

**تأثیر سطوح مختلف پروتئین و چربی جیره بر شاخص های رشد، بیان ژن های درگیر در ایمنی (لایوزوزیم و فاکتور نکروز دهنده تومور-یک آلفا) و اشتها (گرلین) در گورخر ماهی (*Danio rerio*)**

فریده ریگی<sup>۱</sup>، محمد سوداگر<sup>۱</sup>، حامد پاک نژاد<sup>۱</sup>، سیامک یوسفی سیاهکلرودی<sup>۲</sup>

۱- گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، گلستان

۲- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا، ورامین، تهران

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۶/۲۹

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۳/۰۵

**چکیده**

مطالعه حاضر برای ارزیابی تأثیر سطوح مختلف پروتئین و چربی جیره بر بیان ژن های درگیر در ایمنی (لایوزوزیم و TNF- $1\alpha$ ) و اشتها (گرلین) در گورخر ماهی انجام شد. به این منظور ۹ جیره با سه سطح پروتئین (۲۵، ۳۰ و ۳۵٪) و سه سطح چربی (۴، ۸ و ۱۲٪) تهیه و ۱۳۵ قطعه بچه ماهی به صورت گروه های ۵ تایی با میانگین وزن بدن ( $\pm$  انحراف معیار)  $0.123 \pm 0.02$  گرم به طور تصادفی در ۲۷ آکواریم ۳۰ لیتری توزیع و ۳ بار در روز به مدت ۴ ماه تغذیه شدند. طرح آزمایش به صورت فاکتوریل بود و نتایج نشان داد با افزایش پروتئین جیره شاخص های رشد (وزن نهایی، افزایش وزن بدن، درصد افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی) و میزان بیان ژن های ایمنی و اشتها در تیمار ۳۵٪ پروتئین افزایش معنی داری داشت ( $p < 0.05$ ). شاخص های رشد و بیان ژن لایوزوزیم در تیمار ۱۲٪ چربی نسبت به دیگر تیمارها و بیان ژن گرلین در تیمار ۱۲٪ چربی نسبت به ۴٪ ( $p < 0.05$ ) و بیان ژن TNF- $1\alpha$  با افزایش سطوح چربی جیره افزایش یافت ( $p > 0.05$ ). اثر متقابل پروتئین و چربی نیز باعث افزایش شاخص های رشد و بیان ژن های ایمنی و گرلین شد ( $p < 0.05$ ). به طوری که بالاترین میزان رشد و بیان ژن در تمامی ژن های مورد بررسی در تیمار ۳۵٪ پروتئین و ۱۲٪ چربی مشاهده شد. یافته های تحقیق حاضر مشخص کرد که پروتئین و چربی جیره می توانند در بهبود عملکرد دستگاه ایمنی و اشتها در گورخر ماهی نقش داشته باشند.

**کلمات کلیدی:** گورخر ماهی، تغذیه، ایمنی، رشد.

نویسنده مسئول: sudagar.2015@gmail.com

چربی بهترین عملکرد رشد را در این ماهی نشان داد (نویریان و همکاران، ۱۳۸۶).

رشد در ماهیان و مهره داران عالی تا حد زیاد توسط هورمون هایی که ترشح آن ها با دسترسی به مواد غذایی در ارتباط است، کنترل می شود (Fox et al. 2010). در واقع، ترشح هورمون ها از غدد درون ریز به طور مستقیم توسط مصرف غذا فعال می شود و مواد غذایی ممکن است عملکرد غدد درون ریز را از راه اثر بر ساخت، ترشح و تبدیل هورمون ها تحت تأثیر قرار دهند (MacKenzie et al. 1998). هورمون گرلین نیز به عنوان پپتید معده ای-مغزی، یک لیگاند درون زاد برای رسپتور GHSR-a هورمون رشد است و سبب افزایش سیگنال های گرسنگی و در نتیجه، افزایش اشتها می شوند (Wren et al. 2001).

گورخر ماهی با نام علمی *Danio rerio* متعلق به خانواده Cyprinidae است (Spence et al. 2008). این ماهی از یک سو به علت رنگ بندی و خطوط زیبای روی بدن، شکل بدن و ارزش اقتصادی (Ghosh et al. 2017) و از سوی دیگر به دلیل اینکه در سال های اخیر به عنوان مدلی برای تجزیه و تحلیل سریع عملکرد ژن ها و فعالیت های زیست شناختی مولکول های آلی مطرح شده، دارای اهمیت خاص است (Zon and Peterson, 2005). همچنین، به علت شباهت های بالای ژنتیکی، فیزیولوژیک و فارماکولوژیک با انسان، برای تشخیص مواد طبیعی با توان بالقوه درمانی مختلف، بسیار مناسب به نظر می رسد. دلایل اولیه ای که سبب گسترش این مدل شده، عبارت اند از: اندازه کوچک نوزاد و جنین مورد آزمایش (۱ تا ۵ میلی متر بسته به مراحل رشد)، قدرت باروری بالای ماهی های بالغ (صدها بچه ماهی در یک بار جفتگیری طی یک هفته)، شفافیت جنین و نوزاد این ماهی (راحتی مشاهده اندام های داخلی ماهی زبرا) و سرعت رشد خارج رحمی (تمام مراحل رشد از تخم تک سلولی تا نوزاد در خارج از رحم صورت می گیرد)، که امکان ردگیری اثرات مختلف ترکیبات مورد آزمایش را امکان پذیر خواهد کرد. نکته کلیدی دیگر در بررسی مولکول های فعال با استفاده از نوزاد و جنین این ماهی، امکان افزودن ترکیبات به صورت غیراستریل به محیط رشد آنهاست که سرعت انجام روندهای غربالگری را افزایش می دهد (Crawford et al. 2008).

پرورش ماهیان زینتی را می توان یکی از پرسودترین صنایع در دهه های اخیر نام برد که به علت داشتن رنگ های درخشان، شکل و رفتارشان مانند جواهرات زنده اند. آن ها معمولاً آرام، کوچک و دارای رنگ های جذاب هستند؛ در گونه های مختلف دسته بندی شده اند و تجارت آن ها در آسیا و در سراسر جهان در حال رشد و توسعه است (Tissera, 2010; Mandal et al. 2012). یکی از عمده ترین مخاطراتی که پرورش دهندگان ماهی با آن مواجه هستند، کاهش میزان زنده ماندی با بروز برخی بیماری ها و آلودگی ها به خصوص در مراحل اولیه زندگی است. لذا تقویت و ارتقای دستگاه ایمنی و دفاعی بدن ماهیان در گونه های با ارزش و اقتصادی از اصلی ترین نیازهای پرورش دهندگان و مهم ترین رویکردهای محققان در این راستاست (Shalaby et al. 2006).

آبزی پروری موفق و پایدار، به فراهم کردن غذاهای مصنوعی که از لحاظ مواد مغذی متعادل و از لحاظ اقتصادی به صرفه باشند، وابسته است (Lee and Kim, 2005). توازن مناسب از درشت- و ریزمغذی ها از جمله اسیدهای آمینه، اسیدهای چرب غیراشباع، ویتامین ها، عناصر کمیاب و کوفاکتورهای آنزیمی نه تنها برای رشد، بلکه برای تکامل طبیعی و عملکرد دستگاه ایمنی نیز ضروری است، به طوری که با افزودن ۳ تا ۶٪ چربی به جیره گربه ماهی کانالی *Ictalurus punctatus* فعالیت لایوزیم سرم به طور معنی دار نسبت به گروه شاهد افزایش یافت (Yildirim-Aksoy et al. 2009). Rahimnejad و Lee (۲۰۱۴) نیز با بررسی تأثیر اسید آمینه ایزولوسین بر پاسخ ایمنی غیراختصاصی در ماهی کفشک (*Paralichthys olivaceus*) مشاهده کردند که افزودن ۲٪ از این اسید آمینه به جیره باعث افزایش ایمنی ذاتی شد. از سوی دیگر، پروتئین و چربی در رشد ماهی نیز نقش مهمی بر عهده دارد (محمودی و همکاران، ۱۳۹۲). نویریان و همکاران (۱۳۸۴) اثر سه سطح پروتئین (۲۵، ۳۰ و ۳۵٪) جیره را در بچه ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) ۲ گرمی مطالعه و مشاهده کردند که با افزایش سطح پروتئین تا ۳۵٪، میزان رشد افزایش یافت. در تحقیقی که بر روی ماهی سفید با جیره های حاوی ۴ سطح چربی (۳، ۶، ۹ و ۱۲٪) انجام شد، جیره با ۱۲٪

مخلوط حاصل اضافه شد و پس از عبور از چرخ گوشت با چشمه ۰/۵ میلی‌متر، به صورت رشته‌ای در آمدند. رشته‌های خارج شده روی سینی گسترده، و در دمای اتاق خشک شدند. غذاهای ساخته شده تا زمان مصرف در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای آگاهی از عملکرد جیره‌های غذایی و چگونگی رشد ماهیان، در طول دوره تحقیق هر ۱۵ روز یکبار ۱۰۰٪ بیوماس ماهیان با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم توزین شد. طول ماهیان با خط کش با دقت ۱ میلی‌متر اندازه‌گیری، و با توجه به نتایج حاصل از زیست‌سنجی هر یک از آکواریوم‌ها، غذای مورد نیاز هر آکواریوم محاسبه شد. این غذا برای دو هفته بعد تنظیم، و ماهیان روزانه به میزان ۱۰٪ وزن بدن، طی سه وعده غذایی (ساعات ۸، ۱۲ و ۱۶) با جیره‌های آزمایشی تغذیه شدند. در پایان آزمایش، شاخص‌های رشد اندازه‌گیری شد که در این راستا از رابطه‌های زیر استفاده شد (De Almeida Bicudo et al. 2009):

از آنجا که پروتئین و چربی، ترکیبات مهم جیره غذایی ماهیان به حساب می‌آیند و همچنین، درباره تاثیر تغذیه ماهیان با سطوح مختلف پروتئین و چربی بر بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی و اشتها ماهیان مطالعات اندکی وجود دارد، پژوهش حاضر با هدف تعیین تأثیر سطوح مختلف پروتئین و چربی جیره بر بیان ژن‌های درگیر در ایمنی [لایزوزیم و TNF-1 $\alpha$  (فاکتور نکروز دهنده تومور- یک آلفا)] و اشتها (گرلین) در گورخرماهی به عنوان یک گونه مدل طراحی و اجرا شد.

## مواد و روش‌ها

### ماهی

تحقیق حاضر به مدت ۴ ماه، در آزمایشگاه آبی‌پروری شهید فضل‌ی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان با تهیه ۱۳۵ قطعه بچه ماهی زبرا از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان زینتی شصت کلای شهرستان گرگان انجام شد. بچه ماهیان دوره سازش‌پذیری را به مدت ۲ هفته در دمای ۲۶-۲۸ درجه سانتی‌گراد و با pH در حد خنثی (۶/۸-۷/۵) گذراندند. طی دوره سازش بچه ماهیان با غذای تجاری (ساخت شرکت Biomar SAS، فرانسه) شامل ۴۷٪ پروتئین خام، ۱۴٪ چربی خام، ۳/۵٪ فیبر خام و ۹/۲٪ خاکستر) تغذیه و پس از پایان دوره سازش‌پذیری به صورت گروه‌های ۵ تایی با میانگین بیوماس ( $\pm$  انحراف معیار)  $0/02 \pm 1/23$  گرم در ۲۷ عدد آکواریوم ۳۰ لیتری که ۲۰ لیتر آبگیری شده بودند، نگهداری شدند.

### طراحی آزمایش و ساخت جیره غذایی

طرح آزمایش نیز به صورت فاکتوریل بوده است. در این پژوهش با استفاده از ترکیبات غذایی (جدول ۱)، ۹ جیره هم انرژی (۳۰۰۰ kcal/kg) با سطوح مختلف پروتئین خام (۳۰، ۳۵ و ۴۰٪) و چربی خام (۱۰، ۱۵ و ۲۰٪) (جدول ۱) با استفاده از نرم‌افزار<sup>۱</sup> UFFDA متعادل شد و بچه ماهیان در سه تکرار تغذیه شدند. برای ساختن جیره‌های آزمایشی ابتدا مواد اولیه آسیاب و به مدت ۱۵ دقیقه با یکدیگر ترکیب، سپس روغن به مخلوط، اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه دیگر با یکدیگر ترکیب و سپس مقداری آب (۵۰۰ میلی لیتر به ازای هر کیلوگرم)، به

<sup>1</sup> User Friendly Feed Formulation Done Again

میانگین وزن ابتدای دوره (گرم) - میانگین وزن انتهای دوره (گرم) = افزایش وزن بدن  
 (مقدار غذای خورده شده (گرم)) / (افزایش وزن بدن (گرم)) × ۱۰۰ = کارایی غذا  
 [زمان (تعداد روزهای دوره پرورش)] / (لگاریتم طبیعی میانگین وزن اولیه (گرم) - لگاریتم طبیعی میانگین وزن نهایی به (گرم)) × ۱۰۰ = نرخ رشد ویژه  
 افزایش وزن بدن (گرم) / مقدار غذای خورده شده (گرم) = ضریب تبدیل غذایی

ثانیه تکان داده شد. سپس، ۱۵ دقیقه روی یخ انکوبه شد و به نسبت ۱ به ۱ ایزوپروپانول به آن اضافه، و به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ با ۱۲۰۰۰ rpm قرار داده شدند. در این مرحله، در ته ویال پلت تشکیل شد. بعد، مایع داخل ویال تخلیه، و ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ اضافه شد. ویال ها پس از چرخاندن کوتاه مدت، در سانتریفیوژ به مدت ۸ دقیقه در ۷۵۰۰ rpm قرار گرفتند. پس از تخلیه مایع رویی و خشک شدن پلت ها در دمای اتاق، به ویال ها به میزان ۳۰ میکرولیتر آب تزریق اضافه و تا حل شدن کامل در دستگاه ترمومیکسر با دمای ۳۷ درجه قرار داده شدند. برای ارزیابی کیفی RNA کل از دستگاه الکتروفورز و ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. کمیته RNA از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific, ND-1000, USA) تعیین شد و پس از آن، تا زمان ساخت cDNA در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

### استخراج و ارزیابی کمی و کیفی RNA

۲۴ ساعت پیش از نمونه برداری غذادهی قطع شد. برای نمونه برداری ابتدا ماهیان با استفاده از پودر گل میخک (غلظت ۱ ppt) بیهوش و نمونه های روده پس از برداشت بلافاصله در ازت مایع قرار گرفت و تا زمان استخراج RNA در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. به منظور ارزیابی بیان ژن های لایروزیم و TNF-1α و گرلین، RNA کل از نمونه روده با ازت مایع همگن و با استفاده از کیت RNAX plus طبق دستورالعمل شرکت سازنده (سیناژن، ایران) استخراج شد. برای این منظور ۱ میلی لیتر محلول RNAX plus به نمونه ها اضافه شد. سپس مخلوط همگن و به مدت ۵ دقیقه روی یخ انکوبه شد و ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم افزوده شد. سپس، در سانتریفیوژ یخچال دار در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm قرار گرفتند. در ادامه، فاز شفاف تشکیل شده جدا، و به آرامی به مدت ۶۰

جدول ۱ ترکیبات اولیه (بر اساس درصد جیره) و جیره های آزمایشی مورد استفاده در این پژوهش.

جیره ها									
اقدام غذایی	جیره ۱	جیره ۲	جیره ۳	جیره ۴	جیره ۵	جیره ۶	جیره ۷	جیره ۸	جیره ۹
آرد گندم	۸/۱۴	۴۳/۸۹۲	۱۵/۹۰۷	۷/۵۸۸	۱۷/۷۸۸	۱۸/۹۳	۰/۰۵۵	۹/۱۴۴	۱۸/۲۴۳
آرد سویا	۲۵/۰۶۸	۱/۵۰۶	۶/۳۰۶	۳/۳۹۱	۹/۲۲	۸/۹۷	۰/۲۴	۲۳/۴۹۱	۱/۰۹۶
آرد ذرت	۱/۳۳۴	۴/۸۷۷	۰/۶۶۳	۱/۱۳	۱۱/۸۵۸	۴/۷۸۵	۰/۰۳۲	۶/۰۹۶	۰/۳۷۱
آرد جو	۱۸/۰۲۶	۲۳/۰۳	۲۴/۰۰۶	۶/۳۲۳	۱۳/۸۸۷	۶/۰۱۲	۰/۰۴۶	۱۳/۷۳۶	۱۷/۵۶۶
بذر کتان	۱۰/۵۱	۱/۹۰۳	۳۴/۰۶۷	۱۴/۵۶۹	۴/۸۵۵	۳۵/۹	۳۰/۵۱۶	۵/۳۷۹	۱۰/۷۴۴
پودر ماهی	۹/۹۱۵	۲۵/۲۶۲	۵/۳۹۱	۳۱/۹۵۴	۲۹/۱۶۳	۱۱/۹۳۲	۳۴/۴۱۲	۲۸/۸۵۴	۳۹/۷۵۲
روغن آفتابگردان	۰/۰۳۵	۰/۹۸۶	۰/۱۲۶	۰/۰۱۹	۱/۱۳۸	۰/۷۹۳	۰/۰۰۰۴	۱/۱۲۶	۱/۱۲۹
روغن ذرت	۰/۰۱۷	۲/۳۵۴	۸/۱۵۷	۰/۰۰۸	۱/۴۳۲	۶/۲۷۷	۰/۰۰۰۲	۰/۷۳۶	۲/۱۰۸
روغن کانولا	۰/۱۰۸	۰/۰۲	۰/۱۲۶	۰/۰۱۹	۰/۱۲۳	۰/۷۹۳	۰/۰۰۰۴	۰/۳۱۴	۰/۰۱۵
روغن ماهی	۰/۱۳۳	۰/۲۶۷	۰/۲۴۹	۰/۰۷۹	۰/۶۸۱	۰/۰۷	۰/۰۰۴	۰/۷۵۴	۳/۹۷۶
نشاسته	۲۱/۷۱۴	۱/۹۰۳	۰/۰۰۲	۲۹/۹۲	۴/۸۵۵	۰/۵۸۸	۲۹/۶۹۴	۵/۳۷۹	۰
لسیتین	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
مکمل معدنی <sup>۱</sup>	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
مکمل ویتامینی <sup>۲</sup>	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
منوکسیسم فسفات	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲
درصد پروتئین خام	۲۵	۲۵	۲۵	۳۰	۳۰	۳۰	۳۵	۳۵	۳۵
درصد چربی خام	۴	۸	۱۲	۴	۸	۱۲	۴	۸	۱۲
درصد کربوهیدرات خام	۵۶	۵۸	۵۰	۵۰	۴۳	۳۶	۳۶	۴۴	۲۹

۱- هر ۱۰۰۰ گرم پرمیکس معدنی حاوی: IU ۱۶۰۰۰۰۰ ویتامین A، IU ۴۰۰۰۰۰۰ ویتامین D3، ۳۰ گرم ویتامین E، ۱۰۰ گرم تیامین، ۸ گرم ریبوفلاوین، ۸ گرم پیریدوکسین، ۳ گرم اسیدفولیک، ۰/۰۱ گرم سیانوکوبالامین، ۱۰۰ گرم ویتامین C، ۱۰ گرم ویتامین K3، ۱۰ گرم بیوتین، ۲۰ گرم BHT و ۱۰۰ ویتامین اینوزیتول است.

۲- هر ۱۰۰۰ گرم پرمیکس ویتامینی حاوی: ۲۰ گرم آهن، ۶۰ گرم روی، ۴۰۰ میلی گرم سلنیوم، ۲۰۰ میلی گرم کبالت، ۲ گرم مس، ۴۰ گرم منگنز و ۴۰۰ میلی گرم ید است.

### سنتز cDNA

برای حذف هرگونه باقی مانده DNA ژنومی در نمونه‌های RNA، تیمار DNase انجام شد. سپس ساخت رشته اول cDNA بر اساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز (Fermentas-France) با استفاده از ۵ میکرولیتر RNA تیمار شده با DNase I (غلظت ۵۰۰ نانوگرم)، ۱ میکرولیتر آغازگر الیگو dt و ۵ میکرولیتر آب DEPC انجام شد. به این منظور لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس ۴ میکرولیتر بافر ۵X آنزیم نسخه‌بردار معکوس، ۲ میکرولیتر dNTP ۱۰ میکرومولار و ۲۰ واحد آنزیم RNase inhibitor و ۱/۵ میکرولیتر آب DEPC به مخلوط بالا اضافه شد. لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت. بلافاصله ۲۰۰ واحد آنزیم نسخه‌بردار معکوس به هر لوله اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد تا واکنش غیرفعال شود. سپس، cDNA سنتز شده تا شروع آزمایش‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

### طراحی پرایمر

طراحی پرایمر مناسب برای تکثیر اختصاصی محصولات PCR از روی الگوهای متفاوت، یکی از ملزومات مهم در انجام بیشتر آزمایش‌های Real-Time PCR محسوب می‌شود. پرایمرهای مورد نیاز برای ژن‌های مورد بررسی برای انجام qPCR، طبق توالی‌های موجود در مرکز ملی اطلاعات زیست فناوری (NCBI)<sup>۱</sup> طراحی شد (جدول ۲) و اندازه محصول PCR با توجه به پرایمرها و میزان اختصاصی عمل کردن پرایمر با کمک ژل آگارز یک درصد بررسی شد. برای هر جفت پرایمر طراحی شده منحنی استاندارد ترسیم، و بر اساس ضریب رگرسیون و EF تعیین شد. در این تحقیق، نرمال سازی بیان ژن‌های هدف با استفاده از ژن مرجع  $\beta$ -actin انجام شد.

<sup>۱</sup> National Center for Biotechnology Information

جدول ۲ مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش.

نام پرایمر	توالی (۵'-۳')	دمای اتصال (°C)	کاربرد
Ghrelin q-PCR Ghrelin q-PCR	ATGTTTCTGCTCCTGTGTGT GCTTCTCTTCTGCCACTCT	۵۹	سنجش کمی بیان ژن اشتها
lyz q-PCR lyz q-PCR	GGCAGTGGTGTTTTTGTGTC CGTAGTCCTTCCCCGTATCA	۵۹	بیان ژن لایزوزیم
TNF-1α q-PCR TNF-1α q-PCR	CTGCTTCACGCTCCATAAGA CTGGTCTGGTCATCTCTCC	۵۹	بیان ژن TNF-1α
β-actin q-PCR β-actin q-PCR	AGCAGATGTGGATCAGCAAG TACCTCCCTTGGCCAGTTTC	۵۹	ژن مرجع

مرحله‌ای که کمترین Ct را داشت، به‌عنوان کالیبراتور به منظور ارزیابی بیان نسبی ژن هدف استفاده شد. برای بررسی داده‌ها، ابتدا نرمال بودن آنها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. سپس برای بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها از آنالیز واریانس دو طرفه (Two-Way ANOVA) استفاده شد و در صورت معنی‌دار بودن، به کمک آزمون Tukey در سطح کمتر از ۵٪ مقایسات چندگانه انجام شد. آزمون‌ها در محیط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد.

### نتایج

#### شاخص‌های رشد

شاخص‌های وزن نهایی، افزایش وزن بدن، درصد افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی در تیمار ۳۵٪ پروتئین نسبت به تیمارهای ۲۵ و ۳۰٪ و در تیمار ۳۰٪ نسبت به ۲۵٪ به طور معنی‌دار بالاتر بود ( $p < 0.05$ ). با افزایش چربی جیره، افزایش معنی‌داری در وزن نهایی، افزایش وزن بدن و نرخ رشد ویژه در تیمار ۱۲٪ نسبت به ۸ و ۴٪؛ درصد افزایش وزن بدن در تیمار ۱۲٪ نسبت به ۴٪؛ ضریب تبدیل غذایی در تیمار ۱۲٪ نسبت به تیمار ۸ و ۴٪ و در تیمار ۸٪ نسبت به تیمار ۴٪ مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). اثر متقابل پروتئین و چربی نیز به طور معنی‌داری باعث افزایش شاخص‌های رشد شد ( $p < 0.05$ )، به طوری که بالاترین میزان رشد در تیمار ۳۵٪ پروتئین و ۱۲٪ چربی مشاهده شد ( $p < 0.05$ ) (جدول ۳).

#### انجام Real-time PCR (qRT-PCR)

واکنش qPCR با استفاده از دستگاه Real Time PCR (BioRAD، آمریکا) و با استفاده از کیت سایبرگرین (سایبر بیوپارس، ایران) و بر اساس دستورالعمل استاندارد در مرحله اول، واکنش qPCR به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و با ۴۰ چرخه در این دما در ۳۰ ثانیه انجام شد. در مرحله بعد دما به ۶۵ درجه سانتی‌گراد در مدت ۲۰ ثانیه کاهش یافت و پس از آن، ۴۰ ثانیه در دمای ۷۴ درجه سانتی‌گراد و در مرحله آخر، به مدت ۷ دقیقه در این دما نگه داشته شد. تمامی واکنش‌ها در سه تکرار (تکرار تکنیکی در دستگاه) انجام شد. از آنجا که در دمای ۵۹ درجه سانتی‌گراد محصول غیراختصاصی و دایمر مشاهده نشد، این دما به عنوان دمای واکنش در نظر گرفته شد.

#### آنالیز آماری

برای انجام Real Time تمامی مراحل زمانی ذکر شده ارزیابی و میزان بیان ژن در دستگاه به صورت Ct ثبت شد. منحنی استاندارد با استفاده از نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی cDNA، سری‌های رقیق‌سازی از ۱ به ۱۰ تا ۱ به ۲۰۰ رسم و بازدهی PCR با استفاده از رابطه Radonic et al.)  $E\% = (10^{1/\text{slope}} - 1) \times 100$  (2004) و تغییرات نسبی بیان ژن‌های هدف با دو بار مشتق‌گیری از ( $2^{\Delta\Delta Ct}$ ) محاسبه شد (Livak and Schmittgen, 2001). در بین زمان‌های مورد مطالعه

جدول ۳ مقایسه میانگین ( $\pm$  انحراف معیار) شاخص‌های رشد بچه ماهی زبرا نسبت به اثر متقابل سطوح پروتئین به چربی.

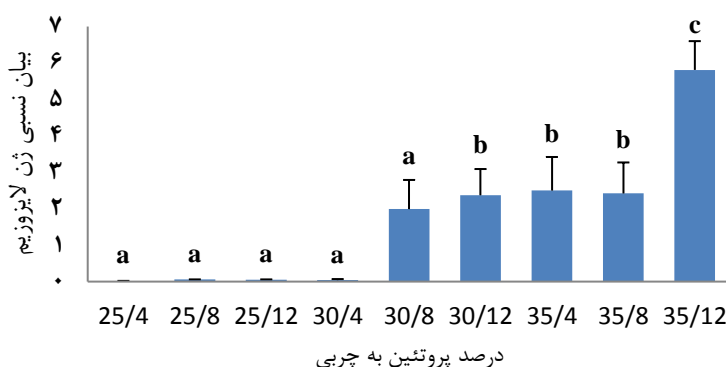
تیمارها	وزن اولیه (گرم)	وزن نهایی (گرم)	افزایش وزن بدن (گرم)	درصد افزایش وزن بدن (درصد)	نرخ رشد ویژه (درصد/روز)	ضریب تبدیل غذایی
۴/۲۵	$1/13 \pm 0/07$	$2/00 \pm 0/1^a$	$0/85 \pm 0/03^a$	$75/32 \pm 3/06^a$	$1/70 \pm 0/06^a$	$2/20 \pm 0/08^f$
۸/۲۵	$1/31 \pm 0/11$	$2/28 \pm 0/09^b$	$0/96 \pm 0/04^b$	$73/86 \pm 8/80^b$	$1/92 \pm 0/07^b$	$1/95 \pm 0/08^e$
۱۲/۲۵	$1/29 \pm 0/078$	$2/28 \pm 0/24^b$	$1/00 \pm 0/20^b$	$77/64 \pm 5/00^b$	$2/00 \pm 0/05^b$	$1/88 \pm 0/05^e$
۴/۳۰	$1/39 \pm 0/32$	$2/81 \pm 0/24^c$	$1/42 \pm 0/08^b$	$107/04 \pm 28/45^b$	$2/84 \pm 0/17^b$	$1/32 \pm 0/08^d$
۸/۳۰	$1/08 \pm 0/06$	$2/71 \pm 0/01^c$	$1/63 \pm 0/05^c$	$151/78 \pm 14/10^b$	$3/27 \pm 0/11^c$	$1/15 \pm 0/04^d$
۱۲/۳۰	$1/28 \pm 0/28$	$3/11 \pm 0/20^d$	$1/83 \pm 0/09^d$	$148/32 \pm 36/67^c$	$3/67 \pm 0/18^d$	$1/03 \pm 0/05^c$
۴/۳۵	$1/18 \pm 0/10$	$3/09 \pm 0/07^d$	$1/90 \pm 0/03^e$	$162/50 \pm 16/43^c$	$3/81 \pm 0/06^e$	$0/98 \pm 0/01^b$
۸/۳۵	$1/16 \pm 0/09$	$3/14 \pm 0/10^d$	$1/98 \pm 0/01^e$	$170/56 \pm 12/11^c$	$3/95 \pm 0/02^e$	$0/95 \pm 0/00^b$
۱۲/۳۵	$1/25 \pm 0/05$	$3/81 \pm 0/22^e$	$2/55 \pm 0/23^e$	$204/09 \pm 22/27^c$	$5/11 \pm 0/47^e$	$0/74 \pm 0/07^a$

در هر ستون حروف انگلیسی متفاوت نشانگر اختلاف معنی دار است ( $p < 0/05$ ).

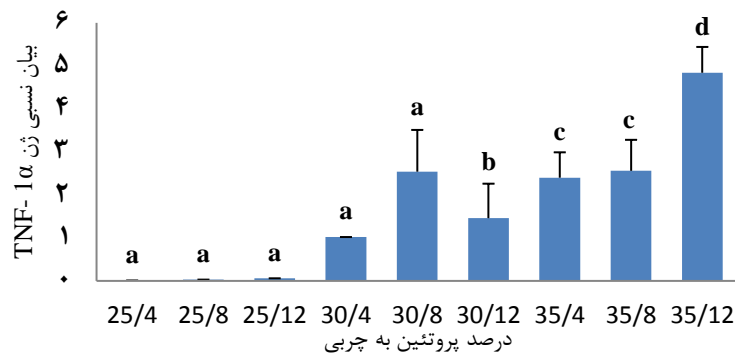
### بیان ژن

شد ( $p < 0/05$ )، به طوری که تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۲۵٪ پروتئین و ۴٪ چربی کمترین و تیمار ۳۵٪ پروتئین و ۱۲٪ چربی بیشترین میزان بیان این ژن‌ها را نشان دادند. یافته‌های این تحقیق مشخص کرد که پروتئین و چربی جیره می‌توانند در بهبود عملکرد دستگاه ایمنی و اشتها در گورخرماهی نقش داشته باشند.

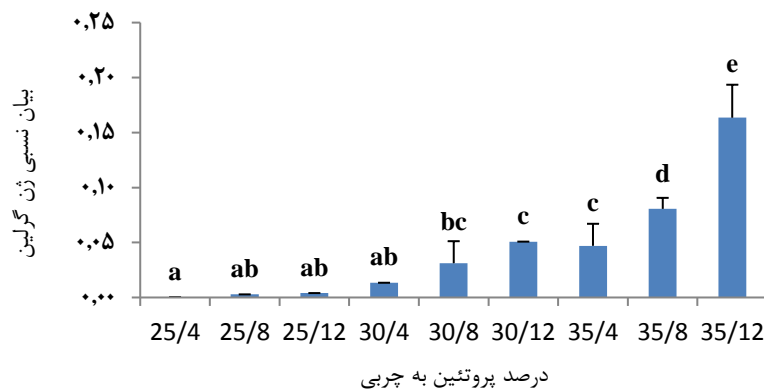
در این مطالعه با افزایش پروتئین میزان بیان ژن‌های ایمنی و اشتها در تیمار ۳۵٪ نسبت به تیمارهای ۲۵ و ۳۰٪ به طور معنی دار افزایش نشان داد ( $p < 0/05$ ). با افزایش چربی جیره، بیان  $TNF-1\alpha$  افزایش معنی دار نداشت ( $p > 0/05$ )، اما بیان ژن لایوزیم در تیمار ۱۲٪ نسبت به تیمارهای ۸ و ۴٪ و نیز بیان ژن گرلین در تیمار ۱۲٪ نسبت به ۴٪ به طور معنی دار افزایش یافت ( $p < 0/05$ ). اثر متقابل پروتئین و چربی نیز به طور معنی دار باعث افزایش بیان ژن‌های لایوزیم (شکل ۱)،  $TNF-1\alpha$  (شکل ۲) و همچنین، ژن گرلین (شکل ۳)



شکل ۱ بیان نسبی ژن لایوزیم تحت تأثیر سطوح مختلف پروتئین به چربی جیره در گورخرماهی.



شکل ۲ سطوح بیان ژن TNF-1α تحت تاثیر سطوح مختلف پروتئین به چربی جیره در گورخر ماهی.



شکل ۳ سطوح بیان ژن گرلین تحت تاثیر سطوح مختلف پروتئین به چربی جیره در گورخر ماهی.

استرولها و ویتامینهای محلول در چربی را که برای عملکرد مناسب فرآیندهای فیزیولوژیک و حفظ ساختار زیست‌شناختی و عملکرد غشاهای سلولی ضروری‌اند، را فراهم می‌کنند (Watanabe, 1982). کمیت و کیفیت آن‌ها در غذا می‌تواند با رشد، سوخت ساز لیپید، تغییرات بافت‌شناسی در کبد و روده و نیز مقاومت ماهی مرتبط باشد (Kalogeropoulos et al. 1992). بنابراین، تنظیم و افزایش کارایی دستگاه ایمنی در ماهیان از طریق دستکاری جیره‌های غذایی ابزاری قدرتمند و موثر جهت حفظ سلامت ماهی و کاهش تلفات است (قائدی و همکاران، ۱۳۹۳). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزایش پروتئین و چربی جیره و نیز اثر متقابل آن‌ها باعث افزایش شاخص‌های رشد و بیان ژن گرلین در گورخر ماهی می‌شود. گرلین هورمون اشتهاست که مهمترین عامل برای ترشح آن، تغذیه است، به طوری که غلظت پلاسمایی آن طی روزه‌داری و گرسنگی افزایش و با دریافت غذا کاهش می‌یابد (Kojima and Kangawa, 2004). در راستای نتایج این تحقیق، افشار مازندران (۱۳۸۱) بیان کرد که کمبود پروتئین سبب کاهش میزان

#### بحث

رشد بدن فرآیند زیست‌شناختی دقیق و کاملی است که حاصل اثر عوامل ژنتیک و هورمونی بوده و همچنین، به‌طور مشخص، وابسته به ترکیبات غذایی مورد استفاده موجودات است (Beckman, 2011). پروتئین گران‌ترین ماده تشکیل دهنده جیره ماهی بوده و در واقع یک ماده مغذی ضروری است که برای اطمینان از سلامتی و رشد سلولی باید به مقادیر کافی تأمین شود. پروتئین‌های رژیم غذایی منبع اسیدهای آمینه ضروری هستند و نیتروژن را برای سنتز اسیدهای آمینه غیرضروری فراهم می‌کنند (Craig and Helfrich, 2002). کمبود اسیدهای آمینه ضروری می‌تواند منجر به اختلال در رشد، کاهش وزن زنده و کاهش بازدهی جیره و همچنین، کاهش مقاومت در برابر بیماری‌ها و اختلال در مکانیسم‌های پاسخ ایمنی در ماهی شود. کمبود پروتئین در رژیم غذایی می‌تواند به کاهش فعالیت لایزوزیم و محتوای پروتئین C واکنش‌پذیر در ماهی شود (یوسفی و حسینی‌فر، ۱۳۹۵). چربی‌ها هم منبع مهم انرژی هستند و هم اسیدهای چرب ضروری، فسفولیپیدها،



همکاران (۲۰۰۹) نیز با افزودن ۳ تا ۶٪ چربی به جیره گربه ماهی آفریقایی (*Ictalurus punctatus*) افزایش معنی‌دار فعالیت لایزوزیم سرم را نسبت به گروه شاهد مشاهده کردند. در مطالعه‌ای دیگر در ماهی *Larmichthys crocea* تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر متوسط n-3 HUFA، میزان رشد، پاسخ ایمنی غیراختصاصی، بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی (TLR22 و MyD88) و مقاومت ماهی نسبت به آلودگی با انگل‌ها افزایش یافت و دلیل این امر این‌گونه تفسیر شد که n-3 HUFA جیره با تغییر سطوح بیان mRNA مربوط به این دو ژن، می‌تواند ایمنی و مقاومت به بیماری را تنظیم کند (Zuo et al. 2012).

در تحقیق حاضر اثر سطوح مختلف پروتئین و چربی جیره و نیز اثر متقابل آنها بر بیان ژن‌های درگیر در ایمنی و اشتها ارزیابی شد. داده‌های این تحقیق افزایش بیان ژن‌های لایزوزیم، TNF-1 $\alpha$  و گرلین در گورخر ماهی را با افزایش سطح پروتئین و چربی جیره نشان داد. به نظر می‌رسد جیره با ۳۵٪ پروتئین و ۱۲٪ چربی را برای افزایش سطح ایمنی و اشتها در این ماهی می‌توان استفاده کرد.

#### منابع

افشار مازندران، ن. ۱۳۸۱. راهنمای عملی تغذیه و نهاده‌های غذایی و دارویی آبزیان در ایران. انتشارات نوربخش ۲۱۶ ص.

سلیقه زاده، ر.، یاور، و.، موسوی، س.م.، ذاکری، م. ۱۳۹۴. اثر مکمل غذایی جلبک اسپرولینا (*Spirulina platensis*) بر شاخص‌های ایمنی کمپلمان ماهی بنی انگشت قد (*Mesopotamichthys sharpeyi*). بوم‌شناسی آبزیان ۵: ۴۴-۵۰.

غضنفری، ش. ۱۳۸۸. بررسی محدودیت غذایی و سطوح مختلف انرژی و پروتئین جیره بر عملکرد بیان ژن Ghrelin در جوجه‌های گوشتی. پایان‌نامه دکتری، دانشگاه فردوسی مشهد.

قائدی، ع.، حسین زاده صحافی، ه.، ضرغام، د. ۱۳۹۳. نقش تغذیه در افزایش کارایی سیستم ایمنی ماهیان. آبزیان زینتی ۱: ۲۱-۲۸.

محمودی، ز.، علاف نویریان، ح.، فلاحتکار، ب.، خوش خلق، م.ر. ۱۳۹۲. تاثیر سطوح مختلف پروتئین و

رشد و بازدهی غذایی، بی‌اشتهایی، کاهش تعادل ازت و غلظت پروتئین سرم خون، کم‌خونی، تجمع چربی در کبد و کاهش ساخت هورمون‌ها و آنزیم‌ها در بدن ماهی می‌شود. غضنفری (۱۳۸۸) نیز با بررسی تأثیر محدودیت غذایی و سطوح مختلف انرژی و پروتئین جیره بر عملکرد و بیان ژن گرلین در جوجه‌های گوشتی مشاهده کرد که با کاهش پروتئین جیره، بیان این ژن نیز کاهش می‌یابد. در تحقیقی دیگر، Schuchardt و همکاران (۲۰۰۸) با مطالعه بر روی ماهی خوراکی دندان‌دار قرمز (*Pagrus pagrus*) مشاهده کردند که میزان افزایش وزن بدن با افزایش چربی از ۱۰ به ۱۵٪ در جیره غذایی بهبود می‌یابد. Kim و همکاران (۲۰۱۲) نیز با بررسی تأثیر سطوح مختلف پروتئین (۳۰، ۴۰ و ۴۰٪) و چربی (۹ و ۱۷٪) جیره بر رشد و ترکیب بدن گربه ماهی شرقی دور (*Silurus asotus*) جوان بیشترین میزان رشد را در تیمارهای تغذیه شده با جیره حاوی ۴۰٪ پروتئین و ۱۷٪ چربی گزارش کردند. در مطالعه‌ای دیگر Chai و همکاران (۲۰۱۳) با بررسی تأثیر پروتئین (۳۶، ۴۰، ۴۴، ۴۸ و ۵۲٪) و چربی (۹ و ۱۵٪) جیره بر روی عملکرد رشد ماهی شوریده ژاپنی (*Nibea japonica*) مشاهده کردند که ماهیان تغذیه شده با جیره ۴۸٪ پروتئین و ۹٪ چربی بهترین رشد را از خود نشان دادند.

لایزوزیم در بسیاری از مهره داران وجود دارد و یکی از شاخص‌های دفاعی در برابر عوامل بیماری‌زاست که در ترشحات موکوسی، آبشش‌ها، بافت‌های کلیه، طحال، دستگاه گوارش و سرم خون یافت می‌شود (سلیقه زاده و همکاران، ۱۳۹۴؛ Iwama and Nakanishi, 1996). همچنین، در رابطه با التهابات، مولکول سایتوکینی فاکتور نکروز کننده تومور (TNF) نقش مهمی در ایمنی دارد. این مولکول به دنبال تحریک دستگاه ایمنی از گلبول‌های سفید ترشح می‌شود و علاوه بر خون، در کلیه نیز به میزان زیاد تجمع و ترشح دارد (Grayfer et al. 2008). در مطالعه حاضر، به خوبی نشان داده شد که بیان ژن‌های لایزوزیم و TNF-1 $\alpha$  تحت تأثیر افزایش سطوح پروتئین و چربی جیره و اثر متقابل آنها بوده است. هم‌راستا با نتایج بررسی حاضر، Chang و Huang (۲۰۱۵) گزارش کردند که میزان لایزوزیم در ماهی کپور آینه‌ای (*Cyprinus carpio*) با افزایش پروتئین جیره، به‌طور معنی‌دار افزایش می‌یابد. Yildirim-Aksoy و

- نویریان، ع.ح.، شعبانی پور، ن.، زمانی کیاسج محله، ح.ع.، خادم، ه. ۱۳۸۶. بررسی اثرات سطوح مختلف چربی بر روی معیارهای شاخص رشد بچه ماهی سفید جنوب دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*). پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان ۲۰: ۴۳-۳۵.
- یوسفی، س.، حسینی فر، س.ح. ۱۳۹۵. انتقال مادری ایمنی در ماهیان با تاکید بر ماهیان زینتی. آبزیان زینتی ۳: ۸-۵.
- Beckman, B.R. 2011. Perspectives on concordant and discordant relations between insulin-like growth factor 1 (IGF1) and growth in fishes. *General and Comparative Endocrinology* 170: 233-252.
- Chai, X.J., Ji, W.X., Han, H., Dai, Y.X., Wang, Y. 2013. Growth, feed utilization, body composition and swimming performance of giant croaker, *Nibea japonica* Temminck and Schlegel, fed at different dietary protein and lipid levels. *Aquaculture Nutrition* 19: 928-935.
- Craig, S., Helfrich, L.A. 2002. Understanding fish nutrition, and feeds and feeding Extension Specialists, Virginia-Maryland College of Veterinary Medicine, and Department of Fisheries and Wildlife Sciences, Virginia Tech, 420-256.
- Crawford, A.D., Esguerra, C.V, Witte, P.A.M. 2008. Fishing for drugs from nature: zebra fish as a technology platform for natural product discovery. *Planta Medica* 74: 624-632.
- De Almeida Bicudo, A.J., Sado, R.Y., Cyrino, J.E.P. 2009. Growth and haematology of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fed diets with varying protein to energy ratio. *Aquaculture Research* 40: 486-495.
- Fox, B.K., Breves, J.P., Davis, L.K., Pierce, A.L., Hirano. T., Grau, E.G. 2010. Tissue-specific regulation of the growth hormone/ insulin-like growth factor axis during fasting and refeeding: Importance of muscle expression of IGF-I and IGF-II Mrna in the tilapia. *General and Comparative Endocrinology* 166: 573-580
- چربی جیره بر عملکرد رشد بچه ماهی سفید دریای خزر ( *Rutilus frisii kutum* Kamensky, ) 1901). مجله علمی شیلات ایران ۲۲: ۱۱۶-۱۰۱.
- نویریان، ح.، مصطفی زاده، س.، طلوعی، م.ح. ۱۳۸۴. بررسی تاثیر سطوح مختلف پروتئین بر روی معیارهای شاخص رشد بچه ماهی (*Rutilus frisii kutum*). پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان ۱۸: ۶۸-۶۱.
- Ghosh, S. Sinha, A., Sahu, C. 2007. Effect of probiotic on reproductive performance in female live-bearing ornamental fish. *Aquaculture Research* 38: 518-526.
- Grayfer, L., Walsh, J.G., Belosevic, M. 2008. Characterization and functional analysis of goldfish tumor necrosis factor alfa. *Developmental and Comparative Immunology* 32: 532-543.
- Huang, j., Xu, Q., Chang, Y. 2015. Effect of temperature and dietary protein on gene expression of Hsp70 and Wap65 and immunity juvenile mirror carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Research* 46: 2776-2788.
- Iwama, G., Nakanishi, T. 1996. The Fish Immune System. Organism, Pathogen and Environment. Academic Press, 395 p.
- Kalogeropoulos., N. Alexis., M.N., Henderson, R.J. 1992. Effects of dietary soybean and cog liver oil levels on growth and body composition of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 104: 293-308.
- Kojima, M., Kangawa, K. 2004. Ghrelin: structure and function. *Physiological Reviews* 85: 495-512.
- Lee, S.M., Kim, K.M. 2005. Effect of various levels of lipid exchanged with dextrin at different protein level in diet on growth and body composition of juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Nutrition* 11: 435-442.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C}$  (T) Method. *Methods* 25: 402-408.

- MacKenzie, D.S., VanPutte, C.M., Leiner, K.A. 1998. Nutrient regulation of endocrine function in fish. *Aquaculture* 161: 3-25.
- Mandal, B., Mukherjee, A., Banerjee, S. 2010. Growth and pigmentation development efficiencies in fantail guppy (*Poecilia reticulata*) fed with commercially available feeds. *Agriculture, Agriculture and Biology* 1: 1264-1267.
- Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I.M., Landt, O., Siegert, W., Nitsche, A. 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313: 856-862.
- Rahimnejad, S., Lee, K.J. 2014. Dietary Isoleucine influences non-specific immune response in juvenile Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fisheries and Aquatic Sciences* 14: 853-862.
- Schuchardt, D., Vergara, J.M., Fernandez-Palacios, H., Kalinowski, C.T., Hernandez-Cruz, C.M., Izquierdo, M.S., Robaina, L. 2008. Effects of different dietary protein and lipid levels on growth, feed utilization and body composition of red porgy (*Pagrus pagrus*) fingerlings. *Aquaculture Nutrition* 14: 1-9.
- Shalaby, A.M., Khattab, Y.A., Abdel Rahman, A.M. 2006. Effects of (*Allium sativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 12: 172-201.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C. 2008. The behavior and ecology of the Zebra fish, *Danio rerio*. *Biological Reviews* 83: 13-34.
- Tissera, K. 2012. The Global Ornamental Fish Industry: An outlook on the First Decade of the New Millennium. International Conference on the Global Ornamental Fish Industry—Way Forward. February 2012, Cochin, Kerala, India.
- Watanabe, T. 1982. Lipid nutrition in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 73: 3-15.
- Wren, A.M., Small, C.J., Ward, H.L., Murphy, K.G., Dakin, C.L., Taheri, S., Kennedy, A.R., Roberts, G.H., Morgan, D.G., Ghatei, M.A., Bloom, S.R. 2001. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 141: 4325-4328.
- Yildirim-Aksoy, M., Lim, C., Shelby, R. H., Klesius, P.H. 2009. Increasing fish oil levels in commercial diets influences hematological and immunological responses of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 40: 76-86.
- Zon, L.I., Peterson, R.T. 2005. In vivo drug discovery in the Zebrafish. *Natural Review Drug Discovery* 4: 35-44.
- Zuo, R., Ai, Q., Mai, K., Xu, W., Wang, J., Xu, H., Liufu, Z., Zhang, Y. 2012. Effects of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids on growth, nonspecific immunity, expression of some immune related genes and disease resistance of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) following natural infestation of parasites (*Cryptocaryon irritans*). *Fish and Shellfish Immunology* 32: 249-258.

## Effects of different levels of dietary protein and lipid on expression of genes involved in immunity (lysozyme and TNF- 1 $\alpha$ ) and appetite (ghrelin) of Zebrafish, *Danio rerio*

Fareideh Riki<sup>1</sup>, Mohammad Sudagar<sup>1</sup>, Hamed Paknejad<sup>1</sup>, Siamak Yousefi Siyahkalrud<sup>2</sup>

1- Department of Aquaculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Golestan, Iran.

2- Department of Biology, Islamic Azad University (Varamin Branch - Pishva), Varamin, Tehran, Iran.

Received 26 May 2019; accepted 20 September 2019

### Abstract

The present study was conducted to evaluate the effects of different levels of dietary protein and lipid on the expression of genes involved in immunity (lysozyme and TNF- 1 $\alpha$ ) and appetite (Ghrelin) in zebrafish, *Danio rerio*. So that, 9 diets with 3 protein levels (25, 30 and 35%) and 3 lipid levels (4, 8 and 12%) were prepared. One hundred and thirty five fish, 5 in each group, with an average weight of  $1.23 \pm 0.02$  (g) were randomly distributed into 27 aquaria (20-liter) and fed 3 times daily during 4 months. A factorial experimental design was used for this study. The results revealed that the growth parameters (final weight, body weight gain, body weight gain percentage, specific growth rate and feed conversion ratio) and expression of immune and appetite genes increased significantly by increasing dietary protein levels in the treatment fed with 35% protein ( $p < 0.05$ ). Increasing dietary lipid increased lysozyme expression and growth indices in fish fed with 12% lipid compared to other treatments; increased ghrelin gene expression in 12% compared to 4% significantly ( $p < 0.05$ ) and also insignificant increased TNF-1 $\alpha$  expression ( $p > 0.05$ ). The combined effects of protein and lipid increased the lysozyme, TNF- 1 $\alpha$  and ghrelin gene expression ( $p < 0.05$ ). The highest gene expression among all genes was observed in the diets containing 35% protein and 12% lipid. These findings revealed that dietary protein and lipid can enhance the function of immune system and appetite in zebrafish.

**Keywords:** Zebrafish, Nutrition, Immunity, Growth, Gene expression.

Corresponding author: sudagar.2015@gmail.com