Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 11:09 +0430 on Wednesday July 17th 2019

دانشگاه گنبد کاووس
نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"
دوره هفتم، شماره دوم، تابستان ۹۸
http://jair.gonbad.ac.ir

اثرات سولفات‌روی ($ZnSO_4$) در جیره غذایی بر عملکرد رشد و بیان ژن فاکتور شبه انسولینی رشد–۱ (IGF-1) در ماهی قرمز *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758)

عبدالرضا جهانبخشی[۱]، علی شعبانی[*۲]، شهاب قاضی[۳]، حامد پاک‌نژاد[۲]

[۱]دانشجوی دکتری، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
[۲]دانشیار، گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
[۳]استادیار، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

تاریخ ارسال: ۹۶/۶/۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۲۹

چکیده

تحقیق حاضر به منظور بررسی تاثیر سولفات روی ($ZnSO_4$) خوراکی بر عملکرد رشد و بیان ژن فاکتور شبه انسولینی رشد (IGF-1) در ماهی قرمز (*C. auratus*) انجام شد. ماهیان (۰/۱۰±۳/۳ گرم) با یک جیره خالص بر پایه کازئین به‌عنوان منبع پروتئینی در چهار سطح مکمل شده با سولفات روی (۰، ۲۵، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم برکیلوگرم) به مدت ۶۰ روز تغذیه شدند. برطبق نتایج، سولفات روی باعث بهبود فاکتورهای رشد گردید و ماهیان تغذیه‌شده با جیره آزمایشی دارای وزن نهایی، نرخ رشد ویژه (SGR) و وزن به‌دست آمده بیشتر و دارای ضریب تبدیل غذایی (FCR) و شاخص وضعیت (CF) پایین‌تر در مقایسه با گروه شاهد بودند. شاخص‌های رشد ماهیان تغذیه‌شده با جیره حاوی ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سولفات روی دارای اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد و دیگر گروه‌ها بودند که نشان می‌دهد تیمار مذکور دارای میزان کافی سولفات روی برای رشد این ماهی می‌باشد. ماهیان تغذیه‌شده با جیره‌های آزمایشی مکمل‌شده با ۱۵۰ میلی‌گرم برکیلوگرم سولفات روی به‌طور معنی‌داری نرخ رشد ویژه بالاتر و ضریب تبدیل غذایی پایین‌تری نسبت به گروه‌های ۰، ۲۵ و ۷۵ میلی‌گرم برکیلوگرم داشتند. همچنین نتایج نشان داد که سولفات روی به‌طور معنی‌داری سبب بیان افزایشی ژن شبه انسولینی رشد-۱ می شود. نتایج نشان داد که سولفات روی باعث تحریک هورمون سبه انسولینی رشد-۱ در مرحله رونویسی mRNA می شود.

واژه‌های کلیدی: ***C. auratus*، سولفات‌روی، فاکتور شبه انسولینی رشد (IGF-1)، شاخص‌های رشد، بیان ژن**

[*]نویسنده مسئول: ali_shabany@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 11:09 +0430 on Wednesday July 17th 2019

مقدمه

موفقیت در تمامی سیستم‌های پرورش ماهی نیازمند تغذیه مطلوب به منظور رشد مناسب، حفظ سلامت و افزایش مقاومت در برابر عوامل نامناسب محیطی نظیر انواع استرس‌ها و بیماری‌ها می‌باشد. دراین راستا مکمل‌های ویتامینی و معدنی برای بهبود رشد و سلامت بیشتر ماهیان به جیره‌های غذایی اضافه می‌گردد. نقش‌های مختلفی در رابطه با ترکیبات غذایی بیان شده است که از آن جمله می‌توان به سوخت و ساز بهتر غذا، افزایش سختی و مقاومت استخوان‌ها، تبادلات یونی و تعادل بهتر اسمزی اشاره نمود (Ghobadi *et al.*, 2013). در میان اجزای جیره توجه به مواد معدنی از مهم‌ترین موضوعات تغذیه ماهی به حساب می‌آید، زیرا باوجود اینکه در جیره به میزان کم لحاظ می‌گردند ولی بر فیزیولوژی و متابولیسم عمومی بدن بسیار مؤثرند (Ghobadi *et al.*, 2013). عنصر روی (Zinc) یکی از عناصر ضروری بدن و از نوع ریزمغذی‌هاست. این عنصر به‌علت نقش حیاتی در ترکیبات ساختاری پروتئین‌ها، فعالیت بسیاری از آنزیم‌ها، بیان ژن (رونویسی ژن و سنتز RNA)، سیستم ایمنی و نیز کوفاکتور آنزیم‌های کاتالیتی، مهم‌ترین عنصر کمیاب مورد نیاز بدن است (Chesters *et al.*, 1997). عنصر روی در اشکال مختلف وجود دارد که یکی از مهم‌ترین آن‌ها سولفات روی و اکسید روی می‌باشد که به‌صورت معدنی وجود دارند و قدرت جذب و دسترسی زیستی سولفات روی نسبت به دیگر اشکال آن بیشتر است (Marcelo *et al.*, 2004). روی موجود در جیره غذایی دارای عملکردهای متفاوتی می‌باشد که بسیاری از مطالعات انجام شده تا به امروز باتوجه به خواص درمان بیماری‌ها و ارتقاء رشد روی حیوانات مختلف از جمله خوک (Bossi *et al.*, 2001) و جوجه‌های گوشتی (Liu *et al.*, 2011) صورت گرفته است. چندین مطالعه در زمینه اثرات روی، بر رشد و اشتها در پستانداران و پرندگان انجام شده اما در آبزیان و ماهی مطالعات بسیار محدودی انجام شده است. در برخی مطالعات، حیواناتی که در غلظت‌های بالایی از رژیم غذایی اکسید روی تا ۳۰۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم تغذیه شده‌اند به‌طور قابل توجهی رشد سریع‌تری از خود نشان داده‌اند (Smith *et al.*, 1997). برخی مطالعات نشان می‌دهد محدودیت روی در جیره غذایی باعث محدود شدن رشد و کاهش مصرف خوراک می‌گردد (MacDonald, 2000). همچنین روی یکی از عناصر مورد نیاز آبزیان است که در بسیاری از سیستم‌های آنزیمی مؤثر بر متابولیسم مواد غذایی، به‌عنوان کوفاکتور عمل می‌کند. به‌عنوان مثال فعالیت آنزیم‌هایی مانند آلدولازها، پپتیدازها و فسفاتازهایی که در هضم نقش دارند، وابسته به عنصر روی است. به‌طورکلی اعمال فیزیولوژیک وابسته به روی شامل رشد، تقسیم سلولی، بلوغ جنسی، تولید مثل و تنظیم سیستم ایمنی می‌باشد. عملکرد سیستم ایمنی بدن حتی در موارد کمبود متوسط روی، دچار نقص می‌شود (Robert *et al.*, 2006). ماهی و سایر موجودات آبزی مواد معدنی از جمله فلزات را از طریق زنجیره‌های غذایی و آب در بدن خود ذخیره می‌کنند. غلظت این فلزات در بدن ماهی به

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 11:09 +0430 on Wednesday July 17th 2019

فاکتورهای زیادی مانند منبع غذایی، عوامل فصلی و شرایط محیطی بستگی دارد. روی یکی از عناصر مورد نیاز آبزیان است که در بسیاری از سیستم‌های آنزیمی مؤثر بر متابولیسم غذایی به‌عنوان کوفاکتور عمل می‌کند. همچنین این عنصر در بسیاری از فعالیت‌های متابولیکی از جمله در حفظ پوست، چشم و استخوان‌ها دخالت دارد (Kucukbay *et al.*, 2006). در سال‌های اخیر مطالعات مهمی در زمینه تأثیر مواد معدنی در جیره غذایی صورت گرفته است. در مطالعات گذشته نشان داده شد که جیره‌های غذایی حاوی روی باعث بهبود عملکرد معده‌ای-روده‌ای و فاکتورهای رشد می‌گردد (Carlson *et al.*, 2007).

عنصر روی در تمامی بافت‌های بدن یافت می‌گردد و برخلاف بسیاری از عناصر کمیاب که در کبد ذخیره می‌شوند، تمایل به انباشته‌شدن در استخوان‌ها را دارد، همچنین عنصر روی در بسیاری از فعالیت‌های متابولیکی از جمله حفظ غدد تناسلی ماهیان، پوست بدن، چشم و استخوان‌ها دخالت دارد (Kucukbay *et al*., 2006).

بسیاری از محققان به نقش روی در رشد و فیزیولوژی حیوانات اشاره کرده‌اند و بیان داشته‌اند که نقش اصلی آن در سنتز هورمون رشد می‌باشد (Maret and Krężel, 2007; Eide, 2006). سیکلار و همکاران (Siklar *et al*., 2003) بیان داشتند که اثر مثبت روی بر شاخص‌های رشد احتمالاً در نتیجه تأثیر آن بر رشد معده‌ای از طریق تحریک سنتز DNA و RNA و همچنین تقسیم سلولی می‌باشد. همچنین در مطالعاتی نشان داده شده است که استفاده از سولفات روی در جیره غذایی باعث افزایش دسترسی زیستی در روده ماهیان به روی در مقایسه با سایر اشکال روی شامل کلراید و نیترات روی می‌شود (Watanabe *et al.*, 1997).

ماهی قرمز (*C. auratus*) گونه بسیار مناسبی جهت مطالعات تولید مثلی، آندوکرینولوژی، سلولی، ایمنی‌شناسی، سم‌شناسی و مولکولی می‌باشد، زیرا از اندازه مناسبی جهت تحقیقات آزمایشگاهی برخوردار بوده و همچنین در محیط‌های آزمایشگاهی به راحتی قادر به زیست، بلوغ و تولید مثل است. در واقع از این گونه به‌عنوان مدل آزمایشگاهی استفاده می‌شود (Bjerselius *et al*., 1995).

با توجه به دلایل ذکر شده به‌نظر می‌رسد فراهم آوردن روی از طریق سطوح مناسب در جیره غذایی می‌تواند تأثیری مثبت بر رشد حیوانات داشته باشد. بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر سولفات روی بر شاخص‌های رشد و بیان ژنIGF-1 در ماهی قرمز می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در مرکز تحقیقات آبزی‌پروری شهید فضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به‌مدت ۲ ماه انجام شد. از حوضچه‌های پرورشی فایبرگلاس با ابعاد ۱×۱ متر با عمق ۵۰ سانتی‌متر به منظور سازگار نمودن و پرورش ماهیان استفاده شد. این حوضچه‌ها به میزان ۲۰۰ لیتر

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 11:09 +0430 on Wednesday July 17th 2019

آبگیری شدند و روزانه ۵۰ درصد آب آن‌ها تعویض گردید. پس از سازگاری کامل ماهیان با جیره‌های آزمایشی و شرایط پرورشی، تعداد ۴۰۰ قطعه ماهی با میانگین وزنی ۰/۱± ۳/۳ گرم و میانگین طولی ۰/۲±۳/۵ سانتی‌متر از یک مرکز تکثیر و پرورش ماهی قرمز در استان گلستان تهیه و در ۱۲ عدد حوضچه فایبرگلاس توزیع شد.

از سولفات‌روی ($ZnSO_4$) در جیره‌های غذایی در ۴ سطح، یک جیره بدون استفاده از سولفات روی (صفر میلی‌گرم برکیلوگرم غذای ماهی)، جیره دوم به میزان کمتر از سطح بهینه ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم غذای ماهی، جیره سوم سطح بهینه ۷۵ میلی‌گرم برکیلوگرم غذای ماهی و جیره چهارم دوز بالاتری از سطح بهینه ۱۵۰ میلی‌گرم برکیلوگرم در جیره غذایی استفاده شد (جدول۱). ماهیان به‌مدت دو ماه با جیره‌های آزمایشی تغذیه شدند. جیره غذایی برای ۴ تیمار آماده شد. این جیره براساس نیازهای غذایی ماهی قرمز و به‌صورت جیره خالص تهیه گردید که شامل کازئین، دکسترین، ژلاتین، سلولز، روغن، کربوکسی متیل سلولز، مکمل معدنی فاقد روی و مکمل ویتامینی بود.

جدول ۱- فرمولاسیون و ترکیب تقریبی اجزا جیره آزمایشی اثرات سولفات روی (ZnSO4) در جیره غذایی بر عملکرد رشد و بیان ژن فاکتور شبه انسولینی رشد-۱ (IGF-1) در ماهی قرمز (*C. auratus*)

تیمارهای آزمایشی / اجزای جیره(٪)	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴
کازئین	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲
ژلاتین	۸	۸	۸	۸
دکسترین	۲۸	۲۸	۲۸	۲۸
سلولز	۱۹	۱۹	۱۹	۱۹
روغن	۶	۶	۶	۶
کربوکسی متیل سلولز	۲	۲	۲	۲
[1]مکمل معدنی	۴	۴	۴	۴
[2]مکمل ویتامینه	۱	۱	۱	۱
سولفات روی (میلی‌گرم بر کیلوگرم روی)	۰	۲۵	۷۵	۱۵۰

۱- مکمل معدنی بدون سولفات‌روی(٪): سولفات آلومینیوم و پتاسیم ۰/۱۵، کلسیم دی‌هیدروژن فسفاته ۴۴/۶، کربنات کلسیم ۱۸/۱، سولفات منیزیوم ۵/۲، کلرید کبالت ۰/۰۷، کلرید پتاسیم ۱۶/۵، سیترات آهن ۱/۳، سولفات منگنز ۰/۰۷، مونوسدیم فسفات ۱۳/۶و سولفات مس ۰/۰۷. ۲- مکمل ویتامینه: تیامین هیدروکلراید، ۱۰ میلی گرم‌برکیلوگرم. ریبوفلاوین، ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم. کلسیم پنتوتنات،۴۰ میلی گرم بر کیلو گرم. نیکوتینیک اسید،۵۰ میلی‌گرم‌برکیلوگرم. پیرودوکسین هیدروکلراید،۱۰ میلی‌گرم‌برکیلوگرم. کلکلسیفرول، ۱۵۰۰ واحدبین المللی، بیوتین، ۱ میلی‌گرم‌برکیلوگرم. ویتامین B_{12}، ۰/۰۲ میلی‌گرم‌برکیلوگرم. ویتامین A، ۳۰۰۰ واحد-بین المللی، ویتامین E، ۵۰ واحد بین المللی و ویتامین C، ۲۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 11:09 +0430 on Wednesday July 17th 2019

برای آگاهی از عملکرد جیره‌های غذایی و چگونگی رشد ماهیان، در ابتدای دوره پرورش و در طول دوره پرورش هر ۱۵ روز ماهیان زیست‌سنجی شدند. برای انجام این کار تمام ماهیان موجود در حوضچه توزین و طول کل آنها نیز محاسبه گردید. براساس نتایج حاصل از زیست‌سنجی ماهیان هر یک از حوضچه‌ها، غذای روزانه هر حوضچه محاسبه شد و پس از توزین برای هر یک از تیمارها (مجموع ۳ تکرار) در پلاستیک‌های ضخیم ریخته شد و در فواصل زمانی منظم (ساعت ۹ و ۱۷) به ماهیان داده شد. تمام ماهیان به‌طور انفرادی وزن و طول کل آن‌ها نیز اندازه‌گیری گردید.

در طی دوره آزمایش شاخص‌های رشد (نرخ رشد ویژه (SGR= Specific Growth Rate)، ضریب تبدیل غذایی (FCR=Food Conversion Rate)، ضریب چاقی (CF= Condition Factor)، درصد افزایش وزن (%BWG= Body Weight Gain) و نرخ بقاء (%SR= Survival Rate) ماهیان مورد بررسی قرار گرفت (Hevroy, 2005).

۱۰۰ × {طول دوره پرورش/ (لگاریتم وزن ابتدایی- لگاریتم وزن نهایی)}= نرخ رشدویژه (٪) : رابطه (۱)

۱۰۰ × (میانگین طول استاندارد^3/میانگین وزن) = ضریب چاقی : رابطه (۲)

میانگین وزن به‌دست آمده/ میانگین غذای خورده شده = ضریب تبدیل غذایی : رابطه (۳)

وزن اولیه (میلی‌گرم) – وزن نهایی (میلی‌گرم) = افزایش وزن بدن : رابطه (۴)

۱۰۰ × تعداد ماهی نهایی/ تعداد ماهی اولیه = درصد بقاء : رابطه (۶)

جهت انجام آزمایش بیان ژن، پس از بیهوش کردن ماهیان با پودر گل میخک با غلظت یک گرم‌درلیتر، نمونه‌برداری از بافت کبد تازه از تیمارهای آزمایشی و تیمار شاهد در پایان دوره آزمایش صورت گرفت. نمونه‌ها بلافاصله با استفاده از ازت مایع (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) فریز شدند و سپس در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند.

کیفیت و کمیت RNA استخراج شده به دو روش کیفی و کمی ارزیابی شد. جهت ارزیابی کیفی و کمی از ژل الکتروفورز و اسپکتوفتومتر استفاده شد..

سنتز cDNA با مستر (master) سنتز cDNA شرکت GENET BIO (کره جنوبی) انجام شد. ۵ میکرولیتر از RNA که قبلاً آماده شده به‌همراه ۱ میکرولیتر آغازگر الیگو به تیوپ‌های جدید اضافه شد و با آب عاری از نوکلئاز به حجم ۱۰ میکرولیتر رسید. سپس روی بلوک حرارتی در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه انکوبه گردید و سپس به روی یخ انتقال داده شد و ۱۰ میکرولیتر مستر حاوی آنزیم نسخه‌بردار معکوس به آن اضافه شد. در نهایت با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ دقیقه و ۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد و سپس محلول حاوی cDNA به حجم ۲۰ میکرولیتر روی یخ گذاشته شد تا خنک شود و سپس به فریزر ۸۰- منتقل شد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 11:09 +0430 on Wednesday July 17th 2019

آغازگرهای مورد استفاده در این آزمایش با استفاده از بانک ژنی NCBI طراحی و با نرم‌افزار Bio edit تست شد و با آزمایش کردن در دستگاه PCR بهترین دما برای تکثیر به‌دست آمد. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ نشان داده شده است. از آنجایی‌که تقریباً تمامی منابع برای بررسی بیان ژن از ژن β-actin به‌عنوان ژن مرجع استفاده می‌گردد و همچنین با استفاده از روش منحنی استاندارد میزان نسبی بیان این ژن مورد بررسی قرار گرفت و مشخص گردید که در تمامی مراحل تقریباً بیان ثابتی دارد. از این رو در این تحقیق، نرمال‌سازی بیان ژن هدف با استفاده از ژن مرجع β-actin صورت گرفت.

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در بررسی اثرات سولفات روی ($ZnSO_4$) در جیره غذایی بر عملکرد رشد و بیان ژن فاکتور شبه انسولینی رشد-۱ (IGF-1) در ماهی قرمز(*C. auratus*)

نام آغازگر	توالی '۳-'۵	دمای‌اتصال (°C)	طول‌قطعه (bp)	درصد کارایی آغازگر	کد بانک ژنی
IGF-1	CAGGGGCATTGGTGTGA GCAGCGTGTCTACAAGC	۵۵	۱۵۴	۹۵	GU583648
Ghrelin	TTCATGATGAGTGCTCCGTTC GTCAGAATTCAAGTGGCGAATC	۵۵/۵	۱۲۴	۹۸	AF454390
β-actin	ACTGCACAGCCAAGAGAGTTCA GTTATTAAAGCGGCCGATATGC	۵۸	۱۸۸	۹۶	AB039726

قبل از انجام Real time PCR برای مطمئن شدن از درستی آغازگرها و اندازه باندهای تشکیل شده محصولات حاصل از آن‌ها و همچنین آزمایش نمودن cDNA، PCR معمولی نمونه‌ها با دستورالعمل ذیل انجام شد: ۲ میکرولیتر نمونه cDNA رقیق شده با نسبت ۱ به ۱۰، ۱ میکرولیتر آغازگر پیش‌رونده، ۱ میکرولیتر آغازگر پس‌رونده، ۳ میکرولیتر آب استریل عاری از نوکلئاز، ۵ میکرولیتر ترکیب مستر (master mix) مخصوص PCR.

PCR در تیوپ‌های مخصوص آن و در ۴ تکرار تکنیکی برای هر تیمار صورت گرفت که محتویات هر تیوپ به مقدار ۲۰ میکرولیتر به این صورت بود: ۱۰ میکرولیتر بافر سایبرگرین، ۰/۲ میکرولیتر آغازگر پیش‌رونده ژن هدف (۱۰ پیکومول) و مرجع، ۰/۲ میکرولیتر آغازگر پس‌رونده ژن هدف و مرجع (۱۰ پیکومول)، ۶/۴۰ میکرولیتر آب، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تگ پلی‌مراز، ۲ میکرولیتر cDNA رقیق شده، ۱ میکرولیتر دی متیل سولفواکساید.

نتایج به‌دست آمده توسط دستگاه Real time PCR تحت‌عنوان CT می‌باشد که نشان‌دهنده تعداد چرخه‌هایی است که سیگنال فلورسنت نسخه‌های ژنی را شناسایی می‌کند.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 11:09 +0430 on Wednesday July 17th 2019

شیوه نمونه‌برداری به‌صورت تصادفی و در قالب طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت. آنالیز آماری پارامترهای رشد با ورود داده‌های به‌دست آمده به صفحات گسترده اکسل انجام گردید. در نرم‌افزار اکسل میانگین داده‌ها محاسبه شد. سپس در نرم‌افزار SPSS-22 ابتدا پراکنش نرمال داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov بررسی و سپس جهت تعیین وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار از نقطه نظر شاخص‌های محاسبه شده با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One Way-ANOVA) و آزمون دانکن (Duncan) در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده گردید. داده‌های به‌دست آمده جهت تعیین بیان نسبی ژن IGF نسبت به بتا اکتین با روش $^{-\Delta\Delta Ct}$ ۲ با کمک نرم‌افزار REST مورد آنالیز قرار گرفت. سپس نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov و Shapiro–Wilk تست شد و آزمون لون نیز جهت بررسی برابری واریانس‌ها انجام گرفت و آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح اطمینان ۹۵٪، جهت بررسی تفاوت‌ها در طی دوره آزمایشی استفاده شد.

نتایج

در تحقیق حاضر تلفاتی در ماهیان تیمارهای مختلف مشاهده نشد. میزان اشتها در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های مختلف، یکسان بود (جدول ۳). شاخص‌هایی مانند وزن نهایی (FBW)، وزن اضافه شده (WG)، نرخ رشد ویژه (SGR)، ضریب تبدیل غذایی (FCR) و شاخص وضعیت (CF) در بین ماهیان تغذیه‌شده با جیره‌های غذایی ۱، ۲ و ۳ اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p<۰/۰۵$). ماهیان تغذیه‌شده با جیره گروه شاهد (فاقد سولفات روی) کمترین وزن نهایی (FBW)، وزن اضافه شده (WG) و نرخ رشد ویژه (SGR) را داشتند که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارهای آزمایشی نشان دادند ($p<۰/۰۵$). ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی ۳، دارای بالاترین وزن نهایی (FBW)، وزن اضافه شده (WG) و نرخ رشد ویژه (SGR) بودند که اختلاف معنی‌داری با سایر گروه‌های آزمایشی داشتند ($p<۰/۰۵$). بهترین ضریب تبدیل غذایی (FCR) و شاخص وضعیت (CF) در ماهیان تغذیه‌شده با جیره غذایی حاوی ۱۵۰ میلی‌گرم سولفات روی ($ZnSo_4$) مشاهده گردید ($p<۰/۰۵$).

نتایج نرمال شده، نشان داد که بیان ژن IGF-1 در ماهیان تغذیه‌شده با جیره‌های غذایی حاوی ۲۵، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم درکیلوگرم سولفات روی ($ZnSo_4$) به‌طور معنی‌داری بیشتر از ماهیان تغذیه‌شده با جیره غذایی شاهد بود ($p<۰/۰۵$) (شکل ۱). بیان ژن IGF-1 در تیمارهای حاوی مقادیر ۲۵ و ۷۵ میلی‌گرم درکیلوگرم سولفات روی در مقایسه با تیمار گروه شاهد، افزایش یافت. در مجموع، سطوح mRNA ژن IGF-1 در ماهیان تغذیه‌شده با جیره غذایی حاوی ۱۵۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم سولفات روی به‌طور معنی‌داری بالاتر از سایر تیمارهای آزمایشی بود ($p<۰/۰۵$). حداقل مقدار بیان ژن IGF-1 در تیمار شاهد مشاهده گردید.

www.SID.ir

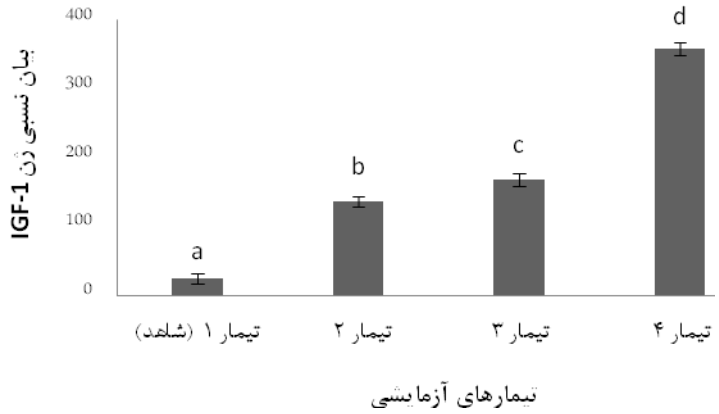
Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 11:09 +0430 on Wednesday July 17th 2019

جدول ۳- میانگین شاخص‌های رشد ماهی قرمز (*C. auratus*) تغذیه‌شده با سطوح مختلف سولفات روی به مدت ۹ هفته

منابع تغییر	شاهد	جیره ۱ (۲۵میلی‌گرم سولفات روی)	جیره ۲ (۷۵میلی‌گرم سولفات روی)	جیره ۳ (۱۵۰میلی‌گرم سولفات روی)
میانگین وزن ابتدایی (گرم)	۳/۳۳±۰/۰۳^{a}	۳/۳۵±۰/۰۱ ^{a}	۳/۳۴±۰/۰۱^{a}	۳/۳۱±۰/۰۵ ^{a}
میانگین وزن نهایی (گرم)	۶/۳۴±۰/۰۳^{a}	۶/۷۱±۰/۰۲ ^{b}	۶/۸۴±۰/۰۳^{c}	۷/۳۵±۰/۰۲ ^{d}
وزن اضافه شده (گرم)	۳/۰۱±۰/۰۶^{a}	۳/۳۵±۰/۰۴ ^{b}	۳/۵۰±۰/۰۵^{c}	۴/۰۴±۰/۰۵ ^{d}
نرخ رشد ویژه	۱/۰۷±۰/۰۲ ^{a}	۱/۱۵±۰/۰۱ ^{b}	۱/۱۹±۰/۰۱^{b}	۱/۳۲±۰/۰۲ ^{c}
ضریب تبدیل غذایی	۳/۰۳±۰/۱۵^{a}	۲/۶۶±۰/۰۴^{b}	۲/۵۵±۰/۰۶^{bc}	۲/۴۲±۰/۰۳^{dc}
شاخص وضعیت	۱/۶۷±۰/۰۴^{a}	۱/۴۹±۰/۰۹^{b}	۱/۳۰±۰/۰۳^{c}	۱/۱۹±۰/۰۴^{c}
درصد بقاء	۱۰۰^{a}	۱۰۰^{a}	۱۰۰^{a}	۱۰۰^{a}

* اعداد بصورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند. حروف انگلیسی متفاوت در هر ردیف بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.



شکل ۱- بیان ژن IGF-1 در ماهی قرمز (*C. auratus*) تغذیه‌شده با جیره‌های آزمایشی به‌مدت ۹ هفته. اعداد به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند. (۴ تکرار تکنیکی برای هر تیمار)

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر نشان داد که سولفات روی باعث بهبود فاکتورهای رشد در ماهی قرمز می‌شود. همچنین این نتایج نشان داد که ماهیان تغذیه‌شده با سولفات روی دارای وزن نهایی، نرخ رشد ویژه (SGR) و وزن به‌دست آمده بیشتر و دارای ضریب تبدیل غذایی (FCR) و شاخص وضعیت (CF) پایین‌تر در مقایسه با گروه شاهد بودند. همچنین نتایج نشان داد که شاخص‌های رشد ماهیان تغذیه‌شده با جیره حاوی ۱۵۰ میلی‌گرم برکیلوگرم سولفات روی دارای اختلاف معنی‌داری

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 11:09 +0430 on Wednesday July 17th 2019

با گروه شاهد و دیگر گروه‌ها بودند که نشان داده شده جیره حاوی ۱۵۰ میلی‌گرم برکیلوگرم سولفات روی میزان کافی برای رشد این ماهی می‌باشد.

مشابه نتایج مطالعه حاضر، جیره‌های غذایی حاوی ۵۰ تا ۱۵۰ میلی‌گرم برکیلوگرم غذا روی در ماهی باس دریایی (*Lates calcarifer*)، گربه‌ماهی (*Clarias batrachus*) توسط ساپکالی و سینگ (Sapkale and Singh, 2011) و ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) توسط محمود (Mahmoud, 2009) سبب افزایش رشد گردید که دلیل این امر می‌تواند افزایش جذب غذایی و وزن به‌دست آمده باشد که متأثر از تأثیر روی بر فعالیت‌های آنزیمی درگیر در فرآیندهای فیزیولوژیکی بدن می‌باشد (Guillaume *et al*., 2001). علاوه بر این، در تحقیق دیگری مشابه با نتایج به‌دست آمده از بررسی اخیر، لیو و همکاران (Liu *et al*., 2014) نشان دادند که میزان ۱۸۴ میلی‌گرم برکیلوگرم روی در جیره غذایی برای ماهی شانک (Sea bream) در جهت متابولیسم پروتئین به‌عنوان یک کوفاکتور آنزیمی ضروری و وجود این میزان از روی در جیره غذایی برای عملکرد صحیح بسیاری از پروتئازها همانند کربوکسی پپتیداز A و B مورد نیاز است (Vallee and Falchuk, 1993). همچنین، مشابه نتایج به‌دست آمده از این مطالعه، لیانگ و همکاران (Liang *et al*., 2012) دریافتند که کپورهای علفخوار تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی بالاتر از ۳۴ میلی‌گرم برکیلوگرم روی به‌طور معنی‌داری دارای نرخ رشد ویژه، وزن نهایی و وزن به‌دست آمده بالاتری بودند. همچنین مارسلو و همکاران (Marcelo *et al*., 2004) نشان دادند که ماهیان تغذیه‌شده با جیره‌های مکمل‌شده با روی دارای وزن به‌دست آمده بیشتری نسبت به گروه ماهیان تغذیه‌شده با جیره‌های بدون روی بودند. همچنین در مطالعه حاضر همانند نتایج اگینو و یانگ (Ogino and Yang, 1979) درباره ماهی کپور و عید (Eid, 1994) بر ماهی تیلاپیای نیل، سولفات روی بر اشتهای ماهیان اثرگذار بود. بی‌اشتهایی در ماهیان تغذیه‌شده با جیره‌های غذایی حاوی غلظت پایین روی، افزایش یافته که علت اصلی آن می‌تواند بخاطر هضم‌پذیری پایین پروتیئن باشد (Liang *et al*., 2012).

حسنات و همکاران (Hasnat *et al*., 2012) تأثیر جیره‌های غذایی حاوی روی (۰، ۳۰،۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره غذایی) را بر ماهی قرمز (*C. auratus*) (میانگین وزن ۸۰ میلی‌گرم) به‌مدت ۹ هفته بررسی نمودند. به‌نظر می‌رسد جذب غذا و به دنبال آن افزایش وزن ماهیان تحت تأثیر سطوح عنصر روی موجود در جیره غذایی قرار گرفته است که در واقع فعالیت آنزیم‌های مرتبط با متابولیسم و فرآیندهای بیوشیمیایی ماهیان تحت تأثیر مقادیر عنصر روی موجود در جیره غذایی می‌باشد (Guillaume *et al*., 2001; Dabrowski and Guderley, 2002). فیز و همکاران (Faiz *et al*., 2015) طی مقایسه تأثیر اشکال مختلف روی (اکسید روی، سولفات روی و نانو ذره اکسید روی در غلظت‌های ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) بر شاخص‌های رشد در ماهی کپور علفخوار

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 11:09 +0430 on Wednesday July 17th 2019

(*Ctenopharyngodon idella*) مشاهده نمودند که جیره حاوی نانو ذره اکسید روی در مقایسه با تیمارهای اکسید روی و سولفات روی، به‌طور معنی‌داری سبب افزایش رشد و بهبود ضریب تبدیل غذایی در ماهیان تغذیه‌شده با این جیره گردید. باتوجه به نتایج ذکر شده فوق و همچنین نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر می توان بیان داشت که سولفات روی در جیره غذایی با افزایش زیستی در معده و روده ماهیان قرمز و همچنین تأثیر بر متابولیسم پروتئینی و نقش کوفاکتور آنزیمی می‌تواند باعث بهبود شاخص‌های رشد در ماهیان قرمز شود.

در تحقیق حاضر بیان نسبی ژن IGF-1 از بافت‌های کبد در پایان دوره آزمایش مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد بیان ژن IGF-1 در ماهیان تغذیه‌شده با جیره‌های غذایی حاوی ۲۵، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم سولفات روی (ZnSo4) به‌طور معنی‌داری بیشتر از ماهیان تغذیه‌شده با جیره غذایی شاهد بود. بیان ژن IGF-1 در تیمارهای حاوی مقادیر ۲۵ و ۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم سولفات روی در مقایسه با تیمار گروه شاهد، افزایش یافت. در مجموع، سطوح mRNA ژن IGF-1 در ماهیان تغذیه‌شده با جیره غذایی حاوی ۱۵۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم سولفات روی به‌طور معنی‌داری بالاتر از سایر تیمارهای آزمایشی بود. حداقل مقدار بیان این ژن در تیمار شاهد مشاهده گردید.

همانگونه که در تحقیق حاضر مشاهده شد، روی اثرات مثبتی بر شاخص‌های رشد و همچنین بیان ژن IGF-1 در ماهیان تغذیه‌شده با تیمارهای مختلف داشته است. هرچند که مکانیسم عمل دقیق روی بر هورمون‌های رشد هنوز به وضوح مشخص نشده است (Hamza, 2012). مشخص گردیده است که گرلین باعث رهاسازی هورمون رشد از غده هیپوفیز و تنظیم آزادسازی هورمون آزادکننده هورمون رشد می‌باشد، فعالیت متقابل گرلین با هورمون آزادکننده هورمون رشد (GH) و محور سوماتواستارین که باعث آزاد سازی هورمون شبه انسولینی رشد (IGF-1) از کبد می‌شود (Rindi *et al*., 2002; Hashizume *et al*., 2003). لوین و همکاران (Levin *et al*., 1992) دریافتند که کاهش اشتها در جانوران در اثر کمبود روی در جیره غذایی امری معمول می‌باشد. در مطالعه حاضر کاهش هورمون شبه انسولینی رشد در ماهیان گروه کنترل (بدون سولفات روی) به وضوح مشخص بود.

در مطالعه امام‌اوغلو و همکاران (Imamoglu *et al*., 2005)، دلایل تأثیر روی بر افزایش میزان IGF-1 را افزایش میزان حساسیت هورمون رشد درون‌زاد، افزایش ترشح فیزیولوژیکی هورمون رشد و اثر مستقیم فلز روی بر افزایش میزان IGF-1 بدون دخالت هورمون رشد بیان کردند. در مطالعه‌ای دیگر، مکنال (McNall, 1995) نشان داد موش‌های تغذیه شده با جیره‌های با کمبود روی دارای بیان ژن پایین‌تری از IGF-1 و GH در کبد بودند که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد به‌طوری‌که در تحقیق حاضر، بالاترین بیان ژن‌های مذکور در جیره حاوی بالاترین مقدار روی مشاهده گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 11:09 +0430 on Wednesday July 17th 2019

محققین دریافتند که IGF-1 پلاسما و میزان IGFBP-3 در ۹۶ تا ۱۰۰ درصد کودکان دارای کمبود روی مشاهده می‌شود (Hamza *et al.*, 2012; Cesur *et al.*, 2009). این یافته‌ها نشان می‌دهد که اثر تحریک‌کننده رشد روی ممکن است از طریق تغییرات سطوح در گردش IGF-1 صورت گیرد (Cole, 2002; Elmlinger *et al.*, 2004) اما در همین راستا در مطالعه‌ای، نین و همکاران (Ninh *et al.*, 1998) بیان کردند که تأثیر کمبود روی بر کاهش وزن تنها از طریق کاهش میزان IGF-1 و تغییر در میزان گردش آن در بدن نمی‌باشد بلکه کمبود روی در بدن باعث کاهش فعالیت متابولیکی IGF-1 نیز می‌گردد. فاکس و همکاران (Fox *et al.*, 2007) افزایش میزان IGF-I در پلاسمای تیلاپیا ۱۰ ساعت پس از تزریق صفاقی گرلین تیلاپیا را گزارش نمودند.

ین و همکاران (Yin *et al.*, 2009) با بررسی تأثیر اکسید روی در جیره غذایی خوک مشاهده کردند که حضور روی در جیره غذایی سبب افزایش بیان ژن IGF-I گردید که همسو با نتایج تحقیق حاضر می‌باشد. همچنین این محققین بیان نمودند که اکسید روی سبب افزایش سطوح mRNA مربوط به IGF-I در کبد و روده کوچک گردید. در مطالعه‌ای دیگر، محققین به این نتیجه رسیدند که حضور اکسید روی در جیره غذایی در غلظت‌های بالا از طریق افزایش فعالیت هیدرولاز در موش‌ها در هضم مواد غذایی تأثیر گذار است (Szabó *et al.*, 2004). هامزا و همکاران (Hamza *et al.*, 2012) به بررسی تأثیر عنصر روی بر مقدار IGF-1 در سرم کودکان پرداختند و مشاهده نمودند که تغذیه با عنصر روی به‌مدت ۳ ماه، سبب افزایش میزان IGF-1 و IGFBP-3 می‌گردد. لی و همکاران (Li *et al.*, 2016) در تحقیق خود در ارتباط با بررسی بیان ژن IGF-1 در خوک‌های تغذیه‌شده با اکسید روی (ZnO)، افزایش بیان این ژن را در روده کوچک خوک‌ها در تیمارهای تغذیه‌شده با اکسید روی در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده نمودند که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی و مطابقت دارد. بنابر نتایج فوق و نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر می‌توان بیان داشت که سولفات روی با تحریک ترشح گرلین و سپس تأثیر بر هورمون رشد و محور سوماتواستارین باعث آزاد سازی فاکتور IGF-1 و یا سولفات روی با اثر مستقیم باعث افزایش ترشح و بیان ژن IGF-1 در ماهیان قرمز می‌گردد.

نتایج به‌دست آمده نشان داد که سولفات روی در جیره غذایی باعث تحریک سیستم فیزیولوژیک ماهی قرمز می‌شود و می‌تواند اثرات مثبتی بر شاخص‌های رشد و افزایش میزان بیان ژن درگیر در رشد این ماهی داشته باشد. لذا می‌توان این عنصر را به‌عنوان یک ماده مغذی مناسب به پرورش دهندگان ماهی پیشنهاد نمود و به‌عنوان یک راهکار مناسب و مقرون به‌صرفه جهت دستیابی به افزایش رشد در ماهیان استفاده شود هر چند ارائه یک نتیجه‌گیری نهایی در این راستا نیاز به مطالعات گسترده‌ای در ابعاد گوناگون به‌ویژه از نقطه نظر فیزیولوژیکی دارد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 11:09 +0430 on Wednesday July 17th 2019

منابع

Bjerselius R., Olsen K.H., Zheng W. 1995. Endocrine, gonadal and behavioral responses of male crucian carp *Carassius carassius* to the hormonal pheromone 17α, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one. Chemistry Senses, 20: 221-230.

Bossi P., Han I., Jung H., Heo K., Perini S., Castellazzi A., Casini L., Creston, D., Cremokolini C. 2001. Effect of different spray dried plasmas on growth, ileal digestibility, nutrient deposition, immunity and health of early weaned pigs challenged with E. coli K88. Asian-Aus Journal of Animal Science, 14:1138-1143.

Carlson D., Poulsen H.D., Sehested J. 2007. Influence of weaning and effect of post weaning dietary zinc and copper on electrophysiological response to glucose, theophylline and 5-HT in piglet small intestinal mucosa. Biochemistry and Physiology, 137: 757-65.

Cesur Y., Yordam N., Dogan M. 2009. Serum Insulin-like Growth Factor-I and Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3 Levels in Children with Zinc Deficiency and the Effect of Zinc Supplementation on these Parameters. Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism, 22: 1137-1143.

Chesters J.K., O'Dell B.S., Sunde R.A. 1997. Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements. Marcel Dekker, New York, USA, pp: 185-230.

Cole T.J. 2002. A chart to link child centiles of body mass index, weight and height. European Journal of Clinical Nutrient, 56: 1194-1199.

Dabrowski K., Guderley H. 2002. Intermediary metabolism. In: Fish Nutrition, 3rd edition (Halver, J.E. and Hardy, R.W. Eds), Academic Press, London, UK, pp: 309-365.

Eid A. 1994. Dietary zinc requirement of fingerling *Oreochromis niloticus*. Aquaculture, 119: 259-264.

Eide D.J. 2006. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. Biochemistry and Biophysiology Acta, 1763: 711-722.

Elmlinger M.W., Kühnel W., Weber M.M., Ranke M.B. 2004. Reference ranges for two automated chemiluminescent assays for serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein 3 (IGFBP-3). Clinical Chemistry Laboratory and Medicine, 42: 654-664.

Faiz H., Zuberi A., Nazir S., Rauf M. 2015. Zinc oxide, zinc sulfate and zinc oxide nanoparticles as source of dietary zinc: comparative effects on growth and hematological indices of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). International Journal of Agriculture and Biology, 17: 568-574.

Fox B.K., Riley L.G., Dorough C., Kaiya H., Hirano T., Grau E.G. 2007. Effects of homologous ghrelins on the growth hormone/insulin-like growth factor-I in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. Zoological Science, 24: 391-400.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 11:09 +0430 on Wednesday July 17th 2019

Ghobadi SH., Rajabi Eslami H., Hosseinifar S.H., Palangi L. 2013. Investigation of different levels of nano Fe on growth parameters and feeding of *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Propagation and Aquaculture, 1(1):67-82. (In Persian).

Guillaume J., Kaushik S., Bergot P., Metailler R. 2001. Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans, 1st ed. Chichester, UK. 403 P.

Hamza R.T., Hamed A., Sallam M.T. 2012. Effect of zinc supplementation on growth Hormone Insulin growth factor axis in short Egyptian children with zinc deficiency. Italian Journal of Pediatrics, 38(21): 2-7.

Hashizume T., Horuchi M., Tate N., Nonaka S., Mikami U., Kojima M. 2003. Effect of ghrelin on growth hormone secretion from cultured adenohypophysial cells in pigs. Domestic Animal and Endocrinology, 24: 209-218.

Hasnat A., Babitha R., Kohli M. P.S., Chandraprakash G. 2012. Zinc Supplementation and its Effect on Thermal Stress Resistance in *Carassius auratus* Fry. The Israeli Journal of Aquaculture–Bamidgeh, 64: 77-97.

Hevroy E.M., Espe M., Waagbo R., Sandness K., Rund M., Hemer G.I. 2005. Nutrition utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed increased level of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. Aquaculture Nutrition, 11: 301-313.

Imamoglu S., Bereket A., Turan S., Taga Y., Haklar G. 2005. Effect of zinc supplementation on growth hormone secretion, IGF-I, IGFBP-3, somatomedin generation, alkaline phosphatase, osteocalcin and growth in prepubertal children with idiopathic short stature. Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism, 18: 69-74.

Kucukbay Z., Yazlak H., Sahin N., Sahin K. 2006. Zinc picolinate decreases oxidative stress in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture, 257(1-4): 465-469.

Levin G., Cogan U., Mokady S. 1992. Food restriction and membrane fluidity. Mechanisms of Ageing and Development, 62: 137-41.

Liang J.J., Yang H.D., Liu Y.J., Tian L.X., Liang G.Y. 2012. Dietary Zinc requirement of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) based on growth and mineralization. Aquaculture Nutrition, 18: 380-387.

Liu H.C., Ye Y.T., Cai C.F., Wu T., Chen K.Q., Pu Q.H. 2014. Dietary Zn requirement of *Megalobrama amblycephala*. Journal of Fish in China, 38: 1522-1529.

Liu Z., Lu L., Li S., Zhang L., Xi K., Zhang Y., Luo X. 2011. Effects of supplemental zinc source and level on growth performance, carcass traits, and meat quality of broilers. Poultry Science, 90(8): 1782-1790.

MacDonald R.S. 2000. The role of zinc in growth and cell proliferation. Journal of Nutrition, 130: 1500-1508.

Mahmoud S.A. 2009. Effect of different artificial diets on growth rate condition and histological structure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Research Journal of Fisheries and Hydrobiology, 4(1): 29-34.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 11:09 +0430 on Wednesday July 17th 2019

Marcelo V.S., Luiz E., Pezzatob M., Maria B., Ferreira L., Pedro de M. 2004. Optimum zinc supplementation level in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juvenile's diets. Aquaculture, 238: 385-401.

Maret W., Krężel A. 2007. Cellular zinc and redox buffering capacity of metallothionein/thionein in health and disease. Journal of Molecular and Medicine, 13: 371-375.

McNall A.D. 1995. The impaired growth induced by zinc deficiency in rats is associated with decreased expression of the hepatic IGF-I and GH receptor genes. Journal of Nutrient, 125: 874-879.

Ninh N.X., Maiter D., Verniers J., Lause P. 1998. Failure of exogenous IGF-I to restore normal growth in rats submitted to dietary zinc deprivation. Journal of Endocrinology, 159(2): 211-7.

Ogino C., Yang G.Y. 1979. Requirement of Carp for Dietary Zinc (In Japanese). Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish, 45: 967-969.

Rindi G., Necchi V., Savio A., Torsello A., Zoli M., Locatelli V. 2002. Characterization of gastric ghrelin cells in man and other mammals: studies in adult and fetal tissue. Histochemistry and Cell Biology, 117: 511-519.

Robert M., Kliegman M.D., Karen Marcdante M.D., Hal B., Jenson M.D., Richard E., Behrman M.D. 2006. Pediatrics Nutrition and Nutritional Disorders. In: Nelson Essentials of Pediatrics, Elsevier Health Sciences; 5th Edition, pp: 532-535.

Sapkale P.H., Singh R.K. 2011. Dietary zinc and cobalt requirements of fry of seabass (*Lates calcarifer*) and catfish (*Clarias batrachus*). Israel Journal of Aquaculture - Bamidge, 63: 613-625.

Siklar Z., Kirsaçlioğlu C.T., Dallar Y., Tanyer G. 2003. Zinc deficiency: A contributing factor of short stature in growth hormone deficient children. Journal of Tropical Pediatrics, 49(3): 187-188.

Smith J., Tokach M., Goodband R., Nelssen J., Richert B. 1997. Effects of the interrelationship between zinc oxide and copper sulfate on growth performance of early-weaned pigs. Journal Animal Science, 75: 1861-1866.

Szabó J., Hegedus M., Bruckner G., Kósa E., Andrasofszky E., Berta E. 2004. Large doses of zinc increases the activity of hydrolases in rats. Journal of Nutrition and Biochemistry, 15: 206-209.

Vallee BL., Falchuk K.H. 1993. The biochemical basis of zinc physiology. Physiological Reviews, 73: 79-118.

Watanabe T., Kiron V., Satoh S. 1997. Trace minerals in fish nutrition. Aquaculture, 151: 185-207.

Yin J., Li X., Li D., Yue T., Fang Q., Ni J., Zhou X., Wu G. 2009. Dietary supplementation with zinc oxide stimulates ghrelin secretion from the stomach of young pigs. Journal of Nutritional Biochemistry, 20: 783-790.

www.SID.ir