تاثیر هم‌زمان شدت و دوره نوری بر تکامل فعالیت آنزیم‌های گوارشی لارو تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus* Borodin,۱۸۹۷)

- **فرزانه نوری*:** گروه بیولوژی و تکثیر و پرورش آبزیان، پژوهشکده آرتمیا و آبزی‌پروری، دانشگاه ارومیه. ارومیه، ایران. صندوق پستی: ۵۷۱۳۵۱۶۵
- **رضوان‌اله کاظمی:** مؤسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران. صندوق پستی: ٤١٦٣٥٣٤٦٤
- **الهه حسن‌نتاج‌نیازی:** گروه بیولوژی و تکثیر و پرورش آبزیان، پژوهشکده آرتمیا و آبزی‌پروری، دانشگاه ارومیه. ارومیه، ایران. صندوق پستی: ۵۷۱۳۵۱۶۵

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹٦ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹٦

چکیده

در تحقیق حاضر تاثیر دوره‌های نوری مختلف و شدت نور بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی (پپسین، تریپسین، کموتریپسین، لیپاز، آمیلاز و آلکالین فسفاتاز) لارو تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) پس از تخم‌گشایی تا جذب کامل کیسه زرده مورد ارزیابی قرار گرفت. لاروهای تازه تفریخ شده تاس‌ماهی ایرانی (قره‌برون) به‌ترتیب با میانگین وزنی و طولی ۰/۰۸±۱۹/۲۳میلی‌گرم و ۰/۰۳±۱۱/۳۵ میلی‌متر تحت شش تیمار با دوره‌های مختلف روشنایی و تاریکی ٢٤D:٠٠L، ١٢L:١٢D، ٢٤L:٠٠D و در سه شدت نور ۵۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ لوکس به‌جز تیمار تاریکی کامل که فقط دارای یک شدت نور ۱۰-۰ لوکس بود، قرار گرفتند. در طول مدت پروژه لاروها در شرایط پرورشی یکسان (pH، دما، دبی آب و میزان تغذیه) قرار داشتند. نتایج حاصله نشان داد که فعالیت پپسین و تریپسین در روز نهم پس از تخم‌گشایی (dph) به‌ترتیب در تیمار ۵ با شدت نور ۱۵۰ لوکس و ۱۲ ساعت روشنایی و تیمار ۲ در ٢٤ روشنایی و ۱۵۰ لوکس بیش‌ترین میزان را دارا بود و به‌صورت معنی‌داری بالاتر از تیمار شاهد بود. فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در تیمار ۲ و آمیلاز و کموتریپسین به‌ترتیب در دوره نوری ١٢L و ٢٤L و شدت نور ۳۰۰ لوکس از فعالیت بیش‌تری برخوردار بود ولی با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نداشتند. نتایج این تحقیق نشان داد نور فاکتور مهمی در مراحل اولیه تکامل سیستم گوارش ماهی قره‌برون به‌شمار می‌رود. هم‌چنین اغلب آنزیم‌های گوارشی تحت دوره نوری ۱۲ ساعت و شدت نور بین ۱۵۰ تا ۳۰۰ لوکس فعالیت بیش‌تری از خود نشان دادند.

کلمات کلیدی: لارو تاس‌ماهی ایرانی، تکامل، شدت نور، دوره نوری، آنزیم‌های گوارشی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: f.noori@urmia.ac.ir

مقدمه

تاس‌ماهی ایرانی یکی از با ارزش‌ترین ماهیان تجاری دریای خزر محسوب می‌شود که سال‌هاست تکثیر و پرورش آن در محیط‌های پرورشی رواج یافته است است. این ماهی گونه منحصر به فرد ماهیان خاویاری بوده که دارای پراکنش بیش‌تری در حاشیه جنوبی دریای خزر می‌باشد و جهت تکثیر مصنوعی صید و به کارگاه‌های مربوطه انتقال می‌یابند (کهنه‌شهری و تاکامی، ۱۳۵۳). ماهیان خاویاریی از نظر تکاملی مابین ماهیان غضروفی و استخوانی هستند و مطالعه آن‌ها اطلاعات ارزشمندی جهت بررسی روند تکاملی (به‌خصوص تغذیه‌ای) از ماهیان غضروفی به استخوانی فراهم می‌کند. شناخت شکل‌گیری ساختار تغذیه‌ای ماهیان خاویاری به‌همراه آغاز فعالیت سیستم گوارشی می‌تواند به درک بهتر نیازهای تغذیه‌ای این گونه کمک کند. میزان کارایی غذا به ظرفیت فیزیولوژیکی ماهی در هضم و جذب مواد غذایی بستگی دارد (Furné و همکاران، ۲۰۰۸). مکانیزم‌های هضم و جذب در لارو ماهیان در طی دو دهه اخیر مورد مطالعه قرار گرفته است (Babaei و همکاران، ۲۰۱۱). مانند لارو اکثر ماهیان، لارو ماهیان خاویاری نیز در زمان تخم‌گشایی به‌طور کامل تکوین نیافته و این امر هضم و جذب بهینه غذای خارجی را تا زمان تکوین و تمایز کامل تحت تاثیر قرار می‌دهد (Gisbert و Sarasquete، ۲۰۰۰). تکوین آنزیم‌های گوارشی منعکس‌کننده میزان تکوین دستگاه گوارش و ظرفیت هضمی جانوران است و می‌تواند به‌عنوان شاخصی از وضعیت تغذیه‌ای در مراحل ابتدایی زندگی (Yúfera و Darias، ۲۰۰۷) و کمک کننده جهت شناخت نیازهای تغذیه‌ای (Noori و همکاران، ۲۰۱۱؛ Twining و همکاران، ۱۹۸۳) باشد. لذا تجزیه و تحلیل تغییرات تکوینی طی مراحل ابتدایی زندگی ماهی جهت طراحی استراتژی تغذیه‌ای و فرمولاسیون غذای خشک ضروری به‌نظر می‌رسد (Verreth و Segner، ۱۹۹۵). تعیین شرایط محیطی بهینه در کارگاه‌های پرورش ماهی جهت تولید بیش‌ترین لارو و بچه‌ماهی بسیار ضروری است. دوره نوری و شدت نور یکی از مهم‌ترین پارامترهای فیزیکی در رشد و بقای لارو ماهیان محسوب می‌شوند (Boeuf و Le Bail، ۱۹۹۹؛ Hart و همکاران، ۱۹۹۶). دوره نوری اپتیمم جهت رشد، تکامل و بقاء لاروی متفاوت است و نیز در طول تکامل لارو تغییر می‌کند. به‌طورکلی دوره نوری بلندمدت منجر به بهبود کارایی لارو می‌شود که احتمالاً ناشی از دسترسی بیش‌تر به غذا می‌باشد (Boeuf و Le Bail، ۱۹۹۹).

تاکنون تاثیر عوامل محیطی بر روی ماهیان به‌خوبی مطالعه قرار گرفته است به‌خصوص در مورد عواملی که بر رشد و تولیدمثل موثرند. در این بین دوره نوری به‌عنوان یک هماهنگ کننده سیستم داخلی بدن عمل کرده و فعالیت حرکتی، رشد، میزان متابولیسم، میزان رنگدانه‌های بدن، بلوغ جنسی و تولیدمثل را در ماهیان استخوانی تحت تاثیر قرار می‌دهد (El-Sayed و Kawanna، ۲۰۰۴؛ Biswas و Takeuchi، ۲۰۰۳؛ Trippel و Neil، ۲۰۰۳؛ Boeuf و Le Bail، ۱۹۹۹). به‌علاوه دوره نوری دوره نوری یکی از عوامل بسیار مهمی است که بر روی استراتژی تغذیه هم تاثیر به‌سزایی دارد (Reynalte-Tataje و همکاران، ۲۰۰۲). در بسیاری از گونه‌ها، تغذیه، از یک ریتم زیستی استاندارد تبعیت می‌کند که تحت تاثیر دوره نوری می‌باشد. به این ترتیب ماهیان روز کار بیش‌ترین فعالیت را در روشنایی روز و کم‌ترین فعالیت را در تاریکی دارند درحالی‌که برعکس آن در مورد ماهیان شب فعال صدق می‌کند. در بسیاری از گونه‌ها دوره نوری دوره نوری طولانی‌تر به‌طور غیرمستقیم با افزایش مصرف غذا سبب افزایش توده ماهیچه‌ای بدن، فعالیت حرکتی (Boeuf و Le Bail، ۱۹۹۹) و استفاده بهینه از مواد مغذی میگردد (Biswas و همکاران، ۲۰۰۵). به‌علاوه، از انرژی حاصل از غذا جهت افزایش توده بدن به جای رشد گنادها استفاده می‌کنند (Boeuf و Le Bail، ۱۹۹۹) اما دوره نوری همیشه منجر به بهبود کارایی، بقاء و رشد ماهیان نمی‌گردد. در طولانی مدت تغییر رژیم نوری تاثیرات منفی بر متابولیسم و رشد ماهی می‌گذارد، خصوصاً هنگامی‌که روشنایی و یا تاریکی مطلق استفاده شود (Villamizar و همکاران، ۲۰۱۱). تاکنون تحقیقات زیادی در رابطه با نقش دوره نوری بر رشد و بقاء، کارایی تغذیه‌ای، فعالیت‌های حرکتی و بلوغ جنسی برخی گونه‌ها صورت گرفته ولی مطالعات اندکی در ارتباط با تاثیر رژیم و شدت نور بر تکامل دستگاه گوارش و ترشح آنزیم‌های گوارشی انجام پذیرفته است.

هدف مطالعه حاضر تعیین زمان شروع و افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی و نیز بررسی تاثیر دوره‌های مختلف نوری و شدت نور بر میزان فعالیت این آنزیم‌ها در لارو تاس‌ماهی ایرانی در مراحل اولیه زندگی می‌باشد تا اطلاعات مناسبی جهت بهبود بیوتکنیک پرورش (فرمولاسیون غذایی و افزایش بقا لارو و بچه‌ماهی مورد نیاز جهت پرواربندی) این ماهی با توجه به صنعت رو به توسعه پرورش این گونه فراهم شود.

مواد و روش‌ها

شرایط پرورش ماهی مورد مطالعه: تخمک‌های لقاح یافته از دو قطعه تاس‌ماهی ایرانی ماده (تا افراد مورد مطالعه دارای بیشینه تنوع ژنوتیپی باشند، هر چند براساس دانش ژنتیک و با توجه به بیش از ۲۲۰ کروموزومی بودن تاس‌ماهی ایرانی و نیز رخداد کراسینگ‌آور، حتی از یک مولد ماده نیز صدها تخمک با تنوع ژنی حاصل خواهد شد و به‌علاوه استفاده از ۳ نر با تفاوت‌های ژنتیکی متنوع می‌تواند

افراد مورد آزمون را از نظر اختلافات ژنتیکی به هزاران فرد برساند) صید شده از سواحل ناحیه ۲ شیلاتی (استان گیلان) تهیه شد.

درمرحله لاروی از سه تیمار دوره نوری ۱۲L :۱۲D، ۲۴ L:۰۰D و ۰۰L:۲۴D و هر یک با سه تیمار شدت نور ۵۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ لوکس و هر تیمار نیز با سه تکرار، به‌جز تاریکی کامل که فقط دارای یک تیمار با شدت نور ۱۰-۰ لوکس بود، استفاده شد. لاروهای حاوی کیسه زرده به حوضچه‌های پلاستیکی با حجم ۱۵۰ لیتر (با ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر و ارتفاع آبگیری ۲۰ سانتی‌متر) و دبی ۰/۱ لیتر در ثانیه با هوادهی مستمر و تعویض خودکار آب (مشابه ساختار حوضچه‌های ونیرو) طراحی شده توسط مجری که با آب رودخانه سفیدرود (پس از ته نشست در استخر مادر و فیلتراسیون با فیلترهای شنی وارد حوضچه‌های پلاستیکی می‌شود) معرفی شد. تعداد لارو معرفی شده به هر حوضچه (در هر تکرار از هر تیمار)، ۵۷۲۰ قطعه (جمعاً ۱۷۱۶۰ قطعه) بود.

نمونه‌برداری از ماهیان در طول آزمایش جهت آنالیزهای آنزیمی: به‌منظور بررسی تاثیر دوره‌های نوری و شدت‌های نوری مختلف بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی لاروهای گروه‌های آزمایشی مختلف، در روزهای۱, ۴, ۹, ۱۴, ۱۹, ۲۴, ۳۰, ۳۷, ۴۳ و ۵۰ (۱۷/۷۱، ۷۲/۸۰، ۲۰۱/۳۷، ۳۹۲/۹۲، ۵۱۳/۸۴، ۶۸۹/۱۰، ۸۷۳/۹۴، ۹۵۷/۱۸، ۱۰۸۴ روز- درجه) پس از تفریخ اقدام به نمونه‌برداری به‌میزان ۵۰ عدد از لاروهای ۱ تا ۲۴ روزه و تعداد ۲۰ عدد از لاروهای ۳۰ تا ۵۰ روزه (به‌ترتیب ۵۰ و ۲۰ عدد لارو از هر مخزن) شد.

تهیه عصاره آنزیمی: به جهت کوچکی ماهی در زمان لاروی عصاره آنزیمی با هموژن کردن کل لاروهای نمونه‌گیری به نسبت ۱:۵ در بافر Tris- HCl ۵۰ میلی‌مولار توسط هموژنایزر (مدل Polytron PT 1300Δ) به‌مدت ۱/۵ دقیقه تهیه شد و سپس هموژنات به‌مدت ۲۰دقیقه‌در سانتریفوژ یخچال‌دار (مدل Z36HK) در ۴درجه‌سانتی‌گراد با دور ۱۰۰۰۰ gسانتریفوژ گردیدو سوپرناتانت حاصله در ویال اپندورف جهت آنالیز آنزیم‌های مورد نظر تقسیم شده و تا زمان سنجش در دمای ۸۰- درجه‌سانتی‌گرادنگه‌داری شد (Chong و همکاران، ۲۰۰۲).

سنجش‌های آنزیمی: فعالیت آنزیم پپسین با استفاده از روش معرفی شده توسط Rungruangsak و Utne (۱۹۸۱) سنجش شد. به‌طور خلاصه، ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی با ۲۰۰ میکرولیتر کازئین ۱ درصد (در HCl ۶۰ میلی‌مولار) مخلوط و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه در انکوباتور شیکردار قرار گرفت. واکنش با اضافه کردن یک میلی‌لیتر TCA پنج درصد متوقف شد و سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اطاق قرار داده شد. در ادامه محلول آماده شده به‌مدت ۲۰ دقیقه با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول بالایی برداشته شد و با یک میلی‌لیتر NaOH ۰/۵ مولار و ۰/۳ میلی‌لیتر معرف Folin-Ciocalteu مخلوط و در نهایت پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۲۵-۲۲ در طول موج ۷۲۰ نانومتر میزان جذب نوری قرائت و با منحنی استاندارد L-Tyrosine مقایسه شد. میزان فعالیت آنزیم پپسین به‌صورت میکرومول تیروزین/ ساعت/ میلی‌گرم پروتئین بیان شده است. فعالیت آنزیم تریپسین با استفاده از benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA) ۱ میلی‌مولار به‌عنوان سوبسترا سنجش شد(Erlangerو همکاران، ۱۹۶۱). BAPNA (۱ میلی‌مولار در ۵۰ میلی‌مولار Tris-Hcl، ۲۰ میلی‌مولار $CaCl_2$، pH=۷) با عصاره آنزیمی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. تغییرات جذب در طول موج ۴۱۰ نانومتر به‌مدت ۱۰ دقیقه خوانده شد (Erlangerو همکاران، ۱۹۶۱). میزان فعالیت آنزیم کیموتریپسین نیز با استفاده از ماده Succinyl-$(Ala)_2$- Pro-Phe-*p*-Nitroanilide (SAPNA) ۰/۱ میلی‌مولار در محلول بافر Tris-HCl ۰/۰۵ مولار $CaCl_2.2H_2O$ ۰/۰۲ مولار، pH=۸/۵) به‌عنوان سوبسترا سنجش شد (Erlangerو همکاران، ۱۹۶۱). مخلوط واکنش آنزیمی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه انکوباسیون شد و بلافاصله میزان جذب‌نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر قرائت شد. میزان آنزیم تریپسین و کیموتریپسین با استفاده از فرمول ذیل محاسبه شد:

$$\frac{\text{میلی گرم پروتئین/واحد}}{\text{میلی گرم پروتئین در مخلوط واکنش} \times ۸۸۰۰} = \frac{\text{میلی لیتر مخلوط واکنش} \times ۱۰۰۰ \times \text{میزان جذب نوری در طول موج ۴۱۰ nm در دقیقه}}{}$$

فعالیت آنزیم لیپاز با استفاده از هیدرولیز p–nitrophenyl myristate و به طریق اسپکتروفتومتری تعیین گردید. هر سنجش لیپازی شامل ۵ میکرولیتر از عصاره آنزیمی و ۰/۵ میلی‌لیتر محلول سوبسترا حاوی ۰/۵۳ میلی‌مولار از p – nitrophenyl myristate، ۰/۲۵ میلی‌مولار از methoxy ethanol –۲، ۵ میلی‌مولار از sodium cholate و ۰/۲۵ مولار Tris – HCl ,pH =۹ می‌باشد (Sigma, USA) که در دمای ۳۰°C به‌مدت ۱۵ دقیقه آنکوباسیون گردید. واکنش فوق با افزودن ۰/۷ میلی‌لیتر از محلول aceton / n- heptanes (۵:۲، v/v) متوقف و به مدت ۲ دقیقه در ۶۰۸۰ g سانتریفوژ شد. میزان جذب لایه آبی زیرین در ۴۰۵ نانومتر قرائت گردید (Iijima و همکاران، ۱۹۹۸). فعالیت آنزیم آمیلاز طبق روش Worthington (۱۹۹۱) با استفاده از نشاسته به‌عنوان سوبسترا تعیین شد. به‌طور خلاصه، نشاسته (۱٪) در بافر فسفات‌سدیم ۲۰میلی‌مولار حاوی کلریدسدیم ۶میلی‌مولار (pH = ۶/۹) رقیق شد و با عصاره آنزیمی به‌مدت ۴ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگرادانکوبه شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر محلول دی‌نیتروسالیسیلیک اسید اضافه و به‌مدت ۵ دقیقه جوشانده‌شد.بعد از جوشیدن، ۵ میلی‌لیتر آب مقطربه‌مخلوط اضافه‌شد و جذب محلول در طول موج ۵۴۰ خوانده

شد. بلانک‌ها نیز به‌همین صورت اما بدون عصاره آنزیمی تهیه شدند. مالتوز (۳-۰/۵ میکرومولار بر میلی‌لیتر) جهت آماده‌سازی منحنی استاندارد استفاده شد. فعالیت آلفا- آمیلاز، بر حسب میکرو مول مالتوز آزاد شده تحت اثر آنزیم در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تعریف شد. میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز نیز با استفاده از ماده p-Nitrophenyl phosphate (PNPP) به‌عنوان سوبسترا سنجش شد. در ابتدا عصاره آنزیمی با محلول بافر ۴ میلی‌مولار PNPP (بی‌کربنات آمونیوم ۵۵ میلی‌مولار به‌همراه $MgCl_2$ ۰/۶ میلی‌مولار، pH=۷/۸) مخلوط و سپس در طول موج ۴۰۵ نانومتر میزان جذب نوری قرائت شد. میزان پروتئین محلول نیز از روش معرفی شده توسط Bradford (۱۹۷۶) با استفاده از آلبومین سرم گاوی به‌عنوان استاندارد محاسبه شد. فعالیت‌های آنزیمی به‌صورت فعالیت ویژه (U mg/protein) بیان شدند. تمامی نمونه‌ها در سه تکرار (تکرار بیولوژیکی) و هر کدام از آن‌ها نیز در سه تکرار متدولوژیکی آنالیز شدند.

تجزیه و تحلیل آماری: در مطالعه حاضر از طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار برای هر دوره تاریکی و روشنایی و شدت نور استفاده شد. شرایط آنالیز واریانس یعنی نرمال بودن و همگنی واریانس تست شد و برای مقایسه میانگین بین تیمارها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و دو طرفه Two-Way ANOVA در سطح احتمال ($P<0/05$) استفاده شد. در صورت معنی‌دار بودن اثرات متقابل متغیرها از آزمون Duncan برای یافتن اختلاف معنی‌دار بین سطوح متغیر مستقل استفاده شد. برای تجزیه تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج

در تحقیق حاضر، فعالیت تمامی آنزیم‌ها در تیمارهای تحت مطالعه در نخستین روز بعد از تفریخ مشاهده شد. نتایج نشان داد که زمان اثر معنی‌داری بر فعالیت پپسین داشت به‌طوری‌که با گذشت زمان ترشح پپسین روند افزایشی را طی کرده و به بالاترین مقدار خود در روز نهم پس از تخم‌گشایی dph(dd۲۰۱/۳۷ درجه‌روز) رسید. اختلاف معنی‌داری در میزان فعالیت پپسین در روز نخست (۱۷/۷۱ dd) در تیمارهای تحت مطالعه مشاهده نشد ولی فعالیت پپسین تیمارهای ۱، ۵ و ۶ در این روز به‌طور معنی‌داری بالاتر از کنترل منفی بود. بالاترین فعالیت پپسین در روز چهار dph (۷۲/۸۰ dd) در تیمار ۵ مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با کنترل مثبت و منفی داشت اما فعالیت پپسین بین سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. دوره نوری اثر معنی‌داری بر فعالیت پپسین داشت به‌طوریکه در نهمین روز dph (dd ۲۰۱/۳۷)، فعالیت پپسین در تیمارهای تحت دوره نوری ۱۲L به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از دوره نوری ۲۴L بود. به‌علاوه، در نهمین روز dph، اختلاف معنی‌داری در فعالیت پپسین تیمارهای ۴، ۵ و ۶ با کنترل منفی و نیز تیمارهای ۱، ۲ و ۳ با کنترل مثبت مشاهده شد(جدول ۱).

جدول ۱: مقایسه تیمارها با در نظر گرفتن اثر زمان× پدوره نوری× شدت نوری بر فعالیت آنزیم پپسین

متغیر تیمار	دوره روشنایی	شدت نوری (لوکس)	پپسین روز اول (۱۷/۷۱ ddph)	پپسین روز چهارم (۷۲/۸۰ ddph)	پپسین روز نهم (۲۰۱/۳۷ ddph)
۱	۲۴	۵۰	۱۶/۷۴ ±۳/۳۵$^{gh+--}$	۱۸/۵۱ ±۳/۰۶$^{fg--}$	۴۸/۳۳ ±۴/۱۱$^{c+}$
۲		۱۵۰	۱۰/۸۳ ±۰/۷۸^{hi}	۱۶/۱۱ ±۲/۷۲$^{gh+--}$	۵۴/۰۴ ±۴/۸۷$^{bc-}$
۳		۳۰۰	۸/۵۳ ±۱/۴۸^{i}	۱۶/۰۶ ±۲/۵$^{gh+--}$	۵۰/۴۱ ±۳/۵۵$^{c+}$
۴	۱۲	۵۰	۱۱/۱۷ ±۱/۸۴^{hi}	۲۳/۲۹ ±۴/۶۳$^{ef-}$	۵۶/۸۹ ±۷/۵۲$^{ab-}$
۵		۱۵۰	۱۲/۹۴ ±۱/۳۵$^{ghi--}$	۳۶/۲۳ ±۴/۱۶$^{d++-}$	۶۰/۹۵ ±۶/۵۹$^{a--}$
۶		۳۰۰	۱۵/۴۱ ±۱/۱۶$^{gh--}$	۲۷/۵۸ ±۲/۸۹^{e}	۶۰/۰۵ ±۵/۰۸$^{a--}$
کنترل مثبت	تاریکی	۱۰	۱۲/۱۹ ±۳/۰۹^{C}	۲۳/۴۱ ±۰/۷۶^{B}	۶۰/۷۵ ±۲/۴۲^{A}
کنترل منفی	شاهد	-	۷/۸۹ ±۱/۳۸^{C}	۲۹/۵۶ ±۰/۸۸^{B}	۴۶/۱۳ ±۱/۹۶^{A}

حروف مشترک کوچک نشانه عدم تفاوت معنی‌دار بین تیمارها و حروف بزرگ مقایسه تیمارها به‌صورت افقی است.

+ مقایسه بین کنترل مثبت (تاریکی) و – مقایسه کنترل منفی (شرایط معمول) با تیمارها به‌صورت ستونی است.

مطابق جدول ۲، بالاترین فعالیت تریپسین در تیمار ۱ در روز نهم (۲۰۱/۳۷ ddph) مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با کنترل مثبت و منفی داشت. به‌علاوه، در روز چهارم (۷۲/۸۰ ddph)، اختلاف معنی‌داری بین فعالیت تریپسین تیمارهای ۱ و ۲ مشاهده نشد ولی در مقایسه با کنترل مثبت و منفی دارای اختلاف معنی‌داری بودند.

جدول ۲: مقایسه تیمارها با در نظر گرفتن اثر زمان × دوره نوری بر فعالیت آنزیم تریپسین

متغیر تیمار	دوره روشنایی	شدت نوری (لوکس)	تریپسین روز اول (۱۷/۷۱ ddph)	تریپسین روز چهارم (۷۲/۸۰ ddph)	تریپسین روز نهم (۲۰۱/۳۷ ddph)
۱	۲۴	۵۰	۰/۰۲۴ ±۰/۰۱۶$^{a++-}$	۰/۰۲۲ ±۰/۰۰۱$^{a+--}$	۰/۰۲۶ ±۰/۰۰۲۶$^{a+}$
۲	۲۴	۱۵۰	۰/۰۲۶ ±۰/۰۱$^{a++-}$	۰/۰۳۰ ±۰/۰۰۱۴$^{ab++}$	۰/۰۴۲ ±۰/۰۰۵$^{c++--}$
کنترل مثبت	تاریکی		۰/۰۲۹ ±۰/۰۰۲^{A}	۰/۰۲۴ ±۰/۰۰۲^{A}	۰/۰۲۳ ±۰/۰۰۴^{A}
کنترل منفی	شاهد		۰/۰۲۷ ±۰/۰۰۱^{A}	۰/۰۳۳ ±۰/۰۰۳^{B}	۰/۰۲۴ ±۰/۰۰۳^{A}

حروف مشترک کوچک نشانه عدم تفاوت معنی‌دار بین تیمارها و حروف بزرگ مقایسه تیمارها به‌صورت افقی است.

+ مقایسه بین کنترل مثبت (تاریکی) با تیمارها در هر ستون و – مقایسه کنترل منفی (شرایط معمول) با تیمارهای هر ستون است.

در مطالعه حاضر، پایین‌ترین فعالیت کیموتریپسین در روز نخست (۱۷/۷۱ ddph) در تیمار ۱ مشاهده شد و بالاترین فعالیت کیموتریپسین در روز نهم (۲۰۱/۳۷ ddph) در تیمار ۳ مشاهده شد که هر دو اختلاف معنی‌داری با کنترل مثبت داشتند. در روز چهارم (۷۲/۸۰ ddph) فعالیت کیموتریپسین در تیمارهای تحت دوره نوری ۱۲L بیش‌تر از ۲۴L بود. به‌علاوه، پایین‌ترین فعالیت کیموتریپسین در این روز در تیمار ۳ (بالاترین دوره نوری و شدت نوری یعنی ۲۴L و ۳۰۰ لوکس) مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری کم‌تر از کنترل مثبت و منفی بود و بالاترین فعالیت کیموتریپسین مربوط به تیمار ۶ بود که به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از کنترل مثبت و منفی بود. در روز نهم (۲۰۱/۳۷ ddph)، میزان فعالیت کیموتریپسین در تیمارهای تحت دوره نوری ۲۴L بیش‌تر از ۱۲L بود ولی اختلاف معنی‌داری بین این تیمارها مشاهده نشد($P>0/05$).هم‌چنین، در روز نهم، فعالیت کیموتریپسین در تیمارهای ۱، ۲ و ۳ با افزایش شدت نور به‌طور معنی‌داری افزایش یافت به‌طوری‌که تیمار ۳ در بالاترین شدت نوری و دوره نوری، بالاترین فعالیت را داشت ولی اختلاف معنی‌داری در تیمارهای ۴، ۵ و ۶ مشاهده نشد (جدول ۳).

جدول ۳: مقایسه تیمارها با در نظر گرفتن اثر زمان × دوره نوری × شدت نوری بر فعالیت آنزیم کیموتریپسین

متغیر تیمار	دوره روشنایی	شدت نوری لوکس	کیموتریپسین روز اول(۱۷/۷۱ ddph)	کیموتریپسین روز چهارم(۷۲/۸۰ ddph)	کیموتریپسین روز نهم(۲۰۱/۳۷ ddph)
۱	۲۴	۵۰	۰/۰۰۳۱ ±۰/۰۰۱$^{i++}$	۰/۰۱۳۰ ±۰/۰۰۱^{defg}	۰/۰۱۱۰ ±۰/۰۱^{fghi}
۲		۱۵۰	۰/۰۰۶۵ ±۰/۰۰۳^{ghi}	۰/۰۱۵۰ ±۰/۰۰۳^{cdef}	۰/۰۲۰۰ ±۰/۰۰۲$^{bcd-}$
۳		۳۰۰	۰/۰۰۶۹ ±۰/۰۰۲^{ghi}	۰/۰۱۰۰ ±۰/۰۰۲$^{fghi++--}$	۰/۰۲۸۰ ±۰/۰۰۵$^{a++}$
۴	۱۲	۵۰	۰/۰۰۶۹ ±۰/۰۰۲^{ghi}	۰/۰۲۲۰ ±۰/۰۰۳^{abc}	۰/۰۱۲۰ ±۰/۰۰۵^{efgh}
۵		۱۵۰	۰/۰۰۵۳ ±۰/۰۰۰۱^{ghi}	۰/۰۱۹۰ ±۰/۰۰۱^{bcde}	۰/۰۱۹۰ ±۰/۰۰۷^{bcde}
۶		۳۰۰	۰/۰۰۴۰ ±۰/۰۰۲$^{hi+}$	۰/۰۲۴۰ ±۰/۰۰۴$^{ab++--}$	۰/۰۱۷۰ ±۰/۰۰۹^{bcdef}
کنترل مثبت	تاریکی		۰/۰۰۸۱ ±۰/۰۰۰۳^{B}	۰/۰۱۸۰ ±۰/۰۰۱^{A}	۰/۰۰۹۰ ±۰/۰۰۴^{B}
کنترل منفی	شاهد		۰/۰۰۶۰ ±۰/۰۰۱^{B}	۰/۰۱۷۰ ±۰/۰۰۱^{A}	۰/۰۱۸۰ ±۰/۰۰۴^{A}

حروف مشترک کوچک نشانه عدم تفاوت معنی‌دار بین تیمارها و حروف بزرگ مقایسه تیمارها به‌صورت افقی است.

+ مقایسه بین کنترل مثبت (تاریکی) با تیمارها در هر ستون و – مقایسه کنترل منفی (شرایط معمول) با تیمارهای هر ستون است.

در تمامی تیمارها بالاترین فعالیت آمیلاز مربوط به روز نهم بعد از تفریخ بود حال آن‌که پایین‌ترین فعالیت آمیلاز مربوط به تیمار ۱ در روز نخست dph (۱۷/۷۱ روز–درجه (dd)) بود که به‌طور معنی‌داری کم‌تر از کنترل مثبت و منفی بود. اگرچه فعالیت آمیلاز در روز نخست در تیمارهای تحت دوره نوری ۱۲L بالاتر از دوره نوری ۲۴L بود ولی این مقدار معنی‌دار نبود. درروز چهارم dph (۷۲/۸۰ dd) فعالیت آمیلاز در تیمارهای تحت مطالعه اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ولی اختلاف معنی‌داری با کنترل مثبت و منفی نشان داد نحوی‌که فعالیت آن به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود. بالاترین فعالیت آمیلاز در نهمین روز dph (۲۰۱/۳۷ dd) در تیمار ۶ مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با کنترل مثبت و منفی نداشت (جدول ۴).

جدول ۴: مقایسه تیمارها با در نظر گرفتن اثر زمان × دوره نوری × شدت نوری بر فعالیت آنزیم آمیلاز

متغیر تیمار	دوره روشنایی	شدت نوری لوکس	آمیلاز روز اول (۱۷/۷۱ ddph)	آمیلاز روز چهارم (۷۲/۸۰ ddph)	آمیلاز روز نهم (۲۰۱/۳۷ ddph)
۱	۲۴	۵۰	۱/۹۷۹ ±۰/۰۸۸$^{h++-}$	۲/۰۵۹ ±۰/۲۱۳$^{gh++--}$	۲/۶۷۴ ±۰/۱۱۸$^{c++-}$
۲		۱۵۰	۲/۳۲۵ ±۰/۰۳۱$^{defgh+}$	۲/۲۱۳ ±۰/۰۹۸$^{efgh++-}$	۲/۵۷ ±۰/۱۵۹$^{cd++--}$
۳		۳۰۰	۲/۴۳ ±۰/۲۰۸^{cdef}	۲/۲۸۲ ±۰/۰۷۲$^{defgh++}$	۲/۶۱ ±۰/۲۶۷$^{cd++-}$
۴	۱۲	۵۰	۲/۶۹۴ ±۰/۱۸۲$^{c-}$	۲/۱۵ ±۰/۰۸۵$^{fgh++-}$	۳/۲۵۱ ±۰/۲۶۴^{b}
۵		۱۵۰	۲/۷۲۵ ±۰/۰۶۸$^{c-}$	۲/۲۷۵ ±۰/۱۹۱$^{defgh++}$	۳/۲۸۸ ±۰/۲۳۸^{b}
۶		۳۰۰	۲/۵۱۷ ±۰/۲۶۵^{cde}	۲/۳۹۲ ±۰/۲۳۶$^{cdefg++}$	۳/۶۱۳ ±۰/۴۸۶^{a}
کنترل مثبت	تاریکی		۲/۶۵۷ ±۰/۰۹۵^{B}	۲/۹۷۵ ±۰/۲۳۴^{B}	۳/۵۰۴ ±۰/۳۱۷^{A}
کنترل منفی	شاهد		۲/۳۶۴ ±۰/۱۷۸^{B}	۲/۶۵۳ ±۰/۴۲۵^{B}	۳/۴۲۹ ±۰/۵۶^{A}

حروف مشترک کوچک نشانه عدم تفاوت معنی‌دار بین تیمارها و حروف بزرگ مقایسه تیمارها به‌صورت افقی است

+ مقایسه بین کنترل مثبت (تاریکی) با تیمارها در هر ستون و – مقایسه کنترل منفی (شرایط معمول) با تیمارهای هر ستون ست.

جدول ۵: مقایسه تیمارها با در نظر گرفتن اثر زمان × دوره نوری × شدت نوری

متغیر تیمار	دوره روشنایی	شدت نوری (لوکس)	آلکالین فسفاتاز روز اول(۱۷/۷۱ddph)	آلکالین فسفاتاز روز چهارم(۷۲/۸۰ddph)	آلکالین فسفاتاز روز نهم(۲۰۱/۳۷ddph)
۱	۲۴	۵۰	۰/۱۰۴ ±۰/۰۱۷$^{h++-}$	۰/۱۸۲ ±۰/۰۱۳^{def}	۰/۳۶۵ ±۰/۰۲۴^{b}
۲		۱۵۰	۰/۱۴۹ ±۰/۰۰۸^{fg}	۰/۲۳۱ ±۰/۰۰۴$^{c++--}$	۰/۴۲۶ ±۰/۰۲۴^{a}
۳		۳۰۰	۰/۱۳۹ ±۰/۰۰۴$^{gh++}$	۰/۱۶۹ ±۰/۰۰۶$^{defg-}$	۰/۴۰۷ ±۰/۰۶^{a}
۴	۱۲	۵۰	۰/۱۳۳ ±۰/۰۱۳$^{gh++}$	۰/۱۷۰ ±۰/۰۰۳$^{defg-}$	۰/۴۲۷ ±۰/۰۴۱^{a}
۵		۱۵۰	۰/۱۶۱ ±۰/۰۰۹^{efg}	۰/۱۹۲ ±۰/۰۱۷$^{de+}$	۰/۴۲۳ ±۰/۰۳۴^{a}
۶		۳۰۰	۰/۱۳۷ ±۰/۰۱۷$^{gh++}$	۰/۱۹۹ ±۰/۰۲$^{cd++}$	۰/۴۰۹ ±۰/۰۲۸^{a}
کنترل مثبت	تاریکی		۰/۱۷۱ ±۰/۰۱۲^{B}	۰/۱۶۸ ±۰/۰۰۷^{B}	۰/۳۶۳ ±۰/۰۱۶^{A}
کنترل منفی	شاهد		۰/۱۵۶ ±۰/۰۱۲^{C}	۰/۱۹۸ ±۰/۰۰۸^{B}	۰/۳۶۸ ±۰/۰۳۹^{A}

حروف مشترک کوچک نشانه عدم تفاوت معنی‌دار بین تیمارها و حروف بزرگ مقایسه تیمارها به‌صورت افقی است

+ مقایسه بین کنترل مثبت (تاریکی) با تیمارها در هر ستون و – مقایسه کنترل منفی (شرایط معمول) با تیمارهای هر ستون است.

جدول ۶- مقایسه تیمارها با در نظر گرفتن اثر زمان × دوره نوری × شدت نوری بر فعالیت آنزیم لیپاز

متغیر	دوره روشنایی	شدت نوری (لوکس)	لیپاز روز اول (۱۷/۷۱ ddph)	لیپاز روز چهارم (۷۲/۸۰ ddph)	لیپاز روز نهم (۲۰۱/۳۷ ddph)
تیمار ۱		۵۰	۰/۰۰۳۱۶ ±۰/۰۰۱۱۳^{b}	۰/۰۰۳۲۲۴ ±۰/۰۰۰۹۰^{b}	۰/۰۰۴۳۹۳ ±۰/۰۰۱۴۲^{a}
تیمار ۲	۲۴	۱۵۰	۰/۰۰۳۴۶ ±۰/۰۰۰۷۸^{b}	۰/۰۰۳۴۳۱ ±۰/۰۰۰۹۰^{b}	۰/۰۰۵۲۶۷ ±۰/۰۰۰۷۸^{a}
تیمار ۳		۳۰۰	۰/۰۰۳۶۴۸ ±۰/۰۰۰۷۷^{b}	۰/۰۰۴۳۴۴ ±۰/۰۰۰۸۱۸^{a}	۰/۰۰۵۴۲۴ ±۰/۰۰۱۰۱^{a}
تیمار ۴		۵۰	۰/۰۰۳۶۲۶ ±۰/۰۰۱۰۳^{b}	۰/۰۰۲۹۵۴ ±۰/۰۰۱۵۲^{b}	۰/۰۰۴۵۶۱ ±۰/۰۰۱۸۸^{a}
تیمار ۵	۱۲	۱۵۰	۰/۰۰۳۴۴۱ ±۰/۰۰۱۲۹^{b}	۰/۰۰۳۷۲۶ ±۰/۰۰۱۰۳^{b}	۰/۰۰۴۱۲۶ ±۰/۰۰۰۷۲^{a}
تیمار ۶		۳۰۰	۰/۰۰۴۰۷۱ ±۰/۰۰۱۵۱^{b}	۰/۰۰۵۲۹۹ ±۰/۰۰۲۴۸۳^{a}	۰/۰۰۵۹۵۱ ±۰/۰۰۳۲۳^{a}
کنترل مثبت	تاریکی	۱۰	۰/۰۰۴۱۳۶ ±۰/۰۰۱۴۷^{b}	۰/۰۰۳۲۴۶ ±۰/۰۰۰۹۵^{b}	۰/۰۰۳۸۷۶ ±۰/۰۰۰۵۷^{a}
کنترل منفی	شاهد	-	۰/۰۰۴۰۴۹ ±۰/۰۰۱۳۹^{b}	۰/۰۰۴۳۵۵ ±۰/۰۰۱۱۸^{b}	۰/۰۰۵۲۷۸ ±۰/۰۰۰۹۸^{a}

حروف مشترک کوچک نشانه عدم تفاوت معنی‌دار بین تیمارها و حروف بزرگ مقایسه تیمارها به‌صورت افقی است.

بحث

بهبود غذای فرموله‌شده جهت جایگزینی با غذای زنده در پرورش لارو آبزیان نیازمند شناخت کافی از فرآیند هضم در طی تکوین لاروی است (Lazo و همکاران، ۲۰۰۰؛ Cahu و Zambonino-Infante، ۱۹۹۷). پایین بودن میزان موفقیت در جایگزینی کامل غذای زنده با غذای دستی در شروع تغذیه آغازین، نشانه عدم تکامل کامل دستگاه گوارش و پایین بودن ظرفیت هضم به‌دلیل عدم تکوین لارو آبزیان پس از تخم‌گشایی و به‌علاوه نبود دانش کافی از این دو عامل در لارو بسیاری از آبزیان پرورشی می‌باشد (Munilla-Moran و همکاران، ۱۹۹۰؛ Lauf و Hoffer، ۱۹۸۴). در این خصوص تاکنون مطالعات بسیاری در زمینه ماهیان استخوانی و بالاخص در سال‌های اخیر در مورد ماهیان دریایی انجام شده است که منجر به کاهش قابل توجه استفاده از غذای زنده که بخش بزرگی از هزینه‌های دوران لاروی را شامل می‌شود و نیز فرمول‌بندی غذاهای مناسب با توجه به ظرفیت هضمی آبزی مورد پرورش شده است، با این وجود مطالعات بسیار کمی در خصوص لارو ماهیان خاویاری انجام شده است (Agh و همکاران، ۲۰۱۱؛ Noori و همکاران، ۲۰۱۱؛ Gisbert و Doroshov، ۲۰۰۶؛ Bardi و همکاران، ۱۹۹۸؛ Dabrowski و همکاران، ۱۹۸۵؛ Buddington و Doroshov، ۱۹۸۴) و با توجه به صنعت روبه رشد پرورش این ماهیان، لزوم مطالعات بیش‌تر در این خصوص و شناخت ظرفیت هضمی از طریق بررسی آنزیم‌های گوارشی در دوران لاروی ضروری به‌نظر می‌رسد.

تحقیقات متعددی در رابطه با تاثیر دوره نوری یا شدت نور بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی آبزیان صورت گرفته است ولی تاکنون مطالعه‌ای درخصوص تاثیر توأم این دو پارامتر بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی در مرحله لاروی تاس‌ماهی ایرانی صورت نگرفته است. نقش موثر آنزیم‌های گوارشی در هضم لایه کوریون جنینی طی فرآیند تفریخ اثبات شده است (Dettlaff و همکاران، ۱۹۹۳). وجود آنزیم‌های گوارشی در مراحل آغازین لاروی، در بسیاری از گونه‌های ماهیان دریایی و آب شیرین (Zambonino-Infante و همکاران، ۲۰۰۹؛ Rønnestad و Morais، ۲۰۰۷) و ماهیان خاویاری (Babaei و همکاران، ۲۰۱۱؛ Noori و همکاران، ۲۰۱۱) گزارش شده است. نتایج تحقیق Asgari و همکاران (۲۰۱۳) در فیل‌ماهی (*Huso huso*) نشان داد تمامی آنزیم‌های گوارشی بلافاصله پس از تفریخ قابل مشاهده می‌باشد که این نشان می‌دهد ترشح این آنزیم‌ها در روزهای ابتدایی تکوین تحت تاثیر تغذیه نیست (Lazo و همکاران، ۲۰۰۰) بلکه به‌وسیله فرآیندهای ژنتیکی تنظیم می‌شوند (Zambonino-Infante و Cahu، ۲۰۰۱). در تحقیق حاضر نیز فعالیت تمامی آنزیم‌های گوارشی در گروه کنترل و تیمارهای تحت دوره نوری و شدت نور مختلف در نخستین روز بعد از تفریخ مشاهده گردید. Nazemroaya و همکاران (۲۰۱۵) فعالیت تمامی آنزیم‌های گوارشی به‌جز پپسین را بلافاصله بعد از تفریخ در لاروهای صبیتی (*Sparidentex hasta*) مشاهده کردند که اهمیت این آنزیم‌ها را در رشد و تکامل لاروی نشان می‌دهد که با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد ولی برخلاف نتایج آن‌ها، در این تحقیق فعالیت پپسین بلافاصله بعد از تفریخ مشاهده شد. طی مراحل لاروی، هضم پروتئین اساساً به‌واسطه فعالیت آلکالین پروتئازهایی نظیر تریپسین و کیموتریپسین در ترکیب با پپتیدازهای سیتوزولی روده صورت می‌گیرد (Zambonino-Infante و Cahu، ۲۰۰۱). تحقیقات نشان داده است که این دو آنزیم پروتئازی در تاس‌ماهی ایرانی (Babaei و همکاران، ۲۰۱۱)، فیل‌ماهی (Asgari و همکاران، ۲۰۱۱)، ماهیان دریایی و آب شیرین در مرحله تفریخ مشاهده شدند (Pradhan و همکاران، ۲۰۱۳؛ Darias و همکاران، ۲۰۰۷؛ Srivastava و همکاران، ۲۰۰۲) که موافقِ نتایج مطالعه حاضر می‌باشد. در تحقیق حاضر، فعالیت تریپسین و کیموتریپسین در لاروهای تازه تفریخ شدهٔ تاس‌ماهی ایرانی (*A. persicus*)، مشاهده شد که نشان‌دهندهٔ نقش مهم این آنزیم‌ها در طول دوره اندام‌زایی و تکامل اولیه لاروی می‌باشد. این دو آنزیم ممکن است در هضم پروتئین‌های زرده و غذاهای زنده (Gisbert و همکاران، ۲۰۰۹) نقش داشته باشند. از این‌رو، فعالیت این دو آنزیم پانکراسی طی مراحل اولیه لاروی، نقش گوارشی مهم‌شان را در ماهیان استخوان غضروفی تایید می‌کند، چنان‌که در ماهیان استخوانی پیشرفته نیز گزارش شده است (Zambonino-Infante و Cahu، ۲۰۰۱). تغییر تدریجی هضم قلیایی (تریپسین و کیموتریپسین) به هضم اسیدی (پپسین) با افزایش سن لارو نشانهٔ تکامل تدریجی دستگاه گوارش و قابلیت هضم برون سلولی پروتئین‌ها می‌باشد (Segner و همکاران، ۱۹۹۴). در مطالعه حاضر، فعالیت پپسین بلافاصله پس از تفریخ مشاهده شد و با افزایش سن روند صعودی داشت که با تحقیقات Asgari و همکاران (۲۰۱۳) مطابقت دارد که وجود این آنزیم را بلافاصله بعد از تفریخ برای اولین‌بار در ماهیان خاویاری گزارش کردند، ولی با سایر مطالعات پیشین هم‌خوانی ندارد (Babaie و همکاران، ۲۰۱۱؛ Gisbert و همکاران، ۲۰۰۹؛ Buddington، ۱۹۸۵)، اگرچه وجود فعالیت آنزیم پپسین بلافاصله پس از تفریخ در سایر ماهیان استخوانی مانند ماهی آزاد دریای خزر نیز گزارش شده است (Zamani et *al.*, 2009). در مطالعه‌ای دیگر، Cara و همکاران (۲۰۰۳) فقدان پپسین در دستگاه گوارش ماهیان استخوانی طی مراحل اولیه لاروی را به‌وجود هضم میکروپینوسیتوزی و درون سلولی در بخش خلفی روده نسبت داده‌اند که در تضاد با نتایج تحقیق حاضر می‌باشد زیرا در این تحقیق وجود فعالیت پپسین در ابتدای دوره لاروی و بلافاصله بعد از تفریخ و به‌وضوح مشاهده شد. نتایج تحقیق حاضر حاکی از وجود فعالیت قابل ملاحظهٔ آمیلاز

بلافاصله بعد از تفریخ می‌باشد که تا روز نهم مقدار آن به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد که می‌تواند در نتیجه بیان برنامه‌ریزی شده ژن باشد که توسط Zambonino-Infate و Cahu (۲۰۰۱) بیان شد. مطالعات انجام شده تاکنون نشان می‌دهد میزان آنزیم آمیلاز در دوران جذب کیسه زرده بسیار کم و بلافاصله پس از آغاز تغذیه خارجی به‌سرعت در لارو ماهیان افزایش می‌یابد (Lazo و همکاران، ۲۰۰۷؛ Ma و همکاران، ۲۰۰۵؛ Zółtowska و همکاران، ۱۹۹۹؛ Kuzmina و Gelman، ۱۹۹۸) که در تطابق با نتایج تحقیق حاضر می‌باشد. نتیجه مشابه مطالعه حاضر در لارو قره‌برون گزارش شده است که میزان آنزیم آمیلاز از زمان تفریخ شروع به افزایش کرد که وجود ذخایر بسیار بالای گلیکوژن در زرده ماهیان خاویاری دلیل افزایش میزان این آنزیم در طی دوران تغذیه داخلی بیان شده است (Babaei و همکاران، ۲۰۱۱). اگرچه تاکنون گزارشات زیادی درخصوص درک چگونگی هضم و جذب چربی‌ها در بچه‌ماهی و ماهیان بالغ گونه‌های بسیار زیادی از آبزیان وجود دارد ولی مطالعات درخصوص این فرآیند در دوران لاروی بسیار اندک است (Zambonino-Infante و Cahu، ۲۰۰۱). در تحقیق حاضر، فعالیت آنزیم لیپاز بلافاصله بعد از تفریخ مشاهده شد و علاوه بر این، نتایج نشان داد که در مرحله لاروی تنها زمان اثر معنی‌داری بر فعالیت این آنزیم داشته و اثر دوره نوری و شدت نور بر فعالیت این آنزیم قابل توجه نبوده است.

Ahumad-Hernández و همکاران (۲۰۱۴) فعالیت لیپاز را از نخستین روز بعد از تفریخ مشاهده کردند و سپس نوسان و کاهش این آنزیم را مشاهده کردند و علت این نوسانات را به تغییرات جیره (Jiménez-Martínez و همکاران، ۲۰۱۲) نسبت دادند. هم‌چنین، فعالیت اولیه لیپاز در لارو و Eleuthero-embryos برخی گونه‌های ماهیان دریایی توسط بعضی محققین گزارش شده است (Alvarez-González و همکاران، ۲۰۰۸؛ Oozeki و Bailey، ۱۹۹۵). فرآیند نهایی هضم پروتئین‌ها توسط آنزیم‌های روده‌ای نظیر پپتیدازها (سیتوپلاسم سلول‌های آنتروسیت روده)، آمینوپپتیداز (غشای لبه برسی روده) که هر دو هضم درون سلولی را انجام می‌دهند و آلکالین فسفاتاز (داخل مجرای روده) که هضم برون سلولی را انجام می‌دهد، صورت می‌پذیرد. میزان این آنزیم‌ها نشانه اصلی تکامل روده و در نهایت ظرفیت هضمی در لارو آبزیان است (Zambonino-Infante و Cahu، ۲۰۰۱). در ابتدا آنزیم‌های پپتیداز و در ادامه آمینوپپتیدازها و در نهایت آلکالین فسفاتاز شروع به فعالیت می‌کنند که این روند تغییرات، در بین مهره‌داران کاملاً شبیه یکدیگر می‌باشد (Henning، ۱۹۸۷). سنجش حداکثر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز نشان‌دهنده بلوغ دستگاه گوارش و قابلیت استفاده از غذای خارجی می‌باشد (Babaie و همکاران، ۲۰۱۱). در مطالعه حاضر، میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز بلافاصله پس از تفریخ به‌طور ناگهانی شروع به افزایش کرد و اختلاف معنی‌داری بین فعالیت آن در کنترل مثبت (تاریکی) با بسیاری از تیمارها از جمله تیمارهای ۱، ۳، ۴ و ۶ مشاهده شد که به‌طور قابل توجهی کم‌تر از کنترل مثبت بود. این روند افزایشی در مرحله لاروی ادامه یافت تا این‌که در نهمین روز بعد از تفریخ فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در تیمارهای تحت مطالعه بیش‌تر از کنترل مثبت و منفی بود. این مسأله نشان می‌دهد در روزهای اولیه فرآیند هضم در روده، توسط سلول‌های آنتروسیت غشای روده و داخل سلولی انجام می‌شود و به مرور زمان در روزهای بعدی افزایش میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز نشان‌دهنده تکامل روده و تغییر فرآیند هضم از داخل سلولی به خارج سلولی (Holt، ۲۰۱۱) و در نهایت تکامل روده در لارو تاس‌ماهی ایرانی در زمان آغاز تغذیه خارجی می‌باشد. براساس تحقیق Lojda و همکاران (۱۹۷۹)، آلکالین فسفاتاز اصولاً در غشاء سلولی یافت می‌شود که انتقال فعال در آن رخ می‌دهد و افزایش آن در روده لاروها نشان‌دهنده توسعه عملکرد آنتروسیت‌ها می‌باشد. فعالیت آلکالین فسفاتاز طی توسعه لاروی در ماهیان مختلف مشاهده شده است (Zamani و همکاران، ۲۰۰۹؛ Alvarez-Gonzalez و همکاران، ۲۰۰۸؛ Suzer و همکاران، ۲۰۰۷؛ Cara و همکاران، ۲۰۰۳) که در تحقیق حاضر نیز نتایج مشابه مشاهده شد. تحقیقات Gisbert و همکاران (۲۰۰۹) نشان داد با افزایش سن، فعالیت آنزیم‌های غشای نوار مسواکی افزایش می‌یابد که این ویژگی بلوغ نرمال آنتروسیت‌های روده‌ای و شکل‌گیری غشای نوار مسواکی کارآمد در لارو ماهی است. در مطالعه حاضر نیز با افزایش سن، فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز به‌طور معنی‌داری افزایش یافت که در تایید نتایج سایر محققین می‌باشد. Bolasina و همکاران (۲۰۰۶) با مطالعه آنزیم‌های گوارشی طی مراحل آنتوژنتیک کفشک ژاپنی تحت دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی، *Paralichthys olivaceus*، آغاز فعالیت این آنزیم‌ها را از دومین روز بعد از تفریخ مشاهده کردند در حالی‌که در مطالعه‌ای دیگر، فعالیت آنزیم‌های دخیل در هضم پروتئین، کربوهیدرات و لیپید در لاروهای *common dentex* در زمان تفریخ و قبل از شروع تغذیه خارجی مشاهده شد (Gisbert و همکاران، ۲۰۰۸) که با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی داشت. Suzer و همکاران (۲۰۰۶) تاثیر شدت‌های نوری مختلف (۱۰، ۳۰ و ۱۰۰ لوکس) را بر رشد لاروی و فعالیت آنزیم‌های گوارشی (آمیلاز، لیپاز و پروتئاز) *Pagellus erythrinus* مورد مطالعه قرار دادند و بهترین فعالیت این آنزیم‌ها را در شدت نوری ۳۰ لوکس مشاهده کردند که با نتایج تحقیق حاضر مغایرت دارد. این محققین علت این پدیده را به شرایط نگه‌داری بهینه تامین شده در این شدت نور برای لاروها بیان کردند. اما علت این اختلاف می‌تواند به گونه مورد مطالعه نسبت داده شود زیرا ممکن است نیازهای گونه‌های مختلف (شرایط نگه‌داری) برای رشد، آغاز فعالیت آنزیم‌های گوارشی و میزان ترشح این آنزیم‌ها متفاوت باشد. Shan و همکاران (۲۰۰۸)

فعالیت آنزیم لیپاز، آمیلاز و تریپسین در لاروهای miiuy croaker تحت دوره‌نوری‌های مختلف (۰L:۲۴D، ۱۲L:۱۲D، ۱۸L:۶D و ۲۴L) از روز ۲ بعد از تفریخ تا روز ۵۳ بررسی کردند و به این نتیجه دست‌یافتند که فعالیت آنزیم لیپاز در دوره نوری‌های ۱۸L:۶D و ۲۴L نسبت به ۱۲L:۱۲D بالاترین فعالیت را داشته که مغایر با نتایج تحقیق حاضر می‌باشد که دوره نوری تاثیر معنی‌داری بر فعالیت لیپاز نداشته است. به‌علاوه این محققین بیان کردند دوره‌نوری اثر معنی‌داری بر فعالیت آمیلاز و تریپسین نداشته که عکس نتایج این مطالعه است. در تحقیق حاضر فعالیت اکثر آنزیم‌های گوارشی تحت دوره نوری ۱۲ ساعت مشاهده شده که در تضاد با مطالعات Shan و همکاران (۲۰۰۸) می‌باشد که رژیم نوری بهینه طی دوره لاروی را ۱۸ ساعت روشنایی بیان کردند. این نشان می‌دهد که لارو تاس‌ماهیان ایرانی همانند سایر گونه‌های ماهیان مثل شگ ماهیان (*Clupea harengus*) (Pedersen و همکاران، ۱۹۸۷)؛ سی‌باس (Cahu و Zambonino-Infante، ۱۹۹۴)؛ هالیبوت کالیفرنیا (Alvarez-González و همکاران، ۲۰۰۶) و دم زرد (*Seriola lalandi*) (Chen و همکاران، ۲۰۰۶)، دارای مکانیسم ژنتیکی برنامه‌ریزی شده‌ای هستند که می‌تواند آنزیم‌های گوارشی را حتی بدون تحریک غذایی سنتز کند. یگانه و همکاران (۱۳۹۳) با مطالعه تاثیر دوره نوری مختلف (۱۴L:۱۰D، ۱۰L:۱۴D، ۴L:۲۰D و ۲۴L بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی پپسین و آلکالین فسفاتاز در لارو قزل‌آلا دریافتند که دوره‌نوری اثر معنی‌داری بر فعالیت اختصاصی آنزیم پپسین می‌گذارد ولی تاثیری بر فعالیت آلکالین فسفاتاز ندارد که در مورد اول با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. به‌علاوه، بیش‌ترین فعالیت آنزیم‌های گوارشی را در دوره نوری طولانی‌تر بیان کردند که در تطابق با نتایج این تحقیق می‌باشد. هم‌چنین نوری و همکاران (۱۳۹۴) فعالیت آنزیم‌های گوارشی لارو ماهی شیپ تحت دوره‌های مختلف روشنایی و تاریکی شامل ۰۰L:۲۴D، ۱۸ D:۰۶L، ۱۲L:۱۲D، ۰۶L:۱۸ D، ۱۸ L:۰۶D، ۰۰D:۲۴L و شدت نور ثابت ۲۰۰ لوکس مورد مطالعه قرار دادند و مشاهده کردند شاخص رشد لاروها در دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی در مقایسه با سایر گروه‌های آزمایشی بالاتر بوده است که می‌توان علت این امر را افزایش کارایی آنزیم‌های گوارشی در این شرایط نسبت داد که با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که دوره روشنایی- تاریکی با دوره نوری و شدت نور متوسط در سرعت تکامل دستگاه گوارش قبل از تغذیه فعال نقش مهمی ایفا می‌کند.

منابع

۱. **کهنه‌شهری، م. و تاکامی، م.، ۱۳۵۳.** تکثیر مصنوعی و پرورش ماهیان خاویاری. انتشارات دانشگاه تهران. ۲۹۶ صفحه.

۲. **نوری، ف.؛ بهمنی، م. و پورعلی ح.ر.، ۱۳۹۴.** گزارش نهایی طرح تاثیر دوره‌های نوری بر شاخص‌های رشد و آنتوژنی آنزیم‌های گوارشی تاس‌ماهی شیپ. دانشگاه ارومیه، پژوهشکده آرتمیا و آبزی‌پروری.

۳. **یگانه، س.؛ رمضان‌زاده، ف.؛ جانی‌خلیلی، خ. و بابایی، س.ص.، ۱۳۹۳.** بررسی اثرات طول دوره نوری بر فعالیت برخی آنزیم‌های گوارشی معده‌ای و روده‌ای در لارو و نوجوان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، مجله علمی شیلات. سال ۲۳، شماره ۲.

۴. **Agh, N.; Noori, F.; Irani, A.; Van Stappen G. and Sorgeloos, P., 2011.** Fine tuning of feeding practices for hatchery produced Persian sturgeon, Acipenser persicus and Beluga sturgeon, *Huso huso*. Aquaculture Research. pp: 1-10.

۵. **Asgari, R.; Rafiee, Gh.; Eagderi, S.; Noori, F.; Agh, N.; Poorbagher, H. and Gisbert, E., 2013.** Ontogeny of the digestive enzyme activities in hatchery produced Beluga (*Huso huso*). Aquaculture. pp: 416-417, 33-40.

۶. **Ahumad-Hernández, R.I.; Alvarez-González, C.A.; Guerrero-Zárate, R.; Martínez-García, R.; Camarillo Coop, S.; Sánchez-Zamora, A.; Gaxiola-Cortes, M.G.; Palomino-Albarrán, I.G.; Tovar-Ramírez, D. and Gisbert, E., 2014.** Changes of digestive enzymatic activity on yellowtail snapper during initial ontogeny. International Journal of Biology. Vol. 6, No. 4, pp: 110-118.

۷. **Alvarez-González, C.A.; Cervantes-Trujano, M.; Tovar Ramírez, D.; Conklin, D.E.; Nolasco, H.; Gisbert, E. and Piedrahita, R., 2006.** Development of digestive enzymes in California halibut Paralichthys californicus larvae. Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 31, pp: 83-93.

۸. **Alvarez-González, C.A.; Moyano-López, F. J.; Civera Cercedo, R.; Carrasco-Chávez, V.; Ortiz-Galindo, J. and Dumas, S., 2008.** Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted and bass (*Palabrax maculatofasciatus*). I: Biochemical analysis. Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 34, pp: 373-384.

۹. **Bardi, R.W.; Chapman, F.A. and Barrows, F.T., 1998.** Feeding trials with hatchery-produced Gulf of Mexico sturgeon larvae. The Program Fish Culture. Vol. 60, pp: 25-31.

۱۰. **Babaei, S.S.; Abedian Kenari, A.; Rajabmohammad Nazari, R. M. and Gisbert, E., 2011.** Developmental changes of digestive enzymes in Persian sturgeon during larval ontogeny. Aquaculture. Vol. 318, pp: 138-144

۱۱. **Biswas, A.K. and Takeuchi, T., 2003.** Effects of photoperiod and feeding interval on food intake and growth of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. Fisheries Science. Vol. 69, pp: 1010-1016.

۱۲. **Biswas, A.K.; Seoka, M.; Inoue, Y.; Takii, K. and Kumai, H., 2005.** Photoperiod influences the growth, food intake, feed efficiency and digestibility of red sea bream (*Pagrus major*). Aquaculture. Vol. 250, pp: 666-673.

۱۳. **Bolasina, S.; Perez, A. and Yamashita, Y., 2006.** Digestive enzymes activity during ontogenetic development and effect of starvation in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture. Vol. 252, No. 2-4, pp: 503-515.

۱۴. **Boeuf, G. and Bail, P.Y., 1999.** Does light have an influence on fish growth? Aquaculture. Vol. 177, pp:129-152.

۱۵. **Buddington, R.K. and Doroshov, S.I., 1984.** Feeding trials with hatchery produced white sturgeon juveniles (*Acipenser transmontanus*). Aquaculture. Vol. 36, pp: 237-243.

۱۶. **Buddington, R.K., 1985.** Digestive secretions of lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, during early development. Journal of Fish Biology. Vol. 26, pp: 715-723.

۱۷. **Bradford, M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. Vol. 72, pp: 248-254.

۱۸. **Cahu, C. and Zambonino-Infante, J.L., 1997.** Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for a compound diet feeding? Aquacul Intern. Vol. 5, pp: 151-160.

۱۹. **Cahu, C.; Rønnestad, I.; Grangier, V. and Zambonino Infante, J.L., 2004.** Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae in relation to intact and hydrolyzed dietary protein; involvement of cholecystokinin. Aquaculture. Vol. 238, pp: 295-308.

۲۰. **Cara, J. B.; Moyano, F. J.; Cardenas, S.; Fernandez-Diaz, C. and Yuffera, M., 2003.** Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. Journal of Fish Biology. Vol. 63, pp: 48-58.

۲۱. **Chen, B.N.; Qin, J.G.; Kumar, M.S.; Hutchinson, W.G. and Clarke, S.M., 2006.** Ontogenetic development of digestive enzymes in yellowtail kingfish, *Seriola lalandi*, larvae. Aquaculture. Vol. 260, pp: 264-271.

۲۲. **Chong, A.S.C.; Hashim, R.' Lee, C.Y. and Ali, B.A., 2002.** Partial characterization and activities of proteases form the digestive tract of discus fish. Aquacul. Vol. 203, pp: 321-333.

۲۳. **Darias, M.J.; Murray, H.M.; Gallant, J.W.; Douglas, S.E.; Yúfera, M. and Martínez-Rodríguez, G., 2007.**

۴۹. **Nazemroaya, S.; Yazdanparast, R.; Nematollahi, M.A.; Farahmand, H. and Mirzadeh, Q., 2015.** Ontogenetic development of digestive enzymes in Sobaity sea bream Sparidentex hasta larvae under culture condition. Aquaculture. Vol. 448, pp: 545-551.

۵۰. **Noori, F.; Van Stappen, G. and Sorgeloos, P., 2011.** Preliminary study on the activity of protease enzymes in Persian sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1897) larvae in response to different diets: effects on growth and survival.

۵۱. **Pradhan, P.K.; Jena, J.; Mitra, G.; Sood, N. and Gisbert, E., 2013.** Ontogeny of digestive enzymes in butter catfish, Ompok bimaculatus, larvae. Aquacult. pp: 372-375, 62-69.

۵۲. **Pedersen, B.H.; Nilssen, E.M. and Hjelmeland, K., 1987.** Variation in the content of trypsin and trypsinogen in larval herring (*Clupea harengus*) digesting copepod nauplii. Marine Biology. Vol. 94, pp: 171-181.

۵۳. **Reynalte-Tataje, D.; Luz, R.K.; Meurer, S.; Zaniboni Filho, E. and Oliveria Nuñer, A.P., 2002.** Influence of photoperiod on the growth and survival of piranjuba post larvae *Brycon orbignyanus* (Osteichthyed, Characidae). Acta Scientiarum. Vol.n24, pp: 439-443.

۵۴. **Rønnestad, I. and Morais, S., 2007.** Digestion. In: Fin, RN, Kapoor, B.G.(Eds), Fish Larval Physiology. Enfield, Science Publishers. pp: 201-262.

۵۵. **Rungruangsak, K. and Utne, F., 1981.** Effect of different acidified wet feeds on protease activities in the digestive tract and on growth rate of rainbow trout. Aquaculture. Vol. 22, pp: 67-79.

۵۶. **Segner, H.; Storch, V.; Reinecke, M.; Kloas, W. and Hanke, W., 1994.** The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus*. Mar. Biol. Vol. 119, pp: 471-486.

۵۷. **Shan, X.; Xiao, Z.; Huang, W. and Dou, S., 2008.** Effects of photoperiod on growth, mortality and digestive enzymes in miiuy croaker larvae and juveniles. Aquaculture. Vol. 281, pp: 70-76.

۵۸. **Suzer, C.; Kamaci, H.O.; Oban, D.C. and Saka, S., 2007.** Digestive enzyme activity of the red porgy (*Pagrus pagrus*, L.) during larval development under culture conditions. Aquaculture Research. Vol. 38, pp: 1778-1785.

۵۹. **Srivastava, A.S.; Kurokawa, T. and Suzuki, T., 2002.** mRNA expression of pancreatic enzyme precursors and estimation of protein digestibility in first feeding larvae of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Comparative Biochemistry and Physiology. Vol. 132A, pp: 629-635.

۶۰. **Twining, S.S.; Alexander, P.A.; Huibregste, K. and Glick, D.M., 1983.** A pepsinogen from rainbow trout. Comparative Biochemistry Physiology. Vol. 75, pp: 109-112.

۶۱. **Trippel, E.A. and Neil, S.R.E., 2003.** Effects of photoperiod and light intensity on growth and activity of juvenile haddock. Aquaculture. Vol. 217, pp: 633-645.

۶۲. **Verreth, J. and 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. Aquacult. Society, Special publication. Ghent, Belgium.

۶۳. **Villamizar, N.; Blanco-Vives, B.; Migaud, H.; Davie, A.; Carboni, S. and Sánchez-Bázquez, F.J., 2011.** Effects of light during early larval development of some aquacultured teleosts: a review. Aquaculture. Vol. 315, pp: 86-94.

۶۴. **Yúfera, M, and Darias MJ., 2007** the onset of exogenous feeding in marine fish larvae. Aquaculture. Vol. 268, pp: 53-63.

۶۵. **Worthington, C., 1991.** Worthigton Enzyme Manual Related Biochemical Freehold. New Jersey Worthington, C. (1991). Worthigton Enzyme Manual Related Biochemical Freehold. New Jersey.

۶۶. **Walford, J. and Lam, T.J., 1993.** Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass larvae and juveniles. Aquaculture. Vol. 109, pp: 187-205.

۶۷. **Zambonino-Infante, J.L. and Cahu, C., 2001.** Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 130, pp: 477-487.

۶۸. **Zambonino-Infante, J.; Gisbert, E.; Sarasquete, C.; Navarro, I.; Gutiérrez, J. and Cahu, C.L., 2009.** Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. Feeding and Digestive Functions of Fish. Science Publishers, Inc, Enfield, USA. pp: 277-344.

۶۹. **Zambonino-Infante, J.L.and Cahu, C.,1994.** Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, larvae. Fish physiology & Biochemistry. Vol. 12, pp: 199-408.

۷۰. **Zamani, A.; Hajimoradloo, A.; Madani, R. and Farhangi, M., 2009.** Assessment of digestive enzymes activity during the fry development of the endangered Caspian brown trout *Salmo caspius*. Journal of Fish Biology. Vol. 75, pp: 932-937.

۷۱. **Zóltowska, K.; Kolman, R.; Lopienska, E. and Kolman, H., 1999.** Activity of digestive enzymes in Siberian sturgeon juveniles (*Acipenser baeri* Brandt), a preliminary study. Arch. Polish Fisheries. Vol. 7, pp: 201-211.

Ontogeny of pepsinogen and gastric proton pump expression in red porgy (*pagrus pagrus*): determination of stomach functionality. Aquaculture. Vol. 270, pp: 369-378.

۲۴. **Dabrowski, K.; Kaushik, S.J. and Fauconneau, B., 1985.** Rearing of sturgeon (*Acipencser baerii*) larvea. I. Feeding trial. Aquaculture. Vol. 47, pp: 185-192.

۲۵. **Dettlaff, T.A.; Ginsburg, A.S. and Schmalhausen, O.I., 1993.** Development of prelarvae. Sturgeon Fishes. Developmental Biology and Aquaculture. Springer-Verlag Ed, Berlin, Germany. pp: 155-221.

۲۶. **Kunz, Y.W., 2004.** Developmental biology of fishes. Springer, Dordrecht. 636 p.

۲۷. **Kuzmina, V.V., 1996.** Influence of age on digestive enzymes activity in some freshwater teleost. Aquaculture. Vol. 148, pp: 25-37.

۲۸. **Kuzmina, V.V. and Gelman, A.G., 1998.** Traits in the development of the digestive function in fish. Journal of Ichthyology. Vol. 39, No. 1, pp: 106-115.

۲۹. **El sayed, A.M. and kawanna, M., 2004.** Effects of photoperiod on the performance of farmed nile tilapia: I. Growth, feed utilization efficiency and survival of fry and fingerlings. Aquaculture. Vol. 231, pp: 393-402

۳۰. **Erlanger, B.; Kokowsky, N. and Cohen, W., 1961.** The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archive Biochemistry and Biophysics. Vol. 95, pp: 271-278.

۳۱. **Iijima, N.; Tanaka, S. and Ota, Y., 1998.** Purification and characterization of bile saltactivated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 18, pp: 59-69.

۳۲. **Furné, M.; García-Gallego, M.; Hidalgo, M.C.; Morales, A.E.; Domezain, A.; Domezain, J. and Sanz, A., 2008.** Effect of starvation and refeeding on digestive enzyme activities in sturgeon and trout. Comparative Biochemistry and Physiology. Vol. 149, pp: 420-425.

۳۳. **Gisbert, E. and Sarasquete, C., 2000.** Histochemical identification of the blackbrown pigment granules found in the alimentary canal of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) during the lecitotrophic stage. Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 22, pp: 349-354.

۳۴. **Gisbert, E. and Williot, P., 2002.** Advances in the larval rearing of Siberian sturgeon. Journal of Fish Biology. Vol. 60, pp: 1071-1092.

۳۵. **Gisbert, E. and Doroshov, S., 2006.** Allometric growth in green sturgeon larvae. J.Appl. Ichthyol. Vol. 22, pp: 202-207.

۳۶. **Gisbert, E.; Giménez, G.; Fernández, I.; Kotzamanis, Y. and Estévez, A., 2008.** Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. Aquaculture. pp: 484-628.

۳۷. **Gisbert, E.; Gimenez, G.; Fernández, I.; Kotzamanis, Y. and Estevez, A., 2009.** Development of digestive enzymes in common dentex Dentex dentex during early ontogeny. Aquaculture. Vol. 287, pp: 381-387.

۳۸. **Hart, P.R.; Hutchinson, W.G.J. and Purser, G., 1996.** Effects of photoperiod, temperature and salinity on hatchery reared larvae of the greenback flounder (*Rhombosolea tapirina* Günter, 1862). Aquaculture. Vol. 144, pp: 303-311.

۳۹. **Henning, S.J., 1987.** Functional development of the gastrointestinal tract, Physiology of the Gastrointestinal Tract, 2nd edition. Raven Press, New York. pp: 285-300.

۴۰. **Jiang, W.D.; Feng, L.; Liu, Y.; Jiang, J. and Zhou, X.Q., 2009.** Growth, digestive capacity and intestinal microflora of juvenile Jian carp fed graded levels of dietary inositol. Aquaculture Research. Vol. 40, pp: 955-962.

۴۱. **Jiménez-Martínez, L.D.; Alvarez-González, C.A; Tovar Ramírez, D.; Gaxiola, G.; Sanchez-Zamora, A.; Moyano, F.J. and Palomino-Albarrán, I.G., 2012.** Digestive enzyme activities during early ontogeny in Common snook. Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 38, pp: 441-454.

۴۲. **Lazo, J.P.; Holt, G.J. and Arnold, C.R., 2000.** Ontogeny of pancreatic enzymes in larval red drum *Sciaenops ocellatus*. Aquaculture Nutrition. Vol. 6, pp: 183-192.

۴۳. **Lazo, J.P.; Mendoza, R.; Holt, G.J.; Aguilera, C. and Arnold, C.R., 2007.** Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). Aquaculture. Vol. 265, pp: 194-205.

۴۴. **Lauf, M. and Hoffer, R., 1984.** Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. Aquaculture. Vol. 37, pp: 335-346.

۴۵. **Lojda, Z.; Gossrau, R. and Schiebler, T.H., 1979.** Enzyme histochemistry: A Laboratory. Manual. NewYork: Springer.

۴۶. **Ma, N.; Cai, L.; U, W.J.; Tan, H. and Cao, J.P., 2005.** Exogenous ethylene influences flower opening of cut roses by regulating the genes encoding ethylene biosynthesis enzymes. Science in China, Series C. Vol. 48, pp: 434-444.

۴۷. **Munilla-Moran, R.R.; Stark, J.R. and Barbour, A., 1990.** The Role of exogenous enzymes in digestion in cultured turbot larvae. Aquaculture. Vol. 88, pp: 117-350.

۴۸. **Moyano, F.J.; Diaz, M.; Alarcon, F.J. and Sarasquete, M.C., 1996.** Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream.