Archive of SID

اثر افزایش تراکم نگه‌داری بر عملکرد رشد، غلظت هورمون کورتیزول و بیان ژن پروتئین شوک حرارتی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

- **سعید زاهدی**: گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
- **آرش اکبرزاده***: گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
- **جلیل مهرزاد**: گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، ایران
- **احمد نوری**: گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
- **محمد هرسیج**: گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبدکاووس، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۷

چکیده

تراکم نگه‌داری به‌عنوان یک عامل استرس‌زای مزمن در آبزی‌پروری تلقی می‌شود. هدف از این مطالعه، مقایسه عملکرد رشد، تغییرات هورمون کورتیزول و بیان ام‌آران‌ای ژن پروتئین شوک حرارتی (HSP۷۰) ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) در دو تراکم نگه‌داری متداول کشور در سیستم پرورشی باز می‌باشد. به این منظور، قزل‌آلای جوان تمام ماده با دو تراکم نگه‌داری ۲۴ (تراکم متوسط) و ۴۴ (تراکم بالا) کیلوگرم بر مترمکعب و تراکم بارگذاری ۱ لیتر بر دقیقه به‌ازای هرکیلوگرم ماهی به‌مدت ۶۰ روز مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصله کاهش معنی‌دار میانگین وزن نهایی ماهیان را در تراکم بالا و به‌میزان ۶/۲٪ در مقایسه با تیمار تراکم متوسط نشان داد. با این وجود، افزایش تراکم نگه‌داری اثری بر طول کل، چنگالی و استاندارد در پایان آزمایش نداشت. هم‌چنین، افزایش تراکم نگه‌داری هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری را در طول نسبی باله‌های سینه‌ای، شکمی، مخرجی، پشتی و دمی پس از دو ماه موجب نشد. از سوی دیگر، درصد افزایش وزن، افزایش وزن روزانه، نرخ رشد ویژه و ضریب رشد حرارتی در تیمار تراکم بالا، کاهش معنی‌داری را در مقایسه با تیمار تراکم متوسط نشان داد. در مقابل، تغییرات ضریب چاقی فاقد اختلاف معنی‌دار بود. افزایش تراکم نگه‌داری موجب افزایش ضریب تغییرات وزن ماهیان و ضریب تبدیل غذایی گردید. مقادیر گلوکز و هورمون کورتیزول خون فاقد تغییر معنی‌دار بین دو تیمار آزمایشی بود. در پایان، مقادیر بیان ژن HSP۷۰ ماهیچه در سطح ام‌آران‌ای افزایش معنی‌داری را در تیمار تراکم بالا در مقایسه با تراکم متوسط نشان داد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که افزایش تراکم نگه‌داری در محدوده تراکم‌های مجاز در سیستم‌های فاقد اکسیژن‌دهی، می‌تواند موجب ایجاد استرس در ماهیان شده که به‌صورت تغییر برخی از پارامترهای رشدی مورد بررسی در این مطالعه و نیز افزایش میزان بیان ام‌آران‌ای HSP۷۰ مشاهده گردید. لذا افزایش تراکم نگه‌داری، بایستی توام با به‌کارگیری تمهیدات مدیریتی صحیح و رهیافت تغذیه‌ای در جهت تقلیل استرس مربوطه و تقویت سیستم ایمنی ماهی باشد.

کلمات کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، تراکم نگه‌داری، کورتیزول، HSP۷۰

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: akbarzadeh@alumni.ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

استرس در ماهیان پرورشی از اهمیت شایانی برخوردار است که از دو منظر سلامت و تولید می‌تواند مورد ارزیابی قرار گیرد. عملیات پرورش‌ماهی برای‌ماهیان عاری از استرس‌نبوده‌و اقدامات گوناگونی که طی یک عملیات پرورشی در واحدهای تولیدی انجام می‌شود، هم‌چون دست‌کاری، رقم‌بندی، جابجایی، حمل و نقل، درمان بیماری‌ها و تراکم نگه‌داری (Stocking density) می‌تواند به‌عنوان عوامل استرس‌زا محسوب شود (Ellis و همکاران، ۲۰۰۲). تراکم نگه‌داری که به‌صورت زی‌توده ماهی به‌ازای واحد حجم آب تعریف می‌شود، به‌عنوان یک عامل مهم در مدیریت آبزی‌پروری تلقی شده که در ارتباط با آسایش ماهی و تولید سیستم است و نقش کلیدی را در اقتصاد تولید بر عهده دارد. چراکه بسیاری‌از پرورش‌دهندگان خواهان افزایش تراکم نگه‌داری طی دوره پرورشی به‌منظور افزایش تولید مزرعه می‌باشند تا بدین وسیله بیشینه بهره‌برداری از آب و فضای پرورشی را بنمایند. تعیین نیازهای‌ایمن‌و بهینه‌مکانی امر مشکلی است‌و درکی‌پیرامون‌تراکم‌های بهینه برای اندازه‌های مختلف و نیز گونه‌های مختلف پرورشی وجود ندارد. از طرف دیگر، تراکم نگه‌داری در شرایط پرورش متراکم ماهی به‌عنوان یک عامل استرس‌زای مزمن و دارای ماهیت طولانی درنظر گرفته می‌شود که می‌تواند اثرات سویی بر بسیاری از جنبه‌های زیست شناسی ماهی و در سطوح مختلف داشته باشد (Ellis و همکاران، ۲۰۰۲؛ Conte، ۲۰۰۴؛ North و همکاران، ۲۰۰۶). ماهیان پرورشی در تراکم‌های بالای پرورشی، کاهش عملکرد رشد را از خود نشان می‌دهند. شرایط استرس‌زا، ممکن است بر مصرف خوراک اثر گذارد که بنابراین، اثر مستقیمی بر رشد و نیز، ضریب تبدیل غذایی ماهی دارد (Ellis و همکاران، ۲۰۰۲). از طرف دیگر، کاهش مصرف خوراک (Vijayan و Leatherland، ۱۹۸۸)، تغییر برهم‌کنش‌های اجتماعی (Papoutsoglou و همکاران، ۱۹۹۸) و تغییر کیفیت آب (Pickering و Pottinger، ۱۹۸۷) ممکن است منجر به افزایش نیازهای متابولیکی و هزینه بیش‌تر انرژیکی برای تامین رشد شود. با این وجود، هنوز مشخص نیست که آیا کاهش عملکرد رشد ماهی در تراکم‌های بالای پرورشی، ناشی از شرایط زیرحد بهینه فاکتورهای کیفی آب است (مثل سطح پایین اکسیژن، افزایش آمونیاک آب یا افزایش سطوح دی‌اکسیدکربن) یا ناشی از خود تراکم و ازدحامی است که ماهی در سطوح بالاتر پرورشی تجربه می‌کند که می‌تواند موجب رفتار تهاجمی ماهی یا تغییر برهم‌کنش‌های اجتماعی شود. با این وجود، به‌نظر می‌رسد که‌چنین‌اثراتی‌مختص‌به‌گونه باشند (Pickering و Pottinger، ۱۹۸۷؛ Ellis و همکاران، ۲۰۰۲). Holm و همکاران (۱۹۹۰) در مطالعه‌ای پیرامون اثر تراکم نگه‌داری و رژیم غذایی بر سرعت رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) نشان دادند که بالاترین و پایین‌ترین سرعت رشد ویژه به‌ترتیب مربوط به تیمار دارای پایین‌ترین و بالاترین تراکم ذخیره‌سازی است و سرعت رشد با افزایش دفعات غذادهی افزایش می‌یابد. در مقابل، مطالعه‌ای روی قزل‌آلای رنگین‌کمان در سه تراکم ۱۰، ۴۰ و ۸۰ کیلوگرم بر مترمکعب نشان داد که بالاترین تراکم ذخیره‌سازی اثر قابل ملاحظه‌ای بر سرعت رشد یا شاخص‌های فیزیولوژیکی ماهی قزل‌آلا ندارد (North و همکاران، ۲۰۰۶). مطالعه روی باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*) نشان داد که بیان ژن HSP۷۰ در بین سه تراکم مورد آزمایش ۱۰، ۸۰ و ۱۰۰ کیلوگرم بر مترمکعب، افزایش معنی‌داری را فقط در بالاترین تراکم از خود نشان می‌دهد (Gornati و همکاران، ۲۰۰۴). اندازه‌گیری میزان استرس‌در‌گونه‌های پرورشی‌تحت سیستم‌های پرورشی مختلف، بخش مهمی‌ازایجادشیوه‌های مدیریتی مناسب بوده و نیز، اطلاعاتی پیرامون سلامت ماهی به‌دست می‌دهد. استرس مزمن بر رشد و متابولیسم از طریق عمل هورمون کورتیزول اثر می‌گذارد و به‌همین جهت، افزایش مقادیر نشانگرهای استرسی هم‌چون کورتیزول و گلوکز در بسیاری از گونه‌های پرورشی مواجه با استرس تراکم نگه‌داری بالا نشان داده شده است(Tort و همکاران، ۱۹۹۶).سیستم‌های هورمونی دخیل در تنظیم رشد ممکن است توسط استرس با فعال شدن محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-غده‌بین کلیوی تحت‌تاثیر قرار گیرند و به‌طورکلی، کورتیزول و کتکل‌آمین‌ها دارای اثر منفی بر هورمون‌های آنابولیک می‌باشند (Rotllant و همکاران، ۲۰۰۰). در دست داشتن نشانگرهای زیستی دقیق در سطح ام‌آران‌ای به تشخیص شرایط استرسی در زودترین زمان ممکن کمک می‌کند. ساخت ام‌آران‌ای کدکننده پروتئین‌های مرتبط با استرس، یک پاسخ اولیه به شرایط استرسی است که آن را می‌توان با پی‌سی‌آر مورد شناسایی قرار داد (Gornati و همکاران، ۲۰۰۴). پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs= Heat shock proteins) کاپرون‌های ملکولی با حفاظت بالا هستند که دارای طیف گسترده‌ای از عملکردها در موجودات زنده می‌باشند. به‌همین جهت، ساخت این پروتئین‌ها تحت شرایط سلولی استرس‌زا مثل درجه حرارت بالا، نبود اکسیژن، آسیب بافتی، التهاب، فلزات سنگین، تابش، افزایش کلسیم، کمبود گلوکز، سرطان و عفونت باکتریایی افزایش می‌یابد. HSPها در سلول‌ها از تجمع پروتئینی جلوگیری و به پیچ‌خوردگی پروتئین‌های جدیدکمک می‌کنند. این پروتئین‌ها، نشانگرهای زیستی دقیقی جهت ارزیابی میزان سلامت موجود و مواجهه آن با شرایط استرسی محسوب می‌شوند (Basu و همکاران، ۲۰۰۲؛ Gornati و همکاران، ۲۰۰۴). قزل‌آلای رنگین‌کمان مهم‌ترین ماهی پرورشی سردابی ایران می‌باشد که دارای جایگاه ویژه‌ای در سبد مصرف خانواده‌های ایرانی است. با توجه به ضرورت حرکت به سمت سیستم‌هایی با تولید و

www.SID.ir

Archive of SID

فن‌آوری بالاتر که‌به‌طور عمده براساس تراکم‌های نگه‌داری بالا طراحی می‌شوند و عدم درک صحیح پیرامون اثرات واقعی تراکم نگه‌داری بالا بر رشدوسلامت ماهی، این مطالعه‌به بررسی‌اثر افزایش تراکم نگه‌داری برعملکردرشدو استرس قزل‌آلای رنگین‌کمان‌درسن‌پرواری‌می‌پردازد. هدف از تحقیق حاضر، مقایسه اثر دو تراکم نگه‌داری متداول کشور به‌صورت تراکم متوسط و بالا در شرایط بدون اکسیژن‌دهی و با تراکم بارگذاری یکسان بر برخی از پارامترهای رشد، هورمون کورتیزول (به عنوان شاخص استرس) و بیان ژن HSP۷۰ ماهیچه‌ای در ماهی قزل آلای رنگین‌کمان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

ماهیان و شرایط آزمایشگاهی: ابتدا در اواخر بهمن ماه سال ۱۳۹۵، بچه‌ماهیان تمام ماده قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن ۸±۲۷۰ گرم از مرکز حدواسط صدف ۲ به مرکز حدواسط و پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان صدف ۱ واقع در شهرستان تربت حیدریه توسط تانکر پلاستیکی‌منتقل‌و با تراکم تقریبی ۱۲ کیلوگرم بر مترمکعب رهاسازی شدند. آداپتاسیون به‌مدت ۴ هفته در استخرهای هشت ضلعی (حجم مفید ۲۵۰۰ لیتر و عمق ۰/۷ متر و سطح آینه ۴ متر مربع) موجود در سوله حدواسط مرکز و تحت رژیم نوری طبیعی انجام شد. طی این مدت، ماهیان به‌مقدار ۱/۳٪ زی‌توده با خوراک اکسترود قزل‌آلای رنگین‌کمان (اسکرتینگ، ایتالیا)، به‌صورت دستی و دو بار در روز در ساعات ۹ صبح و ۱۶ بعد از ظهر تغذیه شدند. در روز شروع آزمایش، ماهیان (میانگین وزنی۱۰±۴۰۴/۵ گرم و میانگین طول ۰/۱±۳۳/۱ سانتی‌متر) در دو تراکم متوسط (۲۴ کیلوگرم بر مترمکعب و نزدیک به متوسط تراکم استخرهای آبراهه‌ای کشور) و بالا (۴۰ کیلوگرم بر مترمکعب و نزدیک به تراکم مخازن پرورشی کشور) در استخرهای هشت ضلعی مشابه دوره آداپتاسیون، در سه تکرار ذخیره‌سازی شدند. تراکم بارگذاری یکسان ۱ لیتر بر دقیقه به‌ازای هر کیلوگرم ماهی برای هر دو تراکم مورد آزمون ایجاد شد. آب ورودی هر دو سیستم از آب چشمه صدف ۱ (با درجه حرارت ۱۳/۵ درجه سانتی‌گراد، پی‌اچ ۷/۲ و هدایت الکتریکی ۷۰۰ میکروموس بر سانتی‌متر) تامین می‌گردید که قبل از ورود به سوله هوادهی می‌شد. هم‌چنین هوادهی در داخل استخرهای هر دو سیستم به کمک سنگ هوای متصل به پمپ دمنده هوای سالنی (چین) انجام می‌شد. تراکم نگه‌داری در تیمار تراکم بالا پس از رسیدن به ۴۴ کیلوگرم بر مترمکعب حفظ گردید که نزدیک به بیشینه تراکم‌های استخرهای فاقد اکسیژن‌دهی در کشور می‌باشد. به‌منظور حفظ تراکم نگه‌داری نزدیک به‌مقادیر یاد شده، تعداد معینی از ماهیان به‌طور هفتگی و با انجام زیست‌سنجی از استخرهای پرورشی خارج می‌شدند. طی مدت آزمایش، فاکتورهای کیفی آب استخرها با نمونه‌برداری از لوله‌خروجی مرکزی به‌طور مرتب و براساس جدول زمانی مدنظر اندازه‌گیری می‌شدند که عبارت بودند از: درجه حرارت به‌صورت ۴ بار طی روز با استفاده از دماسنج دیجیتالی (چین)، اکسیژن محلول به‌طور روزانه با استفاده از اکسی‌متر (YSI 550, YSI inc, USA)، پی‌اچ به‌طور روزانه با استفاده از مولتی‌متر (AZ instrument, Taiwan)، آموناک‌بااستفاده‌ازکولوریمتر به‌طوروز در میان (Hanna instrument, USA) و هدایت الکتریکی هر دو هفته یک‌بار با استفاده از مولتی‌متر (AZ instrument, Taiwan).

نمونه‌برداری ماهیان: مرگ و میر ماهیان به‌طور روزانه ثبت می‌گردید. نمونه‌برداری از ماهیان قطع غذا شده در روز ۶۰ از شروع آزمایش و در ساعت ۹ صبح با برداشت تصادفی ۲ عدد ماهی از هر تکرار (۶ ماهی به‌ازای هر تیمار) توسط تور دستی انجام شد. پس از بی‌هوشی به کمک محلول ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پودر گل میخک، طول کل، چنگالی و استاندارد (تخته زیست‌سنجی)، وزن (ترازو) و اندازه بالهها (کولیس) اندازه‌گیری شد (North و همکاران، ۲۰۰۶) و خون‌گیری از رگ دمی به‌میزانی نزدیک به ۲ سی‌سی انجام گرفت که فوراً داخل لوله محتوی ماده ضدانعقاد ریخته شده و جهت انجام آنالیز به آزمایشگاه منتقل شد.

اندازه‌گیری پارامترهای رشد و سنجش بیوشیمیایی خون: سانتریفیوژ نمونه‌های خون در ۱۵۰۰ دور بر دقیقه و به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و پلاسمای حاصله برای سنجش گلوکز و هورمون کورتیزول مورد استفاده قرار گرفت. هم‌چنین، یک برش کوچکی (یک گرم) از عضله سفید سمت چپ بدن استحصال که با سرم فیزیولوژیک انسانی شست و شو گردید. سپس نمونه داخل میکروتیوپ مخصوص گذاشته شده و در مخزن ازت منجمد گردید و در فریزر ۸۰ °C - نگه‌داری شد (Montserrat و همکاران، ۲۰۰۷). پارامترهای مرتبط با رشد و تغذیه براساس فرمول‌های زیر مورد محاسبه قرار گرفتند (Liu و همکاران، ۲۰۱۷):

100 × تعداد اولیه ماهیان / تعداد نهایی ماهیان = نرخ بقا

100 × وزن اولیه / (وزن اولیه – وزن نهایی) = درصد افزایش وزن

تعداد روز / (وزن اولیه – وزن نهایی) = افزایش وزن روزانه

100 × تعداد روزهای پرورش / (لگاریتم طبیعی وزن اولیه –لگاریتم طبیعی وزن نهایی) = نرخ رشد ویژه

100 × (میانگین درجه حرارت آب × تعداد روز) / ($وزن اولیه^{1/3}$ – $وزن نهایی^{1/3}$) = ضریب رشد حرارتی

100 × طول چنگالی^3 / وزن کل = ضریب چاقی فولتون

100 × میانگین وزن انفرادی ماهیان / انحراف معیار وزن انفرادی ماهیان = ضریب تغییرات وزنی

تفاضل وزن نهایی و وزن اولیه / غذای مصرف شده = ضریب تبدیل غذایی

www.SID.ir

Archive of SID

مقادیر گلوکز خون توسط دستگاه اتوآنالایزر (BT 3000plus, Biotecnica instrument, Italy) و مقادیر هورمون کورتیزول خون با استفاده از کیت الایزا مورد سنجش قرار گرفت(Diagnostics Biochem Canada Inc, Ontario, Canada).

پی‌سی‌آر کمی: استخراج آران‌ای از ۵۰ میلی‌گرم بافت عضله سفید منجمد با استفاده از کیت استخراج و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد(NucleoSpin Machery-Nagel).برای حذف آلودگی احتمالی با دی‌ان‌ای، تیمار با آنزیم DNase I انجام شد (NucleoSpin). کیفیت و کمیت آران‌ای تخلیص شده به‌ترتیب با انجام الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵٪ و اندازه‌گیری نسبت جذب در ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر با دستگاه نانودراپ مورد بررسی قرار گرفت (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). برای ساخت دی‌ان‌ای مکمل، ۲ میکروگرم از آران‌ای استخراجی به‌عنوان الگو با استفاده از کیت مربوطه (Thermo scientific, USA) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده به دی‌ان‌ای مکمل تبدیل و در دمای ۲۰ºC – نگه‌داری شد. طراحی آغازگر مناسب برای ژن پروتئین شوک حرارتی و ژن مرجع بتااکتین براساس توالی موجود برای قزل‌آلای رنگین‌کمان در بانک ژن ان‌سی‌بی‌آی و با استفاده از نرم‌افزار پرایمر۳ (نسخه۴) (http://bioinfo.ut.ee/primer3/) صورت پذیرفت و با انجام بلاست مورد تایید قرار گرفت. توالی‌های آغازگرهای پیش‌رو و پس‌رو ژن مذکور و ژن مرجع بتااکتین در جدول ۱ نشان داده شده است. آغازگرهای موردنظر توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی سنتز شدند. پی‌سی‌آر کمی با استفاده از مسترمیکس (۵×HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus, no ROX; Solis BioDyne Inc.) و دستگاه ریل تایم (Qiagen, Germany) و آغازگرهای مذکور انجام شد. پی‌سی‌آر کمی شامل مرحله واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ ºC به‌مدت ۱۰ دقیقه و سپس، انجام ۴۰ چرخه تکثیر شامل واسرشت‌سازی در ۹۵ ºC به‌مدت ۲۰ ثانیه، اتصال در ۶۰ ºC به‌مدت ۲۰ ثانیه و بسط در ۷۲ ºC به‌مدت ۲۰ ثانیه و یک مرحله توقف انجام شد.

جدول ۱: آغازگرهای مورد استفاده برای مطالعه پی‌سی‌آر کمی

ژن	پسرو (۳⟸۵)	پیشرو (۳⟹۵)
HSP70	TTGAAGTAGGCAGGGACTGTG	GAACAAATCCTTCAACCCAGAG
β-ACT	GGCACCCTAATCACCTCTGAC	CTTGCAGCCTTAAGTCTTGGTC

قرائت میزان نور فلئورسانس در انتهای هر چرخه توسط دستگاه ریل تایم انجام و میزان بیان ژن در دستگاه به‌صورت سی‌تی ثبت شد. برای آنالیز مقدار بیان نسبی ژن هدف HSP۷۰ نسبت به ژن مرجع بتااکتین برحسب سی‌تی حاصله توسط نرم‌افزار کیو پی‌سی‌آر، از فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ (Livak و Schmittgen، ۲۰۰۱) گردید که ΔΔCT برابر با تفاضل (سی‌تی ژن هدف در تیمار آزمایشی منهای سی‌تی ژن مرجع در تیمار آزمایشی) و (سی‌تی ژن هدف در تیمار شاهد منهای سی‌تی ژن کالیبراتور در تیمار شاهد) می‌باشد.ژن بتااکتین که به‌عنوان ژن مرجع مورد استفاده قرار گرفت، همان کالیبراتور در فرمول فوق می‌باشد.

آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون t-student مورد مقایسه قرار گرفتند. داده‌های آزمایش به‌صورت خطای استاندارد ± میانگین نشان داده شده‌اند. برای پردازش داده‌ها از نرم‌افزار اکسل وجهت انجام آنالیز و مقایسه میانگین‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد.

نتایج

میانگین فاکتورهای فیزیکوشیمیایی اندازه‌گیری شده برای آب استخرهای پرورشی در دو تراکم مورد آزمون، اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. میانگین دما طی دوره یک‌ماهه آزمایش ۱۴±۰/۳ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۷/۷±۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر، پی‌اچ ۷/۲±۰/۱، آمونیاک یونیزه نشده ۰/۰۰۲>میلی‌گرم بر لیتر و هدایت الکتریکی ۶۹۰±۱۵ میکروموس بر سانتی‌متر بود. مرگ و میر ماهیان طی مدت ۶۰ روزه آزمایش به‌ترتیب ۱/۵ و ۲/۵ درصد در دو تراکم متوسط و بالا بود. زیست‌سنجی مرتبط با وزن و طول ماهیان در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج حاصله کاهش معنی‌دار میانگین وزن نهایی ماهیان را در تیمار تراکم بالا نسبت به تیمار تراکم متوسط نشان می‌دهد، به‌طوری که میانگین وزنی به‌میزان ۶/۲٪ در پایان آزمایش کاهش نشان داد (p<۰/۰۵). نتایج حاصل از زیست‌سنجی طول کل، چنگالی و استاندارد، اختلاف معنی‌داری بین دو تیمار تراکمی نشان نداد (p>۰/۰۵). هم‌چنین، اختلاف طول نسبی باله‌ها به‌رغم کاهش ناچیز در تیمار تراکم بالا (به‌جز افزایش اندک در باله سینه‌ای) از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵، جدول ۳). برخی از پارامترهای مرتبط با رشد ماهیان مورد محاسبه در این مطالعه، در جدول ۴ نشان داده شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود در پایان نمونه‌برداری، درصد افزایش وزن، افزایش وزن روزانه، نرخ رشد ویژه و ضریب رشد حرارتی کاهش معنی‌داری را طی افزایش تراکم نشان داد (p<۰/۰۵). اما ضریب چاقی فولتون در دو تیمار تراکمی مورد آزمون اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (p>۰/۰۵). افزایش تراکم نگه‌داری به‌میزان حدود ۸۴٪، موجب افزایش ضریب تغییرات وزنی به میزان ۱۲/۵٪ گردید (p<۰/۰۵). هم‌چنین، ضریب تبدیل غذایی در تیمار تراکم بالا افزایش معنی‌داری را در مقایسه با تراکم متوسط نشان داد (p<۰/۰۵، جدول ۳). تغییرات مقادیر گلوکز و هورمون کورتیزول پلاسما در ماهیان دو تیمار تراکمی، فاقد هرگونه اختلاف معنی‌دار می‌باشد (p>۰/۰۵، شکل ۱ الف و ب). نتایج حاصله از آزمایش، نشان‌دهنده

www.SID.ir

Archive of SID

افزایش غلظت هورمون کورتیزول پلاسمای خون در تیمار تراکم بالا نسبت به تیمار تراکم متوسط است ولی این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد($p>0/05$). نتایج حاصل از بررسی بیان نسبی ام‌آران‌ای ژن HSP۷۰ در عضله سفید ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان جوان در شکل ۲ نشان داده شده است. بیان ژن HSP۷۰ طی ۶۰ روز نگه‌داری ماهیان در تراکم بالا، افزایش معنی‌داری را نسبت به تیمار تراکم متوسط نشان داد به‌طوری‌که نسبت بیان به میزان ۲/۹ برابر افزایش داشت ($p<0/05$، شکل ۲).

جدول ۲: میانگین وزن نهایی (گرم)، میانگین طول نهایی کل، چنگالی و استاندارد (سانتی‌متر) قزل‌آلای رنگین‌کمان جوان در دو تراکم نگه‌داری متوسط و بالا

سیستم باز	وزن نهایی	طول کل نهایی	طول چنگالی نهایی	طول استاندارد نهایی
تراکم متوسط	۱۰/۵۱±۶۷۷/۴۴ [a]	۰/۲۲±۳۸/۲۶ [a]	۰/۲۴±۳۷/۸۱ [a]	۰/۲۴±۳۵/۳۱ [a]
تراکم بالا	۷/۶۱±۶۳۵/۱۵ [b]	۰/۲۵±۳۸/۴۱ [a]	۰/۲۷±۳۷/۲۱ [a]	۰/۲۱±۳۵/۶۲ [a]

داده‌های ارائه شده خطای استاندارد ± میانگین می‌باشد. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین دو تیمار در روز نمونه‌برداری می‌باشد ($p<0/05$).

جدول ۳: طول نسبی باله‌های سینه‌ای، شکمی، مخرجی، پشتی و دمی قزل‌آلای رنگین‌کمان جوان در دو تراکم نگه‌داری متوسط و بالا

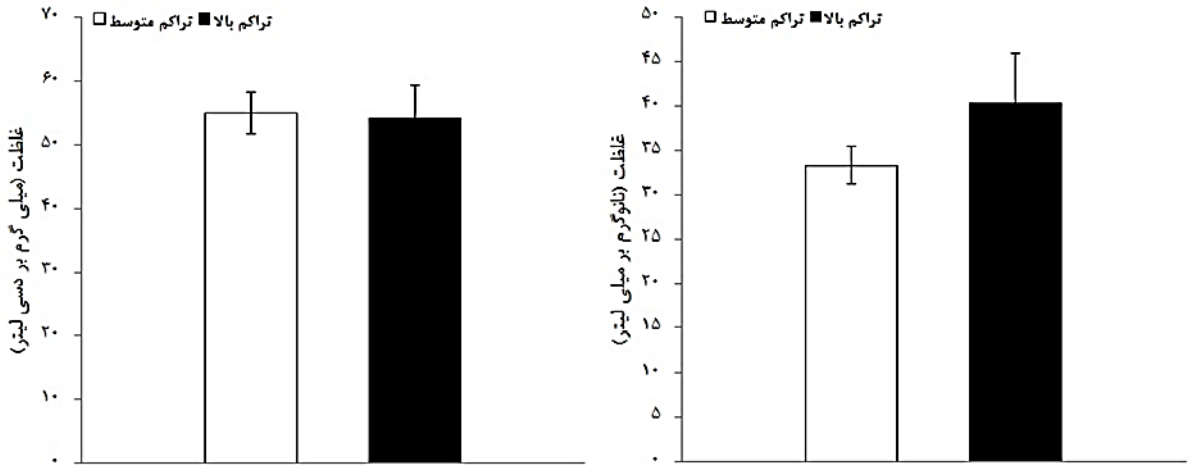
سیستم باز	باله سینه‌ای	باله شکمی	باله مخرجی	باله پشتی	باله دمی
تراکم متوسط	۹/۴۶±۰/۲۹	۸/۸۳±۰/۲۹	۹/۴۹±۰/۳۸	۷/۴۲±۰/۴۸	۷/۷۲±۰/۱۳
تراکم بالا	۹/۶۱±۰/۱۸	۸/۶۱±۰/۲۹	۹/۲۷±۰/۳۶	۷/۱۷±۰/۴۱	۷/۵۱±۰/۲۸

داده‌های ارائه شده خطای استاندارد ± میانگین می‌باشد.

جدول ۴: میزان افزایش وزن (٪)، افزایش وزن روزانه (گرم)، نرخ رشد ویژه (٪)، ضریب رشد حرارتی (٪)، ضریب چاقی فولتون (٪)، ضریب تغییرات وزنی (گرم) و ضریب تبدیل غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان جوان در دو تراکم نگهداری متوسط و بالا

سیستم باز	افزایش وزن (٪)	افزایش وزن روزانه (گرم)	نرخ رشد ویژه (٪)	ضریب رشد حرارتی(٪)	ضریب چاقی فولتون (٪)	ضریب تغییرات وزنی (گرم)	ضریب تبدیل غذایی
تراکم متوسط	۳/۸۸±۷۴/۶۵ [a]	۰/۲۱±۴/۶۹ [a]	۰/۰۳±۰/۸۷ [a]	۰/۴۸±۱۱/۱۸ [a]	۰/۰۱±۱/۲۴ [a]	۰/۲۲±۱۴ [b]	۱/۰۳ [b]
تراکم بالا	۲/۶۹±۶۰/۶۹ [b]	۰/۱۴±۳/۹ [b]	۰/۰۳±۰/۷۶ [b]	۰/۳۸±۹/۶۱ [b]	۰/۰۲±۱/۲۳ [a]	۰/۱۹±۱۶ [a]	۱/۱۵ [a]

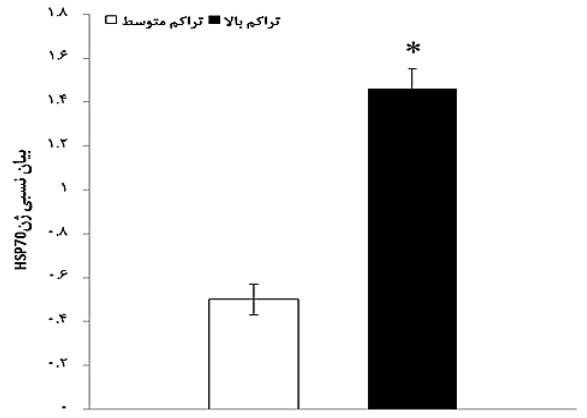
داده‌های ارائه شده خطای استاندارد ± میانگین می‌باشد. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین دو تیمار در روز نمونه‌برداری می‌باشد ($p<0/05$).



شکل ۱: تغییرات مقادیر گلوکز (الف) و کورتیزول (ب) پلاسما (خطای استاندارد ± میانگین، n=۵-۶) در قزل‌آلای رنگین کمان (*O. mykiss*) جوان در دو تراکم نگه‌داری متوسط و بالا

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲: بیان نسبی ام‌آران‌ای ژن HSP۷۰ عضله سفید (خطای استاندارد ± میانگین، n=۵-۶) در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) جوان در دو تراکم نگه‌داری متوسط و بالا (علامت* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین دو تیمار در روز نمونه‌برداری می‌باشد (p<۰/۰۵)

بحث

طی این مطالعه، افزایش تراکم نگه‌داری در سنین پرواری در قزل‌آلای رنگین کمان جوان، کاهش متوسط وزن را بدون تغییر طول ماهیان و تغییر طول نسبی باله‌ها موجب شد که کاهش برخی از پارامترهای محاسبه شده مرتبط با رشد نیز در این راستا می‌باشد. هم‌چنین افزایش تراکم نگه‌داری، اثری بر مقادیر فاکتورهای بیوشیمیایی مرتبط با استرس نداشت. اما افزایش تراکم نگه‌داری باعث افزایش مقادیر ام‌آران‌ای ژن مرتبط با استرس HSP۷۰ در عضله ماهیچه گردید. اگرچه یکی از استراتژی‌های مفید در جهت افزایش تولید ماهی به‌ازای واحد حجم فضای پرورشی، افزایش تراکم نگه‌داری می‌باشد ولی اثرات افزایش تراکم به‌خوبی درک نشده است. در بیش‌تر مواقع، در گونه‌های تراکم‌پذیری هم‌چون قزل‌آلای رنگین کمان، تغییرات مشاهده شده حین افزایش تراکم، به تغییر عوامل کیفی آب نسبت داده می‌شود (Ellis و همکاران، ۲۰۰۲). در بسیاری از گونه‌های ماهیان، کاهش کیفیت آب، منجر به کاهش در مصرف غذا، رشد و نقص عملکردهای فیزیولوژیک می‌شود (Person-Le Ruyet و همکاران، ۲۰۰۸). به‌همین منظور، در این مطالعه سعی شد با رعایت تراکم بارگذاری یکسان بین دو تیمار و استفاده از استخرهای هشت ضلعی با قابلیت خودپالایی بالا، این مورد به حداقل رسانده شود و شرایط پرورشی بهینه‌ای حین آزمایش تراکم فراهم گردد. هم‌چنین، باتوجه به این‌که طی دوره پرورشی غالباً تراکم نگه‌داری بالا در اواخر دوران پرورشی و در سنین جوانی یا آغاز بلوغ مشاهده می‌شود و از طرفی، با توجه به تفاوت‌های ذاتی در پاسخ به استرس تراکم با تغییر سن (Bagley و همکاران، ۱۹۹۴) و تمرکز بیش‌تر مطالعات پیشین بر سنین انگشت‌قدی و نوجوانی، ماهی جوان انتخاب گردید. افزایش تراکم نگه‌داری به‌میزان ۸۴٪ در این مطالعه، موجب کاهش ۶/۲٪ متوسط وزن کل ماهیان طی دوره ۶۰ روزه شد ولی تغییر معنی‌داری در طول‌های مورد اندازه‌گیری مشاهده نگردید. به‌طورکلی، کاهش رشد به‌عنوان شاخص مناسبی برای استرس مزمن درنظر گرفته می‌شود (Valenzuela و همکاران، ۲۰۱۷). افزایش تراکم نگه‌داری در قزل‌آلا، موجب کاهش رشد می‌شود (Ellis و همکاران، ۲۰۰۲ ؛ Suárez و همکاران، ۲۰۱۵). Naderi و همکاران (۲۰۱۷الف) با آزمایش ۶۰ روزه دو تراکم ۲۰ و ۸۰ کیلوگرم بر مترمکعب در قزل آلای رنگین کمان، کاهش معنی‌دار وزن نهایی، درصد افزایش وزن، نرخ رشد ویژه، مقدار خوراک‌گیری و ضریب تبدیل غذایی را در تیمار ۲۰ نسبت به تراکم ۸۰ نشان دادند. این کاهش رشد در تراکم‌های بالای پرورشی، غالباً مرتبط با کاهش مصرف غذا دانسته می‌شود (Boujard و همکاران، ۲۰۰۲). در این مطالعه، با توجه به انجام غذادهی متناسب بازی‌توده پرورشی و هم‌چنین، خورده‌شدن کل غذای توزیع شده توسط ماهیان، مقدار غذای مصرفی نمی‌تواند دلیلی بر کاهش وزن مشاهده شده باشد. هرچند، کاهش اشتها برای دریافت غذای اضافی (بیش‌تر از مقدار محاسبه شده توسط جدول غذادهی اسکرتینگ) در تیمار تراکم بالا به‌ویژه در وعده غذایی عصر مشهود بود. کاهش میزان اشتها و سطح سیری در تراکم بالا احتمالا ریشه عصبی- هورمونی دارد چراکه افزایش فعالیت سراتونرژیک مغزی در قزل‌آلا طی تجربه تراکم بالا نشان داده شده است (Laursen و همکاران، ۲۰۱۳). بنابراین، افزایش نیازهای متابولیکی به جهت تغییر در متابولیسم ماهی طی استرس مزمن تراکم نگه‌داری و اختلالات تغذیه‌ای هم‌چون کاهش راندمان غذایی (با توجه به افزایش ضریب تبدیل غذایی در تراکم بالا در این مطالعه) می‌تواند دلیلی بر کاهش وزن‌گیری ماهیان طی دوره ۶۰ روزه باشد. مقابله با شرایط استرسی در کل، نیاز ماهی به انرژی را می‌افزاید که برای رشد غیرقابل جبران است (Wendelaar Bonga، ۱۹۹۷).

تراکم نگه‌داری بر خوردگی باله در قزل‌آلای رنگین کمان اثر دارد (Ellis و همکاران، ۲۰۰۲؛ North و همکاران، ۲۰۰۶) که می‌تواند ناشی از سایيدگی، رفتار تهاجمی و کاهش کیفیت آب باشد (Ellis و همکاران، ۲۰۰۲؛ North و همکاران، ۲۰۰۶؛ Laursen و همکاران، ۲۰۱۳). باله‌های قزل‌آلاهای تیمار تراکمی ۴۰ و ۸۰ کیلوگرم بر مترمکعب، کوتاه‌تر از تیمار ۱۰ کیلوگرم در مترمکعب بود (North و همکاران، ۲۰۰۶). در مقابل، عدم وجود تغییر معنی‌دار در مطالعه حاضر هم‌خوان با نتایج Laursen و همکاران (۲۰۱۳) است که خوردگی در هیچ‌کدام از باله‌ها (به‌جز باله دمی و باله شکمی سمت چپ) را با افزایش تراکم تا ۱۴۰ کیلوگرم بر مترمکعب مشاهده ننمودند. با توجه به تراکم بارگذاری

www.SID.ir

Archive of SID

یکسان در این مطالعه، کیفیت بالای آب کارگاه و عدم به‌کارگیری تراکم‌های خیلی بالا و هم‌چنین، شرایط هیدرولیکی مناسب استخرهای هشت ضلعی می‌تواند دلیل عدم مشاهده خوردگی باله با افزایش تراکم تا حد ۴۴ کیلوگرم بر مترمکعب باشد.

گلوکز و کورتیزول خون به‌عنوان شاخص پاسخ استرسی، تغییر معنی‌داری را حین افزایش ۶۰ روزه تراکم نگه‌داری نشان ندادند. تغییرات گلوکز و کورتیزول غالبا طی ساعات و روزهای نخست پاسخ استرسی مشاهده می‌شود (Zahedi و همکاران، ۲۰۱۳، ۲۰۱۴) که غالباً با گذشت زمان به جهت مکانیزم‌های هموستازی و تطابق محور هیپوتالاموس- هیپوفیز - غده بین‌کلیوی به سطوح اولیه بر می‌گردد (Naderi و همکاران، ۲۰۱۷ب). به‌همین جهت، کورتیزول نشانگر زیستی مناسبی برای مطالعه پاسخ استرسی طولانی مدت هم‌چون مواجهه با تراکم نگه‌داری بالا نمی‌باشد (Kebus و همکاران، ۱۹۹۲؛ Ellis و همکاران، ۲۰۰۲؛ Trenzado و همکاران، ۲۰۰۷؛ Naderi و همکاران، ۲۰۱۷الف و ب).

افزایش تراکم نگه‌داری، افزایش معنی‌دار مقادیر ام‌آران‌ای HSP۷۰ ماهیچه‌ای را پس از گذشت ۶۰ روز در تیمار تراکم بالا نسبت به تراکم متوسط موجب شد. اثر تراکم نگه‌داری بر القاء بیان HSP۷۰ در سطح ام‌آران‌ای و پروتئین به‌اثبات رسیده است (Gornati و همکاران، ۲۰۰۴؛ Küçükbay و همکاران، ۲۰۰۹؛ Naderi و همکاران، ۲۰۱۷الف). HSP۷۰ در عملکردهای متفاوتی هم‌چون تعمیر و حفاظت از پروتئین‌های عضلانی و هدایت پروتئین‌های ناقص به مسیر انهدام در شرایط استرسی نقش دارد (Basu و همکاران، ۲۰۰۲). مقادیر بیان ام‌اران‌ای ژن HSP۷۰ به‌طور معنی‌داری با افزایش تراکم ماهی به ۲۵ و ۳۰ کیلوگرم بر متر مربع افزایش می‌یابد و این افزایش، مرتبط با استرس حاصله در اثر تراکم دانسته شد (Aksakal و همکاران، ۲۰۱۱). بیان ژن HSP۷۰ در بین سه تراکم ۱۰، ۸۰ و ۱۰۰ کیلوگرم بر مترمکعب در باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*)، افزایش معنی‌داری را فقط در بالاترین تراکم از خود نشان داد (Gornati و همکاران، ۲۰۰۴). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که نشانگر مولکولی انتخاب شده، حتی با گذشت ۶۰ روز نسبت به تیمار با تراکم پایین‌تر، افزایش دارد که نشان‌دهنده حفظ مسیر سیگنالدهی HSP۷۰ است. هم‌چنین، نقش HSP۷۰ در پاسخ ایمنی با توجه به ایجاد استرس در ماهی، نباید از نظر دور داشته شود (Yarahmadi و همکاران، ۲۰۱۶).

به‌طور خلاصه، تراکم نگه‌داری ۴۴ کیلوگرم بر مترمکعب، نسبت به تیمار ۲۴ کیلوگرم بر متر مکعب، کاهش اندک عملکرد رشد ماهیان را با گذشت زمان ایجاد می‌کند که احتمالاً ناشی از اختلالات تغذیه‌ای و افزایش نیازهای انرژیکی حین افزایش تراکم می‌باشد. هم‌چنین، اگرچه مقادیر گلوکز و کورتیزول پلاسما تغییر معنی‌داری را بین دو تراکم مورد آزمون نشان نمی‌دهد ولی افزایش بیان ژن HSP۷۰، ایجاد شرایط استرس مزمن را تایید می‌کند که با توجه به تغییرات مشاهده شده حین افزایش تراکم در عملکرد رشد قابل تایید است. در مدیریت تولید ماهی در استخرها، ایجاد راهکارهایی برای افزایش توان خوراک‌گیری، بهبود راندمان غذایی و تقویت سیستم ایمنی برای مقابله با استرس مزمن در زمان تجربه تراکم‌های نگه‌داری بالا به جهت نیل به شرایط بهینه تولیدی ضروری می‌نماید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از جناب آقایان دکتر بهزاد محمدی و مهندس شاه‌ولی (آزمایشگاه دامپزشکی ثامن)، دکتر محسن نواری، دکتر یاسر سلحشور و محسن زاده (دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه)، مهندس محمدرضا مهدیزاده و مهندس خسرو شیرقاضی (شیلات خراسان رضوی) و مهندس محمدرضا عباسپور (جهادکشاورزی تربت‌حیدریه) به جهت مساعدت‌هایی که جهت انجام این تحقیق نمودند، ابراز می‌دارند. هم‌چنین از آقایان عرفان زاهدی و امیرعباس هادوی و پرسنل زحمتکش مزارع صدف ۱ و ۲ آقایان رضاییان، فرزانه، پرهیزگار و قلی‌زاده برای کمک‌های بی‌دریغشان صمیمانه تشکر می‌گردد.

منابع

۱. **Aksakal, E.; Ekinci, D.; Erdogan, O.; Beydemir, S.; Alim, Z. and Ceyhun, S.B., 2011**. Increasing stocking density causes inhibition of metabolic–antioxidant enzymes and elevates mRNA levels of heat shock protein 70 in rainbow trout. Livestock. Sci. Vol. 141, pp: 69-75.

۲. **Bagley, M.J.; Bentley, B. and Gall, G.A., 1994.** A genetic evaluation of the influence of stocking density on the early growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, Vol. 121, No. 4, pp: 313-326.

۳. **Basu, N.; Todgham, A.E.; Ackerman, P.A.; Bibeau, M.R.; Nakano, K.; Schulte, P.M. and Iwama, G.K., 2002.** Heat shock protein genes and their functional significance in fish. Gene. Vol. 295, No. 2, pp: 173-183.

۴. **Boujard, T.; Labbe, L. and Auperin, B., 2002.** Feeding behavior, energy expenditure and growth of rainbow trout in relation to stocking density and food accessibility. Aquaculture Res. Vol. 33, No. 15, pp: 1233-1242.

۵. **Conte, F.S., 2004.** Stress and the welfare of cultured fish. Appl. Anim. Behav. Sci. Vol. 86, pp: 205-223.

۶. **Ellis, T., North, B.; Scott, A.P.; Bromage, N.R.; Porter, M. and Gadd, D., 2002.** The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. J. Fish. Biol. Vol. 61, No. 3, pp: 493-531.

۷. **Gornati, R.; Papis, E.; Rimoldi, S.; Terova, G.; Saroglia, M. and Bernardini, G., 2004.** Rearing density influences the

www.SID.ir

Archive of SID

(*Sparus aurata*) during Prolonged Crowding Stress: Differential Regulation of Adrenocorticotropin Hormone and α-Melanocyte-Stimulating Hormone Release by Corticotropin Releasing Hormone and Thyrotropin Releasing Hormone. Gen. Comp. Endocrinol. Vol. 119, pp: 152-163.

۲۲. **Suárez, M.D.; Trenzado, C.E.; García-Gallego, M.; Furné, M.; García-Mesa, S.; Domezain, A.; Alba, I. and Sanz, A., 2015.** Interaction of dietary energy levels and culture density on growth performance and metabolic and oxidative status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquac. Eng. Vol. 67, pp: 59-66.

۲۳. **Tort, L.; Sunyer, J.O.; Gomez, E. and Molinero, A., 1996.** Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. Vet. Immunol. Immunopathol. Vol. 51, pp: 179-188.

۲۴. **Trenzado, C.E.; de la Higuera, M. and Morales, A.E., 2007.** Influence of dietary vitamins E and C and HUFA on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) performance under crowding conditions. Aquaculture. Vol. 263, No. 1, pp: 249-258.

۲۵. **Valenzuela, C.A.; Zuloaga, R.; Mercado, L.; Einarsdottir, I.E.; Bjornsson, B.T.; Valdes, J.A. and Molina, A., 2017.** Chronic stress inhibits growth and induces proteolytic mechanisms through two different non-overlapping pathways in the skeletal muscle of a teleost fish. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol: Integr. Comp. Physiol. pp: ajpregu 00009.

۲۶. **Vijayan, M.M. and Leatherland, J.F., 1988.** Effect of stocking density on the growth and stress response in brook charr, *Salvelinus fontinalis*. Aquaculture. Vol. 75, pp: 159- 170.

۲۷. **Wendelaar Bonga, S.E., 1997.** The stress response in fish. Physiol. Rev. Vol. 77, pp: 591-625.

۲۸. **Yarahmadi, P.; Miandare, H.K.; Fayaz, S. and Caipang, C.M.A., 2016.** Increased stocking density causes changes in expression of selected stress-and immune-related genes, humoral innate immune parameters and stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology. Vol. 48, pp: 43-53.

۲۹. **Zahedi, S.; Mirvaghefi, A.; Rafati, M. and Mehrpoosh, M., 2013.** Cadmium accumulation and biochemical parameters in juvenile Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, upon sublethal cadmium exposure. Comp. Clin. Pathol. Vol. 22, No. 5, pp: 805-813.

۳۰. **Zahedi, S.; Mirvaghefi, A.; Rafati, M.; Rafiee, G.; Mojazi Amiri, B.; Hedayati, M.; Makhdoomi, C. and Zarei Dangesaraki, M., 2014.** The effect of sub-lethal exposure to copper and the time course of recovery in clean water on biochemical changes in juvenile fish (*Acipenser persicus*). Mar. Freshwat. Behav. Physiol. Vol. 47, No. 4, pp: 253-264.

expression of stress-related genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). Gene. Vol. 34, pp: 111- 118.

۸. **Holm, J.C.; Refstie, T. and Bø, S., 1990.** The effect of fish density and feeding regimes on individual growth rate and mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. Vol. 89, No. 3-4, pp: 225-232.

۹. **Kebus, M.J.; Collins, M.T.; Brownfield, M.S.; Amundson, C.H.; Kayes, T.B. and Malison, J.A., 1992.** Effects of rearing density on the stress response and growth of rainbow trout. J. Aquat. Anim. Health. Vol. 4, No. 1, pp: 1-6.

۱۰. **Küçükbay F.Z.; Yazlak, H.; Karaca, I.; Sahin, N.; Tuzcu, M.; Cakmak, M.N. and Sahin, K., 2009.** The effects of dietary organic or inorganic selenium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under crowding conditions. Aquaculture Nutr. Vol. 15, No. 6, pp: 569-576.

۱۱. **Laursen, D.C.; Silva, P.I.; Larsen, B.K. and Höglund, E., 2013.** High oxygen consumption rates and scale loss indicate elevated aggressive behaviour at low rearing density, while elevated brain serotonergic activity suggests chronic stress at high rearing densities in farmed rainbow trout. Physiol. Behav. Vol. 122, pp: 147-154.

۱۲. **Liu, B.; Liu, Y. and Sun, G., 2017.** Effects of stocking density on growth performance and welfare-related physiological parameters of Atlantic salmon *Salmo salar* L. in recirculating aquaculture system. Aquaculture Res. Vol. 48, No. 5, pp: 2133-2144.

۱۳. **Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-} ΔΔCT method. Methods. Vol. 25, No. 4, pp: 402-408.

۱۴. **Montserrat, N.; Gabillard, J.C.; Capilla, E.; Navarro, M.I. and Gutiérrez, J., 2007.** Role of insulin, insulin-like growth factors, and muscle regulatory factors in the compensatory growth of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). Gen. Comp. Endocrinol. Vol. 150, No. 3, pp: 462-472.

۱۵. **Naderi, M.; Keyvanshokooh, S.; Salati, A.P. and Ghaedi, A., 2017a.** Effects of chronic high stocking density on liver proteome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish. Physiol. Biochem. pp: 1-13.

۱۶. **Naderi, M.; Keyvanshokooh, S.; Salati, A.P. and Ghaedi, A., 2017b.** Effects of dietary vitamin E and selenium nanoparticles supplementation on acute stress responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) previously subjected to chronic stress. Aquaculture. Vol. 473, pp: 215-222.

۱۷. **North, B.P.; Turnbull, J.F.; Ellis, T.; Porter, M.J.; Migaud, H., Bron, J. and Bromage, N.R., 2006.** The impact of stocking density on the welfare of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. Vol. 255, No. 1, pp: 466-479.

۱۸. **Papoutsoglou, S.E.; Tziha, G.; Vrettos, X. and Athanasiou, A., 1998.** Effects of stocking density on behaviour and growth rate of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles reared in a closed circulated system. Aquac. Eng. Vol. 18, pp: 135- 144.

۱۹. **Person-Le Ruyet, J.; Labbé, L.; Le Bayon, N.; Severe, A.; Roux, A.; Delliou, H. and Quéméne, L., 2008.** Combined effects of water quality and stocking density on welfare and growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Living. Resour. Vol. 21, pp: 185-195.

۲۰. **Pickering, A.D. and Pottinger, T.G., 1987.** Poor water quality suppresses the cortisol response of salmonid fish to handling and confinement. J. Fish. Biol. Vol. 30, pp: 41-50.

۲۱. **Rotllant, J.; Balm, P.H. M.; Ruane, N.M.; Perez-Sanchez, J. and Wendelaar-Bonga, S.E., 2000.** Pituitary Proopiomelanocortin-Derived Peptides and Hypothalamus Pituitary–Interrenal Axis Activity in Gilthead Sea Bream

www.SID.ir