Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 9:13 +0330 on Sunday November 22nd 2020

دانشگاه گنبد کاووس
نشریه "پژوهش‌های ماهی شناسی کاربردی"
دوره ششم، شماره اول، بهار ۹۷
http://jair.gonbad.ac.ir

تأثیر مکمل غذایی پری‌بیوتیکی بر عملکرد رشد، فراسنجه‌های خونی و بیان ژن TGF-ß بچه‌ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)

سیما اسکندری[۱]، سیدمحمدعلی جلالی[۲]*، آذر همت‌زاده[۲]

[۱]دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
[۲]استادیار دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ ارسال: ۹۶/۵/۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۲۱

چکیده

این آزمایش به‌منظور مطالعه اثرات استفاده از دو نوع پری‌بیوتیک الف و ب (الف ترکیبی از ۱۶ درصد بتاگلوکان و ۸۰ درصد مانان‌الیگوساکارید، و ب ترکیبی از ۳۰ درصد بتاگلوکان و ۱۸درصد مانان‌الیگوساکارید) بر افزایش وزن، ضریب تبدیل خوراک، درصد زنده مانی، راندمان لاشه آماده پخت، فراسنجه‌های خونی، بیان ژن TGF-ß غده فوق کلیه و مرفولوژی روده بچه‌ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان (*O. mykiss*) انجام شد. تعداد ۱۸۰۰ قطعه بچه ماهی انگشت قد با وزن اولیه ۶ گرم، به‌طور کاملاً تصادفی در ۹ وان پلی‌اتیلن ۳۰۰ لیتری با تعداد ۲۰۰ ماهی در هر وان، تقسیم شدند. ماهی‌ها به مقدار ۳/۵ درصد توده وزن بدن به‌صورت روزانه با یکی از سه جیره آزمایشی شامل جیره شاهد فاقد پری‌بیوتیک و جیره‌های آزمایشی الف و ب به مدت ۸ هفته تغذیه شدند. جیره‌های آزمایشی الف و ب به‌ترتیب دارای مقدار ۱ و ۲ گرم در کیلوگرم پری‌بیوتیک الف و ب بودند که سطح پری‌بیوتیک هر دو جیره برابر ۰/۹۶ گرم در کیلوگرم بود. نتایج در پایان آزمایش نشان داد که عملکرد رشد ماهی‌ها تحت تأثیر مکمل‌های پری‌بیوتیکی قرار نگرفت اما راندمان لاشه آماده پخت و زنده‌مانی ماهی‌ها با تغذیه پری‌بیوتیک‌ها افزایش معنی‌دار یافت. آلبومین، پروتئین‌کل و گلبولین سرم خون ماهی‌ها در اثر تغذیه با جیره دارای پری‌بیوتیک الف و ب افزایش معنی‌دار داشت و مکمل پری‌بیوتیکی ب اثرات بیشتری را نشان داد. ترکیب پری‌بیوتیکی مورد استفاده به‌طور معنی‌داری سبب افزایش لنفوسیت‌ها و نسبت طول به ارتفاع پرز روده ماهی‌ها شد. بیان ژن TGF-ß1 غده فوق کلیه نیز در اثر تغذیه پری‌بیوتیک‌ها افزایش معنی‌دار داشت به‌طوری‌که تیمار تغذیه شده با جیره دارای پری‌بیوتیک الف موجب افزایش شدت بیان ژن در این تیمار شد. این

*نویسنده مسئول: Fish.nutritionist@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 9:13 +0330 on Sunday November 22nd 2020

پژوهش نشان داد که استفاده از مکمل غذایی پری‌بیوتیکی الف سبب بهبود ایمنی و راندمان‌لاشه ماهی قزل-آلای رنگین‌کمان انگشت‌قد شد و پاسخ فیزیولوژیکی ماهی، بر اساس ترکیب پری‌بیوتیک متفاوت خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: *O. mykiss*، **پری‌بیوتیک، زنده مانی، فراسنجه‌های فیزیولوژیکی**

مقدمه

موفقیت در آبزی پروری با بهبود ژنتیک، تغذیه و کنترل بیماری‌ها در گونه‌های پرورشی میسر شده است شاخص‌هایی مانند رشد ویژه، ضریب تبدیل خوراک و میزان مرگ و میر، نقشی کلیدی در ارزیابی یک سیستم آبزی‌پروری دارد و با کیفیت خوراک مصرفی در ارتباط است (Merrifield *et al*., 2010). ماهی‌ها به‌طور مداوم در معرض عوامل بیماری‌زا مانند باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها قرار دارند و به‌طور کلی بهبود و ارتقاء سیستم ایمنی حیوان، سبب افزایش سلامتی آن شده و در آبزی‌پروری نیز تأمین سلامت آبزی اهمیت زیادی دارد. یکی از عواملی که سبب تحریک سیستم ایمنی آبزیان می‌شود، پری‌بیوتیک‌ها هستند که از کربوهیدرات‌های غیرقابل هضمی تشکیل شده‌اند و از طریق تحریک رشد یا فعال کردن یک یا تعداد محدودی از باکتری‌هایی که در روده وجود دارند، اثرات سودمندی بر میزبان داشته و سلامتی آن را بهبود می‌بخشند (Akrami *et al*., 2009). عمده پری‌بیوتیک‌ها از پلی‌ساکاریدهایی با ساختار بتا دی‌گلوکان و مانان‌الیگوساکاریدها تشکیل شده‌اند (Cerezuela *et al*., 2008) که به‌طور گسترده در طبیعت از جمله در دانه غلاتی مثل جو و جو دوسر یافت می‌شوند. این ترکیبات در دیواره‌های سلولی قرار گرفته‌اند که عمدتاً از دیواره سلولی مخمر نانوایی (*Saccharomyces cerevisiae*) مشتق شده (Welker *et al*., 2007) و می‌تواند به انواع مختلف سلول‌های سیستم ایمنی غیراختصاصی، از جمله ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها متصل شده و به‌عنوان عامل تنظیم کننده ایمنی و تعدیل کننده پاسخ بیولوژیکی ارزیابی می‌شوند (Rufchaie *et al*., 2012). پری‌بیوتیک‌ها باعث بهبود و تعادل میکروفلور روده و افزایش مکانیسم دفاعی میزبان می‌شوند (Akrami *et al*., 2009). مهم‌ترین محصول حاصل از متابولیسم پری‌بیوتیک‌ها، اسیدهای چرب زنجیر کوتاه (نظیر استات، پروپیونات و اسید لاکتیک) هستند (David *et al*., 1999) که از طریق اپیتلیوم روده جذب می‌شوند و به‌عنوان یک منبع انرژی مهم برای میزبان تلقی شده و سبب تقویت انتروسیت‌ها و بهبود جذب مواد غذایی می‌شوند. این مواد همچنین با کاهش pH روده، شرایط مناسب برای رشد باکتری‌های اسید لاکتیک را فراهم می‌کنند (Schely and Field, 2002). در پژوهش‌های مختلف، جهت بررسی اثر پری‌بیوتیک‌ها بر ماهیان، اغلب یک نوع پری‌بیوتیک تجاری در سطوح مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته و سطح مناسب مصرف آن در جیره مشخص شده است. بطور مثال نتیجه پژوهش محمدیان و همکاران (Mohammadian *et al*.,

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 9:13 +0330 on Sunday November 22nd 2020

2015) نشان داد که از بین سطوح مختلف صفر، ۰/۵، ۱و ۱/۵ درصد پری‌بیوتیک ایمونوژن (Imunogen) در جیره غذایی ماهی شیربت، سطح ۱/۵ درصد سبب ایجاد تغییر در فلور باکتریایی دستگاه گوارش و افزایش لاکتوباسیلوس روده گردید. با استفاده از سطوح مختلف پری‌بیوتیک داینامیون (Dinamune) در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) (صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵گرم در کیلوگرم) نشان داده شد که سطح یک گرم در کیلوگرم جیره سبب بهبود ضریب تبدیل خوراک ماهی شد (Ramzani *et al*., 2014).

نتایج مطالعه آفتابگرد و همکاران (Aftabgard *et al*., 2013) نشان داد که افزودن پری‌بیوتیک ایمنواستر (Immunoster) در سطح صفر، ۲ و ۴ درصد جیره غذایی ماهی سفید دریای خزر سبب افزایش سطح ایمنی ماهی گردید و لوکوسیت‌های خون و لنفوسیت‌ها تحت تاثیر جیره‌های آزمایشی قرار گرفت. در پژوهشی دیگر لقمانی جهرمی و همکاران (Loghmani Jahromi *et al*., 2014) با بررسی سطوح صفر، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵ و ۰/۲ درصد پری‌بیوتیک ایمونوژن (Immunogen) درجیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) نشان دادند که سطح۰/۱۵ تا ۰/۲ درصد تاثیر مثبتی بر عملکرد رشد و ضریب تبدیل خوراک ماهی داشت و افزایش تعداد گلبول‌های قرمز، سفید و درصد لنفوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها در اثر تغذیه با این پری‌بیوتیک مشاهده شد.

باتوجه به تنش‌های ناشی از پرورش متراکم ماهی و نیز شیوع بیماریهای باکتریایی و ویروسی مختلف در ماهیان که سبب تلفات ماهی می‌گردد، پژوهش در زمینه بهبود کیفیت خوراک مصرفی با هدف بهبود و ارتقا ایمنی ماهی با اهمیت است. در این زمینه تعیین اثر تغذیه پری‌بیوتیک‌های مختلف و مقایسه اثر هرکدام بر ماهی به‌دلیل ترکیب و منشا متفاوت آنها اهمیت زیادی دارد. این پژوهش نیز به بررسی اثر دو نوع پری‌بیوتیک با ترکیبی که یکی دارای مانان الیگوساکارید و دیگری دارای بتاگلوکان بیشتری است انجام گرفت تا اثرات آنها بر عملکرد رشد، فراسنجه‌های سرمی و هماتولوژیکی، مورفولوژی روده و بیان ژن TGF-ß1 (Transforming Growth Factor-beta) در ماهی قزل‌آلای-رنگین‌کمان (*O. mykiss*) مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مدیریت سیستم آزمایشی: این پژوهش در پایلوت تحقیقاتی شرکت فرادانه واقع در مزرعه پرورش ماهی دشت‌آبی رستم آباد شهرستان اردل در استان چهارمحال و بختیاری به‌مدت ۱۰ هفته انجام گرفت. از بین ۴۰۰۰ قطعه ماهی پرورشی در سالن تحقیقاتی، تعداد ۱۸۰۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) با وزن اولیه ۶ گرم توزین و سپس به‌صورت تصادفی به ۹ عدد وان پلی‌اتیلنی (۲۰۰ ماهی در هر وان) به حجم ۳۰۰ لیتر واقع در سالن تقسیم شدند. ماهی‌ها برای تطابق‌پذیری با

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 9:13 +0330 on Sunday November 22nd 2020

شرایط آزمایش به‌مدت دو هفته با جیره شاهد فاقد پری‌بیوتیک تغذیه شدند. وضعیت دمای آب به‌طور روزانه ثبت گردید و در مدت آزمایش در دامنه ۱۱-۱۳ درجه سانتی‌گراد قرار داشت و ویژگی‌های آب شامل pH با میانگین ۸ و میزان اکسیژن ۶/۵ میلی‌گرم در لیتر بود. جیره آزمایشی شامل جیره شاهد (فاقد پری‌بیوتیک)، جیره دارای ترکیب پری‌بیوتیکی الف (ترکیبی از ۱۶٪ بتاگلوکان و ۸۰ درصد مانان‌الیگوساکارید) به مقدار ۱ گرم در کیلوگرم و جیره دارای ترکیب پری‌بیوتیکی ب (۳۰ درصد بتا گلوکان و ۱۸ درصد مانان‌الیگوساکارید) به مقدار ۲ گرم در کیلوگرم بود. ماهی‌ها به مدت ۸ هفته به مقدار ۳/۵ درصد وزن بدن بصورت روزانه در ۵ وعده غذایی تغذیه شدند. هر دو هفته یک بار، همراه با قطع خوراک به‌مدت ۲۴ ساعت، وزن گروهی ماهی‌های هر وان اندازه‌گیری و برای دو هفته بعدی خوراک دهی براساس توده زنده تصحیح شد. در کل دوره پرورش تلفات ماهی‌ها به‌صورت روزانه ثبت شد.

ساخت جیره‌های آزمایشی: جیره‌های آزمایشی و شاهد با استفاده از خوراک پایه اکسترود بدون روغن تهیه شده از شرکت فرادانه (SFT) آماده گردید. چون پری‌بیوتیک الف دارای۱۶ درصد بتاگلوکان و ۸۰ درصد مانان‌الیگوساکارید (مجموعا ۹۶ درصد الیگو ساکارید) و پری‌بیوتیک ب دارای ۳۰ درصد بتاگلوکان و ۱۸درصد مانان‌الیگوساکارید (مجموعا ۴۸ درصد الیگوساکارید) بود، مقدار سطح مصرف آنها در جیره‌های آزمایشی به ترتیب ۱ و ۲ گرم در کیلوگرم جیره در نظرگرفته شد تا مجموع الیگوساکارید افزوده شده به جیره الف و ب با یکدیگر برابر و به مقدار ۰/۹۶ گرم در کیلوگرم خوراک باشد. بسته به نوع جیره آزمایشی و سطح پری‌بیوتیک در جیره، پری‌بیوتیک‌های الف و ب به طور مجزا با روغن ماهی مخلوط گردید. روغن مصرفی در جیره شاهد نیز کاملا مشابه با جیره‌های آزمایشی بود ولی به آن پری‌بیوتکی اضافه نگردید. به جیره تجاری اکسترود فاقد روغن (۹۰ درصد) براساس نوع جیره که شامل جیره‌های شاهد، آزمایشی الف و ب بود به‌طور مجزا ۱۰ درصد روغن ماهی به ترتیب بدون پری‌بیوتیک، با پری‌بیوتیک الف و ب اضافه شد.

زیست سنجی و نمونه برداری: در پایان آزمایش پس از یک روز قطع خوراک دهی، ماهی‌ها با استفاده از پودر گل میخک با دوز ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر بیهوش شده و زیست‌سنجی انفرادی آن‌ها شامل اندازه‌گیری طول استاندارد با دقت ۰/۱ سانتی‌متر و وزن ماهی‌ها با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم انجام شد. سپس از هر وان ۱۰ عدد ماهی به‌صورت تصادفی انتخاب و خونگیری از ماهیان با استفاده از سرنگ از ساقه دمی صورت گرفت. پس از خون‌گیری بخشی از نمونه بلافاصله به داخل میکروتیوپ ۲ سی‌سی منتقل و بخش دیگری از خون به داخل لوله‌های دارای ماده ضد انعقاد (هپارینه) منتقل شد. پس از تشکیل لخته در میکروتیوپ‌ها، نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 9:13 +0330 on Sunday November 22nd 2020

شدند تا سرم از خون جدا شود. پس از جداسازی سرم، نمونه‌های سرم در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Ahmadian *et al*., 2015).

سنجش فاکتورهای مورد آزمایش: فراسنجه‌های خونی مانند پروتئین تام و آلبومین سرم با روش نورسنجی و استفاده از کیت‌های درمان کاو (Darman kave) و با دستگاه اسپکتوفتومتر مدل Technicon RA-1000ساخت آمریکا انجام شد. برای اندازه‌گیری پروتئین از روش بیورت (biuret) استفاده شد که در این حالت پروتئین در محیط قلیایی با یون‌های مس تشکیل یک کمپلکس لاجوردی رنگ می‌دهد که شدت رنگ ایجاد شده متناسب با مقدار پروتئین در نمونه می‌باشد. آلبومین موجود در سرم با Bromocresol Green (درpH اسیدی) یک کمپلکس رنگی سبز-آبی ایجاد می‌کند که شدت رنگ ایجاد شده متناسب با مقدار آلبومین در نمونه می‌باشد. مقدار گلوبولین سرم خون نیز با تفاضل آلبومین از پروتئین تام سرم خون محاسبه گردید (Jalali Haji-abadi *et al.*, 2010).

جهت اندازه‌گیری شاخص‌های هماتولوژی مانند هماتوکریت (PCV)، تعداد گلبول قرمز (RBC) و سفید (WBC)، شمارش افتراقی گلبول‌های سفید، غلظت هموگلوبین (Hb)، فاگوسیتوز و تعداد جرم فاگوسیتوز از نمونه خون دارای ماده ضد انعقاد استفاده شد (Nazari Farsani *et al*., 2015). شاخص اریتروسیت‌ها مانند متوسط حجم گلبول قرمز (MCV)، متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز خون (MCH) و متوسط هموگلوبین در حجم مشخص از گلبول‌های قرمز (MCHC) با استفاده از روابط زیر محاسبه شد (V´azquez and Guerrero, 2007):

$$MCV = (PCV \times 10)/RBC$$
$$MCH = (Hb \times 10)/RBC$$
$$MCHC = (Hb \times 100)/PCV$$

محاسبه شاخص‌های رشد و تغذیه

نرخ رشد ویژه (٪) = (Ln وزن نهایی (گرم)- Ln وزن اولیه (گرم)) × ۱۰۰/ دوره پرورش (روز)

افزایش وزن= وزن نهایی (گرم) – وزن اولیه (گرم)

ضریب تبدیل خوراک= خوراک مصرفی در طول دوره پرورشی (گرم) ÷ افزایش وزن ماهی (گرم)

شاخص کبدی= [وزن کبد (گرم) ÷ وزن کل بدن (گرم)] ×۱۰۰

راندمان لاشه آماده پخت= [وزن لاشه بدون اندام‌های داخلی و با سر و دم (گرم) ÷ وزن کل بدن (گرم)] ×۱۰۰

اندازه‌گیری بیان ژن: جهت بررسی بیان ژن TGF-ß1 ، از بافت فوق‌کلیه ۴ ماهی از هر وان خونگیری شد و بلافاصله در تانک ازت مایع و سپس تا شروع آزمایش به فریزر ۷۰- درجه‌سانتی‌گراد منتقل شد. برای طراحی پرایمرهای اختصاصی ژن، ابتدا توالی ژن کدکننده TGF-ß1 (ژن هدف) و توالی ژن Beta

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 9:13 +0330 on Sunday November 22nd 2020

Actin (ژن مرجع) از پایگاه داده‌ای مرکز ملی برای اطلاعات بیوتکنولوژی استخراج شد سپس با استفاده از نرم افزار Fast PCR اقدام به طراحی جفت پرایمر گردید (جدول۱). جهت استخراج RNA از بافت، تعیین غلظت و خلوص آن، کل RNA از بافت فوق کلیه ماهی‌ها با استفاده از روش پیشنهادی کیت Qiagen RNA Isolation Kit، ساخت شرکت کیاژن (تهران-ایران) استخراج گردید.

RNA به‌دست‌آمده از هر نمونه تا زمان استفاده در یخچال فریزر ۷۰- ذخیره گردید. با استفاده از دستگاه پیکودراپ (Pico200, UK) غلظت و خلوص RNA به‌دست آمده از هر نمونه تعیین گردید. برای این منظور ۳ میکرولیتر از RNA بدست آمده از هر نمونه در زمان ساخت cDNA برای تعیین غلظت و خلوص RNA مورد استفاده قرار گرفت. برای رفع آلودگی احتمالی با DNA ژنومیک، ۱ میکروگرم از RNA کل استخراج شده به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در مجاورت آنزیم DNA آز (Fermentase, GmBH, Germany) قرار گرفت. یک میکرولیتر EDTA با غلظت ۲۵ میلی‌مول به تیوب اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد روی پلیت حرارتی نگهداری شد. اولین رشته cDNA از روی RNA استخراج شده در مرحله قبل با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس (Maxima Reverse Transcriptase) از کیت ساخت cDNA (Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit) ساخت شرکت ترمو (Thermo Scientific, GmBH, Germany) تولید شد. برای بررسی کمی بیان ژن با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با کمک دستگاه StepOne Real-Time PCR System (Life Technologies, USA) و کیت SYBR® Green I PCR Master Mix همراه با رنگ زمینه‌ای ROX طبق چرخه دمایی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه و در ادامه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه برای ۴۰ چرخه انجام شد. هر تیوب ۱۰۰ میکرولیتری Real-Time PCR (MicroAmp Optical 8-Cap Strip, Life Technologies, USA و MicroAmp Fast 8-Tube Strip (0.1ml)) حاوی ۱۰ میکرولیتر مواد مورد نیاز برای واکنش qPCR بود. در نهایت به‌منظور تأیید اختصاصیت محصول تکثیر شده و عدم تشکیل پرایمر دیمر برای هر جفت پرایمر منحنی ذوب در فاصله دمایی ۹۹-۶۰ درجه سانتی‌گراد رسم شد. هر واکنش برای هر یک از نمونه‌ها دو بار انجام شد. از روش $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ($2^{-\Delta\Delta CT}$ Method) برای بررسی بیان کمی- نسبی ژن TGF-ß1 استفاده شد. نتایج ژل الکتروفورز ژنها در شکل ۱ آورده شده است.

$$\text{Relative fold change in gene expression} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

$$\Delta C_T = C_{T\ \text{target gene}} - C_{T\ \text{reference gene}}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T\ \text{test sample} - \Delta C_T\ \text{Control sample}$$

بافت‌شناسی روده: از انتهای روده ماهی پس از خونگیری، حدود یک سانتی‌متر از روده جدا و به فرمالین ۱۰ درصد منتقل و به‌مدت ۴۸ ساعت نگهداری شد. با استفاده از الکل آبگیری از نمونه‌ها انجام و با انتقال آنها به گزیلن و سپس قرار دادن در پارافین، امکان برش با استفاده از میکروتوم مهیا و

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 9:13 +0330 on Sunday November 22nd 2020

رنگ‌آمیزی و پایداری با هماتوکسیلین-ائوزین انجام شد. شاخص‌های پرز روده مانند طول، عرض، ارتفاع و ضخامت ماهیچه اندازه‌گیری و نسبت طول به ارتفاع پرزها محاسبه شد (Yarahmadi *et al*., 2016).

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده جهت همسانه‌سازی ژنTGF-ß1 و Beta Actin

پرایمر	توالی پرایمرها	اندازه قطعه ژنی مورد نظر
جفت پرایمر ژن هدف (TGF-ß1)	F: 5/- GCTCGTCACCTACGACCTC -3/ R: 5/- TGTACCGCGTCTTCACCAC -3/	۲۲۵ جفت باز (bp)
جفت پرایمر ژن مرجع (Beta Actin)	F: 5/- AGGCTGTGCTGTCCCTGTAT -3/ R: 5/- GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA -3/	۱۹۹ جفت باز (bp)

شکل ۱- نتایج ژل الکتروفورز ژنها

روش تجزیه و تحلیل آماری: آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار انجام گرفت و داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از برنامه SAS و رویه GLM تجزیه واریانس و مقایسه میانگین با آزمون چند دامنه‌ای دانکن درسطح احتمال ۰/۰۵ انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 9:13 +0330 on Sunday November 22nd 2020

نتایج

نتایج حاصل از بررسی اثر پری‌بیوتیک‌ها بر فاکتورهای رشد و عملکرد لاشه و کبد در ماهی انگشت‌قد قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که مصرف خوراک، افزایش وزن، شاخص رشد ویژه، ضریب تبدیل خوراک و شاخص وضعیت ماهی‌ها تحت تأثیر هیچکدام از پری‌بیوتیک‌ها قرار نگرفت ($p>۰/۰۵$) و افزودن پری‌بیوتیک به جیره غذایی بر وزن کبد، لاشه و وزن‌نسبی‌کبد اثر معنی‌داری نداشت ($p>۰/۰۵$) اما وزن نسبی لاشه با تغذیه هر دو ترکیب پری‌بیوتیکی الف و ب افزایش معنی‌داری یافت ($p<۰/۰۵$). درصد زنده‌مانی ماهی‌ها با تغذیه هر دو پری‌بیوتیک بهبود یافت به‌طوری‌که پری‌بیوتیک الف موجب افزایش معنی‌دار درصد زنده‌مانی ماهی‌ها شد (جدول ۲).

جدول ۲- تاثیر استفاده از ترکیب پری‌بیوتیکی بر عملکرد رشد، لاشه و کبد در ماهیان انگشت‌قد قزل‌آلای - رنگین‌کمان (*O. mykiss*)

فراسنجه	شاهد	ترکیب پری بیوتیک (الف)	ترکیب پری بیوتیک (ب)	سطح احتمال
وزن اولیه(گرم)	۶/۸۰۰±۰/۱۱۵	۶/۷۳۳±۰/۱۳۳	۶/۵۸۳±۰/۱۰۹	Ns
وزن نهایی(گرم)	۴۲/۴۱۳±۰/۶۵۳	۴۲/۹۰۴±۰/۲۳۸	۴۳/۱۹۵±۱/۶۸۰	Ns
مصرف‌خوراک (گرم /ماهی در روز)	۰/۴۵۲±۰/۰۰۸	۰/۴۴۵±۰/۰۰۵	۰/۴۳۷±۰/۰۲۶	Ns
افزایش وزن (گرم/ماهی در روز)	۰/۶۶۲±۰/۰۲۳	۰/۶۴۳±۰/۰۱۳	۰/۶۴۵±۰/۰۱۸	Ns
ضریب تبدیل خوراک	۰/۶۸۴±۰/۰۱۱	۰/۶۹۲±۰/۰۰۸	۰/۶۷۹±۰/۰۲۰	Ns
شاخص رشد ویژه	۳/۰۵۹±۰/۰۳۱	۳/۰۲۲±۰/۰۳۸	۳/۱۱۶±۰/۱۰۲	Ns
وزن کبد (گرم)	۰/۵۰۱±۰/۰۵۱	۰/۴۵۸±۰/۰۳۸	۰/۵۷۳±۰/۰۴۹	Ns
وزن لاشه (گرم)	۳۷/۷۶±۲/۱۶	۴۳/۰۷±۲/۵۲	۴۳/۵۹±۳/۳۱	Ns
وزن نسبی کبد (درصد)	۱/۱۲۷±۰/۱۲۱	۱/۰۸۱±۰/۱۰۴	۱/۲۵۷±۰/۱۱۲	Ns
راندمان لاشه آماده پخت (درصد)	۸۲/۹۳±۱/۰۱ [b]	۹۰/۸۶±۱/۶۰ [a]	۹۰/۸۹±۰/۵۲ [a]	**
شاخص وضعیت	۱/۰۹۷±۰/۰۱۴	۱/۰۸۹±۰/۰۱۵	۱/۱۱۲±۰/۰۱۳	Ns
زنده مانی (درصد)	۹۶/۳۳±۰/۷۲ [b]	۹۸/۵۰ ±۰/۵۷[a]	۹۷/۶۶±۰/۱۶ [ab]	*

حروف متفاوت بر روی اعداد (میانگین ± خطای استاندارد) هر سطر نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است.
Ns ($p<۰/۰۵$): غیرمعنی‌دار *: ($p<۰/۰۵$). **: ($p<۰/۰۱$). ***:($p<۰/۰۰۱$).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 9:13 +0330 on Sunday November 22nd 2020

نتایج تأثیر ترکیب پری‌بیوتیکی بر فاکتورهای خونی در ماهی انگشت‌قد قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) در جدول۳ نشان داده شده است. آلبومین، پروتئین کل و گلبولین سرم خون ماهی‌ها در اثر تغذیه جیره دارای پری‌بیوتیک افزایش معنی‌داری داشت که اثر ترکیب پری‌بیوتیکی ب بیشتر بود هر چند تعداد گلبول‌های سفید ماهی تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفت، اما تغذیه جیره‌های دارای پری‌بیوتیک به‌طور معنی‌داری سبب افزایش درصد لنفوسیت‌ها و کاهش درصد نوتروفیل‌ها و تعداد جرم در فاگوسیتوز شد ($p<۰/۰۵$).

جدول ۳- تأثیر استفاده از ترکیب پری‌بیوتیکی بر فراسنجه‌های خونی و هماتولوژی در ماهیان انگشت‌قد قزل-آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*)

فراسنجه	شاهد	ترکیب‌پری‌بیوتیک (الف)	ترکیب پری‌بیوتیک (ب)	سطح احتمال
تعداد گلوبول‌های قرمز (میکرولیتر/ $۱۰^۶$ ×)	۴/۱۰±۰/۲۱۶	۴/۱۲±۰/۲۰۵	۴/۷۴±۰/۲۰۶	Ns
هموگلوبین(گرم/دسی لیتر)	۱۰/۸۸۰±۰/۵۴۶	۱۱/۳۶۰±۰/۲۹۹	۱۲/۲۴۰±۰/۵۹۳	Ns
تعداد گلوبول‌های سفید (میکرولیتر/ $۱۰^۳$ ×)	۱۴۳۸۰±۱۰۱۶	۱۳۰۱۰±۶۵۶	۱۵۴۲۰±۲۲۲	Ns
نوتروفیل (درصد)	۱۹/۷۵۰±۰/۷۵۰^a	۱۴/۸۳۳±۱/۰۴۶^b	۱۴/۴۰۰±۰/۸۱۲^b	**
لنفوسیت (درصد)	۷۴/۰۰۰±۱/۳۰۳^b	۷۷/۸۳۳±۰/۹۴۵^a	۷۹/۱۶۷±۰/۸۷۲^a	***
منوسیت (درصد)	۴/۳۳۳±۰/۴۹۴	۴/۶۰۰±۰/۸۱۲	۳/۶۰۰±۰/۴۰۰	Ns
ائوزینوفیل (درصد)	۱/۸۳۳±۰/۳۰۷	۲/۰۰۰±۰/۳۶۵	۲/۲۵۰±۰/۴۷۸	Ns
فاگوسیت (درصد)	۱۵/۷۵۰±۱/۶۵۲^a	۱۱/۰۰۰±۱/۵۸۱^b	۱۳/۲۰۰±۱/۰۱۹^{ab}	*
تعداد جرم در فاگوسیتوز	۱۱/۷۵۰±۱/۱۰۸^a	۷/۲۰۰±۰/۷۳۴^b	۶/۲۰۰±۱/۱۵۷^b	**
حجم متوسط گلبولهای قرمز (میکرومترمکعب)	۱۱۶/۷۶۶±۳/۴۴۴	۱۱۴/۵۹۶±۲/۶۰۶	۱۱۷/۴۷۵±۵/۴۶۱	Ns
وزن متوسط هموگلوبین در سلول (پیکوگرم)	۲۶/۵۷۴±۰/۴۸۹	۲۶/۰۸۵±۰/۵۰۲	۲۵/۸۳۷±۰/۶۹۰	Ns
میانگین غلظت هموگلوبین سلولی (گرم/دسی لیتر)	۲۲/۷۱۵±۰/۴۲۴	۲۲/۲۳۱±۰/۲۲۹	۲۲/۱۶۷±۰/۴۰۴	Ns
آلبومین (گرم/دسی لیتر)	۱/۴۴۰±۰/۰۱۷^c	۱/۵۷۳±۰/۰۲۳^b	۱/۶۹۰±۰/۰۲۶^a	***
گلوبولین (گرم/دسی لیتر)	۱/۳۶۳±۰/۰۲۶^b	۱/۵۷۶±۰/۰۴۹^a	۱/۶۰۰±۰/۰۱۰^a	**
پروتیین کل (گرم/دسی لیتر)	۲/۸۰۳±۰/۰۱۴^c	۳/۱۵۰±۰/۰۳۰^b	۳/۲۹۰±۰/۰۱۷^a	***

حروف متفاوت بر روی اعداد (میانگین ± خطای استاندارد) هر سطر نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است.
Ns ($p<۰/۰۵$): غیرمعنی‌دار *: ($p<۰/۰۵$) **: ($p<۰/۰۱$) ***:($p<۰/۰۰۱$).

www.SID.ir

Archive of SID

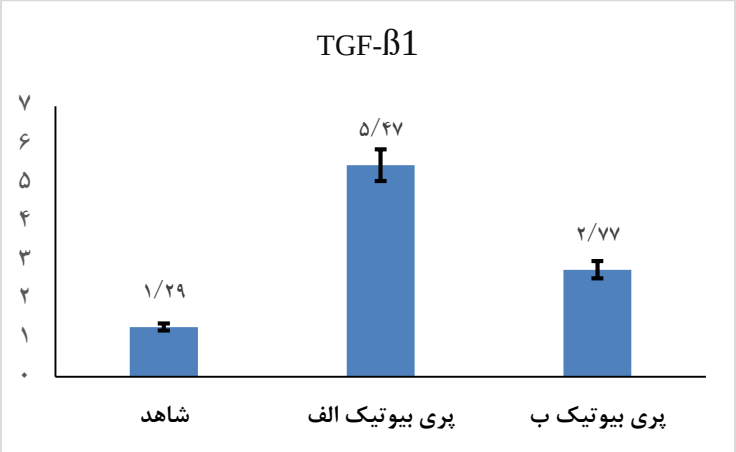
Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 9:13 +0330 on Sunday November 22nd 2020

نتایج حاصل از اثر این دو ترکیب پری‌بیوتیکی بر مرفولوژی بافت روده بچه‌ماهیان قزل‌آلای–رنگین‌کمان (*O. mykiss*) در جدول ۴ نشان داده شده است. ضخامت ماهیچه، ارتفاع پرز و طول پرز، روده تحت تاثیر پری‌بیوتیک‌های مصرفی قرار نگرفت ($p > ۰/۰۵$) اما نسبت طول به ارتفاع پرز روده ماهی‌ها در اثر هر دو ترکیب الف و ب افزایش معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). شکل ۲ به بیان ژن TGF-ß1 در ماهی انگشت‌قد قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) می‌پردازد. هر دو ترکیب الف و ب سبب افزایش شدت بیان این ژن گردید اما اثر تغذیه با پری‌بیوتیک الف بر این ژن نسبت به پری‌بیوتیک ب و شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر بود ($p<۰/۰۵$).

جدول ۴- تأثیر استفاده از ترکیب پری‌بیوتیکی بر مرفولوژی بافت روده در ماهیان انگشت‌قد قزل‌آلای رنگین-کمان (*O. mykiss*)

فراسنجه	شاهد	ترکیب‌پری‌بیوتیک (الف)	ترکیب‌پری‌بیوتیک (ب)	سطح احتمال
ضخامت ماهیچه (میکرون)	۱/۶۶۶ ±۰/۲۱۰	۱/۸۳۳±۰/۳۰۷	۲/۴۰۰±۰/۴۰۰	Ns
ارتفاع پرز (میکرون)	۴/۸۰۰±۰/۲۰۰	۴/۳۳۳±۰/۳۳۳	۴/۰۰۰±۰/۳۶۵	Ns
طول پرز (میکرون)	۴۰/۷۵۰±۴/۰۶۹	۵۱/۲۰۰±۴/۲۴۷	۴۵/۵۰۰±۴/۲۱۳	Ns
نسبت طول به ارتفاع	۸/۵۲۵±۰/۵۱۵^{b}	۱۲/۲۸۷±۰/۵۷۰ ^{a}	۱۳/۱۸۸±۱/۳۹۳ ^{a}	**

حروف متفاوت بر روی اعداد (میانگین ± خطای استاندارد) هر سطر نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است.
Ns ($p<۰/۰۵$): غیرمعنی‌دار *: ($p<۰/۰۵$). **: ($p<۰/۰۱$). ***:($p<۰/۰۰۱$).



شکل ۲- اثر پری‌بیوتیک بر بیان ژن TGF-ß1 فوق کلیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*)
(اعداد روی هر ستون میانگین نسبت بیان ژن هدف به ژن رفرنس است).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 9:13 +0330 on Sunday November 22nd 2020

بحث و نتیجه‌گیری

باتوجه به نتایج به‌دست آمده از این پژوهش مشخص شد که وزن نسبی لاشه و درصد زنده مانی بچه‌ماهیان انگشت‌قد قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) بهبود معنی‌دار یافت (جدول ۲). به‌طورکلی، استفاده از پری‌بیوتیک‌ها در جیره غذایی آزادماهیان سبب افزایش جمعیت میکروبهای مفید دستگاه گوارش می‌شود (Birkbeck and Ringo, 2005) و مشخص شده که مانان الیگوساکارید منبع تغذیه‌ای مناسب برای رشد و فعالیت باکتری‌های فلور دستگاه گوارش نظیر باکتری‌های اسیدلاکتیک، لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکترها بوده و به‌عنوان منبع انرژی توسط باکتری‌های اسید لاکتیک مصرف می‌شود (Staykov *et al*., 2007). علاوه براین، مهمترین محصول نهایی متابولیسم پری‌بیوتیک‌ها اسیدهای چرب کوتاه زنجیره هستند که از طریق اپیتلیوم روده جذب شده و علاوه بر تامین منبع انرژی برای میزبان، سبب بهبود جذب مواد مغذی می‌شوند (Wache *et al*., 2006). همچنین مطالعات بیانگر آنست که پری‌بیوتیک‌های مانان الیگوساکاریدی و بتاگلوکانی سبب تولید گلوکز کبدی شده که انرژی لازم برای سوخت و ساز بافت‌های بدن را فراهم می‌کند و با ایجاد شرایط مناسب برای فعالیت باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در روده، در نهایت سبب بهبود عملکرد روده ماهی را به دنبال دارد (Andrews *et al*., 2009). بهبود بقا و درصد زنده مانی ماهیان تغذیه شده با پری‌بیوتیک‌ها (جدول۲) به‌خصوص ترکیب پری‌بیوتیکی الف، ممکن است مربوط به بهبود وضعیت ایمنی ماهی‌ها باشد (Couso *et al*., 2003; Dalmo and Bøgwald, 2008) که با پژوهش پیشین که با ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) انجام شده است مطابقت دارد (Yarahmadi *et al*., 2016).

براساس نتایج این پژوهش، پروتئین‌های سرم خون (کل، آلبومین و گلوبولین) افزایش معنی‌دار داشت (جدول ۳) که این موضوع ممکن است مربوط به تولید ایمنوگلوبین باشد که در ماهی‌های تغذیه شده با سطح بتا گلوکان بالاتر در جیره با ترکیب پری‌بیوتیکی ب، سطح آلبومین و پروتئین کل بیشتری مشاهده شد. نتایج سایر پژوهش مشخص کرده است که بتاگلوکان‌ها سبب افزایش غلظت آنتی‌بادی‌ها در ماهیان می‌شوند (Chen and Ainsworth, 1992). افزایش معنی‌دار درصد لنفوسیت‌های خون در اثر تغذیه پری‌بیوتیک‌ها نیز مشاهده شد (جدول ۳). بتاگلوکان‌ها یک گیرنده ویژه روی گلبول‌های سفید خون را تشخیص می‌دهند، زمانی که گیرنده توسط بتاگلوکان‌ها اشغال است فعالیت گلبول‌های سفید خون در احاطه کردن، کشتن و هضم کردن باکتری‌های بیماری‌زا بیشتر می‌شود (Andrews *et al*., 2009). علاوه براین مشخص شده است که پری‌بیوتیک مانان الیگوساکارید و بتاگلوکان از طریق اتصال به گیرنده‌های شبه لکتین روی لکوسیت‌ها و افزایش تکثیر ماکروفاژها سبب تحریک سیستم ایمنی می‌شود (Cerezuela *et al*., 2008). گلبول‌های سفید در عمل فاگوسیتوز و پاسخ ایمنی نسبت به عوامل انگلی، باکتری و ویروسی و کمک به ترمیم بافت‌های صدمه دیده نقش

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 9:13 +0330 on Sunday November 22nd 2020

مهمی ایفا می‌کنند (Sakai, 1999)، بنابراین تعداد جرم فاگوسیت شونده و نیز فاگوسیتوز کاهش می‌یابد (جدول ۳).

بیان ژن TGF-ß1 در بافت فوق کلیه ماهی‌ها در اثر تغذیه با پری‌بیوتیک‌ها افزایش معنی‌دار یافت (شکل ۲). TGF-ß1 به‌عنوان یک سیتوکین نقش‌های متفاوتی مانند تنظیم تکثیر، تمایز، بقا و مرگ سلولی در شرایط مختلف فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی دارد. این ترکیب نقش حیاتی در تنظیم ایمنی ذاتی و اکتسابی ایفا می‌کند به‌طوری‌که مانع تکثیر سلول‌های T شده و تولید اینترلوکین ۲ را متوقف می‌کند. نشان داده شده است که بیان TGF-ß1 در بافت‌های مرتبط با ایمنی مانند تیموس، غده فوق کلیه و طحال ماهی به خوبی اتفاق می‌افتد (Qi *et al*., 2016). علاوه بر این TGF-ß1 در پاسخ‌های ایمنی تاثیر مثبت دارد به‌طوری‌که این ترکیب نقش‌های کلیدی در تمایز سلول‌های Th17 و Treg دارد. این خصوصیت دوگانه نه تنها در سیستم پستانداران مشاهده شده است بلکه در ماهی‌ها نیز وجود دارد به‌طوری‌که مشخص شده است که TGF-ß1 سبب ممانعت از فعال شدن ماکروفاژها شده و در مجموع قادر به کاهش اما تحریک فعالیت انفجار تنفسی ماکروفاژها در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) می‌شود (Maher *et al*., 2013). در این پژوهش نیز کاهش فعالیت فاگوسیتوزی و تعداد جرم فاگوسیتوز شونده (جدول ۳) همراه با تغذیه پری‌بیوتیک‌ها که افزایش معنی‌دار بیان ژن TGF-ß1 را به دنبال داشت (شکل ۲) مشاهده شد.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که نسبت طول به ارتفاع پرز روده در ماهی‌های تغذیه شده با ترکیبات پری‌بیوتیکی مصرفی بیشتر بود (جدول ۴). به‌نظر می‌رسد تاثیر پری‌بیوتیک‌ها بر این نسبت به علت جلوگیری مانان الیگوساکارید از تجمع باکتری‌های بیماری‌زا در روده به دلیل تولید ترکیبات ضد باکتریایی باشد. چسبیدن باکتری‌های مضر به روده نقش مهمی در تشکیل کلونی و بیماری‌زایی دارد. سلول‌های موکوسی اپیتلیال روده در برابر اتصال باکتری‌ها دارای مکانیسم‌های دفاعی شامل ترشح موکوس، در برگرفتن باکتری‌ها و فعالیت موسین هستند (Bavington *et al*., 2004)؛ بنابراین با تغذیه پری‌بیوتیک‌ها افزایش سطح جذبی همراه با افزایش نسبت طول به ارتفاع پرز ممکن است ایجاد شود.

در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از ترکیب پری‌بیوتیک داینامیون و ایمونوژن در جیره غذایی سبب بهبود ایمنی، زنده مانی و راندمان لاشه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) انگشت‌قد می‌شود و با تغییر فراسنجه‌های خونی مانند پروتئین کل، لنفوسیت‌ها، فاگوسیتوز و نیز اثر بر پرزهای روده و همچنین افزایش شدت بیان ژن TGF-ß1 در فوق کلیه اثرات فیزیولوژیکی و ایمنولوژیکی خود را سبب می‌شوند که البته اثر آنها تا حدودی به ترکیب پری‌بیوتیک مصرفی بستگی دارد.

منابع

Aftabgard M., Zamini A.A., Ershad Langroudi H., Miralami N. 2013. The study of Immunoster prebiotic effects on biometric factors with emphasis on weight and

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 9:13 +0330 on Sunday November 22nd 2020

length and differential specification of leukocytes in Caspian Sea *Rutilus kutum* fingerlings. Journal of Animal Research, 26: 245-254.

Ahmadian A., Jalali S.M.A., Pourreza J. 2015. Effect of oil source and dietary supplements of L-carnitine and ractopamine on growth performance and some blood biochemical parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Iranian Scientific Fisheries Journal, 24: 109-120. (In Persian).

Akrami R., Ghelichi A., Manuchehri H. 2009. Effect of dietary inulin as prebiotic on growth performance and survival of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Research in Marine Sciences and Technology, 4: 1-9.

Andrews S.R., Sahu N.P., Pal A.K., Kumar S. 2009. Hematological modulation and growth of *Labeo rohita* fingerlings: effect of dietary mannan oligosaccharide, yeast extract, protein hydrolysate and chlorella. Aquaculture Research, 41: 61-69.

Bavington C.D., Lever R., Mulloy B., Grundy M.M., Page C.P., Richardson N. V., McKenzie J.D. 2004. Anti-adhesive glycoproteins in echinoderm mucus secretions. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 139: 607-617.

Birkbeck T.H., Ringo E. 2005. Pathogenesis and the gastrointestinal tract of growing fish. In: Holzapfel, W., Naughton, P. (Eds.), Microbial Ecology in Growing Animal. Elsevier, Edinburgh, UK, pp: 208–234.

Cerezuela R., Cuesta A., Meseguer J., Esteban A. 2008. Effect of inulin on gilthead Seabream (*Sparus aurata*) innate immune parameters. Fish Shellfish Immunology, 24: 663 668.

Chen D., Ainsworth A.J. 1992. Glucan administration potentials immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafineque. Journal of Fish Disease, 15: 295-304.

Couso N., Castro R., Magarinas B., Obach A., Lamas J. 2003. Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. Aquaculture, 219: 99-109.

Dalmo RA., Bøgwald J. 2008. Beta-glucans as conductors of immune symphonies. Fish Shellfish Immunology, 25: 384-96.

David J.A., Jenkiss C.W.C., Vladimir V. 1999. Inulin, oligofructose and intestinal function. Journal of Nutrition, 129: 1431-1433.

Loghmani Jahromi V., Keyvanshokooh S., Salati A.P., Pashazanoosi H. 2014. Effects of Dietary Immunogen Prebiotic on Growth, Hematological Indices and Proximate Composition of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Oceanography, 5: 11-19.

Jalali Haji-abadi S.M.A., Mahboobi-sofiani N., Sadegi A.A., Chamani M., Riazi, G.H., 2010. Effects of supplemental dietary L-carnitine and ractopamin on the performance of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture Research, 103: 1582-1591.

Maher T., Costa M.M., González Vecino J.L., Wadsworth S., Martin S., Wang T., Secombes C.J. 2013. Transforming growth factor-ß1: A second TGF-ß1 paralogue in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) that has a lower

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 9:13 +0330 on Sunday November 22nd 2020

constitutive expression but is more responsive to immune stimulation. Fish Shellfish Immunology, 34: 420-432.

Merrifield D.L., Dimitroglou A., Foey A., Davies S.J., Baker R.R., Bøgwald J., Castex M., Ringø E. 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. Aquaculture, 302: 1–18.

Mohammadian T., Rohanizade S., Alishahi M., Alizade P., Abdi E. 2015. Studying the effect of Immunogen on microflora of intestine and carcass composition of Barbus Grypus. Veterinary Journal, 1: 2-9.

Nazari Farsani M., Jalali S.M.A., Jafarian Dehkordi M. 2015. Evaluation the meat composition and immunity parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed by dietary different oil sources, l-carnitine and ractopamine supplement, ARPN Journal of Agricultural and Biological Science, 10: 108-115.

Qi P., Xie C., Guo B., Wu C. 2016. Dissecting the role of transforming growth factor-β1 in topmouth culter immunobiological activity: a fundamental functional analysis. Scientific Reports, 6: 271-279.

Ramzani S., Soltani M., Gholipourkanani H. 2014. Influence of Dietary Dinamune® on Growth Performance and Lysozyme Activity in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fry. Agriculture Technology and Biological Sciences, 11: 865-869.

Rufchaie R., Hoseinifar S.H., Sayad Borani M., Maghsodie Kohan H., Zamini A.A., Faeed M. 2012. The effects of glucan on hema tological parameters, immune response and intestinal microbiota of *Rutilus frisii kutum* fry . Iranian Scientific Fisheries Journal, 3: 73- 84. (In Persian).

Sakai M. 1999. Current research status of fish Imunostimulants. Aquaculture, 172:63 92.

Schely P.D., Feild C.J. 2002. The immuneenhancing effects of dietary fibers and prebiotics. British Journal Nutrition, 87: 227-230.

Staykov Y., Spring P., Denev S., Sweetman J. 2007. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture International, 15:153-161.

V´azquez G., Guerrero G.A. 2007. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). Tissue and Cell, 39: 151–160.

Wache Y., Auffray F., Gatesoupe F.J., Zambonino J., Gayet V., Labbe L., Quentel C. 2006. Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss* fry. Aquaculture, 258: 470–478.

Welker T.L., Lim C., Yildirim-Aksoy M., Shelby R., Klesius P.H. 2007. Immune response and resistance to stress and *Edwardsiella intahuri* challenge in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed diets containing commercial whole-cell yeast or yeast subcomponents. Journal of the World Aquaculture Society, 38: 24-35.

Yarahmadi P., Kolangi Miandare H., Hoseinifar S.H. 2016. Haemato-immunological and serum biochemical parameters, intestinal histomorphology and growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed dietary fermentable fibre (Vitacel®), Journale of Aquaculture Nutrition, 22: 1134–1142.

www.SID.ir