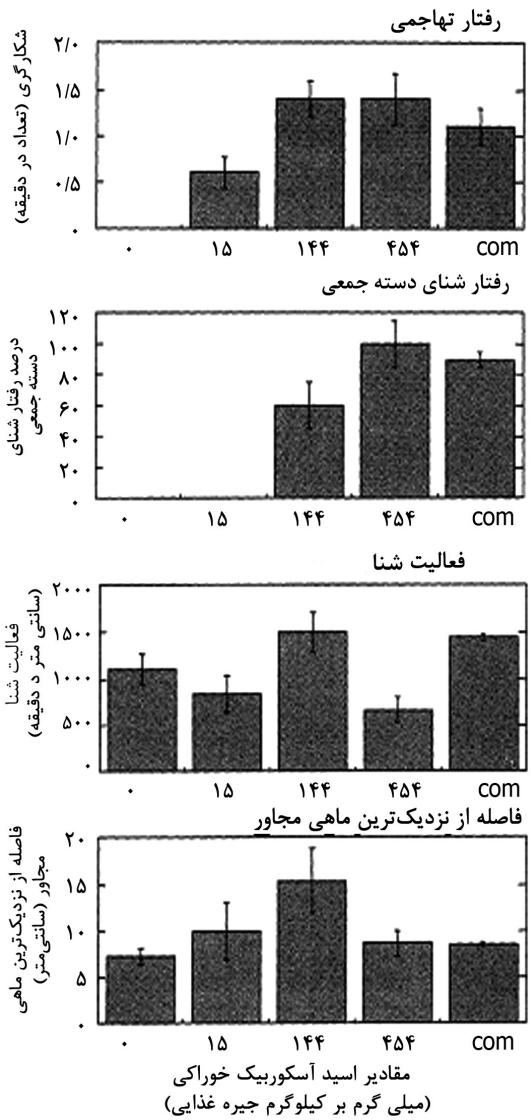
ما چهار جیره غذایی حاوی مقادیر صفر، ۱۵، ۱٤٤ و ٤٥٤ mg AA/kg جیره غذایی را تهیه کردیم (۱۵) و این جیره‌ها را به ترتیب به مدت ۳۰ و ۱۳۰ روز به ماهیان آیو سه گرمی خوراندیم. مخازن گرد ۳۰۰ لیتری آب شیرین فیلتر شده با دبی ۲ لیتر در دقیقه - با دمای ۱۲ درجه سانتی گراد - را دریافت می کردند.

پس از گذشت ۳۰ روز از آزمایش، به طور تصادفی ۱٦۰ قطعه ماهی از هر تیمار برای بررسی رفتار پرشی و ٤۰ عدد برای آزمایش فعالیت شنا، ۱۰ عدد ماهی برای بررسی نگه داری در هوا و ۱۰ عدد برای بررسی رفتار دسته جمعی انتخاب شدند. در روز ۳۰ اُم آزمایش، ماهیان آیو زنده مانی بسیار خوبی داشتند (میزان زنده مانی بیشتر از ۹۵ درصد) و علائم کمبود ویتامین ث مشاهده نشد. ضریب چاقی در ماهیانی که جیره‌های غذایی حاوی ۱٤٤ میلی گرم اسیدآسکوربیک را دریافت کرده بودند، در بالاترین میزان قرار داشت و غلظت‌های کبدی و مغزی با افزایش میزان دریافت اسیدآسکوربیک، افزایش یافت. نرخ رفتار شنای دسته جمعی و فاصله از نزدیکترین ماهی مجاور در ماهیانی که با جیره غذایی حاوی ۱٤٤ میلی گرم اسیدآسکوربیک تغذیه شده بودند، بالاترین میزان بود در حالیکه فعالیت شنا و رفتار پرشی تحت تاثیر میزان دریافت ویتامین ث نبود (شکل۲-۱٦). در روز ۱۳۰ اُم آزمایش، رفتار تهاجمی در ماهیانی که با جیره غذایی حاوی ۱٤٤ و ٤٥٤ میلی گرم اسیدآسکوربیک تغذیه شده بودند، در بالاترین میزان خود بود (شکل۳-۱٦) و فعالیت شنا و فاصله از نزدیک ترین ماهی مجاور در ماهیانی که جیره غذایی حاوی ۱٤٤ میلی گرم اسیدآسکوربیک را دریافت کرده بودند، بالاترین بود. همچنین ما غلظت کورتیزول پلاسما را جهت بررسی شرایط استرس ماهیانی که با جیره‌های غذایی آزمایشی به مدت ۳۰ و ۱۳۰ روز تغذیه شده بودند، اندازه گیری کردیم و نتایج نشان داد که (شکل ۱٤-٤) در بررسی سی روزه، غلظت کورتیزول در ماهیان تغذیه شده با ۱٤٤ میلی گرم اسیدآسکوربیک در پایین ترین میزان قرار دارد و ماهیانی که از جیره غذایی با کمتر از ٤۰ میلی گرم اسیدآسکوربیک تغذیه شده بودند، غلظتهای بالاتری را نشان دادند که مبین آن است که ماهیان تغذیه شده با ۱٤٤ میلی گرم اسیدآسکوربیک،کمتر تحت تاثیر استرس قرار داشته اند و می‌تواند در ارتباط با عملکرد رفتاری بهتر باشند. در یک آزمایش ۱۳۰ روزه، ماهیانی که جیره غذایی حاوی ۱٤٤ میلی گرم اسیدآسکوربیک را خورده بودند، بالاترین میزان کورتیزول را نشان دادند که این مقدار بالاتر، می‌تواند

مربوط به رفتار تهاجمی بیشتری باشد که در این گروه مشاهده گردید. بعلاوه، آزمایش مواجهه با باکتری*Vibrio anguillarum*، در ماهیانی انجام شدکه جیره غذایی آزمایشی را برای مدت ۱۳۰ روز دریافت کرده بودند.۱۰ ماهی از هر تیمارآزمایشی بطور تصادفی انتخاب و در معرض یک سوسپانسون باکتریایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۳/٦ درجه سانتی گراد قرار گرفت و سپس به مخزن پرورشی جهت ارزیابی زنده مانی منتقل گردید. در گروهی از ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی فاقد اسیدآسکوربیک، تنها ۲۰-۱۰ درصد ماهیان زنده ماندند. درحالیکه در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی بیشتر از ۱٤٤ میلی گرم اسیدآسکوربیک، میزان زنده مانی طی ۱۰۰ ساعت در حدود ۹۰ درصد بود.



شکل۲-۱۶ : نرخ رفتار شنای دسته جمعی (درصد)، فعالیت خودبخودی(شنا) (cm/min) و فاصله از نزدیکترین ماهی مجاور (cm) در ماهی آیو تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی مقادیر مختلف اسیدآسکوربیک برای مدت ۳۰ روز



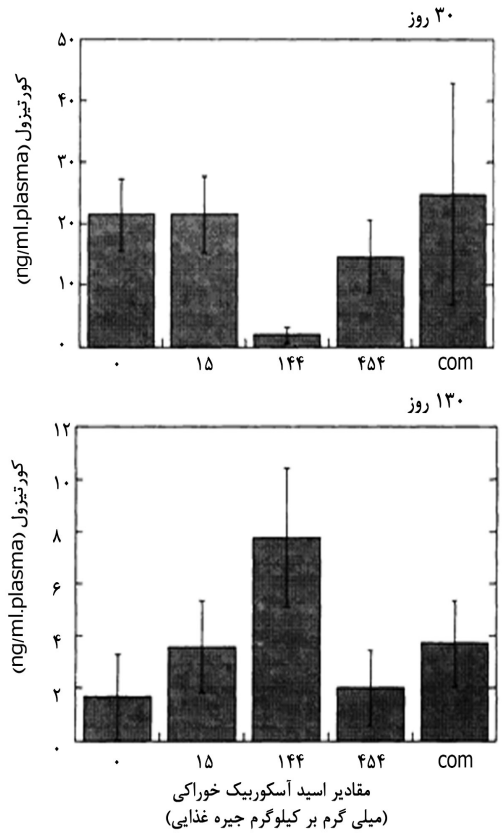
شکل ۳-۱۶: رفتار تهاجمی (شکارگری، تعداد در دقیقه)، نرخ رفتار شنای دسته جمعی (درصد)، فعالیت شنا (سانتی متر در دقیقه) و فاصله از نزدیک‌ترین ماهی مجاور (سانتی متر) در آیو تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی مقادیر متفاوت ویتامین ث برای مدت ۱۳۰ روز

۳-۳-۱۶- بچه ماهیان انگشت قد دم زرد ژاپنی (*Seriola quinqueradiata*)

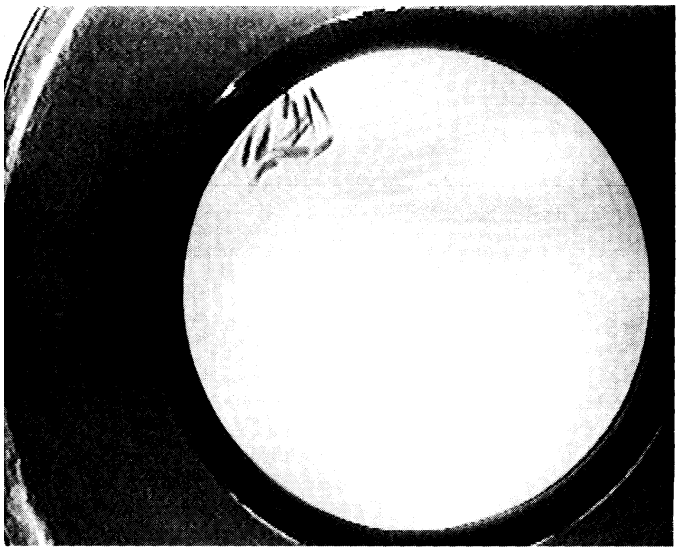
ما آزمایشهایی مشابه آنچه در بالا اشاره شد را در مورد ماهیان انگشت قد دم زرد ژاپنی انجام دادیم که با جیره‌های غذایی حاوی اسیدآسکوربیک در مقادیر ۰/۷، ۱۵۷، ٤٨٠ و ٨٨٢ میلی گرم در هر کیلوگرم جیره غذایی، تغذیه شده بودند. جیره‌های غذایی آزمایشی به ۵۰۰ عدد از بچه ماهیان (با متوسط طول کل ۳/٦ سانتی‌متر و وزن مرطوب ۰/٤ گرم) به ازای هر تیمار با مخازن دوگانه (مخازن دایره‌ای ۵۰۰ لیتری) به مدت ۲۰ روز، خورانده شد. دوره تقریبا کوتاه آزمایش بر اساس مشاهدات اولیه ما بود که طی آن اثر اسیدآسکوربیک بر رفتار ماهیان در مدت کوتاهی در مقایسه با آزمایش کمبود آن، ظاهر شد. پس از بیست روز آزمایش،۱۰ تا ۲۰ قطعه از بچه ماهیان بطور تصادفی از هر تیمار برای آزمایش نگه داری در معرض هوا و رفتار دسته جمعی، انتخاب شدند. ما آزمایش نگه داری در معرض هوا را به منظور تعیین میزان مقاومت در برابر استرس با شمارش تعداد ماهیان زنده مانده پس از تماس با هوا، انجام دادیم. ما رفتار دسته جمعی مانند الگوی رفتار شنای دسته جمعی، فعالیت شنا و فاصله از نزدیک ترین ماهی مجاور را با استفاده از سیستم‌های ویدیویی ضبط کردیم و اطلاعات حاصله را با استفاده از سیستم‌های گرافیکی رایانه‌ای تجزیه و تحلیل نمودیم (۱۸).

زنده مانی ماهیان بیشتر از ۹۰ درصد بود و علایم کمبود اسیدآسکوربیک در هیچ یک از ماهیان طی بیست روز آزمایش مشاهده نشد. دریافت مقادیر متفاوت اسیدآسکوربیک بر رشد اثری نداشت و مقاومت در برابر استرس تماس با هوا در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های غذایی فاقد اسیدآسکوربیک، ضعیف بود در حالیکه در ماهیانی که جیره‌های غذایی حاوی بیش از ٤٨٠ میلی گرم اسیدآسکوربیک به ازای هر کیلوگرم را دریافت کرده بودند، مقاومت بیشتری در برابر تماس با هوا داشتند. شکل های ۵-۱۶ و٦-۱۶، الگوهای رفتار دسته جمعی و تهاجم معمول دم زرد را نشان می‌دهند. میزان حرکت شنای دسته جمعی به میزان معنی داری در ماهیانی بالاتر بود که با جیره‌های غذایی آزمایشی حاوی ٨٨٢ mg AA/kg -٤٨٠ تغذیه شده بودند (شکل۷-۱۶). زمانی که غلظت‌های اسیدآسکوربیک مغز و کبد بررسی شدند، مشخص شد که غلظت ویتامین در مغز با افزایش دریافت اسیدآسکوربیک، افزایش یافته است درحالیکه غلظت مغزی در ٤٨٠ mg/kg ثابت بود. این بررسی نشان می‌دهد که بچه ماهیان دم زرد ژاپنی با بالاترین میزان آسکوربیک اسید مغزی – طی تغذیه از جیره‌های غذایی حاوی ٤٨٠ mg AA/kg الگوهای رفتاری مشابه با ماهیان وحشی را نشان می‌دهند و مقاومت

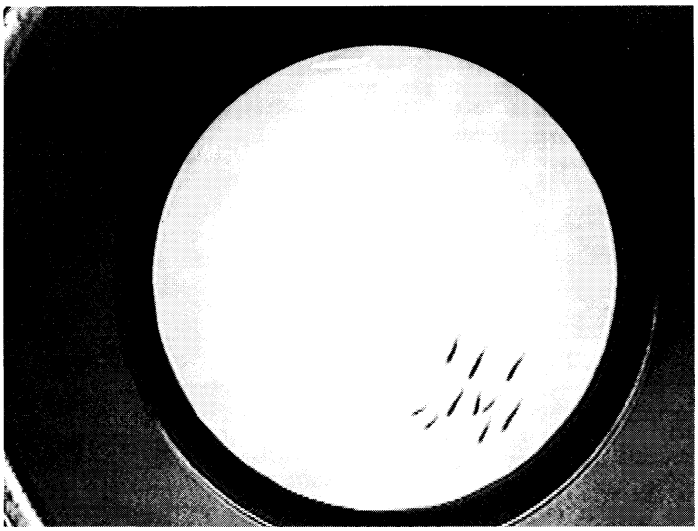
بیشتری در برابر استرس دارند. به عبارت دیگر، گمان می‌رود که بچه ماهیان دم زرد تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی ٤٨٠ mg AA/kg، می‌توانند پس از رهاسازی، رشد و زنده مانی بهتری را در شرایط طبیعی از خود نشان دهند.



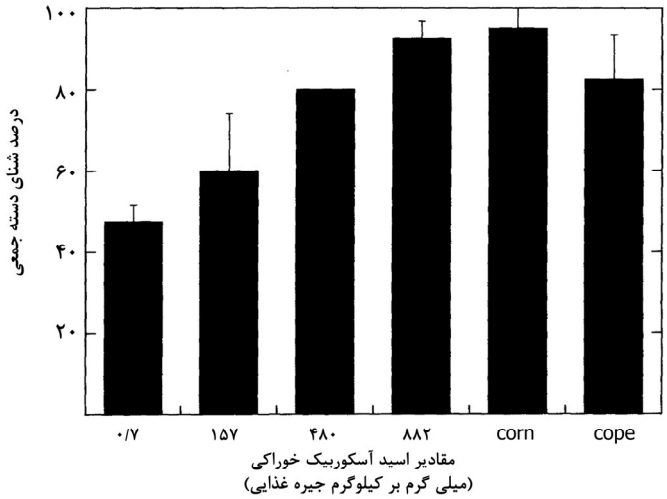
شکل ٤-١٦: غلظت کورتیزول پلاسما (ng/ml) در ماهی آیو تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی مقادیر متفاوت ویتامین ث برای مدت ۳۰ و ۱۳۰ روز



شکل۵-۱٦: الگوی رفتار تهاجمی ماهی دم زرد ژاپنی تغذیه شده با جیره غذایی حاوی اسیدآسکوربیک



شکل٦-۱٦ الگوی رفتار شنای دسته جمعی ماهی دم زرد ژاپنی تغذیه شده با جیره غذایی حاوی اسیدآسکوربیک



شکل ۷-۱٦: نرخ رفتار تجمعی (درصد) در ماهی دم زرد تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی مقادیر مختلف اسیدآسکوربیک برای مدت ۲۰ روز

٤-۳-۱٦- بچه ماهیان شانک قرمز (*Pagrus major*)

ما رفتار سرعتی بچه ماهیان شانک قرمز (۲/٦ گرم) را طی تغذیه از جیره‌های غذایی حاوی صفر، ٤۰، ۲۱۰ و ۱۰۰۰ mg AA/kg همراه با دو سطح از DHA (۱/٦ و ۳/۲ درصد) بررسی نمودیم (۱۷). به منظور جلوگیری از برخورد ماهیان در مخازن، پرورش آنها به صورت انفرادی انجام گرفت و تناوب و طول مدت این رفتار بعد از ۱٤ روز بررسی گردید.

شانک قرمز الگوهای مختلفی از این رفتار را در نتیجه دریافت مقادیر متفاوت ویتامین ث از خود نشان می دهد ولی این موضوع به میزان DHA جیره غذایی نیز وابسته بود. برای مثال، درصد این رفتار در ماهیان با افزایش میزان دریافت اسیدآسکوربیک افزایش یافت و بالاترین درصد در ماهیانی مشاهده گردیدکه جیره غذایی حاوی ۱۰۰۰ mg را خورده بودند در حالیکه درصد این رفتار توسط میزان اسیدآسکوربیک جیره غذایی زمانیکه جیره حاوی ۳/۲ درصد DHA بود، تغییری نداشت.

مقادیر DHA جیره غذایی بر مدت زمان رفتار، اثری نداشتند ولی طی تغذیه از جیره غذایی فاقد اسیدآسکوربیک، میزان آن در پایین ترین حد خود قرار داشت. بعلاوه، پس از یک آزمایش مدت شش هفته ای، طول مدت این رفتار تحت تاثیر میزان اسیدآسکوربیک جیره غذایی بود که بر اساس آن در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی بیشتر از ٤٠ میلی گرم اسیدآسکوربیک و ۳/۲ درصد DHA، میزان آن بالاتر بود.

٤-١٦- بحث و نتیجه گیری

از آنجایی که مطالعات ما بیان می دارد که رفتار پیچیده‌ای همچون رفتارهای دسته جمعی و سرعتی که توسط سیستم عصبی مرکزی کنترل می‌شوند، از دریافت ویتامین ث و DHA اثر می‌پذیرند، ما پیشنهاد می کنیم که ممکن است هر دو این ترکیبات به عنوان تنظیم کننده ناقل عصبی در ماهیان عمل کنند و دریافت ناکافی این مواد مغذی ممکن است توزیع غیر عادی آنها در مغز را باعث شده که منجر به بروز مشکلاتی در سیستم عصبی در ارتباط با کنترل رفتار شود. همچنین با کنترل مقادیر ویتامین ث و DHA جیره غذایی، بهبود کیفیت ماهیان و بنابراین زنده مانی بالاتر و تطابق سریع به زیستگاه طبیعی پس از بازسازی ذخایر، مقدور است. با این وجود مطالعات اندکی پیرامون ارتباط بین مصرف مواد مغذی و رفتار ماهیان وجود دارد و بنابراین مطالعات بیشتری برای درک کامل مکانیزم‌های موجود در این حوزه از فیزیولوژی ماهی، لازم است.

تشکر و قدر دانی

مولف بر خود لازم می‌داند که از دکتر Y. Sakakura، دکتر K. Tsukamoto، دکتر J. Blom، دکتر K. Dabrowski، آقای Y. Iida و T. Kida و دانشجویان آزمایشگاه تغذیه آبزیان دانشکده شیلات دانشگاه Kagoshima کمال تشکر و قدردانی را داشته باشد. بدون تلاش و همیاری این عزیزان، این بخش از کتاب آماده نمی شد.

منابع

1. Nakano, H., Criteria for evaluating healthy fry for release, in *Healthy Fry for Release, and Their Production Techniques,* Vol. *93,* Kitajima, C, Ed., Koseishakoseikaku, Tokyo,1993, 9. (in Japanese)

2. Tsukamoto, K., Fry quality, in *Healthy Fry for Release, and Their Production Techniques,* Vol. 93, Kitajima, C., Ed., Koseishakouseikaku, Tokyo, 1993,102. (in Japanese)

3. Uchida, K., Tsukamoto, K., and Kajihara, T., Effects of environmental factors on jumping behaviour of the juvenile Ayu Plecoglossus altivelis with special reference to their upstream migration, *Nippon Suisan Gakkaishi, 56,1393,*1990.

4. Tsukamoto, K., Uchida, K., Murakami, Y., Endo, M., and Kajihara, T., Density effect on jumping behavior and swimming upstream in the ayu juveniles, *Nippon Suisan Gakkaishi, 51,* 323,1985.

5. Uchida, K., Kuwada, H., and Tsukamoto, K., Tilting behavior, a fear response to frightening stimuli, AA possible predictive index for stocking effectiveness in the juveniles of red sea bream *Pagrus major*, Nippon Suisan Gakkaishi, 59,991,1993.

6. Yamaoka, K., Yamamoto, E., and Taniguchi, N., Tilting behavior and its learning in juvenile Red Sea Bream, *Pagrus major*, Bull. Mar. Sci. Fish. Kochi Univ., 14, 63, 1994.

7. Furuta, S., Predation on juvenile Japanese flounder (Paralichthys olivaceus) by diurnal piscivorous fish: Field observations and laboratory experiments, in *Survival Strategies in Early Life Stages of Marine Resources,* Watanabe, Y, Yamashita, Y, and Oozeki, Y, Eds., Balkema, Rotterdam, 1996, 285.

8. Ikeda, S., Sato, M., and Kimura, R., Biochemical studies on L-ascorbic acid in aquatic animals-II. Distribution in various parts of fish. *Bull. fpn. Soc. Sci. Fish.,* 29,765,1963.

9. Kuo, C., Hata, R, Yoshida, H., Yamatodani, A., and Wada, H., Effect of ascorbic acid on release of acetylcholine from synaptic vesicles prepared from different species of animals and release of noradrenaline from synaptic vesicles of rat brain. *Life Science,* 24, 911,1979.

10. Gardiner, T. W., Armstrong-James, M., Caan, A. W., Wightman, R. M., and Rebec, G. V, Modulation of neostriatal activity by iontophoresis of ascorbic acid, *Brain Research,* 344,181,1985.

11. Rebec, G. V. and Pierce, R. C., A vitamin as neuromodulator: ascorbate release into the extracellular fluid of the brain regulates dopaminergic and glutamater-gic transmission. *Prog. Neurobio.,* 43, 537,1994.

12. Koshio, S., Sakakura, Y, lida, Y, Tsukamoto, K., Kida, T., and Dabrowski, K., The effect of vitamin C intake on schooling behavior of amphi-dromous fish, ayu *(Plecoglossus altivelis), Fish. Sci.,* 63*, 619,*1998.

13. Tsukamoto, K. and Uchida, K., Spacing and jumping behaviour of the ayu, *Plecoglossus altivelis, Nippon Suisan Gakkaishi,* 56,1383,1990.

14. Tsukamoto, K., Masuda, S., Endo, M., and Otake, T., Behavioural characteristics of the ayu, *Plecoglossus altivelis,* as predictive indices for stocking effectiveness in rivers, *Nippon Suisan Gakkaishi,* 56,1177,1990.

15. Koshio, S., Sakakura, Y., lida, Y., Tsukamoto, K., and Kida, T., The role of vitamin C on the improvement of fish quality for stock enhancement—The effect of dietary vitamin C on Ayu juveniles. Fall Meeting of the Japanese Society of Fisheries Science, Kyoto, Sep. 27-30, 1995 (Abstract in Japanese).

16. Sakakura, Y., Koshio, S., lida, Y., Tsukamoto, K., Kida, T., and Blom, J. H., Dietary vitamin C improves the quality of yellowtail *(Seriola quinqeradiata)* seedlings, *Aquaculture,* 161, 427,1998.

17. Koshio, S., Blom, J. H., Nomoto, S., Tsukamoto, K., Kida, T., Ishikawa, M., and Teshima, S., The role of vitamin C on the improvement of fish quality for stock enhancement—the effect of dietary vitamin C and squid liver oil on the tilting behavior of red sea bream juveniles. Fall Meeting of the Japanese Society of Fisheries Science, Hiroshima, Sep. 27-30,1997 (Abstract in Japanese).

«فصل ۱۷»

مطالعات ویتامین ث در آبزیان: گذشته، حال و آینده

Konrad Dabrowski

چکیده

بایستی از باربارا مک لارن[1] به دلیل کشف او در سال ۱۹٤۷ در مورد ضرورت اسیدآسکوربیک برای ماهیان استخوانی، تقدیر کرد. این یافته، یک «کشف شگرف علمی» بود که تا سال ۱۹٦۹ مورد قبول همه واقع نشد ولی مطالعه‌ای پیرامون آزادماهیان نشان داد تغذیه ماهیان با جیره‌های غذایی فاقد ویتامین ث، موجب کاهش غلظت آسکوربات بافتی در آنها می شود. بسیاری از جنبه‌های متابولیسم ویتامین ث در ماهیان تا به امروز بحث برانگیز باقی مانده است و در این فصل برآنیم تا به بررسی برخی از نتایج بدست آمده در آزادماهیان در ارتباط با ساخت، هیدرولیز و فراهمی سولفات آسکوربیل بپردازیم. ترشح آسکوربات در شیره معده ای و باز جذب در روده فقط مختص پستانداران نبوده، اگرچه ماهیان فاقد یا واجد معده ممکن است به طور متفاوتی آسکوربات را جابه‌جا نمایند. معیارهای لازم در تعیین نیاز ماهیان به آسکوربات نیز مورد بررسی قرار گرفته‌اند و نتیجه گرفته شده

[1] Barbara McLaren

است که تاثیر پذیری زیاد ماهیان ناشی از اختصاصات تغذیه‌ای و مقاومت آنها به شرایط محیطی می باشد که به شکل ویژه‌ای، ایجاد شرایط یکسان به منظور انجام مقایسه فیزیولوژیک را مشکل می‌سازد. مکانیزم عمل آسکوربات بایستی فرضیه Peterkofsky. B و همکاران (۱۹۹۱) را در بر بگیرد که بیان داشت در جانوران دچار کمبود ویتامین ث، پروتئین‌های متصل به فاکتور رشد شبه انسولینی[1]، افزایش یافته اند و با اتصال به گیرنده‌های سلولی، مانع از ساخت کلاژن، پروتئوگلیکان و DNA می‌شوند. همچنین بایستی مطالعات پیرامون آزمایش امکان انتقال ماهی به ماهی (تاسماهیان به ماهیان استخوانی) ژن گلونولاکتون اکسیداز از طریق فن آوری تولید تراریخته ادامه یابد.

۱-۱۷- مقدمه

هدف از نگارش این فصل بیان خلاصه‌ای از مواردی است که به نظر نمی رسد در فصول قبلی بیان شده باشد ولی از ارزش زیادی در ارائه وضعیت کلی آسکوربات در آبزیان برخوردار است. بنابراین در اینجا در مورد برخی از جنبه‌های کشف ضرورت آسکوربات برای ماهیان و زمینه‌های مورد توجه در مورد نقش آسکوربات در ماهیان خواهیم پرداخت که تا کنون بحث برانگیز بوده اند و در نهایت به شناساندن زمینه‌هایی می پردازیم که کمک شایانی به فهم عملکرد ویتامین ث نموده اند.

۲-۱۷- تاریخچه

۱-۲-۱۷-کشف عملکرد اسیدآسکوربیک در ماهیان

چه اسیدآسکوربیک از طریق ساخت کلیوی یا کبدی موجود در اکثر مهره داران، تولید شود یا به جیره غذایی جانورانی مانند نخستیان یا ماهیان استخوانی افزوده شود، این ماده به تمام بافت‌ها انتقال خواهد یافت که در آنجا نقش حیاتی خود را به عنوان یک آنتی آکسیدان و یک کوفاکتور مهم در ساخت پروتئین و آمیداسیون[2] پپتیدها بازی می‌کند. توجه به کاهش سریع اسیدآسکوربیک در انسان‌ها که منجر به بیماری‌های وخیمی می‌شود (۱)، برای چندین قرن شناخته شده بود که در آغاز قرن بیستم نخست با معرفی خوکچه هندی به عنوان مدل جانوری مناسب (۲) که برای انجام چنین مطالعاتی

[1] Insulin-like growth factor-binding proteins
[2] Amidation

ضروری بود و بعد شناسایی خاصیت ضد کمبود ویتامین ث اسید هگزورونیک، بـه اوج خـود رسـید (۳). از طرفی، کینگ و واگ (٤) موفق شدند ماده شیمیایی خاصـی را از لیمـو تـرش جـدا کننـد (٤). بطور همزمان تشخیص ماهیت شیمیایی اسید هگزورونیک توسط Haworth و همکاران (٥) پـس از توصیف آزمایش های انجام شده توسط آلبرت گیورگی و همکارانش روی خوکچه هندی در دانشگاه Szeged مجارستان، انتشار یافت. در سال ۱۹۳۳، آلبرت گیورگی (٦) نام جدیدی برای ایـن ترکیـب پیشنهاد نمود، و این نام، **اسیدآسکوربیک** (AA) بود. اگرچه کـشف اسیدآسـکوربیک، توجـه جامعـه علمی را بخود معطوف ساخت ولی هنوز تناقض های علمی موجود در این زمینه بدون راه حل بـاقی مانده‌اند و اکثر محققین معتقدند که بایستی این افتخار به هر دوی آلبرت گیورگی و کینگ نـسبت داده شود (۷). در سال ۱۹۳۳، ریشستین [1] و همکاران (۸) توانـستند کـه ویتـامین ث را بـصورت شـیمیایی بسازند و در سال ۱۹۳۷ آلبرت گیورگی، هاورث و ریشستین موفق به دریافت جایزه نوبل شدند.

نخستین مشاهده در مورد اثرات کمبود ویتامین ث، مربوط به قزل آلاهای جویباری دارای لوردوزیس و زخم‌های شکمی بود که توسط مک کی [2] و تونیسون [3](۹) زمانی انجام شد که ماهیان به مدت ٤٤ هفته با وعده غذایی نگهداری شده در فرمالین ۱ درصد تغذیه شده بودند. سایر اجزای غذایی شامل (از هر کدام یک سوم) پودر پنبه دانه و شیرخشک بدون چربی بود. دکتر G.Rumsey در سال ۱۹۹۵ عنوان کرده بود:" ..... نمی دانیم که چه زمانی مک کی و تونیسون متوجه شدند که در حال کار روی چه چیزی هستند؟" و این موضوع قبل از زمانی بود که McLaren و همکاران (۱۰) (شکل ۱-۱۷) نشان دادند که فقدان ویتامین ث در جیره غذایی منجر به افزایش مرگ و میر، کاهش افزایش وزن و خونریزی در کبد، کلیه و روده می‌شود. McLaren و همکاران (۱۰) با استفاده از جیره‌های غذایی نیمه خالص جدید که متشکل از ۵۲ درصد کازئین، ۱۰ درصد ژلاتین، ۱۸ درصد دکسترین، روغن ذرت و کبد ماهی کاد، مواد معدنی و ویتامین‌ها بود، در یک آزمایش ١٦ هفته‌ای نشان دادند که میزان ۲۵۰ میلی گرم اسیدآسکوربیک در هر کیلوگرم جیره غذایی، می تواند نیاز بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان را مرتفع سازد.

---

[1] Reichstein
[2] McCay
[3] Tunison

سایر مطالعات انجام شده نتوانستند ضرورت اسیدآسکوربیک را برای آزادماهیان ثابت کنند، اگرچه یک گزارش جامع توسط Kitamura و همکاران (۱۲) نشان داد که عوارض اسکولیوزیس و لوردوزیس در سه گونه از ماهیان استخوانی یعنی قزل آلای رنگین کمان، کپور معمولی و گوپی بر اثر تغذیه با جیره غذایی کازئین- ژلاتین فاقد ویتامین ث ایجاد می‌شود که آخرین مدرکی بود که نشان می داد، برخلاف بسیاری از جانوران دیگر، بسیاری از ماهیان مستعد ابتلا به اسکوروی هستند. تحقیق Poston (۱۳) روی قزل آلای جویباری و Halver و همکاران (۱٤) روی آزاد ماهی کوهو و قزل‌آلای رنگین کمان، اطلاعات موجود در زمینه آسیب شناسی‌های مربوط به ویتامین ث و نقش این ویتامین در بهبود زخم را تایید نمود. همچنین تحقیق Halver در زمینه ویتامین ث در ماهیان، به جهت اینکه برای نخستین بار غلظت‌های بافتی اسیدآسکوربیک را طی تغذیه از مقادیر درجه بندی شده ویتامین ث جیره غذایی بدست آورده بود و اختلافات بین گونه‌های (قزل آلای رنگین کمان و آزادماهی کوهو) را با توجه به شدت کمبود ویتامین ث بیان نموده بود، با ارزش و مهم بودند. همچنین مشخص شد که غلظت‌های اسیدآسکوربیک کل در خون آزادماهی کوهو پس از ۲٤ ماه تغذیه با جیره غذایی فاقد ویتامین ث، ۲/۲ ± ۲۲/۳ µg/ml می باشد که برای شرایط مذکور فوق العاده بالا بود. احتمالاً عدم دقت روش رنگ سنجی مورد استفاده علت حصول چنین نتایج غیر منطقی بوده است.

به زودی گزارش های دیگری نیز در این زمینه منتشر شدند و در سال ۱۹۷۰، بیشتر گزارش های بیماری لوردوزیس و اسکولیوزیس در شرایط عملی تفریخگاه‌ها مرتبط با کمبود ویتامین ث بود (۱۵). اگرچه مجدداً، غلظت‌های اسیدآسکوربیک در جیره‌های غذایی و بافت‌های ماهی، فهرست بندی شد ولی مقادیر ارایه شده، با توجه به نارسایی های آنالیزی، دقیق نبودند. Primbs و Sinnhuber (۱٦) اظهار داشتند که اسیدآسکوربیک برای قزل آلای رنگین کمان، ضروری نبوده و آسیب شناسی‌های مشاهده شده مثل عوارض اسکوروی در اسکلت و غضروف (آبشش) به علت مصرف بیش از اندازه ویتامین A می‌باشد. در حقیقت این محققین تا حدودی درست می‌گفتند و سالها بعد ناهنجاری در تشکیل اسکلت در اثر مصرف بالای ویتامین A در کفشک ماهی ژاپنی ثابت شد (۱۷). Primbs و Sinnhuber (۱٦) از روش رنگ سنجی، دی نیتروفنیل هیدرازین (DNPH) استفاده نمودند و

اختلاف قابل توجهی را در غلظت‌های ویتامین در چندین بافت بین گروه شاهد (mg Vit ۱۲۰۰C/kg) و ماهیان آزمایشی مشاهده نمودند. مولفین این اختلافها را این گونه توجیه نمودند که ویتامین A مانع ساخت اسیدآسکوربیک می‌شود که تا آن زمان هیچ مطالعه ای، چنین جنبه ای از تغذیه ماهیان را مورد بررسی قرار نداده بود.گذشت زمان ثابت کرد که ایده Primbs و Sinnhuber (۱٦) درست نمی باشد زیرا در واقع آزاد ماهیان فاقد ژن گولونولاکتون اکسیداز می باشند و بنابراین به یک منبع خارجی ویتامین ث نیاز دارند.

شکل ۱-۱۷: دکتر Barbara A. McLaren، کاشف ضرورت اسیدآسکوربیک در جیره غذایی برای قزل آلای رنگین کمان در دانشگاه Wisconsin، Madison، در سال ۱۹٤۷. این عکس قبل از سال ۱۹۵۳ در شهر Pullman گرفته شده است.

۳-۱۷- وضعیت کنونی

۱-۳-۱۷- پیشرفت در آنالیز اسیدآسکوربیک

ما آنالیز اسیدآسکوربیک در بافت‌های ماهیان مثل مباحث حساسیت و تداخل های ممکنه را زمانیکه از روش‌های رنگ سنجی، بدون وجود گروه های شاهد مورد نیاز استفاده شده و همچنین روشهای

HPLC که منحصرا مبتنی بر زمان ماندگاری[1] بوده است را بررسی و مرور کرده‌ایم (۱۸). تداخل بین اسید اوریک، هیپوگزانتین یا گزانتین در سنجش‌های HPLC، بین سایر مواد نیز ممکن می‌باشد. از آن زمان به بعد، اصلاحات متعددی در این زمینه انجام شده است که موارد زیر را مقدور می‌سازد:

۱- آنالیز همزمان اسیدآسکوربیک و استرهای آن (۱۹-۲۱).

۲- اسیدآسکوربیک و دهیدروآسکوربات (۲۲-۲۳).

آنالیز همزمان اسیدآسکوربیک احیاء شده و آسکوربات اکسیده شده (DHA) از ارزش ویژه‌ای برخوردار می باشد به طوری که بحثها پیرامون ارتباط فیزیولوژیک نسبت اسیدآسکوربیک به اسید دهیدروآسکوربیک همچنان ادامه دارد (۲٤). Moeslinger و همکاران (۲۵) روش جدیدی را برای آنالیز مایعات فیزیولوژیک DHA (یا اسیدآسکوربیک کل پس از واکنش آسکوربات اکسیداز) به روش‌های قبلی افزودند که در روش آنها متانول در یک بافر فسفاته با pH ٦، سبب افزوده شدن گروه‌های کربونیل به کربن شماره ۲ و ۳ DHA می شد که در طول موج ۳٤٦ nm پایش می گردید. با حذف آهن واکنشی با استفاده از محلول دسفروکسامین[2]، نمونه ها پایداری لازم به منظور نگهداری برای مدت ۲٤ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی گراد را پیدا می کردند. Koshishi و همکاران (۲٦) اطلاعات مهمی را برای درک ما از رفتار DHA در مایعات بدن، تهیه نمودند. این محققین با استفاده از پس ستون‌های اشتقاق گر با بنزآمیدین[3] و به طور همزمان استفاده از دستگاه طیف سنج نوری فلورنست، مقادیر اسیدآسکوربیک، DHA و ۲، ۳- دی کتوگولونات را سنجش نمودند. حضور بی کربنات در پلاسمای خون موش صحرایی (۲۰-٤۰ mM) تجزیه DHA را افزایش می‌دهد و تقریبا ۸۵ درصد DHA تزریق شده بصورت وریدی، پس از شکسته شدن حلقه لاکتونی، در ادرار بازیافت می شود.

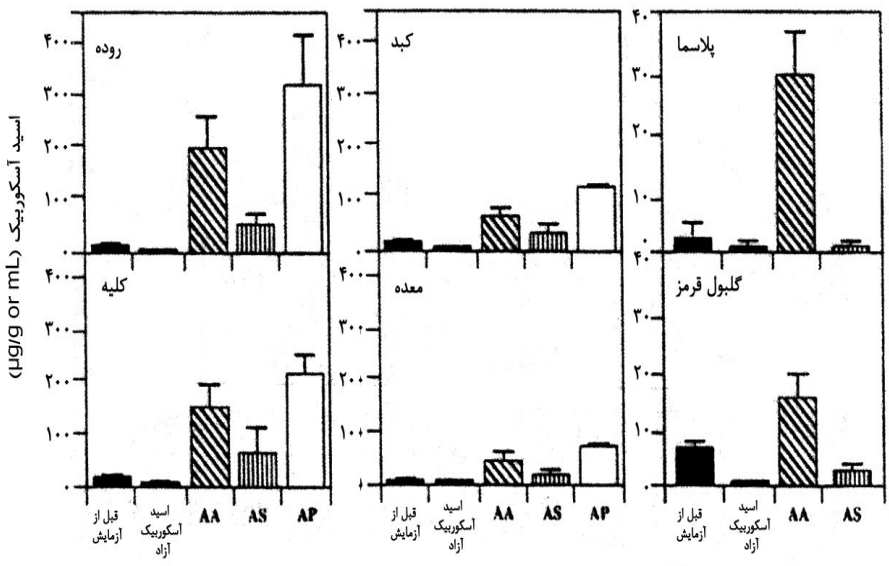
۲-۳-۱۷- حضور و استفاده از سولفات آسکوربیل (AAS) در ماهیان

سولفات آسکوربیل از استرهای طبیعی ویتامین ث در آبزیان است که شناخته شده ترین مورد آن

[1] Retention time
[2] Desferrioxamine
[3] Benzamidine

سیست‌های آرتمیا *Artemia salina*، می باشد (۲۷). انتقال خوراکی AAS به انسان‌ها (نفر/g ۷/۵-٦) منجر به ترشح ۲/۵ درصدی آن از ادرار طی ٤٨ ساعت می شود ولی اغلب آن، به درون مدفوع ترشح می گردد (۲۸). همین محققین، افزایش معنی دار اسیدآسکوربیک آزاد را در ادرار مشاهده نکردند و نتیجه گرفتند که تنها ۰/۱ درصد این ماده، هیدرولیز می شود. Mechlin و همکاران (۲۹) انتقال خوراکی و تزریق عضلانی AAS را در میمون‌ها به کار بردند، ولی AAS منجر به نقصان وزن بدن و کاهش اسیدآسکوریک خون می شود و علائم اسکوروی (التهاب لثه، خونریزی در پوست و لثه) در جانوران دریافت کننده AAS، ایجاد می شود. در مروری بر تحقیقات ۳۰ ساله پیرامون فعالیت AAS، Tsujimura (۳۰) اذعان نمود که ماهیان برخلاف پستانداران، قادر به هیدرولیز AAS می باشند. با این وجود این محقق غلظت‌های بالای AAS اندازه گیری شده در مدفوع قزل آلای رنگین کمان و قابلیت جذب اندک آن را در نظر نگرفت (۳۱، ۳۲) و تنها به بیان مجدد اطلاعات حاصله از انتقال خوراکی دوزهای بالای AAS، بسنده نمودند. شکل ۲-۱۷ خلاصه‌ای از داده‌های موجود در مورد غلظت‌های بافتی اسیدآسکوربیک در قزل آلای رنگین کمان را ارایه می‌دهد که با جیره‌های غذایی حاوی دو استر آسکوربیل و گروه های شاهد با جیره‌های غذایی حاوی اسیدآسکوربیک آزاد یا جیره غذایی فاقد آسکوربات تغذیه شده بود. ما شواهد متناقض با تحقیق پیشین در مورد AAS در ماهیان (۲۳) را بررسی نموده ایم و در اینجا صرفا به بررسی نتایج انتشار یافته پس از سال ۱۹۹٤ خواهیم پرداخت.

Halver و Hardy (۳۳)، در یک مطالعه هفده هفته‌ای روی آزادماهی اقیانوس اطلس تغذیه شده با جیره غذایی نیمه خالص (کازئین، ژلاتین، دکسترین) نشان دادند که استفاده از ۵۰ mg AAequiv/kg بصورت AAS، باعث عدم بروز اختلافات رشد و آسیب شناسی‌های مربوط به ویتامین ث، در مقایسه با ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی فاقد ویتامین ث، می شود. این نتیجه با توجه به نتیجه گیری‌های Cho و Cowey (۳٤) بدیهی بود که آزادماهیان به بیشتر از ۱۰ mg/kg از شکل فراهم ویتامین ث نیاز ندارند و این که افت رشد پس از افزایش ۳۰ برابری بدن قابل مشاهده نبود. در مطالعه مشابهی، میزان معادل ۳۰-۱۵ mg اسیدآسکوربیک به صورت AAS، نتایج Halver و Hardy (۳۳) که نسبتهای مختلفی از AAS را در طول سال استفاده کرده بودند، برخی دارای مقادیر معنی دار اسیدآسکوربیک



شکل ۲-۱۷ : غلظت‌های اسیدآسکوربیک در بافت‌های قزل آلای رنگین کمان تغذیه شده با جیره غذایی فاقد ویتامین ث یا جیره‌های غذایی حاوی مقادیر معادل ۵۰۰ mg AA/kg به شکل اسیدآسکوربیک معمولی (AA)، سولفات آسکوربیل (AS) یا فسفات آسکوربیل (AP) (۳۱، ۳۲).

آزاد بودند، بنابراین به نظر می‌رسد غلظت ۵۰ mg/kg، یک دوز کافی برای آزمایشهای دوازده هفته‌ای باشد که افزایش ده برابری وزن بدن را مقدور می‌سازد. همچنین ما اذعان می‌کنیم که برخی توانایی‌های محدود هیدرولیز AAS در کبد آزادماهیان و سایر گونه ها وجود دارد (۳۱).

دو نتیجه حاصله از تحقیق Halver و Hardy (۳۳) توضیح قانع کننده ای برای این موضوع بود که چرا زیست فراهمی AAS در آزادماهیان بعید می‌نماید. نخست آنکه به دنبال افزایش میزان AAS جیره غذایی از ۵۰ به ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم در هر کیلوگرم، افزایش غلظت‌های اسیدآسکوربیک کبدی مشاهده نمی شود و ماهیان تغذیه شده با مقادیر اندک اسیدآسکوربیک، مقدار اسیدآسکوربیک بالاتری (۱۷µg/g) را نسبت به ماهیان تغذیه شده با ۱۰۰ mg AAS/kg، نشان می دهند

(۱۰/۲µg/g). روند مشاهده شده و غلظت‌های دقیق، بوضوح حاکی از کمبود ویتامین ث می باشند. ثانیاً، غلظتهای AAS در لاشه های ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی فاقد ویتامین ث و جیره غذایی که تنها دارای اسیدآسکوربیک می باشد، مجددا مشخص می نماید که AAS بطور طبیعی در ماهیان وجود دارد که توسط خودشان ساخته و در بافت‌های آنها ذخیره می‌شود. من تنها به مطالعات قبلی حاصل از آنالیزهای آزمایشگاهی که این نتایج را ارائه کرده است، رجوع می‌کنم که" تعیین مقدار دقیق (AAS و AA) به دلیل مواد تداخل گر همراه الوشن، غیر ممکن بود" (۳۵).

نتایج Felton و همکاران (۳٦) در مورد استفاده از AAS کمک زیادی به ارتقاء بحث پیرامون اثبات ارزش زیستی این ماده در ماهیان نمود، زیرا آنها اظهارات قبلی که AAS در بدن ماهیان به AA تغییر شکل می‌یابد و بر عکس را، مجددا به مورد بحث گذاشتند و نیز آنها دو تکنیک مفید برای حل مشکلات سنجش یعنیHPLC وEIMS را بکار بردند. AAS در مقادیر دارویی ٤٥ میلی گرم به ازای هر ۷۷ گرم، معادل ٥۸٤ mg/kg، به صورت اجباری به بچه ماهیان خورانده شد که این مقدار، ٥۸٤ برابر بیشتر از نیاز این ماهیان بود، که توسط Hilton و همکاران (۳۷) در mg/kg ۱ وزن بدن مشخص شده بود. فهم این موضوع مشکل است که پس از این تیمار، میزان اسیدآسکوربیک در خون بین صفر و µg/g ٥٦٥ قرار دارد و در برخی از تیمارها غلظت‌های AAS کبدی به µg/g ۲۳٦٤ می‌رسید. این نتایج چه معنی فیزیولوژیک می توانست داشته باشد وقتی که در ماهیان گروه شاهد غلظت‌های AAS در بسیاری از بافت‌ها مانند عضلات قابل مشاهده و ردیابی نبود؟ درنتیجه، اذعان بسیاری از محققین مبنی بر اینکه، AAS می‌تواند از طریق بافت معده جذب شده و به AA تبدیل شود، فاقد هر گونه پایه و اساس می باشد زیرا مقدار اسیدآسکوربیک خون بسیاری از ماهیان که AAS را بصورت اجباری دریافت کرده‌اند، صفر بود. حتی این موضوع سوالات بیشتری را پیرامون شیوه های آنالیزی Felton و همکاران به ذهن متبادر می سازد چون ما هرگز آزادماهی سالمی را نیافتیم که فاقد اسیدآسکوربیک در پلاسمای خونش باشد (۳٦).

مطالعات Kittakoop و همکاران (۱۹) و Shiau و Hsu (۳۹) به ترتیب روی میگوی ببری و هیبرید تیلاپیا، فعالیت سولفوهیدرولاز سولفات آسکوربیل[1] را در کبد این دو گونه آبزی نشان داد. بر

[1] Ascorbyl sulfate sulfohydrolase

اساس پاسخ اندازه گیری شده از غلظت‌های بافتی اسیدآسکوربیک، بهره وری از AAS کمتر از مقادیر معادل مونوفسفات آسکوربیل بود و خلوص منبع AAS نیز آزمایش نشده بود. همچنین Shiau و Hsu (۳۹) نشان دادند که حضور AAS در بافتهای ماهیچه و کبد تیلاپیا که از جیره غذایی فاقد ویتامین ث تغذیه شده بودند، تعجب برانگیز و مغایر با یافته‌های قبلی در مورد این گونه بود.

به طور خلاصه، مشخص شده است که بهره وری از AAS به ماهیان محدود شده است، منتهای مراتب ممکن است دوز های بالا، مقداری اسیدآسکوربیک از طریق فعالیت سولفوهیدرولاز کبدی فراهم آورد. با این وجود، در مقایسه با فسفاتهای آسکوربیل که عمده هیدرولیز آن در سطح روده ای رخ می‌دهد و منجر به جذب AA آزاد به دورن گردش خون می‌شود (۳۸)، مقدار محدودی از AAS، از طریق شیب غلظت منتقل می شود و ناقلین غشایی اسیدآسکوربیک و دهیدرو آسکوربیک به شدت اختصاصی عمل می کنند (٤٠) و شکل استری برای یک ناقل معمولی با گلوکز در رقابت است. در غلظت فیزیولوژیک هگزوزها، تنها ممکن است که مقادیر بسیار بالای AAS (٣٦) به درون جریان خون، منقل گردد.

۳-۳-۱۷- ساخت آنزیمی استرهای آسکوربیل

سولفات اسیدآسکوربیک (AAS) که در سیست‌های آرتمیا تشخیص داده شد نشان می دهد که سولفوترانسفراز[1] اسیدآسکوربیک باید در انباشته سازی استر پایدار ویتامین ث دخیل باشد (٤١). پس از آبگیری (هیدراسیون) سیست‌ها و شروع نمو جنینی در آنها، AAS به منظور تولید اسیدآسکوربیک آزاد، هیدرولیز می‌گردد (۱۸).

عمل سولفاسیون[2] اسیدآسکوربیک به وسیله ATP به عنوان یک کوفاکتور اجباری در همگن های کبد و روده موش صحرایی، بررسی شد (٤٢). در این سنجش، AAS ایجادی، در مایع رویی (g× ۱۲۰۰۰) پس از افزودن کلرید باریم سنجش شد که Na_2SO_4 یا سولفات فسفوآدنیل (PAPS) (۹۹/۹درصد) را به عنوان دهنده گروه سولفات، رسوب می داد. در حضور ٥ mM

[1] Sulphotrransferase
[2] Sulfation

Na_2SO_4 یا PAPS ۰/۲۵mM و ۱ mM اسیدآسکوربیک، واکنش سولفاسیون، بسیار کارآمد خواهد بود. ما اطلاعات مربوط به توزیع AAS در بافت‌های ماهیان را مورد بررسی قرار دادیم و هیچ دلیل محکمی مبنی بر ساخت یا فعالیت سولفوترنسفراز اسیدآسکوربیک مشاهده نکردیم. Baker و همکاران (٤٣) ابراز داشتند که AAS یک متابولیت ادراری ویتامین ث در انسان ها می باشد و به بررسی فعالیت زیستی این ترکیب موازی با مطالعات انسانی، در ماهیان پرداختند؛ با این وجود حتی بهترین مدل ساخت AAS در آرتمیا، مورد مطالعه و بررسی بیشتر قرار نگرفت. بیوسنتز دهندهٔ سولفات فعال شده، PAPS، در سیستم پستانداران مورد مطالعه قرار گرفت و ثابت شد که عمل متوالی دو آنزیم (I. ATP + سولفات و II. فسفوریلاسیونAPS) روی پروتئینی با دو عملکرد وجود دارد (٤٤).

اسیدآسکوربیک-۲- گلوکورونید[1] از ادرار و پلاسمای بیماران دچار عارضه اورمی[2] جدا شده است (٤٥). محققین پیشنهاد می نمایند که این ترکیب در جایی وجود دارد که اسید گلوکورونیک به کربن شماره ۲ اسیدآسکوربیک متصل می شود ولی به ۰/۵ میلی لیتر به ازای لیتر می رسد. درک نقش این ترکیب، نیاز به تحقیقات بیشتر و گلوکورونیداسیون[3] به صورت *in vitro* بوسیله بخش میکروزومال سلولها دارد (٤٦)که به نظر می رسد آزمایش قابل اطمینانی برای درک اهمیت فیزیولوژیک آن باشد.

٤-۳-۱۷- گردش آسکوربات معده ای و درون روده‌ای

ما شواهد مربوط به ترشح پایه ای اسیدآسکوربیک به درون معده (آزادماهیان) و روده (کپور ماهیان فاقد معده) ماهیان را مورد بررسی قرار دادیم (٤٧). شواهد آزمایشی در انسان‌ها وجود دارد که نشان می‌دهد غلظت اسیدآسکوربیک در ترشح معده ای، در ارتباط تنگاتنگی با غلظت پلاسمای خون و همچنین ویتامین ث پلاسما می باشد (μM/l ۳۵) (٤٨). یکی از مهمترین نتایج حاصله مبنی بر افزایش۵۰-۲۰ برابری غلظت‌های آسکوربات در مدفوع طی اختلالات معده ای- روده ای، بندرت مطرح شده است، اگر چه می‌تواند دلایل بی شماری داشته باشد. Rathbone و همکاران نتیجه

[1] Ascorbic acid-2-glucuronic
[2] Uremia
[3] Glucuronidation

گرفتند که محاسبه میانگین ترشح روزانه شیره معده، حاکی از ترشح تقریباً ٦٠ mg AA است. Dabrowski (٤٧) نتیجه گرفت که در انسان‌ها و در ماهیان استخوانی که مستعد ابتلا به اسکوروی می باشند، میزان ترشح روزانه، تقریبا دو برابر مقدار مجاز روزانه است که تاکید دارد چرخش معده ای- روده ای و بازجذب اسیدآسکوربیک برای حفظ غلظت فیزیولوژیکی مورد نیاز اسیدآسکوربیک در بدن حیاتی می باشد.

ماهیانی که از جیره‌های غذایی فاقد آسکوربات تغذیه می کنند، مقادیر قابل ردیابی از آسکوربات را در مجرای معده ای – روده ای خود نشان می دهند و عمده ویتامین ث موجود در لوله گوارشی، به شکل اکسید شده وجود دارد (۱۸). عملکرد DHA به عنوان یک عامل ممانعت کننده شیمیایی و نقش آن در جذب مواد مغذی یا فراهمی آنها، نیازمند تحقیقات بیشتر است. Naito و همکاران بیان نمودند که ترکیبی از غلظت‌های فیزیولوژیک اسیدآسکوربیک (٤٠-٤٠٠٠ μM) و سولفات آهن به درون لایه موکوسی معده - بر حسب غلظت آن - سبب بروز زخم‌های معده ای می‌شود در حالیکه تزریق جداگانه هر کدام از این ترکیبات چنین عارضه ای را ایجاد نمی کند. در اثر عمل سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، رادیکال‌های سوپراُکسید که بخشی از مکانیزم تشکیل زخم هستند، کاهش می یابند که کاهش زخم‌های معده ای را بدنبال خواهد داشت. بوضوح، یافته‌های مربوط به حضور دهیدروآسکوربات در محیط قلیایی روده، فرضیه عدم دخالت ویتامین ث در پراُکسیداسیون چربی به واسطه رادیکال اکسیژن را تقویت می‌کند.

آسکوربات به عنوان یک عامل از بین برنده خارج سلولی مهم در لوله گوارشی عمل می‌کند که از لایه موکوسی معده حفاظت کرده و از اثرات جانبی ایجاد شده پس از ایجاد زخم‌ها، مانند خونریزی جلوگیری می‌کند (۵۱). دوز ۱ mM آسکوربات در پلاسمای خون، در تقلیل اثر شوک خونریزی در موش‌های صحرایی دخیل می باشد. بنابراین پیش تیمار آسکوربات در دوز ثابت جیره ای، منجر به حفظ غلظت‌های بالای اسیدآسکوربیک در جریان خون شده (سطح طبیعی در پلاسمای خون ماهیان ۰/۰۵ mM- ۰/۰۱ می‌باشد) و از شرایط احتمالی ایجاد بیماری جلوگیری می کند.

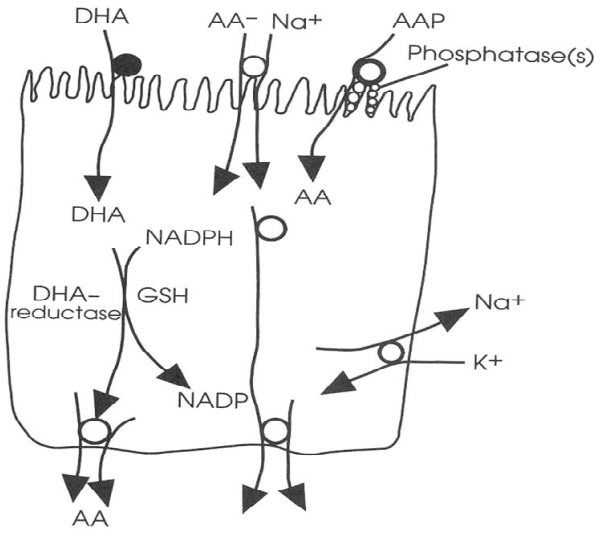
۵-۳-۱۷- برهمکنش آسکوربات و فلاونوئیدها

بسیاری از شواهد بدست آمده از آزمایش های *in vitro* در مورد جانوران مستعد ابتلا به اسکوروی، جذب آسکوربات در روده را با جذب وابسته به سدیم برخلاف شیب غلظت مرتبط می داند (۵۲). بخش عظیمی از آسکوربات کل در جیره‌های غذایی فرموله شده به شکل استر آسکوربیل برای ماهیان، می‌تواند فرایند را با دخالت آنزیم های آلکالین فسفاتاز حاشیه پرزکی مشکل تر سازد (شکل ۳-۱۷). اسیدآسکوربیک رها شده، بسرعت در معرض اکسایش قرار می‌گیرد و احتمالا مکانیزم دخیل در انتقال DHA به درون انتروسیت‌ها، از لحاظ کمی از سایر مکانیزم‌ها مهم تر باشد. $GLUT_1$ یک ناقل اولیه بیان شده DHA روده ای می باشد. با این وجود، انتقال آن توسط D-گلوکز ممانعت می‌شود، در حالی که فروکتوز و L- گلوکز چنین ممانعتی را از خود نشان نمی‌دهند (۵۳). K_m ظاهری ناقل DHA، حدود ۱/۵ mM است. بافت پوششی روده نیز مکانی برای ناقل آسکوربات، یعنی $SVCT_1$ می‌باشد (٤٠) در حالیکه $SVCT_2$ در غدد معده ای دیده شده است و شاید در جذب قاعده ای جانبی آسکوربات برای ترشح شدن بدون شیرهٔ معده، دخیل باشد.

این یافته‌ها از اهمیت بسزایی برخوردار می باشد چرا که به درک بهتر و تبیین سیستم‌های ناقل آسکوربات/DHA، برهمکنش آنها با سایر سیستم‌ها و ترکیبات کمک می کنند. ایزوفلاونوئیدهای حاصله از گیاهان، از جمله اجزای غذایی معمول در جیره غذایی ماهیان هستند که همراه با آرد سویا، یا پنبه دانه، وارد غذا می‌شوند (٥٤). برخی ایزوفلاونوئیدها به شکل آگلیکون[1] مانند ژنیستئین[2]، در کیسه صفرا تحت بازیافت قرار می‌گیرند که این موضوع مبین هیدرولیز و جذب موثر آنها می باشد. Vera و همکاران (۵۵)، به وسیله سلول‌های بیان کننده ناقل $GLUT_{-1}$، عنوان نمودند که ممانعت ۵۰ درصدی DHA در غلظت ۱۰- ۱۵ μM ژنیستئین طی ۱-۱۰ دقیقه پیش انکوباسیون، قابل تشخیص است. همچنین محققین نشان دادند که ممانعت ژنیستئین از ناقلین گلوکز DHA، از طریق اتصال به مکانهای ناقلی به شکل رقابتی حاصل می آید. بنابراین، اگر چندین ایزوفلاونوئید به درون مجرای روده رها شوند، ممکن است به طور موثری سیستم‌های ناقلی ویتامین‌ها را بلوکه نمایند.

[1] Aglycone
[2] Genistein

Park و Levine (۵۶) ماده میریستین[1] را در غلظت µM ۱۸- ۲۲ به عنوان ایزوفلاونوئید انتخاب نمودند که با این عمل هر دو سیستم ناقلی DHA و اسیدآسکوربیک ممانعت شد اگرچه بایستی مکانیزم‌های مختلفی درگیر در این امر دخیل باشند. جذب اسیدآسکوربیک وابسته به سدیم به صورت غیر رقابتی، بلوکه می‌شود.



شکل ۳-۱۷: مدل عملی توصیف کننده جذب اسیدآسکوربیک و مشتقات آن در سلول اپیتلیال لوله گوارشی ماهیان استخوانی حقیقی. انتقال موکوسی شامل انتقال فعال، وابسته به سدیم- اسیدآسکوربیک، ناقل تسهیل شده DHA، مستقل از سدیم و فعالیت فسفاتازهای حاشیه پرزکی می‌باشدکه در هیدرولیز و انتقال اسیدآسکوربیک نقش دارند. انتقال سروزی تنها شامل انتقال وابسته به سدیم – اسیدآسکوربیک آسکوربات می‌باشد. نقش گلوتاتیون احیاء شده و آنزیم DHA ردوکتاز سیتوزولی، نشان داده شده است.

[1] Myricetin

فراوانترین فلاونول‌های[1] گیاهی، کوئرستین[2] نیز یک ممانعت کننده موثر تجمع اسیدآسکوربیک در سلول‌های سرطانی انسانی می‌باشد و این فلاونوئید از ژنیستئین موثرتر است (۵۷). درجه ممانعت ناقل اسیدآسکوربیک به درون سلول‌های سرطانی مرتبط با خصوصیت ضد تکثیری بوده و می‌تواند به تخلیه اسیدآسکوربیک برای رشد سلول‌ها مرتبط شود.

به طور خلاصه، اطلاعات فوق از مطالعات آزمایشگاهی بطور مستقیم مربوط به وضعیتهای *in vivo* بوده که مقادیر قابل توجه فلاونوئیدهای دارای منشاء پروتئین‌های گیاهی در جیره غذایی ماهیان استفاده می شود و ممکن است بر زیست فراهمی بسیاری از مواد مغذی مانند ویتامین ث اثر گذارد.

٦-۳-۱۷- نیاز ماهیان به آسکوربات

معیارهای مورد استفاده در تعیین علمی مقادیر دقیق ویتامین ث در جیره غذایی ماهیان و سایر آبزیان بر اساس شرایط پرورش، فرمولاسیون جیره غذایی و نوع گونه پرورشی و ارتباطات جدید بین تغذیه و سطح سلامت، تولید مثل یا شرایط محیطی (فوق اشباعیت اکسیژن، نور ماوراء بنفش) در مشاهدات آزمایشگاهی یا اپیدمیولوژیک، مشخص می‌شوند. معیارهای کفایت ویتامین ث باید براساس نیازهای پایه‌ای برای حفظ سلامت ماهیان، و اشباع بودن کینتیکهای ویتامین ث در بافت‌های حیاتی (مانند لنفوسیت‌ها، کلیه) و به صورت عملکردی از دوز روزانه باشد. اگرچه یک ارتباط مستقیم باید بین چنین شاخصی و مزایای تولید (رشد، زنده مانی، مقاومت) بنا گردد (۵۸).

بسیاری از آزمایشهایی که ضرورت اسیدآسکوربیک را برای ماهیان استخوانی ابراز داشته‌اند، باید به دلیل کافی نبودن طول مدت مطالعه یا دقت سنجش‌های بیوشیمیایی، به بوته نقد گذارده شوند. اخیراً Reddy و Ramesh (۵۹)، گزارش نمودند که کپور معمولی پس از ۷۰ روز تغذیه با جیره غذایی فاقد ویتامین ث، کاهش در غلظت آسکوربات بافتی را در مقایسه با تیمار شاهد، نشان نمی‌دهد. دومین دلیل برای نقد این گونه تحقیقات استفاده از اجزای غذایی کاربردی در زمان فرمولاسیون جیره غذایی است. برای مثال، Pharomkunthong و همکاران (٦۰) در ساخت جیره غذایی گورخرماهی *Brachydanio renio*، از ٤٦ درصد موادگیاهی استفاده نمودند، درحالیکه Martins (٦۱)

[1] Flavonol
[2] Quercetin

وMartins و همکاران (٦٢) از جیره غذایی حاوی ٧٤ درصد مواد گیاهی استفاده نمودند و بیان داشتند که این جیره‌های غذایی، فاقد ویتامین ث هستند. محاسبه نیازها بر اساس چنین داده‌های غیر منطقی، دارای اثر منفی می‌باشد و انجام مقایسه با مطالعات بدقت طراحی شده، انسجام و ارتباط اندکی را نشان می دهد. Martins و همکاران (٦٢) مطالعه‌ای پیرامون ماهی میوه خوار آمازونی (٦٣) انجام دادند که غلظتهای آسکوربات موجود در غذای آن ممکن است بیشترین مقدار مشاهده شده در بین گیاهان خشکی زی باشد. متاسفانه هیچ نوع اطلاعاتی در مورد غلظت آسکوربات پلاسمای خون یا سایر بافت‌ها ارائه نشده است. این جنبه از مقایسه نیاز ویتامینی بین گونه‌ای در ماهیان، در محیطهایی با درجه حرارت ۱/۹- درجه سانتی گراد یا ٤٠+ درجه سانتی گراد، می‌تواند برای درک مکانیزهای عمل ویتامین ث، بسیار مفید باشد. در عوض Gieseg و همکاران (٦٤)، غلظت آسکوربات را در خون ماهیان قطب جنوب، اندازه گیری نمودند و نتیجه گرفتند که مقادیر آسکوربات (۱۰-٥٤ μM) فقط در یک گونه از ماهیان قطب جنوب نسبت به ماهیان مناطق معتدله، به میزان معنی داری بالاتر است.

در یک ماهی آمازونی دیگر *Astronotus ocellatus*، که در جیره غذایی اش میوه ها وجود دارند، کاهش رشد در مورد جیره های غذایی نیمه خالص فاقد ویتامین ث در یک افزایش فوق العاده ناچیز وزن بدن برابر با ۱۰۰ درصد، مشاهده شد (٦٥)، اگرچه مجموع دوره زمانی آزمایش حدود ۳۷ هفته بود. در اکثر گونه‌های ماهیان موجود در آب‌های معتدله، افزایش۱۰-٥ برابری وزن بدن، برای اثبات ناهنجاری‌های اسکتی و آبششی ناشی از کمبود ویتامین ث، لازم است. در ماهیان اسکار، بدشکلی های آرواره و رشته‌های آبششی، شباهت زیادی به موارد نادر مشاهده شده در سایر ماهیان، دارد. Saroglia و Scarano (٦٦)، احتمالاً اولین کسانی بودن که ناهنجاری ها یا فقدان کامل استخوان اوروفیز و عدم اتصال استخوان‌های جمجمه ای را در ماهی استخوانی حقیقی دریایی *Dicentrarchus labrax*، مورد بررسی قرار دادند. علائم بالینی کمبود ویتامین ث بر اثر کمبود ویتامین[1] پیشرفته، عنوان شده اند. اگرچه، معیارهای تشخیص سریعتر مانند غلظت‌های آسکوربات در گلبول‌های سفید (٦٧) یا فعالیت آنزیم اختصاصی (٦٨) مستلزم بررسی آنالیزی است.

[1] Avitamininosis

در مجموع، هدف این بحث تاکید بر ایده کلی تعیین نیازهای ماهیان به اسیدآسکوربیک با قبول تنوع گسترده گونه‌های موجود و انواع نیازهای محیطی آنها و تاریخچه های تغذیه‌ای آنها و همچنین پرهیز از وقوع بسیاری از اشتباهات رایج در مطالعات آزمایشگاهی می باشد که منجر به اظهارات بدون پایه و اساس یا تعیین میزان نیاز در مقداری کمتر از حد واقع می شود. براورد نیاز ماهیان به مواد مغذی نتایجی برای فرمولاسیون صحیح غذایی ماهیان است و ممکن است بر کاربردهای عملی و موفقیت صنعت آبزی پروری اثر گذارند.

٤-۱۷- آینده

۱-٤-۱۷- مکانیزم عمل آسکوربات

در تمام منابع علمی ارتباط دهنده کمبود آسکوربات با اسکوروی ماهیان، ایده بیان شده این است که ناهنجاری کلاژن و تاخیر در التیام زخم، از لحاظ عملکردی مرتبط با هیدروکسیلاسیون ضعیف پرولین و لیزین و در نتیجه تشکیل ناپایدار مولکولهای مارپیچ سه گانه پروکلاژن است. غلظت‌های هیدروکسی پرولین موجود در بافت‌های ماهیان در ارتباط با کمبود ویتامین ث می‌باشند (٦۹). ترکیبات همگن آنزیم پرولیل هیدروکسیلاز[1] تهیه شده از بافت‌های پرندگان، پستانداران و سلول‌های محیط کشت (۷۰)، نشان می دهد که این آنزیم‌ها نیاز به آهن فرو دارند و اینکه آسکوربات، به عنوان یک عامل احیاء کننده عمل می‌کند. همان محققین تغییرپذیری و نقایص مرتبط با اثر آسکوربات بر ۱) ساخت کلاژن و ۲) هیدروکسیلاسیون پرولین و لیزین را بررسی نمودند. آنها همچنین دلایل احتمالی که منجر به بروز نتایج گمراه کننده می شود را به مورد بحث قرار گذاشتند و به تهیه فهرستی از فاکتورهایی مبادرت نمودند که مورد توجه قرار نگرفته و کنترل نشده بود. Chojkier و همکاران (۷۱) برای نخستین بار نشان دادند که سلول‌های استخوان آهیانه ای خوکچه هندی مستعد ابتلا به اسکوروی نگه داری شده در محیط کشت، کاهش نرخ ساخت کلاژن را از خود بروز می دهند و این موضوع در ارتباط با کاهش هیدروکسیلاسیون پرولین نبود. خوکچه های هندی بر اثر غذادهی محدود، کاهش وزن می یابد درحالی که با تامین ویتامین ث، کاهش ساخت کلاژن همچنان مشاهده

[1] Prolyl-hydroxylase

می شود. در اینجا، محققین نتیجه گرفتند که مقادیر mRNA کلاژنی در زمان گرسنگی و در جانوران دچار کمبود آسکوربات، کاهش می یابد. اکنون شواهدی وجود دارد که نحوه عمل آسکوربات مرتبط با ساخت و متابولیسم کلاژن همچون رونویسی ژن، تکثیر سلولی، تثبیت mRNA پروکلاژن، تغییرات پساترجمه‌ای و ترشح کلاژن، موضوع بغرنج و پیچیده ای می باشد.

Beverly Peterkofshy در سال ۱۹۹۱، ایده‌ای مبنی بر اینکه یک فاکتور هموورال بجای آسکوربات در ساخت کلاژن و پروتئوگلیکان در جانوران مستعد ابتلا به اسکوروی دخیل است، ارایه نمود (۷۲). آزمایشهای قبلی نشان داده بود که کمبود تحمیل شده آسوربات توسط غذا در خوکچه هندی دچار کمبود ویتامین ث می توانست از طریق مدیوم حاوی سرم به کشت های سلولی انتقال یابد و سبب ایجاد نقایصی در ساخت پروتئوگلیکان و کلاژن شود. این موضوع نشان می‌دهد که ممانعت ساخت کلاژن به علت فقدان یک فاکتور از دست رفته (آسکوربات) نبوده بلکه به دلیل حضور بازدارنده است که این بازدارندگی می‌تواند توسط IGF-I[1] معکوس شود. Peterkofsky و همکاران (۷۲) نشان دادند که افزایش ۱۰ برابری ۲ نوع پروتئین در سرم خوکچه هندی دچار کمبود ویتامین ث، قادر خواهد بود که اتصال IGF به گیرنده‌های سلولی آن را، محدود سازد (شکل٤-۱۷).

Kipp و همکاران (۷۳)، شواهدی دال بر چند فازی بودن تکوین کمبود ویتامین ث، ارائه نمودند که در فاز اول، به رغم عدم مشاهده کاهش وزن یا القای پروتئین‌های متصل بهIGF، کاهش٤٠ – ٢٦ درصدی غلظت mRNA پروکلاژن، مشاهده شد. پیش از این، کاهش ساخت کلاژن زمانی مشاهده می شد که پرولین در یک سرعت معمول تحت هیدروکسیلاسیون قرار می‌گرفت. تشکیل ناقص رگ‌های خونی و قطورشدن رگ‌ها نیز جلوتر از ممانعت هیدروکسیلاسیون پرولین است. این سیر زمانی رخدادها مربوط به کمبود ویتامین ث، برخی از تناقضهای آزمایشهای مختلف اولیه را توجیه می‌کند و نشان می دهد که هیدروکسیلاسیون طبیعی پرولین و لیزین با مقادیر بسیار کم آسکوربات انجام می‌شود و مشاهدات گذشته در مورد کاهش مقادیر هیدروکسی پرولین ناشی از کمبود ویتامین ث، احتمالاً به علت کاهش ساخت کلاژن بوده است.

ساخت و ترشح انواع کلاژن‌ها تحت تاثیر آسکوربات یا شلاته شدن آهن برحسب موقعیت و

[1] Insulin-like growth factor I

میزان هیدروکسیلاسیون پرولین می باشد. کلاژن نوع IV، پروتئین مهم سازنده غشاهای پایه‌ای سلولی، مشخصا حاوی مقدار زیادی از ٤- هیدروکسی پرولین است (۷٤). در سلولهایی که منحصرا کلاژن IV را می سازند، شلاته کننده آهن (α،α- دی پریدیل[1]) و نبود آسکوربات، ترشح کلاژن را کاملا محدود می‌سازند. بطور قابل ملاحظه‌ای، ساخت کلاژن حتی دو روز پس از افزایش آسکوربات، تحریک نمی شود. بعلت اینکه کلاژن نوع IV دارای قطعات توالی‌های غیرکلاژنی است، زنجیره هیدروکسیل دار نشده، سوبسترای مناسبی برای هضم پروتئازی است که موجب تخریب ساختارهای سلولی (و رگی) می شود.

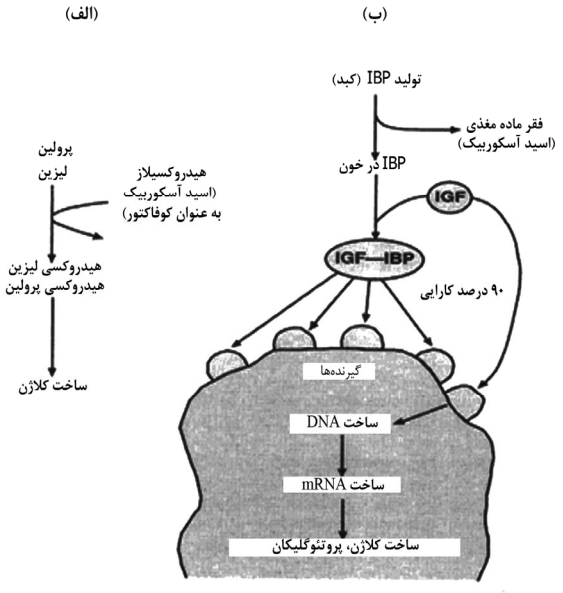
تایید بیشتر کاهش غلظت mRNA کلاژن نوع IV در سرم از آزمایشهای انجام شده روی خوکچه هندی مبتلا به کمبود اسیدآسکوربیک بدست آمد (۷۵). اگرچه، جانوران مبتلا به کمبود شدید ویتامین ث با کاهش ۲۰ درصدی وزن بدن، به میزان معنی داری کاهش در مقادیر mRNA کلاژنی (۵۷ درصد نسبت به حالت عادی) و mRNA الاسین (۳درصد نسبت به حالت عادی) را در رگهای خونی از خود نشان دادند. در خوکچه های هندی محروم از غذا، mRNA الاستین تا ۳٤/۵ درصد حالت طبیعی، کاهش می یابد که نشان دهنده اختصاصیت بالای این نقص بیوشیمیایی است.

در نتیجه، با تشریح پیچیدگی عمل ویتامین ث و مشخص نمودن مکانیزم‌های موجود در عملکرد آن، فراتر از آنچه برای ویتامین ث به عنوان نقش‌های آنتی اکسیدانی و فعال کننده جانبی آنزیمی، می‌شناسیم، قادر خواهیم بود تا شاخص عملکردی دقیق تر و اختصاصی تری از وضعیت ویتامین ث در جانوران را ایجاد کنیم.

۲-٤-۱۷- تنظیم مولکولی (بیان ژنی) آسکوربات

کمبود آسکوربات، سبب نقص در ساخت (ترشح) ماده زمینه استخوانی خارج سلولی شده و تشکیل غیر طبیعی استخوان را موجب می‌شود و همچنین اثر قابل ملاحظه‌ای بر تمایز سلولی دارد. Ragab و همکاران (۷٦) نتیجه گرفتند که اگر سلولهای پیش ساز به دست آمده از طحال یا مغز استخوان در محیط کشت به اسیدآسکوربیک بعنوان یک ترکیب ضروری برای کسب عملکردهای خاص (مانند

[1] α, α-dipiridyl



شکل٤-۱۷: مکانیزم عملکرد آسکوربات در سطح سلولی

الف: آسکوربات به عنوان یک کوفاکتور در فعالیت هیدروکسیلاز، منجر به تشکیل اسیدهای آمینه هیدروکسیل دار شده می‌گردد. این عمل منجر به کاهش معنی دار ساخت کلاژن و پروتئوگلیکان غضروف می‌شود، اگرچه اثر کمبود ویتامین ث و گرسنگی قابل تفکیک نیست. ب: شمایی از فرضیه Peterkofski (٦٩) مبنی بر اثر کمبود آسکوربات بر ساخت پروتئین‌های ممانعت کننده متصل به IGF_I و مقدار آنها در خون. در خوکچه هندی مبتلا به کمبود ویتامین ث، فعالیت IBP تا ده برابر حالت طبیعی افزایش می‌یابد. IBP از اتصال IGF به گیرنده‌های سلولی جلوگیری نموده و در نتیجه ساخت کلاژن را کاهش می‌دهد.

فعالیت اختصاصی اسید فسفاتاز) نیاز داشته باشند، این موضوع می‌تواند دلیل محکمی باشد که کنترل تمایز استئوکلاست نیز بر پوکی استخوان اثر دارد. در واقع، آنها دریافتند که به منظور تمایز استئوکلاست‌ها، نیاز به غلظت های به نسبت بالای (از لحاظ فیزیولوژیک) آسکوربات (۲۵-۱۲/۵ μg/ml) داریم، ولی ویتامین‌ها نیز قویا می‌توانند طول عمر سلول‌های پیش ساز و

استئوکلاست‌های بالغ را افزایش دهند. به طور مقتضی، مطالعات *in vitro* جدید به طور فزاینده‌ای در حال استفاده از فسفات آسکوربیل به عنوان منبع ویتامین ث می‌باشند (۷۷) که این منبع ویتامین ث، قبل از جذب توسط سلولها در محیط‌های کشت قلیایی، تحت تجزیه قرار نمی گیرد. مشخص شده است که فسفات آسکوربیل تکثیر سلول‌های فیبروبلاست انسانی را در محیط *in vitro* افزایش می‌دهد در حالیکه فیبروبلاست‌های پوستی موش صحرایی (جانوری که می تواند آسکوربات بسازد) به منبع ویتامین ث کاربردی، با افزایش ساخت DNA پاسخ می‌دهند، ولی هیچ تکثیر یا تمایزی (فعالیت ترشحی) قابل مشاهده نخواهد بود (۷۸). به علاوه ۱۷/٦ و۳۵ µg/ml اسیدآسکوربیک آزاد، تکثیر فیبروبلاست انسانی را به ترتیب به میزان ۵۰ و ۹۵ درصد کاهش می‌دهد. آنجا که غلظت‌های هم مول فسفات آسکوربیل ، اختلافی در رشد سلولی ایجاد نمی کند، مولف این موضوع را مرتبط با سیتوتوکسی سیتی سلولی اسیدآسکوربیک می داند. ممکن است تجزیه آسکوربات طی کشت سلولی ۹ روزه یا تجمع دهیدروآسکوربات بعلت سمیت(توکسی سیتی) باشد که این نتیجه، نتیجه گیج کننده ای است.

به احتمال قوی، انواع چنین مدل هایی برای کشت‌های سلولی ماهیان بکار خواهند رفت. Lee و همکاران (۷۹) تیره‌های سلولی پوست ماهی حوض را جهت بیان ضرورت اسیدآسکوربیک (۵۰ µg/ml) (قسمت بالا را ملاحظه فرمائید) به کار بردند تا ترشح کلاژن را القاء کنند در حالیکه غلظت پایین تر ویتامین، حتی پس از ۲۱ روز کشت، هیچ نوع تشکیل فیبری را با روش‌های بافت شناسی نشان نداد. جالب آنکه، دو تیره سلولی دیگر از بافت‌های قزل آلای رنگین کمان به حضور آسکوربات بصورت تشکیل کلاژن، پاسخی نمی دهد.

کشت سلولی به صورت *in vitro* مستلزم چند روز زمان برای القاء یک ژن خاص است. سلول‌های بشدت پاسخ دهنده، مانند استئوبلاست‌ها برای بیان پروتئین‌های متصل به استئوکلسین- کلسیم، به حضور آسکوربیات نیاز دارند. Xiao و همکاران (۸۰) به سلولهای پیش استئوبلاست موشی پروموتور ژن استئوکلسین را انتقال دادند که منجر به بیان ژن لوسیفراز کرم شب تاب شد. آسکوربات فعالیت لوسیفراز را تا ۲۰ برابر می افزاید و این پاسخ فضاویژه[1] بود. این محققین ناحیه خاصی را در

[1] Stereospecific

توالی‌های نوکلئوتید شناسایی نمودند که مسئول القاء وابسته به آسکوربات بود و نشان دادند توالی وجود دارد که پیش از بیان ژن استئوکلسین القای وابسته به آسکوربات، نیازمند ساخت ماده زمینه کلاژن است. Ostuka و همکاران (۸۱)، اختصاصی بودن عمل آسکوربات را در استئوبلاست‌ها مورد آنالیز بیشتر قرار دادند و قادر بودند تا افزایش بیان mRNA آلکالین فسفاتاز و استئوکلسین را نشان دهند. با این وجود بیان mRNA یک پروتئین ریخت زا تحریک نشده بود.

تمایز سلولی و نقش فاکتور رشدی تغییر شکل دهنده[1](TGF)، ممکن است در برخی از انواع سلول‌ها در مسیر درست قرار بگیرند و در فیبروبلاستهای پوستی انسانی، TGF و آسکوربات بر ساخت کلاژن، اثر جمعی دارند (۸۲). اگرچه، زمانیکه mRNA در موقعیت TGF آنالیز می‌شود و آسکوربات به آن افزوده می شود، مشخص می‌شود که بطور اختصاصی آسکوربات ساخت کلاژن نوع I را افزایش داده و تغییرات پساترجمه ای را ارتقاء می دهد در حالیکه TGF ساخت سرتاسری پروتئین را افزایش می‌دهد.

Mahmoodian و همکاران (۸۳) نشان دادند که «اثر اسکوروی» از بسیاری جهات از «اثر گرسنگی» روی خوکچه هندی که در معرض کمبود ویتامین ث قرار دارد، متفاوت است. نتایج آنها کاهش غلظت‌های mRNA استوکلسین، کلاژن نوع I و آلکالین فسفاتاز را نشان می‌دهد. بعلاوه این محققین دریافتند زمانی فعالیت آلکالین فسفاتاز استخوانی تا ۳۱ درصد نسبت به گروه شاهد کاهش می یابد که آنزیمهای کبدی تا ۱۱۰ درصد نسبت به گروه شاهد بدنبال حداقل کاهش وزن بدنی (۷ درصد) افزایش بیابد. محققین این موضوع را با پاسخ اختصاصی ایزوآنزیم‌های آلکالین فسفاتاز در بافت‌های مختلف مرتبط دانسته‌اند. به طور جداگانه، Matusiewicz و Dabrowski (۳۸) دریافتند که مکانیزم مشابهی در قزل‌آلای رنگین کمان وجود دارد به طوریکه کمبود ویتامین ث نسبت فعالیت آلکاین فسفاتاز کبد به استخوان را به ۲/۲۷ می‌رساند که در مقایسه با ۰/۲۱ در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر بالای آسکوربات، مقدار قابل توجهی است.

آزمایشهای انجام شده روی موش صحرایی ناقل نقص موروثی در بیان ژن GLO، مثال‌های روشنی از این نکته هستند که اثر کمبود آسکوربات بر بیان ژن، مستقیما به تشکیل کلاژن و ساختار استخوانی

[1] Transforming growth factor

مربوط نمی باشد. Ikedla و همکاران (۸٤) پیشنهاد نمودند که بیان ژن‌های واقع شده در بافت‌های کبدی موش‌های صحرایی دچار کمبود ویتامین ث مشابه با مرحله التهاب حاد است. غلظت‌های سرمی mRNA آلفا اسیدگلیکوپروتئین و هپتوگلوبین[1] و همچنین فعالیت اینترلوسین[2] (٤ برابر افزایش) و غلظتهای کورتیکواسترون (۵ برابر افزایش) به میزان معنی‌داری در جانوران دچار کمبود اسیدآسکوربیک، افزایش می یابد. علی رغم این که مقادیر پائین آسکوربات کبدی در روز هفتم تغذیه از جیره غذایی فاقد ویتامین ث اتفاق افتاد، زمان لازم برای کاهش بیان این ژن‌ها چهارده روز پس از تغذیه با این جیره‌ها بود که نشان دهنده تاثیر غیر مستقیم کمبود ویتامین ث در بیان ژن است.

کورتیکواستروئیدها موجب القای مرگ سلولی می شوند، در حالیکه افزایش غلظت‌های آسکوربات (تا بیش از ۱۰۰ µg/mL) به وضوح طول عمر سلول‌های ایمنی نوع T طحال موش را افزایش می‌دهد (۸۵). سلول‌های T، سیتوکین‌ها را می‌سازند و تبدیل به سلول‌های موثر برای پاسخ به آنتی ژن‌ها (ویروس‌ها) می‌گردند. افزایش زنده‌مانی این سلول‌های ایمنی، ممکن است برای تشدید پاسخ ایمنی و کنترل واکنش التهابی، در نتیجه مقادیر بالاتر ویتامین ث باشد. این نکته که ممانعت از پراُکسیداسیون چربی توسط ویتامین ث (۸٦)، تنها مکانیزم دخیل در تنظیم بیان ژن توسط ویتامین ث است، هنوز مورد تردید می باشد. برای مثال، Farquaharson و همکاران (۸۷) سطح بالاتر غلظت‌های ۱، ۲۵ دی هیدروکسی ویتامین D_3 و افزایش تعداد گیرنده ویتامین D_3 را مشاهده نمودند. آنها پیشنهاد نمودند که افزایش ویتامین D_3، تمایز سلول‌های غضروفی و ساخت پروتئین‌های ماده زمینه غضروف را بهبود می‌بخشد.

به طور خلاصه، شواهدی دال بر نقش آسکوربات بر تکثیر و تمایز سلولی، افزایش بیان گیرنده‌های غشای سلولی، ساخت هورمون‌های پپتیدی و بیان ژن وجود دارد. مطالعات *In vitro* و *In vivo* روی ماهیان استخوانی با استفاده از یافته‌های توصیف شده جهت درک فاکتورهای رشد، تنظیم هورمونی و جذب مواد مغذی، مستلزم دقت بیشتر است.

[1] Heptoglobin
[2] Interleucin activity

۳-٤-۱۷- ماهیان تراریخته با ژن GLO

عنوان کردیم که GLO همراه با فیلوژنی شعاع بالگان بوده و ممکن است ماهیان استخوانی توانایی ساخت اسیدآسکوربیک را در اواخر دوره تریاسه از دست داده باشند (۸۸). بنابراین فقدان پروتئین GLO و فعالیت GLO در ماهیان استخوانی، بیان می‌دارد که فقدان رونویسی آنزیم بسیار اختصاصی است. همچنین، Krasnov و همکاران (۸۹) اظهار نمودند زمانی که آنزیم GLO موش صحرایی به سلول های کلیه قزل آلای رنگین کمان عرضه می شود، مقادیر اندکی آسکوربات ساخته می‌شود. اگر GLO تنها آنزیم از دست رفته در ماهیان استخوانی فاقد قدرت بیوسنتز اسیدآسکوربیک باشد، بنابراین تولید ماهیان تراریخته مقاوم به کمبود ویتامین ث، فقط مستلزم ترجمه و تثبیت یک آنزیم است. جنین‌های قزل آلای رنگین کمان که کانستراکت GLO موش صحرایی را از طریق ریزتزریق دریافت کرده بودند، پس از تفریخ توانستند ژن را رونویسی کنند. بدشکلی‌های لارو قزل آلای رنگین کمان، حاکی از بیان یک ژن خارجی بود. اگرچه، روش‌های لکه گذاری وسترن و فعالیت GLO نتوانستند حضور GLO موش صحرایی را در قزل آلای رنگین کمان، ثابت کنند.

برخلاف اکثر مطالعات انجام شده روی قزل آلای رنگین کمان، Toyohara و همکاران (۹۰) ابراز داشتند که کانستراکت GLO موش صحرایی را به طور موفقیت آمیزی به DNA ژنومی ماهی استخوانی حقیقی، *Oryzias latipes*، منتقل کرده اند و این ژن در نسل دوم حاصله از نخستین مولدین نر تراریخت، به ارث رسید. اگرچه محققین اطلاعاتی را در مورد فعالیت GLO در ماهیچه بدنی ماهیان تراریخت، ارائه نمودند ولی آنها اختلافی را در مقادیر آسکوربات در بدن ماهیان گروه شاهد و ماهیان دارای فعالیت GLO گزارش ننمودند.

سنجش انجام شده، فاقد گروه شاهد مناسب (D- گولانولاکتون) بود و فعالیت گزارش شده (۰/۰۸ میکرومول آسکوربات بر میلی گرم پروتئین بر ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد) تقریباً به اندازه نصف میزان فعالیت مشاهده شده در میکروزوم‌های کلیوی ماهیان سازنده آسکوربات بود (۱/۵ میکرو مول بر میلی گرم پروتئین بر ساعت) (۸۸). بنابراین بدون تایید توانایی ساخت آسکوربات در ماهی Oryzias، مطالعه Toyohara با غذاهای فاقد آن، نکات مبهمی را بر جای گذاشت.

Nishikimi و Yagi (۹۱) بیان نمودند تشابه سرتاسری توالی‌های نوکلئوتیدی ژن کاذب انسانی (ژنی که بیان نمی شود) و ژن GLO موش صحرایی (ژنی که بیان می‌شود)، تقریبا ۸۰ درصد است. با

در نظر داشتن اینکه میانگین جایگزینی نوکلئوتیدها در جوندگان ۱۰-٤ برابر بیشتر از نخستیان است، برآورد زمان از دست دادن فعالیت GLO تقریبا به ۷۰ میلیون سال قبل بر می‌گردد. با بررسی شاخه ماهیان استخوانی و حضور فعالیت GLO در خانواده Amiidae، می‌توان نتیجه گرفت که فقدان فعالیت GLO در اجداد ماهیان استخوانی امروزی حدود ۲۰۰ میلیون سال قبل بوقوع پیوسته است (۸۸). بنابراین، تعداد جایگزینی های نوکئوتیدی در توالی ژن GLO در طول تکامل ماهیان استخوانی به مدت طولانی تری بوسیله نیروی بهگزینی محدود نشده است. پروب GLO cDNA موش صحرایی مورد استفاده در آنالیز لکه گذاری ساترن، DNA ژنومی انسان و خوکچه هندی، علائم مثبتی را نشان داد (۹۱)، بنابراین اگر تعداد جهش‌های تجمع یافته در جانوران خونسرد زیاد نباشد (۹۲)، می توان از این پروب برای شعاع بالگان امروزی استفاده کرد. در نتیجه، ممکن است انتقال ژن GLO از ماهی به ماهی به طور منطقی میزان موفقیت بالاتری را داشته باشد و از لحاظ اخلاقی نیز پسندیده باشد.

منابع

1. Carpenter, J. K., The history of scurvy and vitamin C, *Cambridge University Press,* Cambridge, U.K., 288,1986.

2. Hoist, A., and Frolich, T., Experimental studies relating to ship beri-beri and scurvy. II. On the etiology of scurvy,. *Hygiene, 7,* 634,1907.

3. Svirbely, J. L. and Szent-Gyorgyi, A., Hexuronic acid as the antiscorbutic factor, *Nature,* 129, 576,1932.

4. King, C. G. and Waugh, W. A., The chemical nature of vitamin C, *Science, 75,* 1944:357,1932.

5. Haworth, W. N., Hirst, E. L., and Reynolds, R. J. W., Hexuronic acid as the antiscorbutic factor, *Nature* 129, 3259: 576,1932.

6. Szent-Gyorgyi, A., Identification of vitamin C, *Nature,* 131, 225, 1933.

7. Stare, F. J. and Stare, I. M., Charles Glen King, 1896-1988. *Nutrition,* 118, 1272,1988.

8. Reichstein, T, Grussner, A., and Oppenheimer, R., synthese der d-und 1-ascorbinsaure (C-vitamin), *Helvet. Chim. Acta,* 26,1019,1933.

9. McCay, C. M. and Tunison, A. V., The nutritional requirement of trout. *Annual Report,* Cortland Hatchery, New York Conservation Department, 3,1933.

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

11. Coates, J. A. and Halver, J. E., Water-soluble vitamin requirements of silver salmon; *Bureau of Sport Fisheries and Wildlife, Report 281,* Washington, DC, 1958.

12. Kitamura, S., Ohara, S., Suwa, T., and Nakagawa, K., Studies on vitamin requirements of rainbow trout, *Salmo gairdneir-L* On the ascorbic acid. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.,* 31, 818,1965.

13. Poston, H. A., Effect of dietary L-ascorbic acid on immature brook trout. *Fish. Res. Bull.,* 35,46,1967.

14. Halver, J.E., Ashley, L. M., and Smith, R. M., Ascorbic acid requirements of coho salmon and rainbow trout. *Tram. Am. Fish. Soc., 90,* 762,1969.

15. Rucker, R. R., Yasutake, W. T., and Wedemeyer, G., An obscure disease of rainbow trout. *Prog Fish Culturist,* 3,1970.

16. Primbs, E. R. J. and Sinnhuber, R. 0., Evidence for the nonessentiality of ascorbic acid in the diet of rainbow trout. *Prog. Fish Culturist,* 33,141,1971.

17. Takeuchi, T., Dedi, J., Ebisawa, C., Watanabe, T., Seikai, T., Hosoya, K., and Nakazoe, J. I., The effect of beta-carotene and vitamin-A envriched artemia nauplii on the malformation and color abnormality of larval Japanese flounder, *Fish. Sci.,* 61,141,1995.

18. Dabrowski, K., Matusiewicz, M., and Blom, J. H., Hydrolysis, absorption and bioavailability of ascorbic acid esters in fish, *Aquaculture* 124,169,1994.

19. Kittakoop, P., Piyatiratitivorakul, S., and Menasveta, P., Detection of metabolic conversions of ascorbate-2-monophosphate and ascorbate-2-sulfate to ascorbic acid in tiger prawn *(Penaeus monodon)* using high-performance liquid chromatography and colorimetry, *Comp. Biochem. Physiol.,* 113B, 737,1996.

20. Khaled, M. Y., Simultaneous HPLC analysis of L-ascorbic acid, L-ascorbyl-2-sulfate and L-ascorbyl-2-polyphosphate, ,. *Lia. Chrom, Rel. Tech.,* 19, 3105,1996.

21. Kim, H. R. and Seib, P. A., Assay of L-ascorbic 2-monophosphate in aquaculture feeds by high-performance anion-exchange chromatography with conductivity detection, J. *Chrom. A.,* 803, 141, 1998.

22. Huang, T. and Kissinger, P. T., Simultaneous LC determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in foods and biological fluids, *BAS,* 29,1996.

23. Esteve, M. J., Farre, R., Frigola, A., and Garcia-Cantabella, J. M., Determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in blood plasma and serum by liquid chromatography, J. *Chromat. B.,* 688, 345,1997.

24. Bates, C.J., Plasma Vitamin C assays: a European experience, *Int. J. Vit. Nutr. Res.,* 64,283,1994.

25. Moeslinger, T., Brunner, M., Volf, I., and Spieckermann, P. G., Spectrophotometric determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid, *Clin. Chem.,* 41,1177,1995

26. Koshiishi, I., Mamura, Y., Liu, J., and Imanari, T., Degradation of dehydroascorbate to 2,3-diketogulonate in blood circulation, *Bioch. Biophy. Acta,* 1425, 209,1998.

27. Dabrowski, K., Administration of gulonolactone does not evoke ascorbic acid synthesis in teleost fish. *Fish Physiol. Biochem.,* 9, 5,1991.

28. Tsujimura, M., Fukuda, T., and Kasai, T., Studies on the excretion of ascorbic acid 2-sulfate and total vitamin C into human urine after oral administration of ascorbic acid 2-sulfate, *J. Nutr. Sci. Vitamin,* 28, 467, 1982.

29. Machlin, L.J., Garcia, R, Kuenzig, W., and Brin, M., Antiscorbutic activity of ascorbic phosphate in the rhesus monkey and the guinea pig. *Am. J. din. Nutr.,* 32,325,1976.

30. Tsujimura, M., Thirty-year history of research about vitamin C activity in a naturally occurring ascorbic acid derivative; L-ascorbic acid 2-sulfate, *J,. Kagawa Nutrit. Univ.,* 28, 31,1997.

31. Dabrowski, K., Lackner, R., and Doblander, C., Effect of dietary ascorbate on concentration of tissue ascorbic acid, dehydroascorbic acid, ascorbic sulfate and ascorbic sulfate sulfohydrolase in rainbow trout. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.,* 47, 1518,1990.

32. Dabrowski, K., Comparative bioavailability of ascorbic acid and its stable forms in rainbow trout, in: C. Wenk, R. Fenster, and L. Volker, Eds., *Ascorbic Acid in Animal Nutrition,* Proceedings of the 2nd Symposium in Zurich Ittingen, Switzerland. 344,1992.

33. Halver, J. E. and Hardy, R. W., L-ascorbyl-2-sulfate alleviates Atlantic salmon scurvy, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,* 206, 421,1994.

34. Cho, C. Y. and Cowey, C. B., Utilization of monophosphate ester of ascorbic acid by rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss),* in S.J. Kaushik and P. Luquet, Eds., *Fish Nutrition in Practice,* INRA, Paris, 149,1993.

35. Halver, J. E., Felton, S., and Pallmisano, A. N., Efficiacy of L-ascorbyl-2-sulfate as a vitamin C source for rainbow trout, in S.J. Kaushik and P. Luquet, Eds., *Fish Nutrition in Practice,* INRA, Paris, 137,1993.

36. Felton, S. P., Dukelow, A., and Felton, H. M., Ascorbyl-2-sulfate compared with ascorbic acid in Atlantic salmon: uptake and distribution confirmed by mass spectroscopy, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,* 215,248,1997.

37. Hilton, J. W., Cho, C. Y., and Slinger, S. J., Effect of graded levels of supplemental ascorbic acid in practical diets fed to rainbow trout *(Salmo gairdneri), J. Fish. Res. Board Can.,* 35, 431,1978.

38. Matusiewicz, M., Dabrowski, K., Volker, L., and Matusiewicz, K., Ascorbate polyphosphate is a bioavailable vitamin C source in juvenile rainbow trout: tissue saturation and compartmentalization model, ,. *Nutr.,* 125, 3055, 1995.

39. Shiau, S-Y. and Hsu, T-S., L-ascorbyl-2 sulfate has equal antiscorbutic activity as L-ascorbyl-2 monophosphate for tilapia *Oreochromis miloticus* x 0. *aureus, Aquaculture,* 133,147,1995.

40. Tsukaguchi, H., Tokui, T., MacKenzie, B., Berger, U. V., Chen, X-Z., Wang, Y., Brubaker, R. F, and Hediger, M. A., A family of mammalian Na^-dependent L-ascorbic acid transporters, *Nature,* 399, 70,1999.

41. Nelis, H. J., Merchie, G., Lavens, P., Sorgeloos, P., and De Leenheer, A. P., Solid-phase extraction of ascorbic acid 2-sulfate from cysts of the brine shrimp *Artemia franciscana, Anal. Chem.,* 66,1330,1994.

42. Mohamram, M., Rucker, R. B., and Hodges, R. E., Formation *in vitro* of ascorbic acid 2-sulfate, *Bioch. Bioph. Acta,* 437, 305,1976.

43. Baker, E. M., Hammer, D. C., March, S. C., Tolbert, B. M., and Canham, J. E., Ascorbate sulfate: a urinary metabolite of ascorbic acid in man. *Science,* 173, 826, 1971.

44. Lyie, S., Ozeran, J. D., Stanczak, J., Westley, J., and Schwartz, N. B., Intermediate channeling between ATP sulfurylase and adenosine 5'-phosphosulfate kinase from rat chondrosarcoma. *Biochemistry,* 33, 6822,1994.

45. Gallice, P., Sarazin, E, Polverelli, M., Cadet, J., Borland, Y, and Crevat, A., Ascorbic acid-2-O-p-glucuronide, a new metabolite of vitamin C identified in human urine and uremic plasma, *Bioch. Bioph. Acta,* 1199, 305,1994.

46. Crespy, V., Morand, C., Manach, C., Besson, C., Demigne C., and Remesy, C., Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am. J. Physiol.,* 177, G120,1999.

47. Dabrowski, K., Gastrointestinal circulation of ascorbic acid, *Comv. Biochem Physiol.,* 95A, 481,1990.

48. Sobala, G. M., Schorah, C. *J.,* Pignatelli, B., Crabtree, J. E., Martin, I. G., Scott, N., and Quirke, P., High gastric juice ascorbic acid concentrations in members of a gastric cancer family, *Carcinogenesis,* 14, 291,1993.

49. Rathbone, B. J., Johnson, A. W., Wyatt J. I., Kellcher J., Heatley, R. V., and Losowsky, M. S., Asocrbic acid: a factor concentrated in human gastric juice, *CUn. Sci.,* 76, 237,1989.

50. Naito, Y., Yoshikawa, T., Yoneta, T., Yagi, N., Matsuyama, K., Aral, M., Tanigawa, T., and Kondo, M., A new gastric ulcer model in rats produced by ferrous iron and ascorbic acid injection. *Digestion,* 56, 472,1995.

51. Ekman, T., Risberg, B., and Bagge, U., Ascorbate reduces gastric bleeding after hemorrhagic shock and retransfusion in rats, *Europ. Sug. Res.,* 26,187,1994.

52. Rose, R., Intestinal absorption of water-soluble vitamins, *Proc. Soc. Esp. Biol. Med.,* 212,191,1996.

53. Rumsey, S. C., Kwon, 0., Xu, G. W., Burant, C. E, Simpson, I., and Levine, M., Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid, J. *Biol. Chem.,* 272,18982,1997.

54. Mambrini, M., Roem, A. J., Cravedi, J. P., Lalles, J. P., and Kaushik, S. J., Effects of replacing fish meal with soy protein concentrate and of DL-methionine supplementation in high-energy extruded diets on growth and nutrient utilization of rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss, J. Animal Sci.,* 77, 2990, 1999.

55. Vera, J. C., Reyes, A. M., Carcamo, J. G., Velasquez, V., Rivas, C. I., Zhang, R. H., Strobel, P., Iribarren, R., Scher, H. I. Slebe, J. C., and Golde, D. W., Genistein is a natural inhibitor of hexose and dehydroascorbic acid transport through the glucose transporter, GLUT1, J. *Biol. Chem.,* 271, 8719,1996.

56. Park, J. B. and Levine, M., Intracellular accumulation of ascorbic acid is inhibited by flavonoids via blocking of dehydroascorbic acid and ascorbic acid uptakes in HL-60, U937 and jurkat cells, *J. Nutr.,* 130,1297, 2000.

57. Kuo, S-M., Morehouse, H. E, and Lin, C-P, Effect of antiproliferative flavonoids on ascorbic acid accumulation in human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Letters,* 116,131,1997.

58. Young, V. R., Evidence for a recommended dietary allowance for vitamin C from pharmacokinetics: a comment and analysis, Proc. *Natl. Acad. Sci., U.S.A.,* 93, 14344,1996.

59. Reddy, H. R. V. and Ramesh, T. J., Dietary essentiality of ascorbic acid for common carp *Cyprinus carpio* L., *Indian J. Exper. Biol.,* 34,1144,1996.

60. Phromkunthong, W., Boonyaratpalin, M., and Storch, V., Different concentrations of ascorbyl-2-monophosphate-magnesium as dietary sources of vitamin C for seabass, *Lates calcarifer, Aquaculture,* 151, 225,1997.

61. Martins, M. L., Effect of ascorbic acid deficiency on the growth, gill filament lesions and behavior of pacu fry *(Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887), *Braz. J. Med. Biol. Res.,* 28, 563,1995.

62. Martins, M. L., Castagnolli, N., Zuim, S. M. P., and Urbinati, E. C, Influencia de diferentes niveis de vitamina C na racao sobre parametros hematologicos de alevinos de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae), *Revista Bras.* Zoo,.,12, 609,1995.

63. Araujo-Lima, C. and Colliding, M., So *Fruitful a Fish. Ecology, Conservation, and Aquaculture of the Amazon's Tambaaui,* Columbia University Press, New York, 191,1997.

64. Gieseg, S. P., Cuddihy, S., Hill, J. V., and Davison, W., A comparison of plasma vitamin C and E levels in two Antarctic and two temperate water fish species, *Comp. Bioch. Physiol. B,* 125,371,2000.

65. Fracalossi, D. M., Alien, M. E., Nicholas, D. K., and Oftedal, 0. T., Oscars, *Astronotiis ocellatus,* have a dietary requirement for Vitamin C, J. *Nutr.* 128, 1745,1998.

66. Saroglia, M.G. and Scarano, G., Fabbisogno di vitamina C nella dieta di spigola *(Dicentrarchus labras)* allevata in acqua di mare, *Rivista Italiana di Piscicoltiira e Ittiopatologia,* 19,1,1984.

67. Verlhac, V. and Gabaudan, *J.,* Influence of vitamin C on the immune system of salmonids. *Aqua. Fish. Mgmt.,* 25, 21,1994.

68. Matusiewicz, M. and Dabrowski, K., Utilization of the bone,liver alkaline phosphatase activity ratio in blood plasma as an indicator of ascorbate deficiency in salmonid fish, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,* 212, 44,1996.

69. Sato, M., Hatano, Y., and Yoshinaka, R., L-ascorbyl 2-sulfate as a dietary vitamin C source for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss, Nippon Suisan Gakkaishi,* 57, 717,1991.

70. Englard, S. and Seifter, S., The biochemical functions of ascorbic acid, *Ann. Rev. Nutr.,* 6, 365,1986.

71. Chojkier, M., Spanheimer, R., and Peterkofsky, B., Specifically decreased collagen biosynthesis in scurvy dissociated from an effect on proline hydroxylation and correlated with body weight loss, ,. *Clin. Invest.,* 72, 826,1983.

72. Peterkofsky, B., Palka, J., Wilson, S., Takeda, K. and Shah, V., Elevated activity of low molecular weight insulin-like growth factor-binding proteins in sera of vitamin C-deficient and fasted guinea pigs. *Endocrinology,* 128,1769, 1991.

73. Kipp, D., Wilson, S., Gosiewska, A., and Peterkofsky, B., Differential regulation of collagen gene expression in granulation tissue and nonrepair conective tissues in vitamin C-deficient guinea pigs, *Wound Rep. Reg.,* 3,192,1995.

74. Kim, Y-R. and Peterkofsky, B., Differential effects of ascorbate depletion and a, a'-dipyridyl treatment on the stability, but not on the secretion, of type IV collagen in differentiated F9 cells,;. *Cell. Biochem,.* 67, 338,1997.

75. Mahmoodian, F. and Peterkofsky, B., Vitamin C deficiency in guinea pigs differentially affects the expression of type IV collagen, laminin, and elastin in blood vessels, *J. Nutr.,* 129, 83,1999.

76. Ragab, A. A., Lavish, S. A., Banks, M. A., Goldberg, V. M., and Greenfield, E. M., Osteoclast differentiation requires ascorbic acid, *J. Bone Miner. Res.,* 13, 970,1998.

77. Nowak, G. and Schnellmann, R. G., Renal cell regeneration following oxidant exposure: inhibition by TGF-p and stimulation by ascorbic acid, *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 145,175,1997.

78. Kato, T. and Royce, P. M., Different responses of human and rat dermal fibroblasts to L-ascorbic acid 2-phosphate, *Biomed. Res.,* 16,191,1995.

79. Lee, L. E. J., Caldwell, S. *J.,* and Gibbons, J., Development of a cell line from skin of goldfish, *Carassins auratus,* and effects of ascorbic acid on collagen deposition, *Histochem. J.,* 29, 31,1997.

80. Xiao, G., Cui, Y., Ducy, P., Karsenty, G., and Franceschi, R. T., Ascorbic acid-dependent activation of the osteocalcin promoter in MC3T3-E1 preosteoblasts: requirement for collagen matrix synthesis and the presence of an intact OSE2 sequence, *Mol. Endocrin.,* 11,1103,1997.

81. Otsuka, E., Yamaguchi, A., Hirose, S., and Hagiwara, H., Characterization of osteoblastic differentiation of stromal cell line ST2 that is induced by ascorbic acid. *Am. J. Physiol.,* 277, C132,1999.

82. Phillips, C. L., Tajima, S., and Pinnell, S. R., Ascorbic acid and transforming growth factor-(31 increase collagen biosynthesis via different mechanisms: coordinate regulation ofproal (I) and proal(III) collagens. *Arch. Biochem. Biophys.,* 295, 397,1992.

83. Mahmoodian, F., Gosiewska, A., and Peterkofsky, B., Regulation and properties of bone alkaline phosphatase during vitamin C deficiency in guinea pigs. *Arch. Biochem. Biophys.,* 336, 86,1996.

84. Ikeda, S., Horio, R, and Kakinuma, A., Ascorbic acid deficiency changes hepatic gene expression of acute phase proteins in scurvy-prone ODS rats, *J,. Nutr.,* 128, 832,1998.

85. Campbell, J. D., Cole, M., Bunditrutavorn, B., and Vella, A. T., Ascorbic acid is a potent inhibitor of various forms of T cell apoptosis, *Cellul. Immunol.,* 194,1, 1999.

86. Chojkier, M., Houglum, K., Solis-Herruzo, J., and Brenner, D.A., Stimulation of collagen gene expression by ascorbic acid in cultured human fibroblasts, *J. Biolog. Chem.,* 264,16957,1989.

87. Farquharson, C., Berry, J. L., Mawer, E. B., Seawright, E., and Whitehead, C. C., Ascorbic acid-induced chondrocyte terminal differentiation: the role of the extracellular matrix and 1, 25-dihydroxyvitamin D, *Europ. J. Cell Biol.,* 76,110, 1998.

88. Moreau, R. and Dabrowski, K., Biosynthesis of ascorbic acid by extant actinopterygians,. *Fish Biol.,* 57, 733, 2000.

89. Krasnov, A., Reinisalo, M., Pitkanen, T. I., Nishikimi, M., and Molsa, H., Expression of rat gene for L-gulono-lactone oxidase, the key enzyme of L-ascorbic acid biosynthesis, in guinea pig cells and in teleost fish rainbow trout *(Oncorhynchns mykiss), Bioch. Bioph. Res. Comm.,* 223, 650,1996.

90. Toyohara, H., Nakata, T., Touhata, K., Hashimoto, H., Kinoshita, M., Sakaguchi, M., Hishikimi, M., Yagi, K., Wakamatsu, Y, and Ozato, K., Transgenic expression of L-gulono-'y-lactone oxidase in medaka *(Oryzias latipes),* a teleost fish that lacks this enzyme necessary for L-ascorbic acid biosynthesis, *Biochem. Biophys. Res. Comm.,* 223, 650, 1996.

91. Nishikimi, M. and Yagi, K., Molecular basis for the deficiency in humans of gulonaolactone exidase, a key enzyme for ascorbic acid biosyntheis. *Am. J. Clin. Nutr.,* 54, 1203S, 1991.

92. Martin, A. P., Naylor, G. J. P., and Palumbi, S. R., Rates of mitochondrial DNA evolution in sharks are slow compared with mammals, *Nature,* 357, 153, 1992.

ضمیمه ۱ : جدول اسامی علمی، انگلیسی و فارسی آبزیان

نام علمی	نام انگلیسی	نام فارسی
Acipenser baeir	**Siberian sturgeon**	ناسماهی سیبری
Amia calva	**Bowfin**	باله کمانی
Anguilla japonica	**Japanese eel**	مارماهی ژاپنی
Artemia spp	**Brine shrimp**	آرتیما
Carrassius auratus	**Gold fish**	ماهی حوض ، ماهی طلایی
Channa punctatus	**Snake head**	سرماهی
Pagrus major	**Read sea bream**	شانک قرمز
Cirrhina mrigala	**Mrigal**	مریگال
Clarias batrachus	**Asian catfish, walking catfish**	گربه‌ماهی آسیایی، قدم زن
Clarias gariepinus	**African catfish**	گربه ماهی آفریقایی
Corregonnus lavaretus	**White fish**	سفیدماهی
Cyprinus Carpio	**Common carp**	کپورماهی
Dasyatis akejei	**Stingray**	سفره‌ماهی خاردار
Dicentrarchus labrax	**Seabass**	یاس دریایی
Heteropneustes fossilis	**Freshwater Catfish**	گربه‌ماهی آب شیرین
Hippoglossus hipoglossus	**Atlantic halibut**	هالیبوت
I ctalurus punctatus	**Channel Catfish**	گربه ماهی روگاهی (معمولی)
Lates calcarifer	**Barramandi**	سوف عظیم جثه- بارامونده‌ی
Litopenaeus Vannamei	**White leg shrimp**	میگوی پاسفید
Mucrobrachium rosenbergii	**Freshwater prawn**	میگوی آب شیرین

نام علمی	نام انگلیسی	نام فارسی
Marsupenaeus japonicus	**Kuruma**	میگوی کروما
Micropogonias undulatus	**Atlatic croaker**	
Mugil cephalus	**Grey mullet**	کفال خاکستری
Mustelus manazo	**Gummy shark**	
Neoceratodus forsteri	**Australian lungfish**	ماهی شش دار استرالیایی
Oreochromis aureus	**Blue tilapia**	تیلاپیای آبی
Oreochromis niloticus	**Nile tilapia**	تیپلای رودخانه نیل
Orcorhynchus mykiss	**Rainbow trout**	قزل‌آلای رنگین کمان
Orcorhynchus nerka	**Sockeye salmon**	ماهی آزاد سوک ماهی
Orcorhynchus kisutch	**Coho salmon**	ماهی آزاد کوهو، آزاد نقره‌ای
Orcorhynchus tschawytscha	**Chinook salmon**	ماهی آزاد چینوک، آزاد سیاه
Oryzias latipes	**Medaka**	مداکا
Parralichthys olivaceus	**Japanese flounder**	کفشک ماهی ژاپنی
Penaeus monodon	**Black tiger shrimp**	میگوی ببری سیاه
Petromyzon marinus	**Lamprey**	لامپری دریایی
Piaractus mesopotamicus	**Pacu**	پاکو
Protopterus aethiopicus	**African lungfish**	ماهی شش دار آفریقایی
Rutilus rutilus	**Roach**	کلمه
Salmo salar	**Atlantic salmon**	ماهی آزاد اصیل (اطلس)
Salvelinus alpinus	**Arctic charr**	قزل‌آلای قطبی

نام علمی	نام انگلیسی	نام فارسی
Salvelinus fontinalis	**Brook trout**	قزل‌آلای جویباری
Salvelinus namaycush	**Lake trout**	قزل‌آلای دریاچه‌ای (امریکایی)
Sciaenops ocellatus	**Red drum**	میش ماهی قرمز
Scophthalamus maximus	**Turbot**	تور بوت
Sebastes schlegeli	**Korean rockfish**	صخره ماهی کره‌ای
Seriola quinqueradiata	**Yellow tail**	دُم زرد
Silarus glanis	**Wels, Sheatfish**	اسبله معمولی، ماهی غلافدار
Sparus aurata	**Gilthead sea-bream**	شانک سرطلایی

ضمیمه ۲ : علایم اختصاری

AA	Acid Ascorbic
AAS	Ascorbyl sulfate
AP	Ascorbyl palmitate
C2G	Ascorbate-2-glycoside
C2MP	L-ascorbyl-2-monophosphate
C2MP-Mg(AMP)	L-ascorbyl-2-monophosphate-Mg
C2MP-Na	L-ascorbyl-2-monophosphate- Na
C2PP	L-ascorbyl-2-polyphosphate
C2S	L-ascorbyl-2-sulfate
CAT	Catalase
DHA	Dehydro ascorbic acid
DNPH	2,4-dinitrophenyl hydrazine
EIMS	Electro-ionizing mass spectroscopy
GLO	Glono Lactone oxidase
GPx	Glutathione peroxidase
HPLC	High pressure liquid chromatography
MBL	Marine biological laboratory
MLS	Maximum liver storage
PCA	Perchloric acid
PD	Practical diets
SOD	Superoxide dismutase
SPD	Semi-purified diets
TCA	Trichlor acetic acid

ضمیمه ۳ : واژه‌نامه

Acid ascorbic ، ۷	اسیدآسکوربیک
Acquired ، ۲۰۹،۲۱۳	اکتسابی
Actin ، ۷	اکتین
Acute-phase proteins ، ۲۱۲	پروتئین های فاز حاد
Adrenal gland ، ۶	غده آدرنال
Agglutination ، ۲۱۴	آگلوتیناسیون
Air dive ، ۳۳۳	نگهداری در هوا
Aldrin ، ۱۹۴	آلدرین
Alkaline phosphatase ، ۲۰۹	آلکالین فسفاتاز
Amidation ، ۳۴۷	آمیداسیون
Anorexia ، ۱۱۵	بی اشتهایی
Antiscorbutic ، ۷	ضد کمبود اسیدآسکوربیک
Ascorbyl palmitate ، ۷۹	پالمیتات آسکوربیل
Ascorbyl radical ، ۲۵	رادیکال آسکوربیل
Astaxanthin ، ۱۴۸	آستازانتین
Autofluorescent ، ۱۶۴	اتوفلورسنت
Avitamininosis ، ۳۶۱	آویتامینوزیس
Basolateral membrane vesicle ، ۳۰۰	وزیکول غشایی قاعده ای – جانبی
Bioavailability ، ۱۳۱	زیست فراهمی
Bioavailable ، ۷۸	زیست فراهم
Bioenergetics ، ۸	بیوانرژتیک

Biotransformation ، ۱۹۲	تغییرشکل زیستی
Black death ، ۱۲۵،۱۵۰	مرگ سیاه
Broken-skull disease ، ۸۸	بیماری شکستگی جمجمه
Brush border ، ۲۹۲	حاشیه پرزکی
Calanoid ، ۲۴۴	کالانوئید
Capture stress ، ۱۹۲	استرس صید
Catalase ، ۱۹۸	کاتالاز
Ceruloplasmin ، ۱۹۴	سرولوپلاسمین
Chain-breaking ، ۲۵	قطع کننده زنجیره
Chelate ، ۶۳،۱۶۸	شلات
Chemotaxis ، ۲۱۴	کموتاکسی، جاذبه شیمیایی
Chloroorganics ، ۱۹۳	کلروارگانیک
Chromophore ، ۱۶	کروموفور
Coated AA ، ۵۶	اسیدآسکوربیک پوشش دار
Condition factor ، ۱۰۷	ضریب چاقی
Cyan methemoglobin ، ۱۰۷	سیان مت هموگلوبین
Cytokine ، ۲۱۲	سیتوکین
Cytotoxicity ، ۲۱۸	سیتوتوکسی سیتی، مسمومیت یاخنه ای
Dehydro ascorbic acid ، ۱۵،۲۵	اسید دهیدروآسکوربیک
Dystrophy ، ۲۰۰	دیستروفی

Early mortality syndrome ، ۲۰۳	سندروم مرگ و میر اولیه
Eye cartilage ، ۱۳۷	غضروف چشمی
Feed efficiency ، ۸۰،۱۰۷	کارایی جیره غذایی
Fitness ، ۴۲	شایستگی، سازگاری
Flavonoid ، ۱۶۷	فلاونوئید
Flavonol ، ۳۶۰	فلاونول
Folate ، ۱۴۳	فولات
Fumaric acid ، ۷	اسید فوماریک
Gene pool ، ۴۳	ذخیره ژنی
Genetic drift ، ۴۳	رانش ژنتیکی
Glycerol ، ۷	گلیسرول
Goblet cell ، ۲۱۱	سلول جامی
Guinea pig ، ۳۰	خوکچه هندی
Hans Krebs citric acid cycle ، ۷	چرخه تنفسی هانس کربس
Hatchability ، ۲۰۱	قابلیت تفریخ
Hepatosomatic index ، ۱۰۷	شاخص کبدی
High pressure liquid chromatography ، ۱۶	کروماتوگرافی مایع با فشار(کارایی) بالا
Hyperbolic ، ۳۱۶	هیپروبولیک

Hyperglycemic ، ۱۹۱	افزایش قند خون
Hypertyrosinemia ، ۵۶	هیپرتیروزینمی
Hypervitaminosis ، ۱۶۶	هیپرویتامینوزیس
Hyposalinity ، ۱۹۰	شوری کم
Immunomodulator ، ۶۵	میانجی ایمنی
Innate ، ۲۱۱	ذاتی، طبیعی
Insulin-like growth factor I ، ۳۴۷،۳۶۳	فاکتور رشد شبه انسولینی
Interleucin activity ، ۳۶۸	فعالیت اینترلوکین
Isoflavonoid ، ۲۰۰	ایزوفلاونوئید
Jaundice ، ۲۵۵	زردی
Jumping behavior ، ۳۳۳	رفتار پرشی
Lethargy ، ۱۱۵	ضعف
Lindane ، ۱۹۴	لیندان
Lordosis ، ۱۳۸	لوردوزیس
Menadione ، ۲۹	منادیون
Metallothionein ، ۱۹۹	متالوتیونین
Methemoglobinemia ، ۱۹۲	مت هموگلوبین
Microsome ، ۲۷	میکروزوم
Microwave ، ۱۶	ریز امواج

Mitogen-induced proliferation ، ۱۹۴	تکثیر القاء شده توسط مواد میتوژن
Mucosa ، ۳۰۲	موکوس
Myodegneration ، ۲۰۱	تخریب عضلانی
Myosin ، ۷	میوزین
Na+, K+ ATPase ، ۱۹۱	پمپ سدیم-پتاسیم آت پ آزه
Natural killer cell ، ۲۱۲	سلول کشنده طبیعی
Ontogeny ، ۱۳۸	هستی زایی، انتوژنی
Operator ، ۲۸	متصدی دستگاه، اپراتور
Opsonization ، ۲۱۳	اُپسونیزاسیون
Oxidative blackening ، ۶	سیاه شدن اکسیدانی
Oxidative burst response ، ۶۵،۲۱۵	پاسخ انفجار اکسایشی
Oxidative challenge ، ۱۶۴	چالش اکسایشی
Oxidative damage ، ۵۹	آسیب اکسایشی
Oxygen consumption method ، ۲۸	روش مصرف اکسیژن
Pacu ، ۸۸	ماهی پاکو
Parr ، ۱۷۶	پار
Parrot fish ، ۱۳۸	طوطی ماهی
Passerins ، ۳۰	گنجشکیان
Phagocytic activity ، ۶۵	فعالیت فاگوسیتوزی
Phagocytic engulfment ، ۲۱۶	بلع فاگوسیتوزی

Pigmentation ، ۵۶،۲۵۳	رنگدانه سازی
Plateau ، ۶۷	کفه – سطح صاف
Practical diets ، ۷۹	جیره های غذایی کاربردی
Prawn ، ۱۲۵	میگوی آب شیرین
Protein efficiency ratio ، ۱۰۷	ضریب تبدیل پروتئین
Protein productive value ، ۱۰۷	ارزش (شاخص) تولیدی پروتئین
Rat ، ۱۷	موش صحرایی
Reactive oxygen species ، ۶۵	انواع اکسیژن واکنشی
Red-ox ، ۱۵۸	ردوکس
Retention time ، ۳۵۱	زمان ماندگاری
Retroviral ، ۳۲۱	رتروویروسی
Random fixation ، ۴۳	تثبیت تصادفی
Scoliosis ، ۱۳۸	اسکولیوزیس
Semi-purified diet ، ۷۹،۴۰	جیره غذایی نیمه خالص
Serosa، ۳۰۲	سروز
Serum heamolytic complement activity، ۲۱۸	فعالیت همولیتیک کمپلمان(مکمل) خونی
Shrimp ، ۱۲۵	میگوی آب شور
Smoltification ، ۹۳	اسمولتیفیکیشن
Specific growth rate ، ۱۰۷	نرخ رشد ویژه
Superoxide dismutase ، ۱۹۰	سوپراکسید دیسموتاز

تیامین	Thiamin ، ۲۰۳
توکسافن	Toxaphene ، ۱۹۳
ویتامینQ	Ubiquinon ، ۲۰۳
خصوصیت تحلیل رفته	Vestigial character ، ۴۲
پاهای حرکتی	Walking legs ، ۱۲۵