مجله بوم شناسی آبزیان

Journal homepage: http://jae.hormozgan.ac.ir

اثر سطوح مختلف نوکلئوتید جیره غذایی بر برخی شاخص‌های ایمنی و پروتئین کل پلاسمای مولد میگوی سفیدغربی (*Litopenaeus vannamei*) طی رسیدگی جنسی و قطع پایه چشمی

علی ارشدی[1*]، وحید یاوری[2]، امین اوجی فرد[3]، سید محمد موسوی[2]

[1] گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل

[2] گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

[3] گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس بوشهر

نوع مقاله:
پژوهشی

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۹۴/۰۹/۰۶
اصلاح: ۹۴/۱۱/۰۳
پذیرش: ۹۴/۱۱/۱۳

کلمات کلیدی:
پروتئین پلاسما
میگوی سفیدغربی
نوکلئوتید
هموسیت

چکیده

در این پژوهش تأثیر چهار سطح نوکلئوتید (۰، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ درصد) جیره بر پروتئین کل پلاسما و برخی شاخص‌های ایمنی مولدین ماده میگوی سفیدغربی (*Litopenaeus vannamei*) در چهار تیمار آزمایشی (هر یک با سه تکرار) طی رسیدگی جنسی مورد بررسی قرار گرفت. پروتئین پلاسما به روش رنگ سنجی بیوره، تعداد کل هموسیت ها و شمارش تفریقی هموسیت ها در ابتدای دوره تغذیه ای، ۲۱ و ۳۰ روز پس از شروع تغذیه سنجش شد. طبق نتایج، نوکلئوتید جیره باعث افزایش ۳۵ درصدی تعداد کل هموسیت‌ها نسبت به گروه کنترل گردید (P< ۰/۰۵). در شمارش افتراقی، نوکلئوتید جیره باعث افزایش معنی دار درصد سلول‌های گرانولوسیت و کاهش معنی‌دار درصد سلول‌های هیالینه و نیمه گرانولوسیت در مقایسه با گروه کنترل گردید (P< ۰/۰۵). بیشترین و کمترین تعداد کل هموسیت‌ها به ترتیب در تیمار ۰/۶ درصد نوکلئوتید و گروه کنترل ثبت گردید. همچنین، پروتئین پلاسما در تمام تیمارها در روز ۲۱ و ۳۰ با هم اختلاف معنی‌داری داشتند که مقدار آن در تیمار ۰/۴ نوکلئوتید نسبت به تیمارهای دیگر بیشتر بود (P<۰/۰۵). نتایج نشان داد استفاده از نوکلئوتید خوراکی در سطح ۰/۶ درصد بر شاخص ایمنی در مولد میگوی سفیدغربی تأثیر گذار می باشد.

مقدمــه

میگوی سفیدغربی یکی از گونه های تجاری مهم از گونه های پرورشی خانواده Penaeidae محسوب می شود با توجه به غیربومی بودن این گونه، سالانه هزینه های زیادی جهت تأمین مولد از خارج کشور صورت می گیرد، لذا یکی از راهکارهای اساسی در تأمین مولد و عدم نیاز به مولد وارداتی، تولید مولد در داخل می باشد. با تأمین نیازهای غذایی، شرایط مناسب محیطی و همچنین کنترل

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: arshadi.ali@gmail.com

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-06-11]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1395.6.1.12.0]

بیماری ها، اهلی سازی میگوی سفیدغربی در سیستم پرورشی را می توان در تولید مولد پرورشی مد نظر قرار داد (Arcos *et al.*, 2011). استعمال داروهای شیمیایی[1]، محرک های بلوغ جنسی مولدین، محرک های سیستم ایمنی[2] و پروبیوتیک ها از طریق غذا بهترین روش برای بهبود رشد، بلوغ جنسی، پیشگیری و کنترل انواع بیماری های میگو گزارش شده است (Shankar, 2008؛ Saraswati *et al.*, 2013). محققین نشان دادند که هرگاه در غذای مولدین، تعدیل ترکیبات جیره به خوبی صورت نگرفته و یا عناصر ضروری به حد کافی در غذا موجود نباشد، سطح ایمنی مولد و حتی راندمان تولیدمثلی کاهش می یابد. از طرفی در اغلب مراکز نگهداری مولدین میگو، تهیه غذا، بالاترین هزینه را به خود اختصاص می دهد (Wouters *et al.*, 2000). در بسیاری از کشورها، عفونت های باکتریایی و ویروسی، ضررهای جبران ناپذیری را در تولید میگو وارد کرده است. بیماری های میگو نتیجه ارتباطی پیچیده بین میگو، عامل بیماری زا و محیط زیست می باشد. تغییرات محیطی باعث ایجاد شرایط تنش زا شده و آسیب پذیری میگو را نسبت به فلور طبیعی و عوامل بیماری زا در آب شور افزایش می دهد. مجموعه عوامل تنش زا باعث کاهش توانایی سیستم ایمنی مولدین میگو می گردد. در مراکز تکثیر میگو به طور مداوم به واسطه غذادهی با غذای تر، تعویض درصد بالای آب مخزن پرورشی، فعالیت‌های پرورشی از جمله قطع پایه چشمی و دستکاری‌های مکرر، مولدین در معرض تنش‌های محیطی قرار می‌گیرند که عوامل مذکور، متابولیسم، سیستم ایمنی، رشد، توان تولید مثلی، پوست اندازی و بقا میگوها را تحت تأثیر قرار می دهد (Chen *et al.*, 1995; Le Moullac and Haffner, 2000). شواهد قابل ملاحظه ای وجود دارد که ارتباط بین تنش و کاهش توان سیستم ایمنی و بیماری را نشان می دهند. وضعیت تغذیه ای یکی از عوامل مؤثر بر توانایی موجود در مقابله با عوامل تنش زا و بیماریزا محسوب می شود. نوکلئوتید جیره های غذایی منجر به تقویت سیستم ایمنی، افزایش سطح جذب روده، بهبود عملکرد تولید مثلی و افزایش رشد آبزیان می گردد (Li and Gatlin, 2006; Grace *et al.*, 2012). نوکلئوتیدها یکی از اجزاء ضروری جیره غذایی مولدین میگو می باشد که به عنوان واحد ساختمانی اسیدهای نوکلئیک، DNA و RNA هستند و در ذخیره، انتقال، بیان اطلاعات و افزایش تکثیر سلول ها، کاهش استرس، تأمین انرژی متابولیک، ساخت آنزیم ها و پروتئین های مختلف نقش تعیین کننده ای دارند (Davis and Parker, 1990). به طور کلی نوکلئوتیدها تقریباً در تمام فرآیندهای سلولی دخالت داشته و نقش مهمی در وظایف ساختاری و تنظیمی بدن دارند و به عنوان یکی از اجزای اساسی جیره غذایی در بیوسنتز پلی ساکاریدها و ویتامین C، در بیوسنتز لیپیدها، پروتئین ها، افزایش روند زرده سازی، افزایش میزان هماوری مولدین، بهبود مراحل تکامل جنینی و همچنین به عنوان محرک سیستم ایمنی در بسیاری از مسیرهای بیوسنتز نیز نقش دارند (Li and Gatlin, 2006؛ Phiriyangkul, 2006). نوکلئوتیدها به صورت پیوسته در سلول سنتز، تجزیه و بازیافت می شوند و پورین ها و پریمیدین‌های ساخته شده از دو مسیر *de novo* یا *salvage* در شرایط معمولی برای فرد کافی هستند. نوکلئوتیدها از طریق مسیر *de novo* از پیش ماده‌های آمینواسید گلوتامین، آسپارتیک اسید، گلایسین، فورمات و دی اکسیدکربن شکل می گیرند. آنها همچنین از طریق مسیر *salvage* به وسیله پیوند ریبوز فسفات با بازهای آزاد به وجود آمده از تجزیه هیدرولیتیکی اسیدهای نوکلئیک و نوکلئوتید سنتز می شوند. این مسیر هم ساده تر است و هم انرژی کمتری نسبت به *de novo* مورد نیاز است و به وسیله بازهای آزاد قابل دسترس تنظیم می شود. در تحقیقات انجام شده روی موجودات مختلف مشخص شده که مسیرهای*de novo* و *salvage* به طور قابل ملاحظه ای بین بافت های مختلف فرق می کند و به طور معناداری تحت تأثیر نیازهای متابولیک یا وظایف فیزیولوژیک قرار می گیرد. در برخی از بافت ها که ظرفیت محدودی در سنتز *de novo* برای تولید نوکلئوتید دارند منبع خارجی از نوکلئوتیدها می‌تواند در مسیر *salvage* برای تولید نوکلئوتید مورد استفاده قرار گیرد و سبب تقویت این مسیر شود (Davis and Parker, 1990; Fegan, 2006). سلول های مهم دستگاه ایمنی مثل لکوسیت ها، لنفوسیت ها و سلول موکوس روده با توجه به متابولیسم سلولی و حجم بالای واکنش سریع، همچنین نیاز بالای آنها به نوکلئوتید، ظرفیت بسیار محدودی برای سنتز نوکلئوتید دارند. در

[1] Chemotherapeutant
[2] Immunostimulant

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-06-11]
[DOR: 20.1001.1.23222751.1395.6.1.12.0]

این سلول ها تهیه نوکلئوتید از منبع خارجی برای انجام وظایف نرمال آنها بسیار مهم است (Burrells, 2001). فرآیند تولید مثل نیاز بالای انرژی دارد، در سلول هایی که خودشان قادرند به اندازه کافی مولکول لازم برای ساخت DNA و RNA را در تقسیم سلولی تولید کنند، با فراهم کردن نوکلئوتیدها از طریق جیره برای این فرآیند، ضمن افزایش سرعت تولید مثل بویژه تحت شرایط استرس زا مانند محیط مصنوعی هچری، نیاز به انرژی نیز کم می شود. علاوه بر آن نیاز به نوکلئوتید در دوره رشد سریع و در زمان استرس های فیزیولوژیک و کاهش پروتئین جیره افزایش می یابد (Holen *et al.*, 2005). با توجه به تعداد و اندازه گرانول های موجود در سیتوپلاسم هموسیت ها[3] در سخت پوستان به ۳ دسته طبقه بندی می شوند: ۱- هیالین[4] (HC) ۲- نیمه دانه دار[5] (SGC) ۳- دانه دار بزرگ[6] (LGC). در میگوی سفیدغربی سلول های هیالینه بین ۲۰-۵ درصد، نیمه گرانولار بین ۷۵-۶۰ درصد و گرانولار بین ۲۵-۱۰ درصد کل هموسیت ها را شامل می شوند. هیالونوسیت ها که هیچ گونه گرانولی در سیتوپلاسم خود ندارند، ناپایدارترین و کوچک ترین سلول (قطر ۱۵-۱۰ میکرومتر) بین انواع هموسیت ها بوده و به عنوان سلول‌های فاگوسیتوز کننده پاتوژن ها معرفی شده اند. سلول نیمه گرانولار (قطر ۲۰-۱۰ میکرومتر) در فاگوسیتوز نقش محدودی دارند، ولی در تشکیل کپسول خیلی فعال هستند همچنین در اعمال مسمومیت سلولی و سیستم فعال کننده پروفنول اکسیداز[7] هم نقش دارند. سلول های گرانولار (قطر ۲۰-۱۵ میکرومتر) واجد گرانول هایی در سیتوپلاسم خود بوده و بزرگترین نوع هموسیت هستند که در فاگوسیتوز نقشی ندارند و در واکنش های تشکیل کپسول و ندول نقش محدودی دارند. در مسمومیت سلولی فعالند و عمده نقش آنها در فعال کردن سیستم فعال کننده فنول اکسیداز است. گرانولارها را به عنوان مخزن سیستم فعال کننده فنول اکسیداز می شناسند (Alday-Sanz, 2010; Braak, 2002). مطالعات محققان نشان داده است که نوکلئوتید جیره اثرات مثبت معناداری بر پروتئین کل پلاسما و سیستم ایمنی میگوها (افزایش آنزیم پروفنل اکسیداز و تعداد هموسیت ها) دارد (Ancieta-probstal *et al.*, 2005; Oujifard *et al.*, 2008).

تا کنون مطالعه ای در خصوص تأثیر نوکلئوتید جیره غذایی بر شاخص های ایمنی و پروتئین پلاسمای مولدین میگوهای پرورشی صورت نگرفته است. مشکلات تکثیر و پرورش میگوی سفیدغربی در ایران از جمله کیفیت نامطلوب پست لاروهای تولیدی، تلفات بالای مرحله لاروی و بروز بیماری لکه سفید می باشد. با توجه به اثرات گوناگون و متنوعی که مکمل غذایی نوکلئوتید بر واکنش‌های مختلف فیزیولوژیک از جمله تقویت سیستم ایمنی مولدین و به تبع لاروها و پست لاروهای حاصله را فرآهم آورد، مطالعه حاضر به منظور بررسی تأثیر نوکلئوتید جیره بر تغییرات برخی شاخص های ایمنی و پروتئین کل پلاسمای مولدین ماده میگوی سفیدغربی انجام شد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در بهار سال ۱۳۹۳ در کارگاه تکثیر میگوی صیدان جنوب بندر گناوه (استان بوشهر) در ۴ تیمار آزمایشی (هر تیمار با ۳ تکرار) اجرا شد. ۱۲ مخزن مدور پلی اتیلن ۳۰۰ لیتری با دیواره تیره رنگ برای این آزمایش در نظر گرفته شد. قبل از ذخیره‌سازی، تانک ها به وسیله مواد ضدعفونی کننده هیپوکلریت سدیم کاملاً ضدعفونی شده و سپس با آب شستشو داده شدند. ۱۲۰ قطعه مولد میگو به نسبت جنسی ۲ نر به ۳ ماده (۱۰ قطعه در هر تانک ذخیره سازی) شدند. هر یک از مخازن با ۲۸۰ لیتر آب فیلتر شده دریا با شوری ppt ۳/۱± ۳۱/۸۲، ph ۰/۱۸± ۷/۹، اکسیژن محلول ppm ۰/۴۱± ۵/۷۸ و دمای ۱/۲۴± ۲۷/۷۹ درجه سانتیگراد آبگیری و در طول دوره آزمایش روزانه ۱۰۰ درصد آب از طریق سیفون کردن جهت برداشت باقیمانده های غذایی و

[3] Haemocytes
[4] Hyalin cell
[5] Semi-granular cell
[6] Large-granular cell or Granolocytes
[7] Prophenoloxidase activating system

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-06-11]
[DOR: 20.1001.1.23222751.1395.6.1.12.0]

مدفوع تعویض می‌گردید. برای هوادهی و تامین اکسیژن به هر یک از مخازن ۱ عدد سنگ هوا که به سیستم هواده متصل بود نصب گردید. دمای هوای سالن رسیدگی جنسی مولدین نیز به کمک سیستم گرمایشی در حد ۲۸ درجه سانتیگراد تنظیم شد. برای جلوگیری از خارج شدن و تلفات مولدین میگو هر تانک با توری پوشانده شد. آزمایش در سالن رسیدگی جنسی مولدین مرکز تکثیر میگوی صیدان جنوب با دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی طی ۳۰ روز انجام شد (Arcos *et al.*, 2011; Racotta *et al.*, 2003).

طرح جیره

از نرم‌افزار Lindo (Copy right 1999, release 6.1, USA) در تهیه ۴ جیره آزمایشی استفاده شد. ترکیب چهار جیره ساخته شده برای مولدین میگوی سفیدغربی در جدول ۱ نشان داده شده است. کلیه مراحل ساخت غذا در آزمایشگاه تغذیه آبزیان دانشکده منابع طبیعی دانشگاه خلیج فارس بوشهر انجام شد. اجزای غذایی نظیر پودر ماهی و پودر سر میگو ابتدا آسیاب شده و با الک ۰/۵ میلیمتری غربال شده سپس کلیه مواد اولیه بر اساس فرمول نوشته شده توزین شدند. برای ساخت جیره ها مواد اولیه درون همزن به مدت ۳۰ دقیقه کاملاً همزده شدند تا مخلوطی همگن تهیه شد. ابتدا بر اساس بیوماس موجود و همچنین طول دوره آزمایش میزان دقیق نوکلئوتید مورد نیاز در چهار سطح صفر (شاهد)، ۰/۲ ، ۰/۴ و ۰/۶ درصد جیره روزانه برای هر تیمار محاسبه گردید. مکمل حاوی نوکلئوتید واناژن (Chemoforma Agust, Switzerland) که با درصد خلوص۱۷/۳۰درصد، حاوی: disodium uridine-5´-monophosphate (UMP) , cytidine-5´-monophosphate (CMP) , disodium inosine-5´-monophosphate (IMP) , adenosine-5´-monophosphate (AMP) , disodium guanidine-5´–monophosphate (GMP) بود، بر اساس دستورالعمل شرکت کموفورما، با آب مخلوط و به جیره پایه اضافه شد. پس از اضافه نمودن مکمل، مواد غذایی از چرخ گوشت با قطر چشمه ۳ میلیمتر عبور داده شد و رشته های خارج شده بر روی سینی توری فلزی جمع آوری و در خشک کن با دمای ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند. در نهایت پلت های غذایی در کیسه های نایلونی بسته بندی و در فریزر (دمای ۲۰- درجه سانتیگراد) در دانشگاه خلیج فارس بوشهر نگهداری شدند.

تغذیه روزانه به صورت توام[8] (۲ وعده غذای تر با رطوبت ۷۰ تا ۷۵ درصد و ۲ وعده غذای کنسانتره) صورت گرفت که به میزان ۱۵ درصد وزن بدن غذای تر (اسکوئید، کرم پلی کت و جگر مرغ) و به میزان ۳ درصد وزن بدن میگوها نیز از غذای دستی با ۴ سطح (۰ ، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ درصد) مکمل نوکلئوتید استفاده شد (Wouters *et al.*, 2000; Alday-Sanz, 2010; Arcos *et al.*, 2011). پس از ۳ هفته تغذیه، میگوها با قیچی داغ شده قطع پایه چشمی شدند. پس از قطع پایه چشمی، به کمک تاباندن نور چراغ قوه به سطح پشتی بدن با مشاهده اندازه، حجم و رنگ توده تخمدان، مراحل رسیدگی جنسی مولدین ماده به صورت روزانه مورد ارزیابی قرار می گرفت (Alday-Sanz, 2010).

نمونه برداری و آنالیز همولنف مولدین میگوهای آزمایشی

نمونه گیری از همولنف طی ۳ مرحله یعنی ابتدای دوره (قبل از شروع تغذیه)، ۲۱ روز پس از شروع تغذیه (قبل از قطع پایه چشمی) و ۳۰ روز پس از شروع تغذیه (۹ روز پس از قطع پایه چشمی) با جیره های غذایی هر تیمار صورت گرفت. حدود ۱۰ دقیقه قبل از همولنف گیری، برای کاهش استرس و تحرک، مولدین آزمایشی در آب تشت حاوی یخ خشک با دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. همچنین به منظور جلوگیری از انعقاد همولنف میگوها از محلول خنک ضد انعقاد ۱۰ میلی مول Tris–HCl، ۲۵۰ میلی مول Sucrose، ۱۰۰ میلی مول Sodium Citrate با pH = ۷/۶ به نسبت ۱:۱ استفاده شد. با توجه به سرعت بالای انعقاد همولنف میگو، ابتدا سرنگ ۱ میلی لیتری انسولین را به میزان ۰/۴ میلی لیتر از ماده ضد انعقاد با دمای ۴ درجه سانتیگراد

[8] Co-Feeding

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-06-11]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1395.6.1.12.0]

پر کرده و سپس نوک سرنگ را در ناحیه بین پاهای اول و دوم شنا و از کنار طناب عصبی شکمی، با زاویه ۴۵ درجه تنها به زیر لایه قشری پوسته[9] اندکی فشار داده و اقدام به گرفتن همولنف (۰/۴ میلی لیتر) گردید (Yang *et al.*, 2014). بعد از گرفتن همولنف، بلافاصله محتویات درون سرنگ به درون یک میکروتیوپ استریل منتقل شد و تا مرحله آنالیز به تانک ازت مایع با دمای منفی ۱۹۶ درجه سانتیگراد منتقل گردید. پس از انتقال تانک ازت به آزمایشگاه، میکروتیوب حاوی نمونه در دمای اتاق یخ زدایی شده و با دستگاه ورتکس[10] نمونه ها به مدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه همگن شدند.

جدول ۱. ترکیب جیره های ساخته شده در چهار تیمار آزمایشی مولدین میگوی سفیدغربی

اجزای تشکیل دهنده (درصد)	تیمارهای آزمایشی			
	۱	۲	۳	۴
پودر ماهی[۴]	۶۵	۶۵	۶۵	۶۵
پودر میگو[۳]	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵
آرد گندم	۷/۰۵	۷/۰۵	۷/۰۵	۷/۰۵
روغن ماهی[۱]	۲/۵۹	۲/۵۹	۲/۵۹	۲/۵۹
روغن سویا [۲]	۲/۵۹	۲/۵۹	۲/۵۹	۲/۵۹
مکمل معدنی[۲]	۱	۱	۱	۱
مکمل ویتامینی[۲]	۱	۱	۱	۱
کلسترول [۵]	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
ضد قارچ[۲]	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
دی کلسیم فسفات[۳]	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵
سلولز[۵]	۱	۰/۸	۰/۶	۰/۴
آنتی اکسیدان[۸]	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲
بایندر[۳]	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵
لستین[۷]	۱	۱	۱	۱
مکمل نوکلئوتید[۶]	۰	۰/۲	۰/۴	۰/۶
جمع	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
تجزیه تقریبی (٪)				
پروتئین		۵۵/۵		
چربی		۱۲		
رطوبت		۱۰		
خاکستر		۱۳		
فیبر خام		۴/۴		

۱- تهیه شده در شرکت پارس کیلکا ۲- تهیه شده ازکارخانه خوراک دام و آبزیان ۲۱ بیضاء شیراز ۳- تهیه شده از کارخانه غذای میگو هووراش بوشهر ۴- تهیه شده از کارخانه پودر ماهی میناب ۵- تهیه شده از شرکت مرک آلمان ۶- ساخت شرکت Chemoforma (سوئیس) ۷- تهیه شده در شرکت کیمیا رشد ۸- تهیه شده از شرکت گرماب شیمی

برای شمارش کلی هموسیت ها از هر نمونه همولنف حاوی ضد انعقاد، ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و با حجم برابر از بافر فرمالین (۱۰ درصد) برای ۳۰ دقیقه فیکس گردیده و سپس شمارش کلی هموسیت ها (THC) توسط لام نئوبار (Fortuna, Germany) و

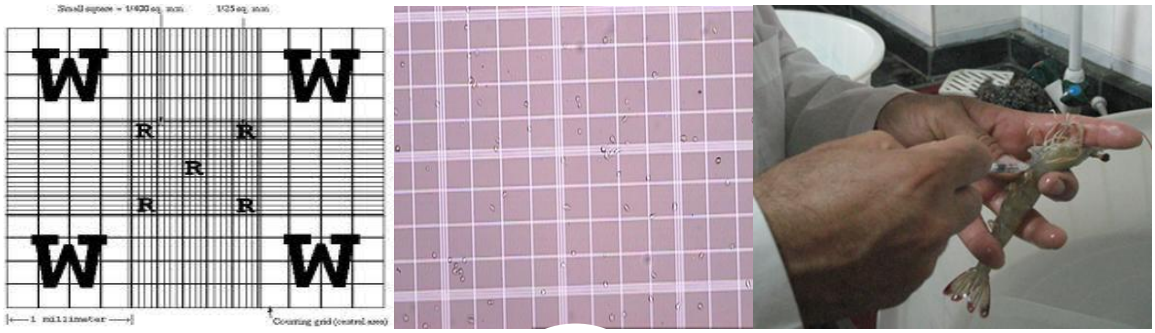
[9] Cuticle
[10] Vortex

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-06-11]
[DOR: 20.1001.1.23222751.1395.6.1.12.0]

میکروسکوپ نوری با لنز شیئی X ۴۰ صورت پذیرفت. پس از شمارش، مقدار هموسیت کل با استفاده از فرمول لام نئوبار که در زیر آمده و احتساب ضریب رقت، محاسبه شد (Song *et al.*, 2003; Le Moullac *et al.*, 1997).

فرمول (۱)

$$\left(\frac{\text{number of cells counted}}{(\text{proportion of chamber counted})\,(\text{volume of chamber})}\right)\left(\frac{\text{volume of sample dilution}}{\text{volume of original mixture in sample}}\right)$$



(C) (B) (A)

شکل ۱. نحوه استخراج همولنف (A)، شمارش کلی هموسیت ها (B) و بخش W قسمت های شمارش شده (C)

به منظور شمارش افتراقی هموسیت ها[11]، ابتدا ۵۰ میکرولیتر (یک قطره) از نمونه همولنف روی لام ریخته شد و لام دیگری با زاویه حدود ۴۵ درجه به قطره همولنف نزدیک کرده و روی لام دارای قطره همولنف کشیده شد. پس از تهیه گسترش، به منظور فیکس کردن نمونه ها به مدت ۳۰ ثانیه درون متانول خالص قرار داده شدند، سپس جهت رنگ آمیزی به روش مای – گرانوالد – گیمسا[12] ۳۰ دقیقه درون رنگ گیمسا (۱۰ درصد) قرار گرفتند. پس از شست و شو، لام ها در دمای اتاق خشک شدند. برای تعیین درصد انواع هموسیت های میگو با توجه به اندازه و تعداد گرانول های موجود در سیتوپلاسم، نسبت هسته به سیتوپلاسم و نوع رنگ بندی سیتوپلاسم سلول ها، گسترش های خشک تهیه شده با لنز شیئی X ۱۰۰ بررسی و تعداد ۱۰۰ عدد سلول توسط میکروسکوپ نوری شمارش گردید. با توجه به شکل ظاهری هموسیت ها به ۳ دسته هیالینه، نیمه گرانولار و گرانولار طبقه بندی می شوند. با رنگ آمیزی تفاوت بین انواع هموسیت ها براساس نسبت هسته به سیتوپلاسم مشخص می گردد. در رنگ آمیزی سلول گرانولار سیتوپلاسم به صورت ائوزینوفیلیک شدید می باشد و نسبت هسته به سیتوپلاسم کم می باشد ولی در سلول هیالینه نسبت هسته به سیتوپلاسم زیاد می باشد. همچنین تفاوت انواع هموسیت براساس اندازه و تعداد گرانول در هر سلول بدین شکل است که سیتوپلاسم هیالینه (کوچکترین هموسیت) فاقد گرانول، سیتولاسم سلول نیمه دانه دار ۴ تا ۹ گرانول ائوزینوفیلیک کوچک و در سیتوپلاسم گرانولار (بزرگترین هموسیت) ۱۰ عدد و بیشتر از گرانول ترشحی ائوزینوفیلیک بزرگ وجود دارد (Braak, 2002؛ Le Moullac *et al.*, 1997؛ Song *et al.*, 2003). ترکیب نمونه و محلول ضد انعقاد جهت سنجش پروتئین کل پلاسما ابتدا در ۶۰۰۰ دور در دقیقه با دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید، سپس قسمت فوقانی نمونه سانتریفوژ شده را به کمک سمپلر جدا و جهت آنالیز بیوشیمیایی پلاسما به میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری دیگری انتقال داده شد. سنجش میزان پروتئین کل پلاسمای همولنف با استفاده از دستگاه اتوآنالیزر بیوشیمیایی مدل BS-200 ساخت کارخانه Mindray کشور

[11] Differential Haemocyte Count
[12] May Grunwald-Giemsa

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-06-11]
[DOR: 20.1001.1.23222751.1395.6.1.12.0]

چین صورت گرفت. سنجش پروتئین کل پلاسما[13](TPP) با استفاده از روش رنگ سنجی و با استفاده از کیت بیوشیمیایی شرکت پارس آزمون (تهران – ایران) صورت گرفت (Emerenciano *et al.*, 2012; Sandeepa and Ammani, 2015).

آنالیز آماری

جهت بررسی نرمال بودن داده ها از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف استفاده گردید و پس از آن جهت بررسی همگنی واریانس ها از آزمون لون استفاده گردید. پس از برقراری شرایط همگنی داده ها از آزمون آماری One Way ANOVA و پس آزمون Duncan در سطح اعتماد ۵ درصد جهت مقایسه میانگین ها و از نرم افزار SPSS(18) برای آنالیز آماری استفاد شد.

نتایــج

جداول ۲، ۳ و ۴ نتایج سنجش پارامترهای ایمنی (تعداد کل هموسیت ها (THC)، سلول های هیالینه (HC)، سلول های نیمه گرانولار (SGC) و سلول های گرانولار بزرگ (LGC)) مولدین میگوی سفیدغربی در تیمارهای آزمایشی طی سه مرحله نمونه برداری از همولنف یعنی مرحله اول: ابتدای آزمایش، مرحله دوم: ۲۱ روز پس از تغذیه با جیره های غذایی حاوی مقادیر مختلف نوکلئوتید (قبل از قطع پایه چشمی) و همچنین مرحله سوم: ۳۰ روز پس از تغذیه با جیره های آزمایشی (۹ روز بعد از قطع پایه چشمی) را نشان می دهند.

جدول ۲. نتایج شمارش کلی و تفریقی هموسیت های مولدین میگوی سفیدغربی قبل از شروع تغذیه با جیره های آزمایشی

شاخص های سلولی همولنف		تعداد
THC ($\times 10^5$cell/ml)		۱۰۹/۸۵±۱۱/۰۳
DHC (%)	HC	۱۸/۵±۲/۴۵
	SGC	۶۰±۳/۸۲
	LGC	۲۱/۵±۲/۶۶

±SD میانگین (n=۳).

طبق نتایج، ۲۱ روز پس از تغذیه مولدین میگوی سفیدغربی با جیره آزمایشی، هر سه سطح نوکلئوتید جیره باعث افزایش تعداد کل هموسیت‌ها شد که با گروه کنترل اختلاف معنی داری داشت (P< ۰/۰۵). بر اساس نتایج جدول ۳ تعداد کل هموسیت ها با افزایش سطح نوکلئوتید جیره افزایش یافت که با گروه کنترل اختلاف معنی داری را نشان داد. بیشترین و کمترین تعداد کل هموسیت ها به ترتیب در تیمار ۰/۶ درصد نوکلئوتید و گروه کنترل دیده شد. در شمارش افتراقی هموسیت ها نیز نوکلئوتید جیره منجر به افزایش معنی دار درصد سلول های گرانولار نسبت به گروه کنترل گردید که بیشترین مقدار آن در تیمار ۰/۶ درصد بود (P< ۰/۰۵)، اما درصد دو گروه دیگر هموسیت‌ها یعنی هیالونوسیت‌ها و نیمه گرانولوسیت‌ها در تیمارهای آزمایشی حاوی نوکلئوتید کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد که در تیمارهای دارای نوکلئوتید اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

۳۰ روز پس از تغذیه با جیره‌های آزمایشی نیز نوکلئوتید جیره در مقایسه با گروه شاهد باعث افزایش معنی دار تعداد کل هموسیت‌ها گردید (P< ۰/۰۵) (جدول ۴). در شمارش افتراقی هموسیت ها، افزایش درصد گرانولوسیت ها در تیمار ۰/۴ درصد و ۰/۶ درصد نسبت به ۰/۲ درصد و گروه کنترل اختلاف معنی داری را نشان داد. همچنین کاهش درصد هیالونوسیت ها و نیمه گرانولوسیت ها نسبت به گروه کنترل معنی دار بود (جدول ۴).

[13] Total Protein Plasma

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-06-11]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1395.6.1.12.0]

جدول ۳. نتایج شمارش کلی و تفریقی هموسیت ها در مولدین میگوی سفیدغربی، ۲۱ روز پس از تغذیه با جیره های آزمایشی.

شاخص های سلولی هموللنف/تیمار		صفر	۰/۲ درصد نوکلئوتید	۰/۴ درصد نوکلئوتید	۰/۶ درصد نوکلئوتید
THC (×۱۰^۵cell/ml)		۱۱۴/۹۱±۶/۹۱ ^{b}	۱۵۰/۸۳±۵/۹۶ ^{a}	۱۵۲/۱۳±۴/۱۳ ^{a}	۱۵۳/۴۹±۶/۶۷ ^{a}
DHC (%)	HC	۱۹/۵±۱/۲۴ ^{a}	۱۵±۲/۱۴ ^{b}	۱۴±۱/۵۱ ^{b}	۱۳/۳۵±۱/۲۵ ^{b}
	SGC	۵۹±۳/۹۱ ^{a}	۵۵/۱۵±۲/۶۱ ^{b}	۵۴/۸۵±۳/۶۵ ^{b}	۵۴/۱۵±۲/۴۱ ^{b}
	LGC	۲۱/۵±۱/۹۷ ^{b}	۲۹/۸۵±۲/۸۴ ^{a}	۳۱/۱۵±۱/۴۹ ^{a}	۳۲/۵±۳/۸ ^{a}

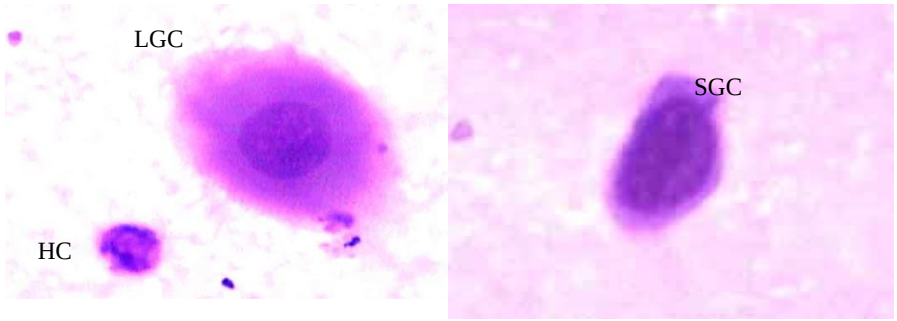
میانگین SD± ۳ تکرار، حروف مشابه در هر ردیف نشانه عدم اختلاف معنادار است (P>۰/۰۵).

جدول ۴. نتایج شمارش کلی و تفریقی هموسیت های مولدین میگوی سفیدغربی ۳۰ روز پس از تغذیه با جیره های آزمایشی

شاخص های سلولی هموللنف/تیمار		صفر	۰/۲ درصد نوکلئوتید	۰/۴ درصد نوکلئوتید	۰/۶ درصد نوکلئوتید
THC (×۱۰^۵cell/ml)		۱۱۰/۴۸±۵/۹۶ ^{b}	۱۴۶/۷۵±۸/۲۸ ^{a}	۱۴۸/۵۱±۴/۶۱ ^{a}	۱۴۹/۴۵±۸/۱۴ ^{a}
DHC (%)	HC	۱۷/۵±۳/۰۸ ^{a}	۱۳/۵±۲/۵۴ ^{b}	۱۱/۵±۲/۰۳ ^{bc}	۱۰/۵±۱/ ^{c}
	SGC	۵۸/۵±۴/۲۸ ^{a}	۵۵/۵±۳/۱۱ ^{b}	۵۵/۷۵±۳/۸۳ ^{b}	۵۶/۳۵±۲/۹۲ ^{b}
	LGC	۲۴±۲/۶۴ ^{c}	۳۱±۱/۶۶ ^{b}	۳۲/۷۵±۲/۱۱ ^{ab}	۳۳/۱۵±۱/۲۵ ^{a}

میانگین SD± ۳ تکرار، حروف مشابه در هر ردیف نشانه عدم اختلاف معنادار است (P>۰/۰۵).

در شکل ۲، سلول‌های گرانول‌دار بزرگ با گرانول بزرگ گرد و غالباً ائوزینوفیلیک[14] مشاهده می‌شود (LGC)، سلول‌های نیمه دانه‌دار، دارای اندازه کوچکتری نسبت به سلول‌های گرانول‌دار بزرگ هستند و گرانول آنها تقریباً ائوزینوفیلیک می‌باشد (SGC)، سلول‌های بدون گرانول غالباً دارای نسبت هسته به سیتوپلاسم اندکی می‌باشند که از لحاظ اندازه کوچکترین سلول محسوب می‌شود (HC).

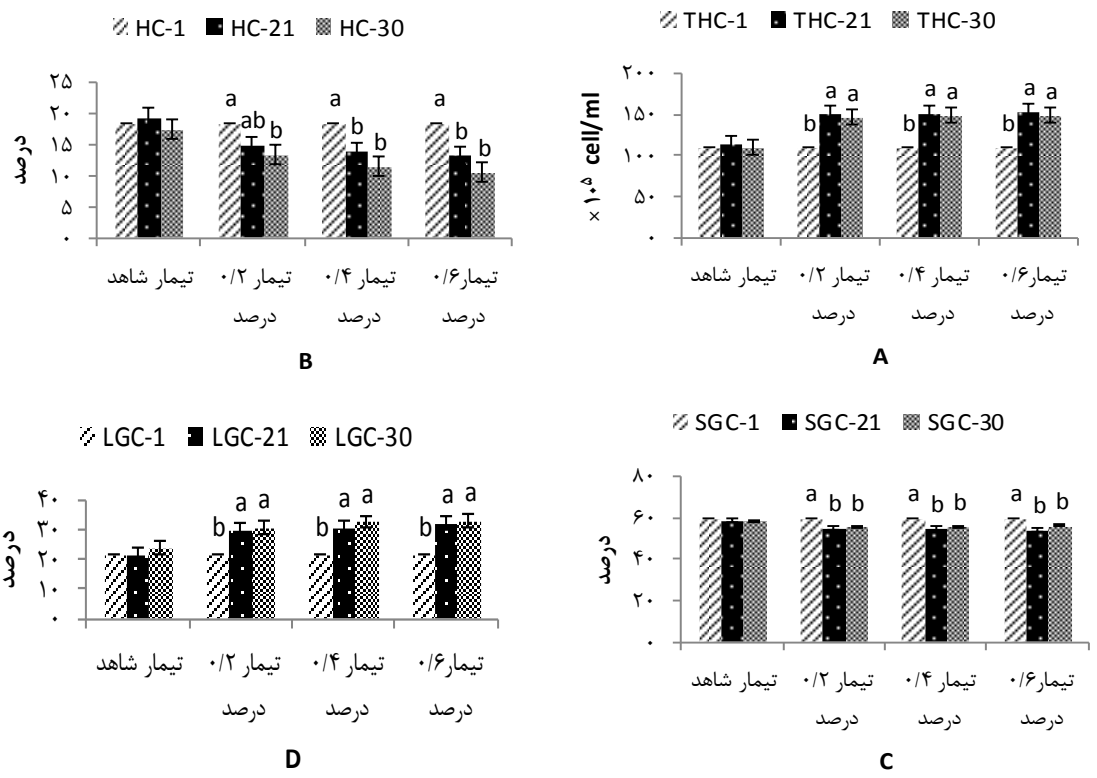


شکل ۲. شمارش تفریقی هموسیت ها با رنگ آمیزی مای گرانوالد گیمسا و بزرگنمایی X ۱۰۰، سلول گرانول‌دار بزرگ (LGC)، سلول نیمه دانه‌دار (SGC) و سلول بدون گرانول (HC).

[14] Eosinophilic

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-06-11]
[DOR: 20.1001.1.23222751.1395.6.1.12.0]

نتایج حاصل از مقایسه فاکتورهای مختلف ایمنی مولدین میگو سفیدغربی تغذیه شده با چهار جیره آزمایشی ۰، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ درصد نوکلئوتید طی سه مرحله نمونه برداری از همولنف یعنی مرحله اول: ابتدای آزمایش، مرحله دوم: پس از ۲۱ روز تغذیه با جیره های آزمایشی (قبل از قطع پایه چشمی) و همچنین مرحله سوم: پس از ۳۰ روز تغذیه با جیره های آزمایشی (۹ روز بعد از قطع پایه چشمی) در شکل شماره ۳ نشان داده شده است. در تیمار کنترل مقادیر پارامترهای مختلف ایمنی مولدین میگو از جمله تعداد کل هموسیت ها، سلول های گرانول دار، سلول‌های نیمه دانه دار و سلول‌های بدون گرانول در هر سه مرحله نمونه برداری اختلاف معنی داری نداشت (P>۰/۰۵). نوکلئوتید جیره منجر به افزایش معنی دار تعداد کل هموسیت ها و گرانولوسیت ها و کاهش معنی دار هیالونوسیت ها و نیمه گرانولوسیت ها پس از ۲۱ و ۳۰ روز تغذیه مولدین میگو نسبت به آغاز آزمایش گردید (P< ۰/۰۵). پس از قطع پایه چشمی مولدین میگو، تمام پارامترهای ایمنی تیمارهای آزمایشی یک کاهش را نشان دادند که معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).



شکل ۳. مقایسه میانگین پارامترهای مختلف ایمنی همولنف مولدین میگو از جمله تعداد کل هموسیت ها (A)، سلول های هیالین (B)، سلول های نیمه دانه دار (C) و سلول های دانه دار بزرگ (D) در سه مرحله نمونه برداری از چهار تیمار آزمایشی با جیره غذایی ۰، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ درصد نوکلئوتید. حروف مشابه در هر تیمار نشانه نبود اختلاف معنی دار است (p> ۰/۰۵).

میانگین غلظت پروتئین کل پلاسما طی سه مرحله نمونه برداری برای تیمارهای مختلف آزمایش در جدول ۵ آورده شده است. مطابق نتایج حاصله، سطح پروتئین پلاسمای همولنف مورد بررسی در ابتدای آزمایش در هر چهار تیمار اختلاف معنی داری را نشان نداد (P>۰/۰۵) و پس از ۲۱ روز (قبل از قطع پایه چشمی) و ۳۰ روز تغذیه با جیره های حاوی مقادیر مختلف نوکلئوتید، سطح پارامتر مذکور در تیمار ۰/۴ درصد نسبت به سایر تیمارها افزایش معنی داری یافت (P<۰/۰۵) (جدول ۵).

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-06-11]

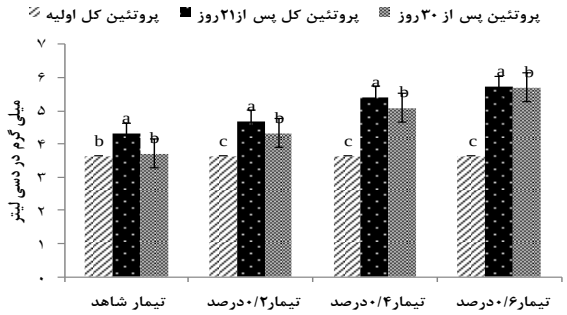
[DOR: 20.1001.1.23222751.1395.6.1.12.0]

جدول ۵. میزان غلظت پروتئین کل پلاسمای همولنف (میلی گرم در دسی لیتر) ابتدای آزمایش، قبل از قطع پایه چشمی و ۹ روز پس از قطع پایه چشمی تغذیه شده با جیره غذایی حاوی مقادیر مختلف نوکلئوتید.

تیمارهای نوکلئوتید (٪) پروتئین کل (میلی‌گرم دردسی لیتر)	۰	۰/۲	۰/۴	۰/۶
ابتدای آزمایش	۳/۶۴ ± ۰/۰۶	۳/۶۴ ± ۰/۰۶	۳/۶۴ ± ۰/۰۶	۳/۶۴ ± ۰/۰۶
پس از ۲۱ روز تغذیه	۴/۳۱ ± ۰/۱۱^{d}	۴/۶۸ ± ۰/۰۹^{c}	۵/۴۱ ± ۰/۱۳^{b}	۵/۷۲ ± ۰/۰۷^{a}
پس از ۳۰ روز تغذیه	۳/۷۱ ± ۰/۰۴^{d}	۴/۳۳ ± ۰/۱۳^{c}	۵/۲۷ ± ۰/۰۱^{b}	۵/۷ ± ۰/۱۴^{a}

میانگین SD± برای ۳ تکرار (n=۶)، حروف مشابه در هر ردیف نشانه نبود اختلاف معنی دار است (P>۰/۰۵).

نتایج حاصل از مقایسه پروتئین کل پلاسمای مولدین میگو سفیدغربی طی سه مرحله نمونه برداری از همولنف یعنی مرحله اول: ابتدای آزمایش، مرحله دوم: پس از ۲۱ روز تغذیه با جیره های غذایی حاوی مقادیر مختلف نوکلئوتید (قبل از قطع پایه چشمی) و همچنین مرحله سوم: پس از ۳۰ روز تغذیه با جیره های غذایی مذکور (۹ روز بعد از قطع پایه چشمی) در شکل شماره ۴ نشان داده شده است.



شکل ۴. مقایسه میانگین سطح پارامترهای پروتئین کل پلاسما (میلی گرم در دسی لیتر) همولنف مولدین میگو در سه مرحله نمونه برداری از چهار تیمار آزمایشی. حروف مشابه در هر تیمار نشانه نبود اختلاف معنی دار است (p> ۰/۰۵).

بحث

نوکلئوتید جیره در آبزیان آثار مفید فیزیولوژیکی و تغذیه ای شامل آثار مفید بر رشد، سیستم ایمنی، دستگاه گوارش، فلور روده، بهبود تولیدمثل، متابولیسم چربی و افزایش مقاومت نسبت به بیماری ها را نشان داده است (Leonardi *et al.*, 2003; Gonzalez-Vecino *et al.*, 2003). بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، افزودن نوکلئوتید جیره (در سطوح ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ درصد) به ترکیب غذایی مولدین میگوی سفیدغربی طی رسیدگی جنسی و پس از قطع پایه چشمی منجر به افزایش معنی داری در تعداد کل هموسیت ها و گرانولوسیت ها و کاهش معنی دار سلول های هیالین و سلول های نیمه گرانولوسیت و افزایش معنی دار میزان پروتئین کل پلاسما در مقایسه با گروه کنترل شد که می تواند به دلیل کارکردهای مختلف نوکلئوتید در بدن از جمله آثار مثبتی که بر ترکیب بیوشیمیایی همولنف و سلامتی میگو دارد، باشد. مطالعات زیادی وجود دارند که تأثیرات مفید نوکلئوتید جیره، فراهم کردن مقادیر مورد نیاز فیزیولوژیکی از نوکلئوتیدها در جیره های غذایی به دلیل ظرفیت سنتزی محدود بعضی بافت های مشخص، هزینه انرژتیک ناکافی برای سنتز *de novo*، تبادلات ایمونو اندوکراینی، تعدیل الگوهای بیان ژن به خصوص بیان ژن آنزیم های مسیر *Salvage*، اثر نوکلئوتید جیره بر فلور روده، مورفولوژی روده، کاهش استرس، بهبود کارایی تولید مثلی، افزایش سطح ایمنی و جاذب شیمیایی بودن نوکلئوتیدها در آبزیان را نشان می دهند (Li and Gatlin, 2006; Gonzalez-Vecino *et al.*, 2003). یکی از پذیرفته‌شده‌ترین فرضیه ها در مورد آثار مفید مشاهده شده نوکلئوتیدهای جیره در ماهیان این است که در مراحل تولید مثلی و شرایط تنش زا، تراکم بالا و دستکاری، میزان نیاز به نوکلئوتید افزایش می یابد (Leonardi *et al.*, 2003; Gonzalez-Vecino *et al.*, 2003). مقدار کل هموسیت ها یکی از مهمترین پارامترهای مورد استفاده در ارزیابی وضعیت سلامتی سخت پوستان می باشد.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-06-11]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1395.6.1.12.0]

نوسانات مقدار کل هموسیت ها در سخت پوستان به چندین فاکتور از جمله: چرخه پوست اندازی و کمبود اکسیژن (Le Moullac and Haffner, 2000)، سازگاری با شرایط اسارت (Sanchez *et al.*, 2001)، نوسانات درجه حرارت و نوع جیره غذایی (Cheng and Chen, 2001)، حضور انگل ها و عفونت ها (Cheng and Chen, 2001) بستگی دارد. Ancieta-Probstl و همکاران (۲۰۰۵) تأثیر نوکلئوتید جیره (در سطح ۰/۲ درصد) در میگوهای ببری سیاه (*Penaeus monodon*) و میگوی ببری سبز (*P. merguensis*) را به مدت ۶ هفته در ۶ تکرار بررسی و تعداد کل هموسیت ها و شمارش تفریقی آنها را مورد سنجش قرار دادند. میزان کل هموسیت ها در میگوهای جوان (۵-۴ گرم) به میزان۱۰۰ درصد و در میگوهای بزرگتر با وزن ۸-۷ گرم به میزان ۳۰ درصد افزایش نشان داد که این افزایش را در هموسیت های دانه دار بزرگ مشاهده کردند. در تحقیق حاضر نیز افزایش معناداری در میزان هموسیت کل و گرانولوسیت ها در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد که با تحقیق Fegan (۲۰۰۲) و Ancieta-Probst و همکاران (۲۰۰۵)، مطابقت دارد. این افزایش به دلیل اینکه در هموسیت های دانه دار بزرگ بوده، حائز اهمیت است. زیرا هموسیت های دانه دار بزرگ و نیمه دانه دار موجب فعال شدن سیستم پروفنول اکسیداز شده و باعث بهبود سیستم ایمنی میگو می شوند. Grace و همکاران (۲۰۱۲)، اثرات نوکلئوتید در چهار سطح ۰، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ درصد جیره غذایی بر پاسخ ایمنی میگوی جوان سفیدغربی در رویارویی با بیماری ویروسی لکه سفید (WSSV) را پس از ۶۰ روز تغذیه، مورد مطالعه قرار دادند. پاسخ شاخص های ایمنی نظیر مقدار کل هموسیت ها، فعالیت انفجار تنفسی و فعالیت فنول اکسیداز تیمارهای آزمایشی با جیره حاوی مقادیر مختلف نوکلئوتید به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل بود. هر چند شاخص های ایمنی در تیمار ۰/۶ درصد نوکلئوتید از دو تیمار آزمایشی ۰/۲ و ۰/۴ درصد نوکلئوتید بیشتر بود ولی اختلاف معنی داری نداشتند. نتایج این مطالعه نشان داد که نوکلئوتید جیره اثرات سودمندی بر بازماندگی و تسریع پاسخ ایمنی میگو در برابر بیماری لکه سفید دارد. در تحقیق اوجی فرد و همکاران (۱۳۸۷)، تغذیه میگوهای جوان با جیره غذایی حاوی ۰/۲ درصد نوکلئوتید منجر به افزایش معنی دار تعداد کل هموسیت، شمارش تفریقی هموسیت ها (هیالین و دانه دار بزرگ) و مقدار کل پروتئین پلاسما نسبت به گروه کنترل گردید. نتایج تحقیق حاضر نیز با یافته‌های مذکور مطابقت داشت. گزارشات در خصوص نسبت تعداد کل هموسیت ها با قطع یک پایه چشمی اندک می باشد. Perazzolo و همکاران (۲۰۰۲)، یک هفته پس از قطع یک پایه چشمی میگوی ماده *Farfantepenaeus paulensis* کاهش معنی داری را در تعداد کل هموسیت ها (۴۳/۷ درصد) مشاهده نمودند. در مطالعه Maggioni و همکاران (۲۰۰۴)، یک روز پس از قطع یک پایه چشمی میگوی ماده سفیدغربی کاهش ۳۰ درصدی در تعداد کل هموسیت ها دیده شد که البته این کاهش نسبت به مرحله قبل از قطع پایه چشمی معنی دار نبود. Sainz-Hernandez و همکاران (۲۰۰۸)، تأثیر قطع یک و دو پایه چشمی میگوی سفیدغربی نر و ماده بر شاخص های ایمنی را مورد مطالعه قرار دادند. طبق نتایج این تحقیق قطع یک و دو پایه چشمی به طور معنی داری منجر به کاهش فعالیت پروفنول اکسیداز و مقدار هموسیت کل نسبت به گروه کنترل مولدین نر و ماده گردید. در این تحقیق نقش مثبت هورمون کنترل کننده پوست اندازی[15] (20HE) مترشحه از پایه چشمی (Sen *et al.*, 2009) در بیان ژن هموسیت های مؤثر در پروفنول اکسیداز نیز مشخص شد. با توجه به نقش هموسیت های نیمه دانه دار و دانه دار بزرگ در فعالیت پروفنول اکسیداز (Sritunyalucksana and Söderhäll, 2000)، کاهش هموسیت های مذکور پس از قطع یک و دو پایه چشمی مولدین میگوی سفیدغربی با کاهش ترشح هورمون های مؤثر در بیان ژن هموسیت ها از پایه چشمی، منجر به کاهش فعالیت پروفنول اکسیداز می گردد (Sainz-Hernandez, 2008). همچنین بر اساس گزارش Burge و همکاران (2007)، تعداد هموسیت کل بعد از مواجهه با ضایعه یا پاتوژن ها در همولنف کاهش یافته و این کاهش همولنف به دلیل مهاجرت سلول های لنفاوی به بافت آسیب دیده یا بافت هایی است که پاتوژن به آنجا هجوم برده است تا بتواند از بافت در مقابل آسیب یا پاتوژن محافظت نماید. نتایج تحقیق حاضر با یافته‌های مذکور مطابقت دارد به طوریکه ۲۰ روز پس از تغذیه با جیره‌های آزمایشی، مقدار کل هموسیت‌ها حدود ۳۲ درصد بیشتر از گروه کنترل بود و ۹ روز پس از قطع پایه چشمی مولدین ماده میگوی سفیدغربی تعداد کل هموسیت‌ها

[15] 20-hydroxy ecdysone

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-06-11]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1395.6.1.12.0]

یک کاهش را نشان دادند که معنی دار نبود. با این وجود ۳۰ روز پس از تغذیه با جیره های آزمایشی، مقدار کل هموسیت‌ها حدود ۳۵ درصد بیشتر از گروه کنترل بود. مقدار هموسیت کل و گرانولوسیت ها در روز ۲۱ و ۳۰ آزمایش در مقایسه با ابتدای آزمایش افزایش معنی داری را نشان داد ولی هیالونوسیت ها و نیمه گرانولوسیت ها کاهش معنی داری را نشان دادند (شکل ۳).

در مطالعه حاضر سطح پروتئین کل پلاسمای همولنف مولدین میگوی سفیدغربی، ۲۱ روز پس از تغذیه با جیره حاوی نوکلئوتید نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی داری داشت که در این میان تیمار ۰/۴ درصد نوکلئوتید نسبت به سایر تیمارها سطوح بیشتری را نشان داد (P<۰/۰۵). سطوح پروتئین در همولنف می تواند به عنوان یک شاخص برای پیش بینی توان تولید مثلی و تخمریزی مورد استفاده قرار گیرد (Arcos *et al.*, 2011). بیشترین فراوانی اجزاء سازنده زرده تخم و ناپلی در میگوهای پنائیده پروتئین می‌باشد که نقش ساختمانی و همچنین در مراحل ناپلی پیشرفته نقش تأمین انرژی را نیز ایفا می کند. سطوح پروتئین کل در ناپلی که در کیفیت لارو تاثیر دارد به وضعیت تغذیه‌ای مولد بستگی دارد (Palacios *et al.*, 2000). Perazzolo و همکاران (۲۰۰۲)، کاهش ۵۰ درصدی سطح پروتئین همولنف در میگوی ماده *F. paulensis* قطع یک پایه چشمی را گزارش کردند. در صورتیکه در تحقیق Maggioni و همکاران (۲۰۰۴)، سطح پروتئین پلاسما در میگوهای ماده سفیدغربی قطع یک پایه چشمی شده افزایش معنی داری نداشت. در مطالعه Sainz-Hernandez و همکاران (۲۰۰۸)، نیز میزان پروتئین پلاسمای میگوی ماده سفیدغربی قطع یک پایه چشمی شده کاهش یافت که نتایج مطالعه حاضر نیز با مطالعه مذکور مطابقت داشت و کاهش پروتئین پلاسما بعد از قطع پایه چشمی بیانگر نقش آن در رسیدگی جنسی است. نتایج چندین مطالعه نشان داده است که مولدین میگوهای ماده با سطوح بالاتر پروتئین کل در همولنف قبل از قطع پایه چشمی در مرحله رسیدگی جنسی پیشرفته تری می‌باشند و پس از قطع پایه چشمی غلظت ترکیبات بیوشیمیایی مذکور پلاسما کاهش معنی داری پیدا می کنند که این کاهش نتیجه ذخیره ترکیبات مغذی در تخمدان و تسریع رسیدگی جنسی در میگوی *Fenneropenaus indicus* (Quinitio and Millamena, 1992) و میگوی سفیدغربی می‌گردد (Arcos *et al.*, 2011; Wouters *et al.*, 2001). در مطالعه حاضر نیز طبق شکل ۴ پس از ۳۰ روز تغذیه با جیره کنترل و جیره های حاوی نوکلئوتید، محتوای پروتئین کل پلاسمای همولنف همه میگوهای تغذیه شده با نوکلئوتید، افزایش معنی داری را در مقایسه با گروه شاهد نشان دادند، به طوری که مقدار پروتئین کل پلاسمای مولدین تغذیه شده با جیره شاهد کمترین مقدار و جیره حاوی ۰/۴ درصد نوکلئوتید، بیشترین میزان پروتئین کل پلاسمای همولنف را دربر داشت و در هر چهار تیمار اختلاف معنی دار بود (P<۰/۰۵). به طور کلی استفاده از نوکلئوتید در جیره میگوهای مولد در آزمایش حاضر، باعث افزایش سلول های همولنف شد که بخشی از سیستم ایمنی میگو را دربر می گیرند.

با توجه به نتایج تحقیق حاضر، می توان بیان نمود که نوکلئوتید جیره منجر به افزایش بیوسنتز ترکیب پروتئین کل پلاسما و در نتیجه افزایش روند زرده سازی و تجمع زرده در تخم می گردد. طی مراحل بلوغ جنسی، تولید نوکلئوتید طبیعی از دو مسیر *de novo* یا *salvage* کافی نبوده و نیازمند میزان نوکلئوتید بیشتری نسبت به آنچه در جیره های رایج میگو وجود دارد، می باشند (Davis and Parker, 1990; Fegan, 2006). بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، تأمین نوکلئوتیدهای بیرونی در سطح ۰/۴ درصد می تواند آثار مفیدی در افزایش سطح پروتئین کل پلاسمای همولنف دخیل در رسیدگی جنسی و همچنین افزایش معنی دار میزان هموسیت کل در مقایسه با گروه کنترل را داشته باشد. نهایتا فرضیه مؤثر بودن افزودن نوکلئوتید در جیره غذایی مولدین میگوی سفیدغربی بر میزان پروتئین پلاسمای موثر در رسیدگی جنسی و شاخص های سلامتی مولدین میگو را تأیید می کند.

تشکر و قدردانی

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-06-11]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1395.6.1.12.0]

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و تقدیر خود را از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، به منظور حمایت جهت انجام مراحل عملی این طرح و همچنین از مدیریت کارگاه تکثیر میگوی صیدان جنوب بندر گناوه، جناب آقای محمد عبدالهی به خاطر فراهم نمودن امکانات و محیط اجرای این تحقیق، ابراز می نمایند.

منابـع

Alday-Sanz, V. 2010. The Shrimp Book. Nottingham University Press. 899 p.

Ancieta-Probstl, D.K., Smullen, R.P., Barnes, A.C. 2005. Enhancing growth performance of shrimp with nucleotide supplemented diets. Aquaculture Asiapacific Magazine. 14: 26-28.

Arcos, F.G., Ibarra, A.M., Racotta, I.S. 2011. Vitellogenin in hemolymph predicts gonad maturity in adult female *Litopenaeus vannamei* shrimp. Aquaculture. 316: 93-98.

Braak, K.V.D. 2002. Haemocytic defence in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). PhD thesis. Fisheries Department. Wageningen University. The Netherlands. 168 p.

Burge, E.J., Madigan, D.J., Burnett, L.E., Burnett, K.G. 2007. Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with Vibrio. Fish and Shellfish Immunology. 22: 327-339.

Burrells, C., William, P.D., Forno, P.F. 2001. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds Effects on resistance to diseases in salmonids. Aquaculture. 199: 159-169.

Cheng, W., Chen, J.C. 2001. Effects of intrinsic and extrinsic factors on the hemocyte profile of the prawn, *Macrobachium rosenbergii*. Fish and Shellfish Immunology. 11: 53-63.

Chen, J.C., Cheng, S.Y. 1995. Hemolymph oxygen content, oxyhemocyanin, protein levels and ammonia excretion in the shrimp *Penaus monodon* exposed to ambient nitrite. Biochemic Physiology.164: 530-535.

Davis, K.B., Parker, N.C. 1990. Physiological stress in striped bass: Effect of acclimation temperature. Aquaculture. 91: 349-358.

Emerenciano, M., Cuzon, G., Mascaro, M., Arevalo, M., Norena-Barroso, E., Jeronimo, G., Racottae, I.S., Gaxiolab, G. 2012. Reproductive performance biochemical composition and fatty acid profile of wild-caught and 2nd generation domesticated *Farfantepenaeus duorarum* (Burkenroad, 1939) broodstock. Aquaculture. May: 194-204.

Fegan, D.F. 2006. Feeds for the future: the importance of better broodstock and larval nutrition in successful aquaculture. Alltech Inc. Bangkok. Thailand: 13 p.

Fegan, D.F. 2002. Effectiveness of NuproTM as immune enhancer for shrimp, *penaeus monodon*. Shrimp biotechnology business Unit (SBBU). Mahidol University, Bangkok/Thailand. 25 p.

Grace, S.K., Andrino., Augusto, E., Serrano, J.R., Valeriano, L.C. 2012. Effects of dietary nucleotides on the immune response and growth of juvenile Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. Asian Fisheries Science. 25: 180-192

Gonzalez-Vecino, J.L., Cutts, C.J., Batty, R.S., Mazorra, C., Burrells, C. 2003. The effects of nucleotide supplementation on broodstock and larval performance in Atlantic halibut and haddock. in: Shimmield, G. (ed.). World Aquaculture Abstracts. Louisiana. USA: 325 p.

Holen, E., Bjorge, O.A., Jonsson, R. 2005. Dietary nucleotides and human immune cells. II. Modulation of PBMC growth and cytokine secretion. Nutrition. 21: 1003-1009.

Le Moullac, G., Haffner, P. 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. Aquaculture. 191: 121-131.

Le Moullac, G., Le Groumelle, M., Ansquer, D., Froissard, S., Levy, P. 1997. Haematological and phenloxidase activity change in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. Fish and Shellfish Immunology. 7: 227-234.

Leonardi, M., Sandino, A.M., Klempau, A. 2003. Effect of a nucleotide-enriched diet on the immune system, plasma cortisol levels and resistance to infectious pancreatic necrosis (IPN) in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Bulletin Euro Associate Fish Pathology. 23: 52-59.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-06-11]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1395.6.1.12.0]

Li, P., Gatlin, D.M. 2006. Nucleotide nutrition in fish Current knowledge and future applications. Aquaculture. 251: 141-152.

Maggioni, D.S., Andreatta, E.R., Hermes, E.M., Barracco, A. 2004. Evaluation of some hemato-immunological parameters in female shrimp *Litopenaeus vannamei* submitted to unilateral eyestalk ablation in association with a diet supplemented with superdoses of ascorbic acid as a form of immunostimulation. Aquaculture. 241: 501-515.

Palacios, E., Ibarra, A.M., Racotta, I.S. 2000. Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock. Aquaculture. 185: 353-371.

Perazzolo, L.M., Gargioni, R., Ogliari, P., Barranco, M.A.A. 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. Aquaculture. 214: 19-33.

Phiriyangkul, P. 2006. Molecular cloning and characterization of vitellin cDNA in banana shrimp *Fenneropenaeus merguiensis*. PhD thesis. Philosophy in biochemistry department. Prince of Songkla University. Thailand. 191 p.

Oujifard, A., Abedin-Kenari, A., Nafisi-bahabai, M., Ghaednia, B., Mahmoudi, N. 2008. Effect of dietary nucleotide on the growth performance, survival and some hemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Journal of Iranian Marine Science and Technology. (1 & 2): 21-31. (in Persian).

Quinitio, E.T., Millamena, O.M. 1992. Ovarian changes and female-specific protein levels during sexualmaturation of *Penaeus indicus*. Aquaculture. 44: 7-12.

Racotta, I.S., Palacios, E., Ibarra, A.M. 2003. Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. Aquaculture. 227: 107-130.

Sainz-Hernández, J.C., Racotta, I.S., Dumas, S., Hernández-López, J. 2008. Effect of unilateral and bilateral eyestalk ablation in *Litopenaeus vannamei* male and female on several metabolic and immunologic variables. Aquaculture. 283: 188-193.

Sanchez, A., Pascual, C., Sanchez, A., Vargas-Albores, F., Le-Moullac, G., Rosas, C. 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus vannamei* adult males: the effect of acclimation. Aquaculture. 198: 13-28.

Sandeepa, M.G., Ammani, K. 2015. Effect of probiotic bacterium on growth and biochemical parameters of shrimp *Litopenaeus vannamei*. International Journal of Recent Scientific Research. 6(2): 2871-2875.

Saraswati, E., Prayitno, A., Yanuhar, U., Abadi, A.L. 2013. Immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* that injected with the extract of Diatomae *Chaetoceros ceratosphorum*. Journal of Basic and Applied Scientific Research. 3(7): 998-1004.

Sen, D., Fang, W., Hao, S., Shuanglin, D. 2009. Effects of salinity fluctuation frequency on the growth, molting rate and hemolymph 20-Hydroxyecdysone concentration in juvenile Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. Journal of Oceanic and Coastal Sea Research. 8(3): 259-264.

Shankar, R. 2008. Efficacy of nucleotides in enhancing immune disease resistance against white muscle disease in Giant Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. PhD thesis. Department of Aquaculture. Mangalore, Animal and Fisheries Sciences University, Bidar. India. 220 p.

Song, L., Yu, I., Lien, W., Huang, C. 2003. Haemolymph parameters of *Litopenaeus vannamei* infected with Taura syndrome virus. Fish and Shellfish Immunology. 14: 317-331.

Sritunyaluck, K., Söderhäll, K. 2000. The propo and clotting system in crustaceans. Aquaculture. 191: 53-59.

Wouters, R., Nieto, J., Sorgeloos, P. 2000. Artificial diets for Penaeid Shrimp. The Advocate, Global Aquaculture Alliance. April: 61-62.

Wouters, R., Lavens, P., Nieto, J., Sorgeloos, P. 2001. Penaeid shrimp broodstock nutrition an updated review on research and development. Aquaculture. 202: 1-21.

Yang, C., Chen, N., Lu, L., Chen, S., Lai, C. 2014. Effect of mushroom Beta Glucan on immune and haemocyte response in shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal of Aquaculture Research Development. 5(6): 275.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-06-11]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1395.6.1.12.0]