



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره پنجم، شماره اول، بهار ۹۶

<http://jair.gonbad.ac.ir>

تغییرات فعالیت آنزیم‌های گوارشی کپور نقره‌ای *Hypophthalmichthys molitrix*

(Valenciennes, 1844) طی مراحل رشد و نمو جنینی و لاروی

فروزان چوبیان*^۱، بابک تیزکار^۲، مهران آوخ^۳، عسگر زحمتکش^۳

^۱دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی آبزیان، مرکز آموزش عالی علمی کاربردی علوم

و صنایع شیلاتی میرزا کوچک خان، رشت، ایران

^۲کارشناس موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

^۳آستادیار گروه شیلات، مرکز آموزش عالی علمی کاربردی علوم و صنایع شیلاتی میرزا کوچک خان، رشت، ایران

تاریخ ارسال: ۹۴/۱۰/۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۱۹

چکیده

مطالعه فعالیت آنزیم‌های گوارشی در ماهیان، جهت پی بردن به مقدار فعالیت آنزیمی و آگاهی از قدرت هضم آن، امری بسیار ضروری است. مطالعه حاضر نیز با هدف تعیین تغییرات آنزیم‌های گوارشی در تخم لقاح یافته و لارو در قبل و بعد از جذب کیسه زرده کپور نقره‌ای (*H. molitrix*) انجام گردید. بدین‌منظور نمونه-برداری از مراحل مختلف لاروی در مراحل تخم لقاح یافته، شروع مرحله گاسترولاسیون و زمان تفریح و مرحله لاروی در مرحله جذب دو سوم کیسه‌زرده، در مرحله شروع تغذیه فعال و سه روز پس از تغذیه فعال نمونه‌برداری انجام شد. در این تحقیق میزان آنزیم آمیلاز، به روش دستی و میزان آنزیم لیپاز به روش آنزیمی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت اختصاصی لیپاز در لارو سه روز پس از تغذیه فعال به شکل معنی‌داری بیش از سایر مراحل بود. فعالیت اختصاصی آنزیم آمیلاز در لارو سه روز پس از تغذیه فعال به شکل معنی‌داری بیش از سایر مراحل بود و اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد. بطورکلی فعالیت اختصاصی آنزیم‌های آمیلاز و لیپاز طی مراحل نمونه‌برداری روند افزایشی نشان داد.

واژه‌های کلیدی: *H. molitrix*، لارو، آنتوژنی، فعالیت آنزیمی، آمیلاز، لیپاز

*نویسنده مسئول: fchubian_59@yahoo.com

مقدمه

در تکثیر و پرورش مصنوعی ماهیان، آگاهی از فعالیت آنزیم‌های گوارشی طی مراحل رشد و نمو بسیار ضروری است. زیرا مراحل جنینی و لاروی از حساس‌ترین مراحل می‌باشند و اطلاعات حاصل می‌تواند در تعیین زمان مناسب جهت تغییر تغذیه از غذای زنده به غذای کنستانت‌تره و محدودیت‌های مرتبط با استفاده از رژیم‌های غذایی دستی موثر واقع شود (Alvarez-Gonzalez *et al.*, 2006). فعالیت آنزیم‌های گوارشی شاخص خوبی جهت سنجش ظرفیت گوارشی و همچنین بیانگر تکامل دستگاه گوارش و وضعیت تغذیه‌ای ماهی است (Ueberschär, 1993; Yúfera and Darias, 2007) و گوارش و جذب مواد غذایی تا حد زیادی به فعالیت آنزیم‌های گوارشی بستگی دارد (Klein *et al.*, 1998). با مطالعه فعالیت آنزیم‌های گوارشی می‌توان اطلاعات زیادی در ارتباط با فیزیولوژی گوارش و شرایط تغذیه‌ای ماهی فراهم نمود (Bolasina *et al.*, 2006) و این امر می‌تواند در تدوین برنامه غذایی مناسب سودمند باشد (Verreth and Senger, 1995). فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهیان با تغذیه و عادات غذایی آن‌ها در ارتباط است (Fernandez *et al.*, 2011). در لارو ماهیان علف‌خوار و همه‌چیزخوار به دلیل فقدان ساختار معده و عدم ترشح پپسین گوارش و هضم غذا وابسته به آنزیم‌های پانکراسی و روده است. از این رو بیشتر مطالعات اولیه آنتوژنی آنزیم‌های گوارشی لارو این ماهیان بر روی پروتئازهای پانکراسی متمرکز می‌گردد (Lazo *et al.*, 2007). یکی از مهم‌ترین عوامل در پرورش لارو ماهیان، توانایی لارو در هضم و جذب کافی مواد مغذی، از دستگاه گوارش است (Alvarez-Gonzalez *et al.*, 2008). آنتوژنی آنزیم‌های گوارشی در گونه‌های مختلف ماهیان از جمله *Salmo caspius* (Gisbert *et al.*, 2004)، *Pralichthys californicus* (Zamani *et al.*, 2009)، *Acipenser persicus* (Babaei *et al.*, 2011)، *Rutilus frisii kutum* (Farhodi *et al.*, 2013)، *Cyprinus carpio* (Bakhtiarvandi and Abedian kenari., 2015) صورت گرفته است. کپور نقره‌ای متعلق به خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) و یکی از گونه‌های مهم ماهیان پرورشی گرمابی است که دارای سازگاری بسیار خوبی با اقلیم‌های متنوع ایران می‌باشد. کپور نقره‌ای در رودخانه‌های ساحل آسیایی اقیانوس آرام از رود آمو در شمال تا رود پرل (Pearl) در جنوب چین یافت می‌شود. این گونه از نظر پرورش اقتصادی است زیرا با استفاده از رژیم غذایی کم هزینه و سطوح پایین زنجیره غذایی به مقدار انبوه پرورش داده می‌شود. در بیشتر کارگاه‌های تکثیر و پرورش، بالا بودن مرگ و میر در مرحله لاروی یکی از بزرگ‌ترین مشکلات است و دغدغه اصلی پرورش دهندگان نیز یافتن راهکارهایی جهت کاهش مرگ و میر می‌باشد (Gawlicka *et al.*, 2000). لذا انجام این تحقیق می‌تواند در افزایش راندمان تکثیر موثر باشد. هدف از انجام طرح حاضر، تعیین تغییرات آنزیم‌های گوارشی آمیلاز و لیپاز، طی دوره رشد

و نمو جنینی و لاروی است و دستاوردهای حاصل از آن می‌تواند در ارزیابی احتیاجات غذایی لارو کپور نقره‌ای در هنگام شروع تغذیه فعال و افزایش کیفیت تولید لارو و ماهی جوان موثر باشد و همچنین می‌تواند در ارایه یک جیره غذایی مناسب به منظور بهبود شرایط تغذیه‌ای مولدین مفید واقع گردد.

مواد و روش کار

تهیه نمونه: در تحقیق حاضر، نمونه‌برداری مرحله‌ای از تخم، لارو و همچنین تهیه مولدین کپور نقره‌ای از کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان گرمابی ماهی ایران در رشت و در تیر ماه ۱۳۹۴ انجام شد. دمای آب روزانه در چندین نوبت، با استفاده از دماسنج جیوه‌ای اندازه‌گیری شد. منبع تامین آب مورد نیاز کارگاه، آب رودخانه بود.

جهت تکثیر ۳ عدد مولد نر و ۳ عدد مولد ماده فیتوفاگ انتخاب شدند. میانگین وزن و طول مولدین ماده به ترتیب $11 \pm 1/73$ کیلوگرم و $91/33 \pm 2/30$ سانتی‌متر و میانگین وزن و طول مولدین نر به ترتیب $3/27 \pm 0/25$ کیلوگرم و $66/33 \pm 3/78$ سانتی‌متر بود. ماهیان مولد ۲۴ ساعت قبل از تکثیر به حوضچه‌های مخصوص منتقل شدند. غذادهی مولدین ۲۴ ساعت قبل از تکثیر قطع شد. مولدین ماده و نر جهت تکثیر به حوضچه‌های دایره‌ای به قطر ۸ متر و ارتفاع ۱/۵ متر منتقل شدند. تخم‌های لقاح یافته در محل خروجی حوضچه، در جعبه‌های مخصوص جمع‌آوری شده و به انکوباتورهای پلی‌اتینی منتقل گردیدند. دمای آب در زمان تکثیر ۳۱ درجه سانتی‌گراد بود. دمای آب در زمان نمونه‌برداری مرحله‌ای از تخم و لارو، از ۲۷ تا ۲۹ درجه سانتی‌گراد در نوسان بود.

در این تحقیق نمونه‌برداری از مراحل جنینی و لاروی طی ۶ مرحله انجام شد. این مراحل شامل (مرحله ۱) تخم بعد از تقسیم چهارتایی، (مرحله ۲) تخم در شروع مرحله گاسترولاسیون، (مرحله ۳) تخم در زمان تفریخ، (مرحله ۴) لارو دارای دو سوم کیسه زرده، (مرحله ۵) لارو در انتهای جذب کیسه زرده و (مرحله ۶) لارو ۳ روز پس از تغذیه فعال بود. نمونه‌برداری‌ها با ۳ تکرار انجام گردید. بررسی مراحل جنینی و لاروی جهت تعیین زمان مناسب برای نمونه‌برداری، با استفاده از استریومیکروسکوپ انجام شد. در هر مرحله از نمونه‌برداری ۵۰ عدد تخم و ۵۰ عدد لارو سالم انتخاب شدند. نمونه‌های تخم و لارو پس از انتقال به ظروف مخصوص، با استفاده از یونولیت حاوی یخ سریعاً به آزمایشگاه منتقل گردیدند و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تهیه عصاره از تخم و لارو: جهت سنجش آنزیم‌های گوارشی در مراحل مورد نظر، از نمونه‌های تخم و لارو عصاره‌گیری انجام شد، بدین منظور نمونه‌های تخم و لارو از فریزر خارج شدند و انجماد زدایی آن‌ها در دمای آزمایشگاه صورت گرفت. سپس عمل یکنواخت‌سازی نمونه‌ها در مجاورت یخ و بافر فسفات (PBS) و با استفاده از آون یکنواخت‌کننده به صورت کامل انجام شد (Gawlicka *et al.* ,)

2000). سوسپانسیون تهیه شده به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۴۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ شد. پس از اتمام سانتریفوژ، محلول حاصله با استفاده از میکروسمپلر جمع‌آوری شد و پس از انتقال به میکروتیوب‌های ۱ میلی‌لیتری تا زمان سنجش آنزیم‌های مورد نظر در فریزر ۲۰- نگهداری شد.

سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی: مقدار فعالیت آنزیم آمیلاز، به روش دستی با استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی شرکت زیست شیمی و مقدار فعالیت آنزیم لیپاز به روش آنزیمی، کالریمتری با استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی شرکت پارس آزمون و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل UNICO 2100UV) انجام شد. طبق دستورالعمل شرکت سازنده، آمیلاز بر اساس روش ورتینگتون (Worthington, 1993) و لیپاز بر اساس روش ایجیما و همکاران (Iijima et al., 1998) اندازه‌گیری شد. فعالیت اختصاصی آنزیم‌های گوارشی در تخم و لارو به صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان گردید.

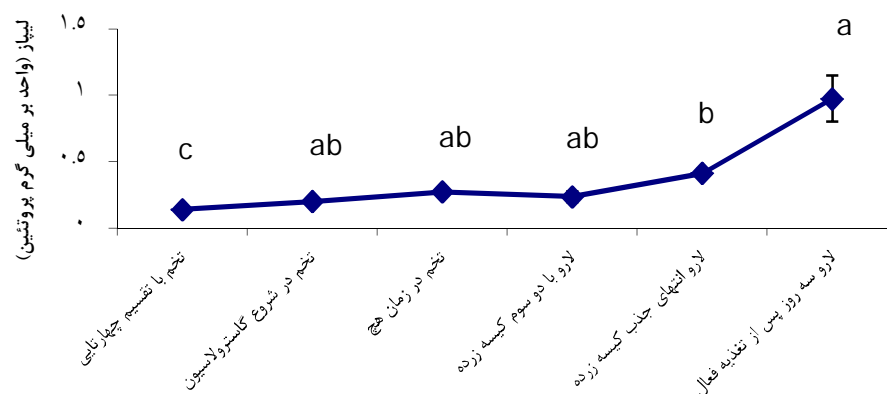
تجزیه و تحلیل داده‌ها: به منظور بررسی توزیع نرمال داده‌ها در گروه‌ها و تکرارها جهت تشکیل تیمارها از آزمون Kolmogorov-Smirnov استفاده شد. در صورت نرمال بودن داده‌ها به منظور مقایسه آماری بین گروه‌ها در تیمارها از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) و پس از انجام آزمون Test of Homogeneity of Variances جهت مقایسه گروه‌ها با یکدیگر از آزمون دانکن استفاده شد. همه داده‌ها به صورت میانگین همراه با انحراف معیار گزارش گردید و ارزیابی‌ها در ۳ تکرار صورت گرفت. کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد. جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2007 استفاده گردید.

نتایج

میانگین فعالیت اختصاصی آنزیم لیپاز به ترتیب در مرحله تقسیم چهارتایی 0.14 ± 0.02 واحد بر میلی‌گرم پروتئین و در لارو سه روز پس از تغذیه فعال 0.98 ± 0.17 واحد بر میلی‌گرم پروتئین بود ($p < 0.05$) و مقدار آن به شکل معنی‌داری بیش از سایر مراحل بود و اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده گردید ($p < 0.05$).

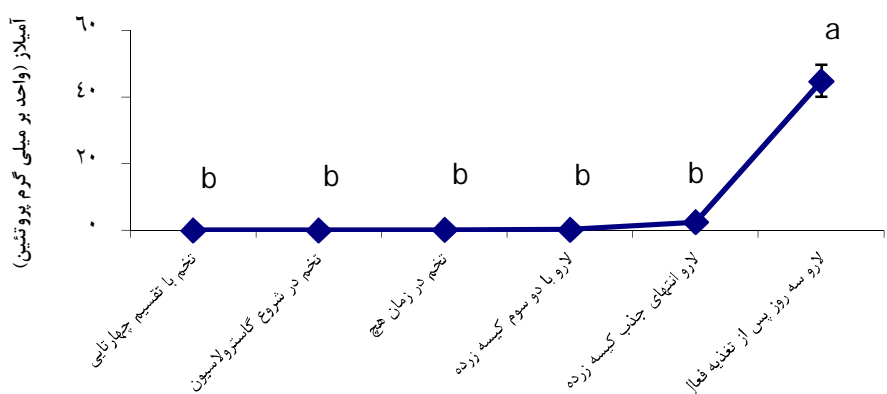
فعالیت آنزیم لیپاز طی مراحل مورد بررسی از روند افزایشی برخوردار بود (شکل ۱) به طوری که مقدار فعالیت آن در مرحله لارو در انتهای جذب کیسه زرده و لارو سه روز پس از تغذیه فعال به ترتیب دارای بیشترین مقدار بود ($p < 0.05$).

تغییرات فعالیت آنزیم‌های گوارشی کپور نقره‌ای...



شکل ۱ - فعالیت اختصاصی آنزیم لیپاز (واحد بر میلی گرم پروتئین) در مراحل مختلف رشد و نمو جنینی و لاروی کپور نقره‌ای (*H. molitrix*) (حروف غیر همنام کوچک نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار آماری است).

فعالیت اختصاصی آنزیم آمیلاز در مراحل مختلف نمونه‌برداری دارای روند افزایشی بود، به‌طوری که در مرحله تقسیم چهارتایی و گاسترولاسیون از مقدار کمتری برخوردار بود و به ترتیب دارای میانگین 0.05 ± 0.05 و 0.062 ± 0.009 واحد بر میلی گرم پروتئین بود فعالیت آنزیم آمیلاز در لارو سه روز پس از تغذیه فعال به شکل معنی‌داری بیش از سایر مراحل بود و اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده گردید ($p < 0.05$). در مرحله لارو انتهای جنب کیسه زرده و لارو سه روز پس از تغذیه فعال، آنزیم آمیلاز بیشترین مقدار را به خود اختصاص داد (شکل ۲).



شکل ۲- فعالیت اختصاصی آنزیم آمیلاز (واحد بر میلی گرم پروتئین) در مراحل مختلف رشد و نمو جنینی و لاروی کپور نقره‌ای (*H. molitrix*). حروف غیر همنام کوچک نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار آماری است.

بحث و نتیجه‌گیری

طبق نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر، فعالیت اختصاصی آنزیم لیپاز در مراحل مختلف نمونه‌برداری دارای روند افزایشی بوده و فعالیت اختصاصی این آنزیم در مراحل جنینی (مرحله ۱ و ۲) کمتر از سایر مراحل بود. لارو کپور نقره‌ای در روزهای سوم یا چهارم زندگی خود از پلانکتون‌های جانوری ریز (روتیفرها، نوزادان آنتن‌منشعب‌ها و پاروپایان) تغذیه می‌کند لذا، افزایش فعالیت لیپولیتیک طی مراحل تکوینی لارو ممکن است یک مکانیسم ژنتیکی جهت سازگاری سیستم گوارشی لارو برای هضم بهتر چربی‌ها به هنگام شروع تغذیه فعال باشد. طبق تحقیقات انجام شده آنزیم لیپاز وابسته به نمک‌های صفراوی است و در گوارش چربی در ماهیان دارای نقش اساسی است (Murray *et al.*, 2004). آنزیم‌های گوارشی تا زمان لقاح و همچنین بلافاصله بعد از تفریح، در متابولیسم (هضم، جذب و انتقال) پروتئین‌ها، چربی‌ها و کربوهیدرات‌های تخم و ذخایر زرده دارای نقش اساسی هستند (Sveinsdottir *et al.*, 2006).

میزان فعالیت اختصاصی آنزیم لیپاز در مرحله انتهایی جذب کیسه‌زرده و سه روز پس از تغذیه خارجی به بیشترین مقدار خود رسید به طوری که فعالیت اختصاصی آنزیم لیپاز سه روز پس از تغذیه خارجی به شکل معنی‌داری بیش از سایر مراحل بود. طبق اظهارات گرین و مک‌کرونیک (Green and McCormick, 2001) فعالیت آنزیم‌های گوارشی قبل از تفریح به مقدار زیادی به ترکیبات کیسه‌زرده وابسته است، در حالی که فعالیت آنزیم‌های گوارشی لارو پس از تغذیه فعال به چربی موجود در جیره‌غذایی بستگی دارد. طبق تحقیقات چکرابارتی و همکاران (Chakrabarti *et al.*, 2006) بیشترین فعالیت اختصاصی آنزیم لیپاز در لارو ماهی *Labeo rohita* در چهارمین روز پس از تفریح گزارش شده که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مطابقت دارد و همچنین افزایش فعالیت این آنزیم در روزهای ۲۲ تا ۳۴ پس از تفریح نیز بیان شده که این امر می‌تواند جهت سازگاری و استفاده بهتر از چربی جیره‌غذایی باشد. همچنین وجود دو نوع آنزیم لیپاز را در لارو ماهیان بیان شد که یکی از آن‌ها فسفولیپاز است که با جذب کیسه زرده (غنی از فسفولیپید) مرتبط است و دیگری آنزیم تری‌گلیسرول است که بعداً توسعه می‌یابد و با تغذیه ماهی (هضم لیپید موجود در غذا) در ارتباط است (Oozeki and Bailey, 1995). از آنجایی که لارو کپور نقره‌ای تا قبل از جذب کیسه‌زرده غذایی دریافت نمی‌کند لذا آنزیم لیپاز می‌تواند از نوع اول باشد.

طبق تحقیق برخی محققان میزان فعالیت آنزیم لیپاز در لارو ماهی *Centropomus undecimalis* در سومین و سی و ششمین روز پس از تفریح به طور ناگهانی افزایش یافت که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (Jimenez-Martinez *et al.*, 2012). مطالعات گوناگونی که در خصوص میزان فعالیت آنزیم لیپاز در دوره لاروی انجام شده است نشان دهنده دو افزایش در مقدار فعالیت این

آنزیم است که اولین مقدار افزایش در فعالیت این آنزیم مربوط به روزهای اولیه زندگی و با هیدرولیز چربی زرده است و دومین افزایش در مقدار فعالیت آن با توسعه سیستم گوارشی لارو اتفاق می‌افتد (Oozeki and Baley, 1995). اما این مقدار فعالیت‌ها می‌تواند به تغییر در منابع غذایی و غنی‌سازی غذا با امولسیون‌های چربی نیز در ارتباط باشد (Hoehne-Reitan and Kjørsvik, 2004). بیشترین فعالیت آنزیم لیپاز در لارو ماهی *Solea senegalensis* در روزهای هفتم، دهم و سی و ششم پس از تفریح گزارش شده و علت این امر توسعه پانکراس اگزوکرینی بیان شده است (Martinez et al., 1999). گلچین‌فر و همکاران (Golchinfar et al., 2011) افزایش میزان فعالیت اختصاصی آنزیم لیپاز را در لارو ماهی *Oncorhynchus mykiss* بین روزهای ۳۱-۲۵ گزارش نمودند و این افزایش را با افزایش سن لارو مرتبط دانستند.

در تحقیق حاضر، فعالیت اختصاصی آنزیم آمیلاز در مراحل مختلف نمونه‌برداری دارای روند افزایشی بود و در مرحله انتهایی جذب کیسه زرده و سه روز پس از تغذیه خارجی به بیشترین مقدار خود رسید و فعالیت این آنزیم سه روز پس از تغذیه خارجی به شکل معنی‌داری بیش از سایر مراحل بود که با یافته ناز (Naz, 2009) مطابقت دارد. با توجه به عدم استفاده از ترکیبات جیره‌ غذایی قبل از شروع تغذیه خارجی، دلیل فعالیت‌های مختلف آمیلاز قبل از شروع تغذیه خارجی را می‌توان یک برنامه‌ریزی ژنتیکی بیان نمود. پرس و همکاران (Péres et al., 1996) نیز پایین بودن فعالیت اختصاصی آنزیم آمیلاز را یک برنامه‌ریزی ژنتیکی بیان نمودند. دستور رونویسی آنزیم‌های گوارشی در ماهیان، قبل از باز شدن دهان بیان می‌گردد (Zambonino Infante and Cahu, 2007). در لارو ماهیان برخی از آنزیم‌های پانکراسی از قبیل تریپسین و آمیلاز می‌توانند قبل از باز شدن دهان پدیدار گردند که این امر نشان می‌دهد که سنتز آنزیم با بلع غذا صورت نمی‌گیرد (Zambonino Infante and Cahu, 2001).

طبق تحقیقات به عمل آمده توسط چکرابارتی و همکاران (Chakrabarti et al., 2006) افزایش فعالیت اختصاصی آنزیم آمیلاز در لارو ۱۰ روزه *Labeo rohita* بیانگر سازگاری لارو جهت استفاده از کربوهیدرات بیان شده است. همچنین افزایش فعالیت آنزیم آمیلاز در لارو بیست و یک روزه کپور نقره‌ای، کپور علفخوار و کپور سرگنده نیز گزارش شده است که، همزمان با مصرف فعالانه لارو از بسیاری از فیتوپلانکتون‌ها و زئوپلانکتون‌ها رخ داده است (Volkova, 1999). افزایش فعالیت برخی از آنزیم‌های گوارشی علاوه بر رژیم غذایی می‌تواند با افزایش سن در ماهیان نیز در ارتباط باشد (Hidalgo et al., 1999). لاروهای جوان نسبت به لاروهای مسن دارای فعالیت‌های آمیلازی بیشتری هستند که این موضوع بیانگر اهمیت استفاده از گلووسیدها طی هفته‌های اول زندگی است و به همین

علت بعضی از محققین پیشنهاد فرموله کردن جیره‌های غذایی را همراه با سطوح قابل توجهی از نشاسته ارائه کردند (Zambonino Infante and Cahu, 2001). ترشحات آنزیمی در لارو ماهیان می‌تواند با وقایعی همچون تکامل دستگاه گوارش و شکل‌گیری برخی اندام‌های مهم در عمل گوارش نظیر پانکراس و کبد در ارتباط باشد (Govoni *et al.*, 1986). به‌طور کلی متناسب بودن جیره‌های غذایی با ویژگی‌های گوارشی لارو در تسهیل فرآیند تکامل و بلوغ روده موثر می‌باشد. با توجه به رژیم غذایی کپور نقره‌ای (فیتوپلانکتون‌خواری)، افزایش آنزیم آمیلاز جهت آمادگی لارو در هضم مقادیر بالای کربوهیدرات‌های غذایی مصرفی به هنگام شروع تغذیه فعال منطقی به نظر می‌رسد. به‌طوری‌که، کیسبرت و همکاران (Gisbert *et al.*, 2009) نیز به مقادیر بالای گلیکوژن و کربوهیدرات در غذای زنده اشاره نمودند.

میزان فعالیت اختصاصی آنزیم‌های آمیلاز و لیپاز لارو قبل از شروع تغذیه خارجی، طبق یک برنامه‌ریزی ژنتیکی است و با فیزیولوژی هضم و متابولیسم ماهی جهت سازگاری سیستم گوارشی به منظور هضم بهتر و بیشتر چربی و کربوهیدرات جیره غذایی است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از تمام افرادی که در انجام این تحقیق همکاری صمیمانه‌ای داشتند از جمله: جناب آقای ریسیان مدیریت محترم کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان گرمابی "ماهی ایران" و پرسنل زحمتکش آن کارگاه، همچنین از آقایان دکتر بهمنی ریاست محترم موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر و مهندس محمد حسن‌زاده صابر سرپرست محترم بخش ژنتیک و بیوتکنولوژی به دلیل مساعدت در استفاده از امکانات آزمایشگاهی آن موسسه و بخش مذکور و در نهایت از همکاری صمیمانه جناب آقای مهندس محمدرضا نوروزفشخامی طی تمامی مراحل انجام این تحقیق تشکر و تقدیر می‌گردد.

منابع

- Alvarez-González C.A., Cervantes-Trujano M., Tovar-Ramírez D., Conklin D.E., Nolasco H., Gisbert E., Piedrahita R. 2006. Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 31: 83-93.
- Alvarez-Gonzalez C.A., Moyano-Lopez F.J., Civera-Cerecedo R., Carrasco-Chavez V., Ortiz-Galindo J.L., Dumas S. 2008. Development of digestive enzyme activities in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*: I. Biochemical analysis. *Fish Physiology and Biochemistry*, 34: 373-384.

- Babaei S.S., Abedian Kenari A., Nazari R., Gisbert E. 2011. Developmental changes of digestive enzymes in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) during larval ontogeny. *Aquaculture*, 318(1-2): 138-144.
- Bolasina S., Perez A., Yamashita Y. 2006. Digestive enzymes activity during ontogenetic development and effect of starvation in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 252(2-4): 503-515.
- Chakrabarti R., Rathore R.M., Kumar S. 2006. Study of digestive enzyme activities and partial characterization of digestive proteases in a freshwater teleost, *Labeo rohita*, during early ontogeny. *Aquaculture Nutrition*, 12: 35-43.
- Farhoudi R., Abedian kenari A.M., Nazari R.M., Makhdoomi C.H. 2013. Changes of digestive enzymes activity in common carp (*Cyprinus carpio*) during larval ontogeny. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 12(2): 320-334.
- Fernandez I., Moyano F.J., Diaz M., Martinez T. 2011. Characterization of alpha-amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (Sparidae, Teleostei). *Journal of Experimental Marine Biology Ecology*, 262: 1-12.
- Gawlicka A., Parent B., Horn M.H., Ross N., Opstad I., Torrissen O.J. 2000. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): indication of readiness for first feeding. *Aquaculture*, 184: 303-314.
- Gisbert E., Piedrahita R.H., Conklin D.E. 2004. Ontogenic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture*, 232: 455-470.
- Gisbert E., Giménez G., Fernandez I., Kotzamanis Y., Estévez A. 2009. Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. *Aquaculture*, 287: 381-387.
- Golchinfar F., Zamani A., Hajimoradloo A., Madani R. 2011. Assessment of digestive enzymes activity during the fry development of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*: from hatching to primary stages after yolk sac absorption. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 10(3): 403-414.
- Govoni J., Boehlert G.W., Watanabe Y. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environmental Biology of Fishes*, 16(1-3): 59-57.
- Green B.S., McCormick M.I. 2001. Ontogeny of the digestive and feeding systems in the anemone fish *Amphiprion melanopus*. *Environmental Biology of Fishes*, 61: 73-83.
- Hidalgo M.C., Urea E., Sanz A. 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits, proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*, 170(3-4): 267-283.
- Hoehne-Reitan K., Kjørsvik E. 2004. Functional development of the liver and exocrine pancreas in teleost fish. *American Fisheries Society Symposium Proceeding*, 40: 9-36.

- Iijima N., Tanaka S., Ota Y. 1998. Purification and characterization of bile salt-activated Lipase from the hepatopancreas of red sea bream (*Pagrus major*). *Journal of Fish Physiology and Biochemistry*, 18: 59-69.
- Jimenez-Martinez L.D., Alvarez-Gonzalez C.A., Tovar-Ramirez D. 2012. Digestive enzyme activities during early ontogeny in Common snook (*Centropomus undecimalis*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(2): 441-54.
- Khosravi Bakhtiarvandi N., Abedian kenari A.M. 2015. Changes of digestive enzymes activity in Caspian kutum (*Rutilus frissi kutum*) during larval developmental stages. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 14(1): 158-175.
- Klein S., Cohn S.M., Alpers D.H. 1998. The alimentary tract in nutrition. In: Shils M.E., Olson A.J., Shike M., Ross A.C. (Eds.). *Modern Nutrition in Health and Disease*, pp: 605-633.
- Lazo J.P., Mendoza R., Holt G.J., Aguilera C., Arnold C.R., 2007. Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 265: 194-205.
- Martinez M.I., Moyano F.J., Fernandez-Diaz C., Yufera M. 1999. Digestive enzyme activity during larval development of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 21: 317-323.
- Murray H.M., Gallant J.W., Perez-Casanova J.C., Johnson S.C., Douglas S.E. 2004. Ontogeny of lipase expression in Winter flounder. *Journal of Fish Biology*, 62: 816-833.
- Naz M. 2009. Ontogeny of Biochemical Phases of Fertilized Eggs and Yolk Sac Larvae of Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 9: 77-83.
- Oozeki Y., Baley M. 1995. Ontogenetic development of digestive enzyme activities in larval walleye pollock, *Theragra chalcogramma*. *Marine Biology*, 122: 177-186.
- Péres A., Cahu C.L., Zambonino Infante J.L., Legall M.M., Quazuguel P. 1996. Amylase and trypsin responses to intake of dietary carbohydrate and protein depend on the developmental stage in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 15: 237-242.
- Sanz A, Llorente J.I., Furne M., Ostos-Garrido M.V., Carmona R., Domezain A., Hidalgo M.C. 2011. Digestive enzymes during ontogeny of the sturgeon *Acipenser naccarii*: intestine and pancreas development. *Journal of Applied Ichthyology*, 27: 1139-46.
- Sveinsdottir H., Thorarensen H., Gudmundsdottir A. 2006. Involvement of trypsin and chymotrypsin activities in Atlantic cod (*Gadus morhua*) embryogenesis. *Aquaculture*, 260: 307-314.
- Ueberschär B. 1993. Measurement of proteolytic enzyme activity: significance and application in larval fish research. In: Walter B.T., Fyhn H.J. (Eds.).

- Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development. University of Bergen, Norway, pp: 233–239.
- Verreth J., Segner H. 1995. The impact of development on larval nutrition. In: Lavens P., Jasper E., Roelants I. (Eds.). Larvi' 95, Fish and Shellfish Larviculture Symposium, Europe Aquaculture Society, Special Publication, pp: 24-25.
- Volkova I.V. 1999 Activities of digestive enzymes in plant-eating fish at early phases of ontogenesis. Candidate of Science (Biology), Ph.D Dissertation, Astrakhan Technical University, Astrakhan, Russia.
- Worthington C.C. 1993. Worthington Enzyme Manual. Enzymes and related Biochemicals Worthington Chemical. New Jersey. USA. 730 P.
- Yúfera M., Darias M.J. 2007. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. *Aquaculture*, 268: 53–63.
- Zamani A., Hajimoradloo A., Madani R., Farhangi M., 2009. Assessment of digestive enzymes activity during the fry development of the endangered Caspian brown trout *Salmo caspius*. *Journal of Fish Biology*, 75: 932–937.
- Zambonino Infante J.L., Cahu C.L. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 130: 477-487.
- Zambonino Infante J.L., Cahu C.L. 2007. Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish: applications to diet formulation. *Aquaculture*, 268: 98–105.

