Archive of SID

فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی۵۴، جلد۱۴، شماره۳، تابستان ۱۴۰۰، صفحه ۸۵ تا ۹۶
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۹۸۸۰-۱۷۳۵

اثرات به کار گیری بتائین و مولتی آنزیم ناتوزایم در جیره غذایی بر شاخص‌های رشد و بیان ژن هورمون رشد(GH) در ماهی کپور معمولی(Cyprinuscarpio)

محمد همایونی، محمدرضا ایمانپور، رقیه صفری
دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.گلستان، ایران.fisheriessafari@ yahoo.com

تاریخ دریافت:۹۶/۱۲/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۷/۳/۷

چکیده

زمینه و هدف: آنزیم ها و جاذب های غذایی از جمله موادی هستند که جهت بهبود وضعیت تغذیه ماهیان در سال های اخیر مورد استفاده قرار گرفته اند. هدف از این تحقیق به کارگیری بتائین و مولتی آنزیم ناتوزایم در جیره غذایی بر شاخص های رشد(افزایش وزن، نرخ رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی) و بیان ژن هورمون رشد(GH) در ماهی کپور معمولی می باشد.

روش کار: بدین منظور ۱۸۰ قطعه ماهی کپور با میانگین وزنی ۰/۵ ±۱۹/۵ گرم به مدت ۸ هفته با جیره های آزمایشی حاوی سطوح مختلف ۰، ۱ و ۱/۵ درصد بتائین به صورت ترکیبی با سطوح ۰،۲۵۰و۵۰۰میلی گرم ناتوزیم بر کیلوگرم غذا تغذیه شدند. در انتهای دوره فاکتورهای رشد بررسی و جهت مطالعه ژنتیکی RNA از بافت مغز استخراج، سنتزcDNA با استفاده از کیت Suprime Script RTase انجام و سنجش بیان ژن مرتبط با رشد GH با استفاده از Real Time PCRانجام شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که با افزایش میزان بتایین اختلاف معنی داری در شاخص های افزایش وزن، ضریب رشد ویژه(SGR)و ضریب تبدیل غذایی(FCR) و بیان ژن رشد در تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد($p \leq ۰/۰۵$). اما با بالا رفتن میزان ناتوزیم از ۲۵۰ به ۵۰۰ میلی گرم در شرایط بدون بتائین افزایش معنی داری در میزان شاخص های افزایش وزن، ضریب رشد ویژه و بیان ژن رشد مشاهده شد و همچنین ضریب تبدیل غذایی به طور معنی داری بهبود یافت. شاخص بهترین عملکرد رشد (افزایش وزن، نرخ رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی) و بیان ژن رشد در تیمارهای ترکیبی(۵۰۰ میلی گرم ناتوزیم و۱ و ۱/۵٪ بتائین) بوده است($P \leq ۰/۰۵$).

نتیجه گیری: با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می رسد استفاده از مولتی آنزیم ناتوزایم و بتائین می تواند به واسطه از بین بردن اثر مواد ضد مغذی و جذب ماهی به سمت غذا به بهبود رشد کمک کند.

واژه های کلیدی: ماهی کپور، مولتی آنزیم ناتوزیم، جاذب بتائین، رشد، ژن رشد.

مقدمه

با رشد روزافزون جمعیت نیازهای غذایی نیز افزایش یافته است. در طی چند دهه گذشته، صنعت آبزی‌پروری دارای سریع‌ترین رشد در بخش تولید مواد غذایی در جهان می باشد. تولید ماهی در طول دوره پرورش با عوامل محدودکننده از جمله بیماری ها و شرایط نامطلوب روبرو است. باتوجه به این که افزایش رشد و بازدهی همراه با پیش گیری از بیماری در مزارع آبزی‌پروری یکی از راه کارهای مدیریتی است و تغذیه نیز یکی از فاکتورهای اصلی هزینه در آبزی‌پروری می‌باشد(۶۰ تا ۷۰ درصد هزینه‌ی کل تولید)، لذا استفاده از رژیم‌های غذایی مناسب که با بهبود عملکرد رشد و ایمنی بتواند اثرات مطلوب را ایجاد نماید یکی از ضرورت‌ها در بحث مدیریت تغذیه مزارع پرورشی آبزیان است.آنزیم ها و جاذب های غذایی از جمله موادی هستند که جهت بهبود وضعیت تغذیه ماهیان در سال‌های اخیر مورد استفاده قرار گرفته اند(۱). آنزیم ها با از بین بردن فاکتورهای ضد تغذیه ای باعث بهبود عملکرد رشد ماهیان می شوند(۲۲). به کارگیری آنزیم‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

در جیره های غذایی حاوی کنجاله های پروتئینی گیاهی، باعث افزایش قابلیت هضم آمینواسیدهای آن می شوند(۲۰). غالب آنزیم های تجاری ترکیبی از چند نوع آنزیم هستند که می توانند بر اجزای مختلف غذا تاثیرگذار باشند(۱۸). آنزیم ناتوزیم پلاس یکی ازمکمل‌های آنزیمی است که حاوی فیتاز، بتاگلوکاناز، آلفاآمیلاز، سلولاز، همی سلولاز، پکتیناز، آمینوگلیکوزیداز، لیپاز، زایلاناز، پروتئاز، اسیدفیتاز، اسیدفسفاتاز و پنتوزانازمی باشد(۴). با توجه به عملکرد آنزیمی ذکر شده بهبود رشد یکی از کارکردهای مطرح استفاده از مولتی آنزیم ها می باشد. مطالعاتی متعددی در زمینه اثر مولتی آنزیم بر عملکرد رشد در آبزیان وجود دارند که می توان به مطالعهTuran&Yildirim(۲۰۱۰) بر گربه ماهی آفریقایی(Clariasgariepinus)، مطالعه زمانی و همکاران(۲۰۱۲) بر ماهی آزاد خزر(Salmo truttacaspius)، مطالعه(Lin et al., 2007) در هیبرید تیلاپیا(Oerochromisnioticus×O. aureus)، و مطالعه (عادلیان و همکاران(۱۳۹۵) بر ماهی کپور (*Cyprinus carpio*)اشاره کرد(۲،۱۲،۲۶،۲۷). اضافه نمودن جاذب-های شیمیایی در غذای فرموله شده ماهی اهمیت بسیاری داشته و امروزه در آبزی پروری بسیار گسترش یافته است. ترکیبات فوق سبب افزایش بهبود کیفیت غذای مصرفی، به حداقل رسانیدن زمان غذا گیری ماهی و در نتیجه سبب کاهش و از بین رفتن مواد مغذی موجود در غذا گشته و به تبع آن آلودگی آب نیز به حداقل خواهد رسید(۸). مصرف غذا در موجودات آبزی یک پروسه انتخابی است. ماهی غذا را تست و در صورت مناسب بودن طعم آن را مصرف می نماید. در جذب غذا حس بینایی اولین حس برای جذب غذا می باشد، ولی حس نهایی و تعیین کننده، حس چشایی است. حتی در ماهیانی که در انتخاب غذا، حس بینایی مهم‌ترین تاثیر را دارد، بازهم حس چشایی مهم بوده و حرف نهایی را در مصرف غذا می‌زند. مصرف جاذب ها در تغذیه آبزیان به طور گسترده انجام می شود. در سال های گذشته مواد زیادی به عنوان جاذب درجیره غذایی آبزیان مورداستفاده قرارگرفته است که از جمله آن‌ها می تواند اسیدهای آمینه، الکل ها، آلدئیدها و موادچشایی کلاسیک، نوکلئوتیدها، شکر و دیگر هیدروکربن‌ها، اسیدهای آلی و مخلوطی ازاین مواد را نام برد. استفاده از مواد جاذب در جیره غذایی آبزیان برای افزایش بهترشدن غذای ماهی به عنوان یک ضرورت در جهت کاهش هزینه های مربوط به تغذیه مطرح می باشد. جاذب های غذایی دارای نقش های متعددی ازجمله بهتر کردن ایمنی بدن، تاثیر بر سوخت و ساز چربی و پروتئین، توسعه میکروفلور روده، ذخیره، انتقال و بیان اطلاعات ژنتیکی، تنظیم فشاراسمزی و افزایش رشد، کاهش زمان تطبیق پذیری در ماهیان دریایی می باشند. جاذب ها معمولاً حاوی نیتروژن هستند. وزن مولکولی آن ها کم می باشد تا راحت تر هضم و جذب شوند. فرار نبوده و به راحتی در آب قابل حل می باشند تا ماهی ها از طریق آب به تواند بوی آن ها را حس کنند. آن ها ترجیحاً زمانی بهتر عمل می نمایند که هم زمان عوامل گروه های اسیدی و بازی را داشته باشند. ماهیان گوشت‌خوار بیشترین واکنش را به ترکیبات قلیایی و خنثی مانند گلایسین، پرولین، والین و بتائین نشان می-دهند و ماهیان علفخوار به ترکیبات اسیدی مانند آسپارتیک اسید و گلوتامیک اسید واکنش نشان می-دهند بتائین چه به صورت تنها و چه به صورت ترکیب با اسیدآمینه ها و نوکلئوتیدها بیشتر در تغذیه ماهی و میگو مصرف می شوند(۱۳،۱۶،۲۳). مطالعات صورت گرفته در زمینه استفاده از بتائین به عنوان یک جاذب غذایی اندک و محدود به مطالعاتSudagarو همکاران(۲۰۰۵) بر فیل ماهی(Husohoso)(Fekrandish و همکاران(۲۰۱۰) بر میگوی سفید هندی

www.SID.ir

Archive of SID

(*Fenneropenaeus indicus*) می شود(۲۳،۱۱). هم چنین طبق بررسی انجام شده مطالعه ای در زمینه اثر استفاده از بتائین و مولتی آنزیم ناتوزیم به صورت انفرادی یا ترکیبی بر بیان ژن هورمون رشد در آبزیان و از جمله ماهی کپور صورت نگرفته است. بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی این مکمل های غذایی بر فاکتور-های رشد و بیان ژن رشد(GH)در ماهی کپورصورت پذیرفته است.

مواد و روش ها

ماهی و شرایط آزمایش

این آزمایش به صورت تصادفی در شهریورماه ۱۳۹۶ در نه تیمار و سه تکرار انجام شد. ماهی ها از بخش خصوصی در استان مازندران خریداری و به مرکز تحقیقات آبزی پروری شهید ناصر فضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شدند. ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) پس از مواجهه با حمام نمک ۲٪ در ۱۸ونیرو، با میانگین وزنی ۵±۲۰ به تعداد ۱۲ عدد در هر ونیرو قرار داده شدند. دمای آب در طی آزمایش حدود ۳±۲۲درجه سانتی گراد بود. جهت سازگار کردن ماهی ها به مدت یک هفته جیره غذایی بدون آنزیم و جاذب داده شد و بعد از آن به مدت دوماه(۸هفته) جیره غذایی مورد آزمایش به ماهیان داده شد. جهت اندازه گیری میزان غذای مورد نیاز ماهیان هر چهار هفته یک بار ماهیان زیست سنجی شد. در طی آزمایش هیچ گونه تلفات و یا نشانه های بیماری در ماهیان دیده نشد.

آماده سازی جیره غذایی

بتائین مورد استفاده به صورت پودری و از شرکت بیوشم آلمانScholarly groups و ناتوزیم مورد استفاده از شرکت بیوپروتون، استرالیا تهیه گردید. ماهیان با جیره غذایی حاوی سه سطح ۰، ۱ و ۱/۵ درصد بتائین به صورت ترکیبی با سطوح ۲۵۰،۰ و ۵۰۰ میلی گرم ناتوزیم بر کیلوگرم غذا تغذیه شدند(۲،۲۳). برای این کار بتائین و مولتی آنزیم ناتوزیم توسط ترازو با دقت یک ده هزارم گرم توزین و بعد آن را به حدود یک لیتر آب اضافه کرده، جهت جلوگیری از آب شویی و بهتر چسبیدن مواد بر روی غذا از به مقدار ۳گرم بر ۱۰۰سی-سی آب به آن ژلاتین اضافه کرده سپس توسط افشانه به غذا اضافه گردید.

زیست سنجی ماهیان

در تمام تیمارها زیست سنجی هر چهار هفته یک‌بار انجام شد. وزن بچه ماهیان با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ گرم محاسبه شد. محاسبه

فاکتورهای رشد

پس از پایان دوره آزمایش، شاخص‌های رشد شامل افزایش وزن بدن(Percent body WeightIncrease) نرخ رشد ویژه(SpecificGrowth Rate) و ضریب تبدیل غذایی(Feed Conversion Ratio) با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شدند(۶).

۱- PBWI = (BWf-BWi)/BWi (فرمول۱)

که در این فرمول متوسط وزن اولیه(گرم) در هر مخزن Bwf متوسط وزن نهایی(گرم) است.

نرخ رشد ویژه (S.G.R) طبق فرمول ۲ محاسبه شد:

۲- S.G.R = (LnWt-LnWo)/t×100 (فرمول۲)

که در این فرمول Wo میانگین اولیه بیومس(گرم)، Wt میانگین بیومس نهایی(گرم) و T تعداد روزهای پرورش است.

ضریب تبدیل غذایی(FCR) طبق فرمول ۳ محاسبه شد.

۳- FCR= C×T/Wt-Wo (فرمول۳)

C مقدار غذای خورده شده(گرم)، T روزهای پرورش، Wt وزن نهایی(گرم) و Wo وزن اولیه (گرم) است.

نمونه‌برداری جهت مطالعات ژنتیکی

www.SID.ir

Archive of SID

در انتهای دوره پرورش، نمونه برداری از ماهیان مورد آزمایش هر تیمار و تکرارهای آن(تعداد ۳ نمونه در هر وان) به طور تصادفی در پایان دوره آزمایش انجام گرفت. به منظور انجام آزمایش‌های سنجش کمی بیان ژن GH، در همه نمونه‌ها از مغز ماهی نمونه‌برداری انجام شد. سپس نمونه‌ها با استفاده از ازت مایع سریعاً منجمد و تا شروع آزمایش در فریز ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA

استخراج RNA توسط ماده هضم‌کننده بایوزول انجام شد. نمونه‌های مربوط به هر تکرار از تیمارها با هم مخلوط شدند و در داخل هاون چینی در مجاورت کامل ازت مایع جهت شکسته شدن دیواره سلول‌ها کوبیده و تبدیل به پودر شد که این فرآیند باید خیلی سریع و همواره در مجاورت ازت مایع باشد تا از ذوب شدن بافت‌ها جلوگیری به عمل آید. سپس به میزان ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه بافت کوبیده شده به تیوپ‌های از قبل استریل شده انتقال داده و به میزان ۱ میلی‌لیتر از بایوزول به آن‌ها اضافه شد و پس از ورتکس به مدت ۱۵ ثانیه، در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شدند. سپس به میزان ۰/۲۰ میلی‌لیتر کلروفرم به تیوپ‌ها اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ نگه‌داری شدند. تیوپ‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ با دور 12000 rpm در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند سپس فاز آبی قسمت بالایی تیوپ‌ها جدا و به تیوپ‌های از قبل استریل شده منتقل شدند و هم‌حجم آن‌ها ایزوپروپانول سرد که قبلاً به مدت ۳۰ دقیقه در یخچال ۲۰- درجه سانتی گراد نگه‌داری شده بود، اضافه شد سپس به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ ۴ درجه سلسیوس با دور12000 rpm سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ تیوپ‌ها به روی یخ انتقال داده شدند و فاز بالایی دور ریخته شد و به میزان ۱ میلی‌لیتر از اتانول ۷۵ درصد جهت شستن پلت RNA کف تیوپ‌ها به آن‌ها اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه با سانتریفیوژ 12000 rpm در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ در مرحله قبل، در این مرحله RNA به‌صورت پلت سفید متمایل به کرم‌رنگ در ته تیوپ‌ها دیده می‌شود که در این مرحله اتانول داخل تیوپ‌ها دور ریخته شد در نهایت پلت RNA در زیر هود کاملاً خشک شد. سپس به میزان ۵۰ ماکرولیتر آب دپس به ویال‌ها اضافه و به فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد انتقال داده شدند و تا زمان استفاده جهت تعیین کمیت و کیفیت RNA و سنتز cDNA در آنجا نگهداری شدند(۷).

ارزیابی کیفی و کمی RNAاستخراج‌شده

RNA استخراج شده به دو روش کیفی و کمی مورد ارزیابی قرار می‌گیرد که جهت ارزیابی کیفی از دستگاه الکتروفورز و ژل آگاروز ۱٪ و جهت ارزیابی کمی از دستگاه بایوفتومتر استفاده شد(۱۹).

سنتز cDNA

سنتز cDNA با استفاده از مستر میکس سنتز cDNA شرکت جینت بایو محصول کشور کره و طبق دستورالعمل آن انجام شد. ۵ µl از RNA که قبلاً آماده شده به همراه یک میکرولیتر آغازگر الیگو به تیوپ‌های جدید اضافه شد و با آب عاری از نوکلئاز به حجم ۱۰میکرولیتر رسید. سپس بر روی بلوک حرارتی در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انکوبه و به روی یخ انتقال داده شد و ۱۰میکرولیتر مستر حاوی آنزیم ریورس ترانس کریپتاز به آن اضافه شد. درنهایت با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه و ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد و سپس محلول حاوی cDNA به حجم ۲۰میکرولیتر به دمای ۸۰- درجه سانتی گراد منتقل شد(۱۹).

Real Time PCR

Real Time PCR در ۴ تکرار تکنیکی برای هر تیمار با استفاده از ۱۰میکرولیتر بافر سایبرگرین، ۱میکرولیتر

www.SID.ir

Archive of SID

آغازگر پیش‌رونده و ۱میکرولیتر آغازگر پس‌رونده برای ژن های هدف و رفرنس ، ۲/۸ میکرولیتر آب، ۰/۲میکرولیتر آنزیم تگ پلیمراز و cDNA ۵ میکرولیتر رقیق شده صورت گرفت که حجم نهایی هرتیوپ ۲۰ میکرولیتر بود. ارزیابی عملکرد آغازگرهای به‌کاررفته با استفاده از منحنی استاندارد:

به‌منظور اطمینان از بهینه بودن شرایط Real Time PCR، سری غلظت‌های مختلف(۱/۱۰، ۱/۲۰ ،۱/۵۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۲۰۰) از نمونه‌های cDNA مخلوط از تیمارهای متفاوت هر پلت تهیه و با هر دو آغازگر هدف و رفرنس در ۴ تکرار تکثیر شدند و جهت تخمین کارایی و تکرار پذیری آزمایش برای هر آغازگر منحنی استاندارد ترسیم شد(۱۷). نتایج اثرات مجزا و ترکیب ناتوزیم و بتائین بر بیان ژن رشد بچه ماهی کپور پس از ۸ هفته تغذیه موید نتایج مطالعه شاخص های رشد بود و نشان داد که با افزایش میزان بتایین اختلاف معنی داری($p\geq$ ۰/۰۵) در میزان بیان این ژن در تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد. اما با بالا رفتن میزان ناتوزیم از ۲۵۰ به ۵۰۰ میلی گرم در شرایط بدون بتائین افزایش معنی داری ($p\leq$ ۰/۰۵) در میزان بیان مشاهده شد و در تیمارهای ترکیبی(۵۰۰ میلی گرم ناتوزیم و۱ و ۱/۵٪ بتائین) میزان این افزایش نسبت به تیمارهای مجزا بیشتر بوده است($p\leq$ ۰/۰۵) پیک مشاهده شده در منحنی ذوب آغازگر برای هر محصول، بیانگر وجود یک محصول ویژه و تکثیر اختصاصی است شکل های(۱-۳).

نتایج

اثرات ترکیب ناتوزیم و بتائین و اثرات هر یک از آن‌ها به طور مجزا، بر شاخص های رشد و تغذیه بچه ماهی کپور پس از ۸ هفته تغذیه، در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش میزان بتایین اختلاف معنی داری در شاخص های افزایش وزن، ضریب رشد ویژه(SGR)و ضریب تبدیل غذایی(FCR) در تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد($p\geq$ ۰/۰۵). اما با بالا رفتن میزان ناتوزیم از ۲۵۰ به ۵۰۰ میلی گرم در شرایط بدون بتائین افزایش معنی داری در میزان شاخص های افزایش وزن، ضریب رشد ویژه و مشاهده شد و همچنین ضریب تبدیل غذایی به طور معنی داری بهبود یافت. شاخص های بهترین عملکرد رشد(افزایش وزن، نرخ رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی) در تیمارهای ترکیبی(۵۰۰ میلی گرم ناتوزیم و۱ و ۱/۵٪ بتائین) بوده است($p\leq$ ۰/۰۵).

جدول۱- توالی آغازگرهای استفاده شده (۱۹)

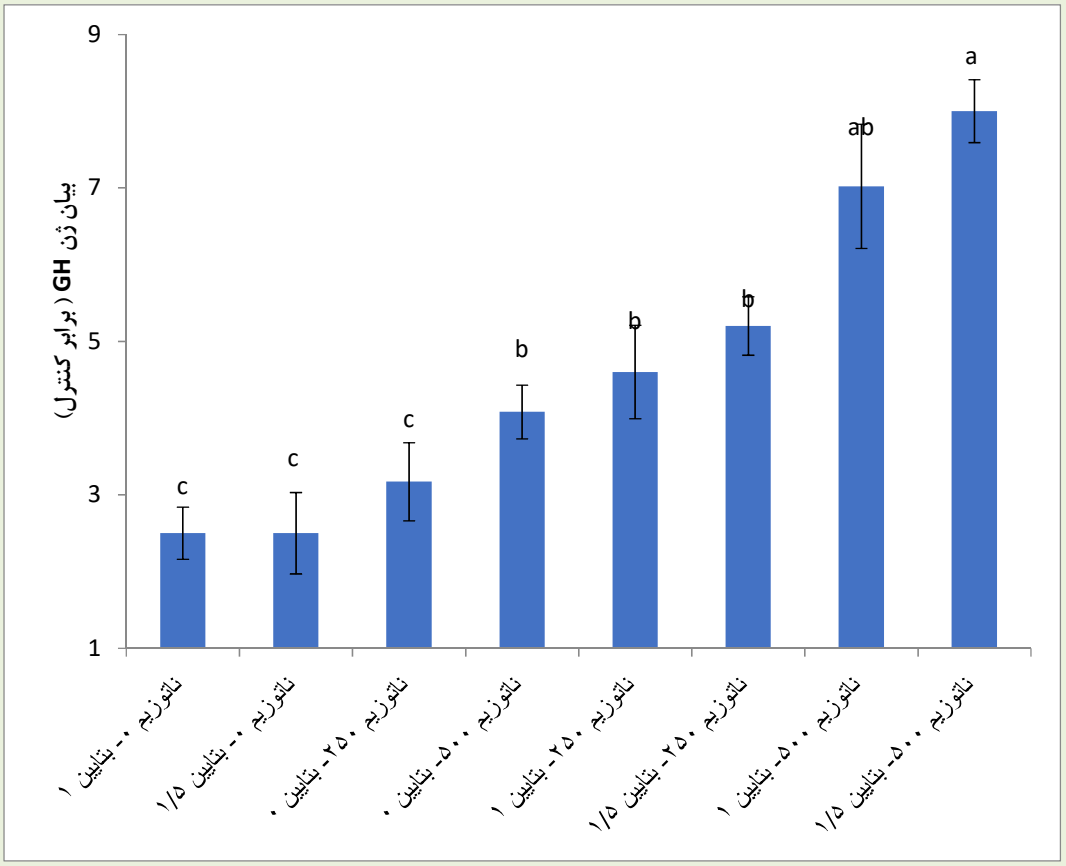
نام پرایمر	مشخصات پرایمر	کارایی پرایمر	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)
GH	F: TCTTCGCATCTCTTTTCACC R: AGTCGGCCAGCTTCTCA	۹۹٪	۶۰
B-actin	F: GACATCAGGGTGTCATGGTTGGT R: CTCAAACATGATCTGTGTCAT	۹۹٪	۶۰

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- مقایسه میانگین شاخص های رشد و تغذیه در تیمارهای آزمایشی

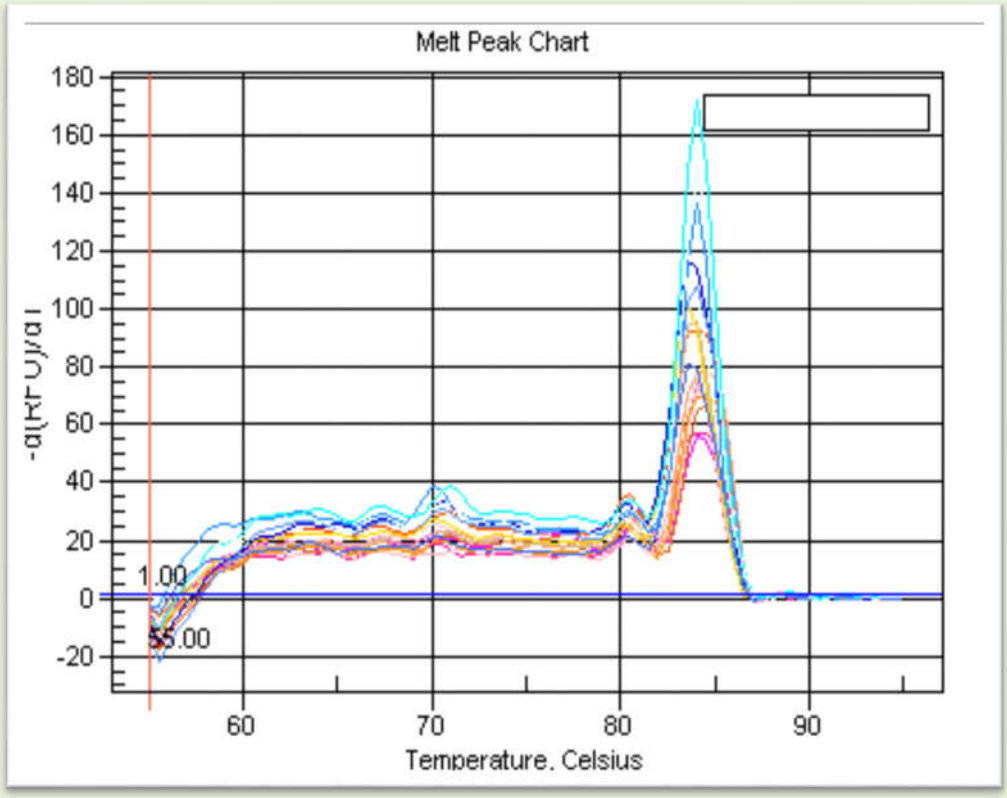
تیمار	افزایش وزن بدن	نرخ رشد ویژه	ضریب تبدیل غذایی
ناتوزیم ۰- بتائین ۰	۱۰/۰۳ ± ۰/۷۹^{c}	۳/۳۴ ± ۰/۰۳^{c}	۳/۱۳ ± ۰/۲۴^{a}
ناتوزیم ۰- بتائین ۱	۱۰/۹۵ ± ۰/۵۸^{c}	۳/۳۵ ± ۰/۰۱ ^{c}	۳/۱۹ ± ۰/۲۴^{a}
ناتوزیم ۰- بتائین ۱/۵	۱۰/۶۶ ± ۰/۹۷^{c}	۳/۳۴ ± ۰/۰۳ ^{c}	۲/۸۹ ± ۰/۲۶^{ab}
ناتوزیم ۲۵۰- بتائین ۰	۱۱/۰۳ ± ۰/۳۱^{c}	۳/۳۷ ± ۰/۰۰ ^{c}	۲/۷۸ ± ۰/۱۵ ^{ab}
ناتوزیم ۵۰۰- بتائین ۰	۱۲/۸۸ ± ۰/۷۹^{b}	۳/۳۸ ± ۰/۰۲۴^{b}	۲/۸۵ ± ۰/۲۳ ^{ab}
ناتوزیم ۲۵۰- بتائین ۱	۱۲/۳۰ ± ۰/۰۸^{b}	۳/۴۱ ± ۰/۰۲^{b}	۲/۵ ± ۰/۰۱^{b}
ناتوزیم ۲۵۰- بتائین ۱/۵	۱۲/۳۶ ± ۰/۲^{b}	۳/۴۱ ± ۰/۰۰^{b}	۲/۴ ± ۰/۰۳^{b}
ناتوزیم ۵۰۰- بتائین ۱	۱۵/۲۹ ± ۱/۱۷^{a}	۳/۵ ± ۰/۰۳^{a}	۲/۴ ± ۰/۲۱^{c}
ناتوزیم ۵۰۰- بتائین ۱/۵	۱۵/۲۵ ± ۰/۶۷^{a}	۳/۵ ± ۰/۰۷^{a}	۱/۹ ± ۰/۱۰^{c}



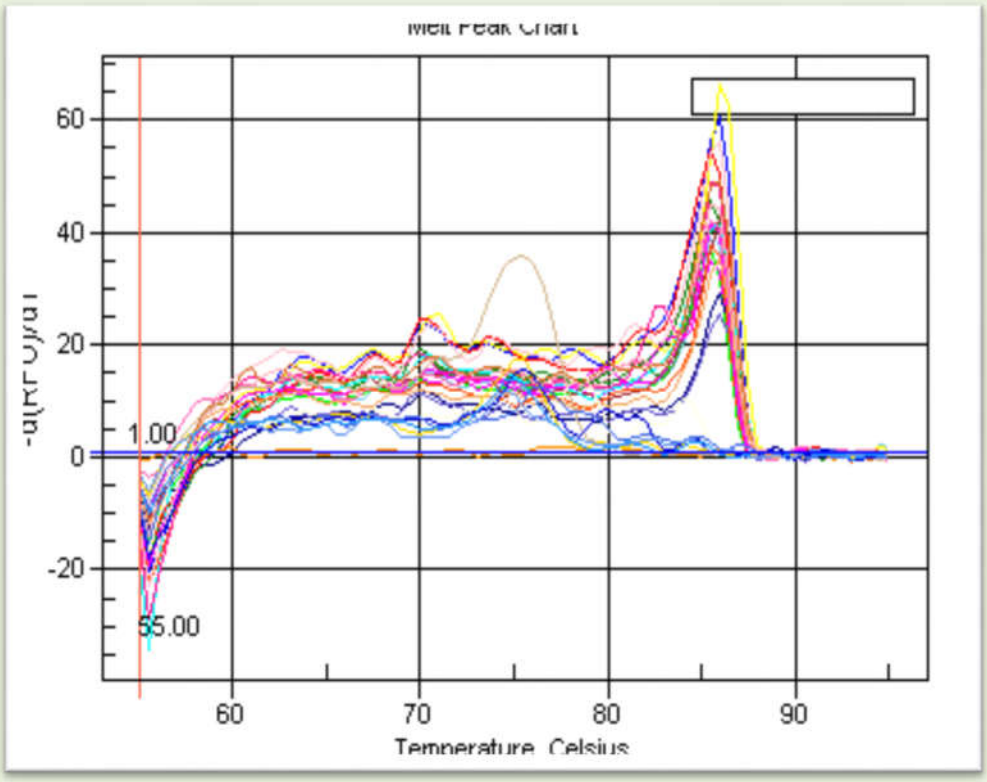
شکل ۱- مقایسه میزان بیان ژن رشد در تیمارهای آزمایشی

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۲- منحنی ذوب ترسیم شده از غلظت های سریالی برای آغازگر B-actin



شکل۳-- منحنی ذوب ترسیم شده از غلظت های سریالی برای آغازگر GH

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه گیری

امروزه به علت استفاده زیاد از مواد ضدتغذیه ای در جیره غذایی آبزیان به کارگیری آنزیم ها به عنوان بهبود دهنده وضعیت تغذیه ای رواج یافته است. استفاده از مولتی آنزیم ها باعث هضم و سوخت وساز بهتر و در نتیجه افزایش رشد می گردد(۱۳، ۹ ،۵). استفاده ازآنزیم‌ها و جاذب های غذایی جهت بهبود وضعیت تغذیه ماهیان در سال های اخیر رواج یافته است. در خصوص استفاده از آنزیم ها و مولتی آنزیم ها بر روی رشد و پارامترهای آن، مطالعات نسبتاً زیادی انجام پذیرفته است. در مطالعه حاضر با بالا رفتن میزان ناتوزیم از ۲۵۰ به ۵۰۰ میلی گرم در شرایط بدون بتائین افزایش معنی داری($p \leq ۰/۰۵$) در میزان شاخص های افزایش وزن، ضریب رشد ویژه و بیان ژن رشد مشاهده شد و هم چنین ضریب تبدیل غذایی به طور معنی داری بهبود یافت($p\leq ۰/۰۵$). Lin و همکاران(۲۰۰۷) در بررسی تأثیر مولتی آنزیم بر عملکرد رشد در ماهیان هیبرید تیلاپیا(Oreochromisniloticus x O. aureus) در مرحله قبل بلوغ گزارش کردند که با افزایش سطوح آنزیم رژیم غذایی سرعت رشد و راندمان خوراکی به طور معنی داری افزایش یافت و بیان نمودند که مکمل آنزیم می¬تواند به طور قابل توجهی موجب بهبود عملکرد خوراک در تیلاپیای هیبرید نوجوانان شود(۱۲). Yildirim و همکاران(۲۰۱۰) در بررسی تأثیر مکمل‌های آنزیمی خارجی در جیره غذایی بر رشد و مصرف خوراک در گربه ماهی آفریقایی(*Clariasgarie pinus*) بیان کردند که میزان رشد در گروه تغذیه شده با رژیم های مکمل آنزیمی نسبت به گروه های شاهد به طور معنی داری افزایش یافت. هم چنین نسبت تبدیل غذا، نسبت پروتئین و مصرف پروتئین خالص در تیمارهای آنزیمی به طور معنی داری بیشتر از شاهد بود(۲۷). Mazandarani و همکاران(۲۰۰۹) در مطالعه استفاده از مولتی آنزیم ناتوزیم در جیره غذایی کپورمعمولی(*Cyprinus carpio*) و تأثیر آن بر شاخص گنادوسوماتیک بیان نمودند که استفاده از غلظت ۷۵۰میلی¬گرم ناتوزیم بر هر کیلوگرم غذا موجب بیشترین میزان رشد و شاخص رسیدگی جنسی(GSI) در ماهیان گردید(۱۴). Zamani و همکاران(۲۰۱۲) در مطالعه اثراستفاده از مولتی آنزیم ناتوزیم و بتا-مانانز در جیره غذایی ماهی سالمون خزری(*Salmo truttacaspius*)بر فاکتورهای خونی و رشد بیان داشتند که میزان رشد، وزن نهایی، و استفاده خوراک در گروه دریافت کننده مکمل آنزیمی۰/۵گرم همیسل و ۰/۵گرم مولتی آنزیم ناتوزیم نسبت به گروه های دیگر بیشتر بود و نشان دادند که مکمل آنزیم باعث بهبودقابل توجهی در عملکرد رشد و استفاده ازخوراک درماهی قزل-آلاشد(۲۶). Adelian و همکاران(۱۳۹۵) در مطالعه ای که بر استفاده مولتی آنزیم ناتوزیم در جیره غذایی کپور معمولی(*Cyprinus carpio*)و تاثیر آن بر شاخص های رشد و فاکتورهای بیوشیمیایی داشتند بیان نمودند که استفاده ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم مولتی آنزیم ناتوزیم بیشترین افزایش رشد و شاخص های آن را داشته است(۲). این افزایش رشد را می توان به نقش آنزیم های مختلف موجود در مولتی آنزیم ها(فیتاز، بتاگلوکاناز، آلفاآمیلاز، سلولاز، همی سلولاز، پکتیناز، آمینوگلیکوزیداز، لیپاز، زایلاناز، پروتئاز، اسیدفیتاز، اسید فسفاتاز و پنتوزاناز) در تجزیه مواد غذایی نسبت داد. هم چنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با افزایش میزان بتائین اختلاف معنی داری در شاخص های افزایش وزن، ضریب رشد ویژه(SGR)و ضریب تبدیل غذایی(FCR) و بیان ژن رشد در تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد($P\geq ۰/۰۵$). هم راستا با نتایج این مطالعه Edivaldo و همکاران(۲۰۰۶) در بررسی که بر روی اثرات بتایین بر عملکرد رشد ماهی piauçu اختلاف

www.SID.ir

Archive of SID

معنی داری در میزان رشد بین تیمارهای تغذیه شده با بتایین و کنترل مشاهده ننمودند(۱۰). اما تحقیقات مختلف بهبود عملکرد رشد با استفاده از بتایین را نشان داده است. Beklevik و همکاران(۲۰۱۲) در مطالعه ای که به بررسی اثرات جیره های حاوی DL آلانین و بتائین بر رشد و ترکیب بدن ماهی انگشت قد قزل آلای رنگین کمان(*Oncorhynchus mykiss*) پرداختند بیان نمودند که جیره حاوی بتائین باعث افزایش رشد شده است(۸). Hadi و همکاران(۲۰۱۳) در مطالعه ای که بر تاثیر بتائین و β-گلوکان به عنوان افزودنی به غذای ماهی کپور معمولی(*Cyprinus carpio*) انجام دادند افزایش قابل توجهی در تمام پارامترهای رشد در گروه تغذیه شده با مکمل بتائین در مقایسه باگروه کنترل مشاهده نمودند. Shankar و همکاران(۲۰۰۸) در مطالعه ای که بر روی اثربتائین به عنوان یک جاذب خوراکی بر رشد، زنده ماندن و مصرف خوراک در کپور آیینه ای هندی(Labeorohita) انجام دادند رشد بهتر، سرعت رشدخاص، بقاء، نسبت تغذیه غذا و نسبت کارایی پروتئین بیشتر در گروه با ۰/۲۵٪ بتایین تغذیه شده نسبت به گروه شاهد گزارش نمودند(۲۱). Zakipour و همکاران(۲۰۱۰) در مطالعه ای که براثرسطوح مختلف رژیم غذایی بتایین بر عملکرد رشد، بهره وری موادغذایی و میزان بقا بچه ماهی انگشت قد سوف ماهی(*Sander lucioperca*) انجام دادند میزان افزایش وزن، سرعت رشد ویژه و راندمان غذا با ۲٪ بتایین به بیومار مشاهده نمودند و به این نتیجه رسیدندکه بتائین می‌تواند طعم و جذب غذارا افزایش داده و در تغییر غذای بچه ماهی از رژیم طبیعی به رژیم غذایی مصنوعی کارا می باشد(۲۵). Murthy و همکاران(۲۰۱۶) در بررسی بتائین هیدروکلراید به عنوان جاذب غذایی بر رشد، بقا و مصرف خوراک کپور معمولی(*Cyprinus carpio*) بیان نمودند که رژیم غذایی حاوی ۰/۲۵ درصد بتائین، نرخ رشد، بقا و نسبت کارایی پروتئین بیشتری نسبت به گروه شاهد و بقیه تیمارها نشان داد(۱۵). عدم مشاهده بهبود وضعیت رشد در مطالعه حاضر می تواند به مقدار مصرف این ماده در جیره غذایی نسبت داده شود. در مطالعه حاضر شاخص بهترین عملکرد رشد(افزایش وزن، نرخ رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی) و بیان ژن رشد در تیمارهای ترکیبی(۵۰۰ میلی گرم ناتوزیم و۱ و ۱/۵ ٪ بتائین) بوده است($p\leq$۰۵/). Biswas و همکاران(۲۰۱۸) نیز در تحقیقی که بر استفاده جاذب-های شیمیایی و تاثیر آن ها بر رشد و بقا گربه ماهی هندی(Ompokbimaculatus) داشت بیان نمود که بیشترین رشد در درمان تغذیه شده با رژیم غذایی بتائین همراه با آنزیم مونوفسفات مشاهده شد(۹). به طور کلی نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از مولتی آنزیم ناتوزیم و جاذب غذایی بتائین با از بین بردن فاکتورهای ضد تغذیه ای و اشتیاق به مصرف غذا می-تواند جهت بهبود وضعیت تغذیه ماهیان مورد استفاده قرار گیرند.

منابع

۱-عادلیان،م.، ایمانپور، تقی زاده، م.، مازندرانی،م. ۱۳۹۲. استفاده ازمولتی آنزیم ناتوزیم درجیره غذایی ماهی کپورمعمولی(*Cyprinus carpio*) و تأثیر آن بر شاخص گنادوسوماتیک(GSI). دومین همایش ملی شیلات وآبزیان ایران. دانشگاه آزاداسلامی واحد بندرعباس.

۲-عادلیان، م.، ایمانپور، تقی زاده، م.، مازندرانی، م. ۱۳۹۵. استفاده از مولتی آنزیم ناتوزیم درجیره غذایی ماهی کپور معمولی(*Cyprinus carpio*) و اثرات آن بر شاخص های رشد و برخی از فاکتورهای بیوشیمیایی خون. فصلنامه علمی پژوهشی محیط زیست جانوری. سال هشتم، شماره۲، ص۲۱۴-۲۰۷.

www.SID.ir

Archive of SID

۳-فروهر واجارگاه، م.، محمدی یلسونی، ا.، رضائی، ح. ۱۳۹۵. تاثیر استفاده از مولتی آنزیم ناتوزیم بر شاخص بقای کپورمعمولی(*Cyprinus carpio*) در مواجهه با غلظت های مختلف سم آبامکتین. مجله بهره برداری و پرورش آبزیان. جلد پنجم، شماره۴، صفحه ۲۳-۱۳.

٤-یعقوب فر، ا.، شریفی، د.، گلستانی میلانو، گ. ۱۳۹۳. اثرات آنزیم ناتوزیم پلاس بر انرژی قابل سوخت ساز و قابلیت هضم پروتئین جیره های حاوی دانه گندم و کنجاله کلزا در جوجه های گوشتی. پژوهش های تولید اتدامی. سال پنجم، شماره۱۰، ص ۶۸-۵۷.

5.Abed ali, H., AL-Faragi, J. (2017). Efficiency of betaine and β-glucan as feed additives on the growth performance and survival rate of common carp(*Cyprinus carpio* L.)fingerlings. Journal of Entomology and Zoology Studies, 5(4); 27-31.

6.Ai, Q., Mai, K., Zhang, L., Tan, B., Zhang, W., Xu, W., and Li, H. (2007). Effects of dietary β-1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker (*Pseudosciae nacrocea*). Fish and Shellfish, 394-402.

7.Awad, E., Cerezuela, R., Esteban, M. A. (2015). Effects of fenugreek (*Trigonellafoenum graecum*) on gilthead seabream (*Sparus aurata*) immune status and growth performance. Fish and Shellfish Immunology, 45(2); 454-464 .

8.Beklevik, G., Polat, A. (2001). Effects of DL alanine and betaine supplemented diets on the growth and body composition of fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W. 1972). Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 25; 301-307.

9.Biswas, P., Patel, A., Saha, H. (2018). Effect of dietary incorporation of chemo-attractants on growth and survival during seed rearing of (*Ompokbim aculatus*). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 18; 491-499.

10. Edivaldo, B. N., Rodrigo, E. B., Robson, F. C., & Helton, C. D. (2006). Effects of betaine on the growth of the fish piauçu(*Leporinus microcephalus*). Brazilian Archives of Biology and Technology, 49; 757-762.

11. Fekrandish, H., Abedian, A.M., Matinfar, A. (2010). Influence of betaine andmethionine in the diet for stimulating food intake of Indian white shrimp(*Fenneropenaeu sindicus*), Pajouhesh and Sazandegi, 73;136-147.

12.Lin, S., Mai, K., Tan, B. (2007). Effects of exogenous enzyme supplementation in diets on growth and feedutilization in tilapia(*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*). Aquaculture Research, 38; 1645-1653.

13. Loguercio, C., Federico, A., Trappoliere, M., Tuccillo, C., de Sio I., Di Leva, B. (2007). The effect of a silybin vitamin E phospho lipid complex on nonalcoholic fatty liver disease: a pilot study. DigestiveDiseases and Science, 52; 2387-2395.

14. Mazandarani, M., Taghizadeh, A., Adelian, M., Imanpour, M. (2009). The useof natuzyme multi-enzyme in common carp (*Cyprinus carpio*) diet and its effect on gonado somatic index. Second National Conference on Fisheries andAquaculture in Iran, Islamic Azad University, Bandar Abbas Branch, Iran.

15. Murthy, H., Manai, A., Patil, P. (2016). Effect of betaine hydrochloride as feed attractant on growth, survival and feed utilization of common carp(*Cyprinus carpio*). Journal of Aquaculture & Marine Biology, 4(3); 1-4.

16. Niroomand, M., Sajadi, M.M., Yahyavi, M., Asadi, M. (2011). Effects of dietary betaineon growth, survival, body composition and resistance of fry rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) under environmental stress, Iranian Scientific FisheriesJournal, 20(1); 39-47.

17. Ramakers, C,. Ruijter, JM., Deprez, RH., Moorman, AF. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction(PCR) data. Neuroscience Letters, 339(1); 62-66.

18. Ritz, C.W., Hulet, R.M., Self, B.B., Denbow, D.M. (1995). Growth and intestinal morphology of male turkeys as influenced by dietary supplementation of amylase and xylanase. Poultry science, 74(8); 1329-1334.

www.SID.ir

Archive of SID

19. Safari, R., Hoseinifar, S.H., Nezhadmoghadam, SH., Jafar Node, A. (2016). Transciptomic study of mucosal immune, antioxidant and growth related genes and non-specific immune response of common carp (*Cyprinus carpio*) fed dietary Ferula (*Ferula assafoetida*). Fish and Shellfish Immunology, 1-16.

20. Selle, P. H., Ravindran, V., Pittolo, P. H. &Bryden, W. L. (2003). Effects of phytase supplementation ofdiets with two tiers of nutrient specifications on growth performance and protein efficiency ratios ofbroiler chickens. Asian-Australasian J AnimSci, 16, 1158-1164.

21. Shankar, R., Shivananda Murthy, H., Prakash, P., Thanuja, K. (2008). Effect of Betaine as a feed attractant on growth, survival, and feed utilization in fingerlingsof the indian major carp(Labeorohita). The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh, 60(20); 95-99.

22. Soltan, M.A. (2009). Effect of dietary fish meal replacement by poultry by-product meal with different grain source and enzyme supplementation on performance, feces recovery, body composition and nutrient balance of Nile Tilapia. Pakistan Journal of Nutrition, 8(4); 395-407.

23. Sudagar, M., Azari, TakamiGh., Pnomarev, C.A., Mahmoudzadeh, H., Abedian, A., Hosseini S.A. (2005). The effects of different dietary levels of betaine and methionine as attractant on the growth factor and survival rate of juvenile beluga (*Huso huso*), Iranian Scientific Fisheries Journal, 14(2);41-50.

24. Zaghari, M., Majdeddin, M., Taherkhani, R. &Moravej, H. (2008). Estimation of nutrient equivalencyvalues of natuzyme and its effects on broiler chick performance. J App Poult Res, 17; 446-453.

*25.*Zakipour Rahimabadi, E., Akbari, M., Arshadi, A., Effatpanah, E. (2012). Effect of different levels of dietary betaine on growth performance, food efficiency and survival rate of pike perch(*Sander lucioperca*) fingerlings. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 11(4); 902-910.

26. Zamini, A.; Kanani, H.; Esmaeili, A.; Ramezani, S., ZorieZahara, S. (2012). Effects of two dietary exogenous multi-enzyme supplementation, natuzyme and beta-mannanase(hemicell), on growth and blood parameters of Caspian salmon (*Salmo truttacaspius*). Comparative Clinical Pathology, 55; 1-6.

27. Yildirim, Y.B., Turan, F. (2010). Effects of exogenous enzyme supplementation in diets on growth and feed utilization in african catfish(*Clarias gariepinus*). Journal of Animal and Veterinary Advances, 2; 327-33

www.SID.ir

Archive of SID

Effect of Dietary Administration of Betaine and Natozim Multi-Enzyme on Growth, Indices and Growth Hormone Gene (GH) in Common Carp (*Cyprinus carpio*)

M. Homauni, M.R. Imanpour, **R. Safari**
Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. **fisheriessafari@ yahoo.com**
Received:2018.23.2 **Accepted: 2018.28.5**

Abstract

Inroduction & Objective: Enzymes and food attractants are the ingredients used to improve the nutritional status of fish in recent years. In this experiment the effect of dietary administration of betaine and Natozim multi-enzyme on growth indices (Weight gain, SGR and FCR) and growth hormone gene expression (GH) in common carp (*Cyprinus carpio*) were investigated.

Materials and Methods: For this purpose 180 fish with average weight of 19.5±0.5 gr, were fed diets supplemented with 3 different levels of 0, 1 and 1.5% in combination with 0, 250 and 500 mg/l for 8 weeks. At the end of feeding trial, growth indices were assessed. RNA extracted from brain, cDNA synthesized using Suprime script RTase kit and Real-time PCR were done using GH primers.

Results: Results showed no significant difference growth indices and GH expression gene in fish fed betaine (P>0.05). However, with increasing the amount of Natozim multi-enzyme from 250 to 500 mg in the non-betaine condition, there was a significant increase (P <0.05) in the weight gain, specific growth factor and growth gene expression, as well as the Food Conversion Rate. The best growth performance indices and growth gene expression were in combination treatments (500 mg of natozym and 1 and 1.5% betaine) (P <0.05).

Conclusion: Regarding the results, it seems that the use of Natozim and betaine can help to improve growth by eliminating the effects of anti-nutrients and attracting fish to foods.

Keywords: Carp, Multi-Enzyme, Natozim, Betaine Adsorbent, Growth, Growth Gene.

www.SID.ir