تغــذیه آبزیــان
سال پنجم، شماره اول،
بهار و تابستان ۱۳۹۸

تاثیر سطوح مختلف پروتئین و چربی جیره بر شاخص های رشد، بیان ژن‌های درگیر در ایمنی (لایزوزیم و فاکتور نکروز دهنده تومور–یک آلفا) و اشتها (گرلین) در گورخر ماهــی (*Danio rerio*)

فریده ریکی[۱]، محمد سوداگر[۱]، حامد پاک نژاد[۱]، سیامک یوسفی سیاهکلرودی[۲]
۱- گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، گلستان
۲- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا، ورامین، تهران

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۳/۰۵ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۶/۲۹

چکیده
مطالعه حاضر برای ارزیابی تأثیر سطوح مختلف پروتئین و چربی جـیره بر بیان ژن‌هـای درگیر در ایمنی (لایزوزیم و TNF-1α) و اشتها (گرلین) در گورخر ماهی انجام شد. به این منظور ۹ جیره با سه سطح پروتئین (۲۵، ۳۰ و ۳۵٪) و سه سطح چربی (۴، ۸ و ۱۲٪) تهیه و ۱۳۵ قطعه بچه مـاهی به‌صورت گـروه‌های ۵ تایی با میـانگین وزن بـدن (± انحـراف معیار) ۰/۰۲ ± ۱/۲۳ گرم به‌طور تصادفی در ۲۷ آکواریوم ۳۰ لیتری توزیع و ۳ بار در روز به مدت ۴ ماه تغذیه شدند. طرح آزمایش به صورت فاکتوریل بود و نتایج نشان داد با افزایش پروتئین جیره شاخص‌های رشد (وزن نهایی، افزایش وزن بدن، درصد افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی) و میزان بیان ژن‌های ایمنی و اشتها در تیمار ۳۵٪ پروتئین افزایش معنی‌داری داشت ($p<0/05$). شاخص‌های رشد و بیان ژن لایزوزیم در تیمار ۱۲٪ چربی نسبت به دیگر تیمارها و بیان ژن گرلین در تیمار ۱۲٪ چربی نسبت به ۴٪ ($p<0/05$) و بیان ژن TNF- 1α با افزایش سطوح چربی جیره افزایش یافت ($p>0/05$). اثر متقابل پروتئین و چربی نیز باعث افزایش شاخـص‌های رشد و بیـان ژن‌های ایمنی و گرلین شد ($p<0/05$)، به‌طوری‌که بالاترین میزان رشد و بیان ژن در تمامی ژن‌های مورد بررسی در تیمار ۳۵٪ پروتئین و ۱۲٪ چربی مشاهده شد. یافته‌های تحقیق حاضر مشخص کرد که پروتئین و چربی جیره می‌توانند در بهبود عملکرد دستگاه ایمنی و اشتها در گورخر ماهی نقش داشته باشند.

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

نویسنده مسئول: sudagar.2015@gmail.com

مقدمه

پرورش ماهیان زینتی را می‌توان یکی از پرسودترین صنایع در دهـه‌های اخیر نام برد که به علـت داشتن رنگ‌های درخشان، شکل و رفتارشان مانند جواهرات زنده‌اند. آن‌ها معمولاً آرام، کوچک و دارای رنگ‌های جذاب هستند؛ در گونه‌های مختلف دسته‌بندی شده‌اند و تجارت آن‌ها در آسیا و در سراسر جهان در حال رشد و توسعه است (Tissera, 2010; Mandal et al. 2012). یکی از عمده‌ترین مخاطراتی که پرورش‌دهندگان ماهی با آن مواجه هستند، کاهش میزان زنده‌مانی با بروز برخی بیماری‌ها و آلودگی‌ها به‌خصوص در مراحل اولیه زندگی است. لذا تقویت و ارتقای دستگاه ایمنی و دفاعی بدن ماهیان در گونه‌های با ارزش و اقتصادی از اصلی‌ترین نیازهای پرورش‌دهندگان و مهم‌ترین رویکردهای محققان در این راستاست (Shalaby et al. 2006).

آبزی‌پروری موفق و پایدار، به فراهم کردن غذاهای مصنوعی که از لحاظ مواد مغذی متعادل و از لحاظ اقتصادی به صرفه باشند، وابسته است (Lee and Kim, 2005). توازن مناسب از درشت- و ریزمغذی‌ها از جمله اسیدهای آمینه، اسیدهای چرب غیراشباع، ویتامین‌ها، عناصر کمیاب و کوفاکتورهای آنزیمی نه تنها برای رشد، بلکه برای تکامل طبیعی و عملکرد دستگاه ایمنی نیز ضروری است، به‌طوری‌که با افزودن ۳ تا ۶٪ چربی به جیره گربه‌ماهی کانالی *Ictalurus punctatus* فعالیت لایزوزیم سرم به‌طور معنی‌دار نسبت به گروه شاهد افزایش یافت (Yildirim-Aksoy et al. 2009). Rahimnejad و Lee (۲۰۱۴) نیز با بررسی تأثیر اسید آمینه ایزولوسین بر پاسخ ایمنی غیراختصاصی در ماهی کفشک (*Paralichthys olivaceus*) مشاهده کردند که افزودن ۲٪ از این اسید آمینه به جیره باعث افزایش ایمنی ذاتی شد. از سوی دیگر، پروتئین و چربی در رشد ماهی نیز نقش مهمی بر عهده دارد (محمودی و همکاران، ۱۳۹۲). نویریان و همکاران (۱۳۸۴) اثر سه سطح پروتئین (۲۵، ۳۰ و ۳۵٪) جیره را در بچه ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) ۲ گرمی مطالعه و مشاهده کردند که با افزایش سطح پروتئین تا ۳۵٪، میزان رشد افزایش یافت. در تحقیقی که بر روی ماهی سفید با جیره‌های حاوی ۴ سطح چربی (۳، ۶، ۹ و ۱۲٪) انجام شد، جیره با ۱۲٪ چربی بهترین عملکرد رشد را در این ماهی نشان داد (نویریان و همکاران، ۱۳۸۶).

رشد در ماهیان و مهره‌داران عالی تا حد زیاد توسط هورمون‌هایی که ترشح آن‌ها با دسترسی به مواد غذایی در ارتباط است، کنترل می‌شود (Fox et al. 2010). در واقع، ترشح هورمون‌ها از غدد درون‌ریز به‌طور مستقیم توسط مصرف غذا فعال می شود و مواد غذایی ممکن است عملکرد غدد درون‌ریز را از راه اثر بر ساخت، ترشح و تبدیل هورمـون‌ها تحت تأثیر قرار دهند (MacKenzie et al. 1998). هورمـون گرلین نیز به عنوان پپتید معده‌ای-مغزی، یک لیگاند درون‌زاد برای رسپتور GHSR-a هورمون رشد اسـت و سبب افـزایش سیگنال‌های گرسنگی و در نتیجه، افزایش اشتها می‌شوند (Wren et al. 2001).

گورخر ماهی با نام علمی *Danio rerio* متعلق به خانواده Cyprinidae است (Spence et al. 2008). این ماهی از یک سو به علت رنگ‌بندی و خطوط زیبای روی بدن، شکل بدن و ارزش اقتصادی (Ghosh et al. 2017) و از سوی دیگر به دلیل اینکه در سال‌های اخیر به عنوان مدلی برای تجزیه و تحلیل سریع عملکرد ژن‌ها و فعالیت‌های زیست‌شناختی مولکول‌های آلی مطرح شده، دارای اهمیت خاص است (Zon and Peterson, 2005). همچنین، به علت شباهت‌های بالای ژنتیکی، فیزیولوژیک و فارماکولوژیک با انسان، برای تشخیص مواد طبیعی با توان بالقوه درمـــانی مختلف، بسیار مناسـب به نظـر می‌رسد. دلایل اولیه‌ای که سبب گسترش این مدل شده، عبارت‌اند از: اندازه کوچک نوزاد و جنین مورد آزمایش (۱ تا ۵ میلی‌متر بسته به مراحل رشد)، قدرت باروری بالای ماهی‌های بالغ (صدها بچه ماهی در یک بار جفتگیری طی یک هفته)، شفافیت جنین و نوزاد این ماهی (راحتی مشاهده اندام‌های داخلی ماهی زبرا) و سرعت رشد خارج رحمی (تمام مراحل رشد از تخم تک سلولی تا نوزاد در خارج از رحم صورت می‌گیرد)، که امکان ردگیری اثرات مختلف ترکیبات مورد آزمایش را امکان‌پذیر خواهد کرد. نکته کلیدی دیگر در بررسی مولکول‌های فعال با استفاده از نوزاد و جنین این ماهی، امکان افزودن ترکیبات به‌صورت غیراستریل به محیـط رشـد آنهاست که سرعت انجام رونـدهای غربال‌گری را افزایش می‌دهد (Crawford et al. 2008).

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

مواد و روش‌ها

ماهی

تحقیق حاضر به مدت ۴ ماه، در آزمایشگاه آبزی‌پروری شهید فضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان با تهیه ۱۳۵ قطعه بچه ماهی زبرا از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان زینتی شصت کلای شهرستان گرگان انجام شد. بچه ماهیان دوره سازش‌پذیری را به مدت ۲ هفته در دمای ۲۸-۲۶ درجه سانتی‌گراد و با pH در حد خنثی (۷/۵-۶/۸) گذراندند. طی دوره سازش بچه ماهیان با غذای تجاری (ساخت شرکت Biomar SAS، فرانسه) شامل ۴۷٪ پروتئین خام، ۱۴٪ چربی خام، ۳/۵٪ فیبر خام و ۹/۲٪ خاکستر) تغذیه و پس از پایان دوره سازش‌پذیری به صورت گروه‌های ۵ تایی با میانگین بیوماس (± انحراف معیار) ۰/۰۲ ± ۱/۲۳ گرم در ۲۷ عدد آکواریوم ۳۰ لیتری که ۲۰ لیتر آبگیری شده بودند، نگهداری شدند.

طراحی آزمایش و ساخت جیره غذایی

طرح آزمایش نیز به صورت فاکتوریل بوده است. در این پژوهش با استفاده از ترکیبات غذایی (جدول ۱)، ۹ جیره هم انرژی (۳۰۰۰ kcal/kg) با سطوح مختلف پروتئین خام (۳۰، ۳۵ و ۴۰٪) و چربی خام (۱۰، ۱۵ و۲۰٪) (جدول ۱) با استفاده از نرم‌افزار UFFDA[1] متعادل شد و بچه ماهیان در سه تکرار تغذیه شدند. برای ساختن جیره‌های آزمایشی ابتدا مواد اولیه آسیاب و به مدت ۱۵ دقیقه با یکدیگر ترکیب، سپس روغن به مخلوط، اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه دیگر با یکدیگر ترکیب و سپس مقداری آب (۵۰۰ میلی لیتر به ازای هر کیلوگرم)، به مخلوط حاصل اضافه شد و پس از عبور از چرخ گوشت با چشمه ۰/۵ میلی‌متر، به صورت رشته‌ای در آمدند. رشـته‌های خارج شده روی سینی گسترده، و در دمای اتاق خشک شدند. غذاهای ساخته شده تا زمان مصرف در دمای۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای آگاهی از عملکرد جیره‌های غذایی و چگونگی رشد ماهیان، در طول دوره تحقیق هر ۱۵ روز یکبار ۱۰۰٪ بیوماس ماهیان با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم توزین شد. طول ماهیان با خط کش با دقت ۱ میلی‌متر اندازه‌گیری، و با توجه به نتایج حاصل از زیست‌سنـجی هر یک از آکواریوم‌ها، غذای مورد نیاز هر آکواریوم محاسبه شد. این غذا برای دو هفته بعد تنظیم، و ماهیان روزانه به میزان ۱۰٪ وزن بدن، طی سه وعده غذایی (ساعات ۸، ۱۲ و ۱۶) با جیره‌های آزمایشی تغذیه شدند. در پایان آزمایش، شاخص‌های رشد اندازه‌گیری شد که در این راستا از رابطه‌های زیر استفاده شد (De Almeida Bicudo et al. 2009):

[1] User Friendly Feed Formulation Done Again

میانگین وزن ابتدای دوره (گرم) - میانگین وزن انتهای دوره (گرم) = افزایش وزن بدن

(مقدار غذای خورده شده (گرم)) /(افزایش وزن بدن (گرم)) × ۱۰۰ = کارایی غذا

[زمان (تعداد روزهای دوره پرورش)/ (لگاریتم طبیعی میانگین وزن اولیه(گرم)- لگاریتم طبیعی میانگین وزن نهایی به(گرم))] × ۱۰۰ = نرخ رشد ویژه

افزایش وزن بدن (گرم)/ مقدار غذای خورده شده (گرم) = ضریب تبدیل غذایی

استخراج و ارزیابی کمی و کیفی RNA

۲۴ ساعت پیش از نمونه‌برداری غذادهی قطع شد. برای نمونه‌برداری ابتدا ماهیان با استفاده از پودر گل میخک (غلظت ۱ ppt) بیهوش و نمونه‌های روده پس از برداشت بلافاصله در ازت مایع قرار گرفت و تا زمان استخراج RNA در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به منظور ارزیابی بیان ژن‌های لایزوزیم و TNF-1α و گرلین، RNA کل از نمونه روده با ازت مایع همگن و با استفاده از کیت RNAx plus طبق دستورالعمل شرکت سازنده (سیناژن، ایران) استخراج شد. برای این منظور ۱ میلی‌لیتر محلول RNAx plus به نمونه‌ها اضافه شد. سپس مخلوط همگن و به مدت ۵ دقیقه روی یخ انکوبه شد و ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم افزوده شد. سپس، در سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm قرار گرفتند. در ادامه، فاز شفاف تشکیل شده جدا، و به آرامی به مدت ۶۰ ثانیه تکان داده شد. سپس، ۱۵ دقیقه روی یخ انکوبه شد و به نسبت ۱ به ۱ ایزوپروپانول به آن اضافه، و به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ با ۱۲۰۰۰ rpm قرار داده شدند. در این مرحله، در ته ویال پلت تشکیل شد. بعد، مایع داخل ویال تخلیه، و ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ ٪ اضافه شد. ویال‌ها پس از چرخاندن کوتاه مدت، در سانتریفیوژ به مدت ۸ دقیقه در ۷۵۰۰ rpm قرار گرفتند. پس از تخلیه مایع رویی و خشک شدن پلت‌ها در دمای اتاق، به ویال‌ها به میزان ۳۰ میکرولیتر آب تزریق اضافه و تا حل شدن کامل در دستگاه ترمومیکسر با دمای ۳۷ درجه قرار داده شدند. برای ارزیابی کیفی RNA کل از دستگاه الکتروفورز و ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. کمیت RNA از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific, ND-1000, USA) تعیین شد و پس از آن، تا زمان ساخت cDNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

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

	جیره‌ها								
اقلام غذایی	جیره ۱	جیره ۲	جیره ۳	جیره ۴	جیره ۵	جیره ۶	جیره ۷	جیره ۸	جیره ۹
آرد گندم	۸/۱۴	۴۳/۸۹۲	۱۵/۹۰۷	۷/۵۸۸	۱۷/۷۸۸	۱۸/۹۳	۰/۰۵۵	۹/۱۴۴	۱۸/۲۴۳
آرد سویا	۲۵/۰۶۸	۱/۵۰۶	۶/۳۰۶	۳/۳۹۱	۹/۲۲	۸/۹۷	۰/۲۴	۲۳/۴۹۱	۱/۰۹۶
آرد ذرت	۱/۳۳۴	۴/۸۷۷	۰/۶۶۳	۱/۱۳	۱۱/۸۵۸	۴/۷۸۵	۰/۰۳۲	۶/۰۹۶	۰/۳۷۱
آرد جو	۱۸/۰۲۶	۲۳/۰۳	۲۴/۰۰۶	۶/۳۲۳	۱۳/۸۸۷	۶/۰۱۲	۰/۰۴۶	۱۳/۷۳۶	۱۷/۵۶۶
بذر کتان	۱۰/۵۱	۱/۹۰۳	۳۴/۰۶۷	۱۴/۵۶۹	۴/۸۵۵	۳۵/۹	۳۰/۵۱۶	۵/۳۷۹	۱۰/۷۴۴
پودر ماهی	۹/۹۱۵	۲۵/۲۶۲	۵/۳۹۱	۳۱/۹۵۴	۲۹/۱۶۳	۱۱/۹۳۲	۳۴/۴۱۲	۲۸/۸۵۴	۳۹/۷۵۲
روغن آفتابگردان	۰/۰۳۵	۰/۹۸۶	۰/۱۲۶	۰/۰۱۹	۱/۱۳۸	۰/۷۹۳	۰/۰۰۰۴	۱/۱۲۶	۱/۱۲۹
روغن ذرت	۰/۰۱۷	۲/۳۵۴	۸/۱۵۷	۰/۰۰۸	۱/۴۳۲	۶/۲۷۷	۰/۰۰۰۲	۰/۷۳۶	۲/۱۰۸
روغن کانولا	۰/۱۰۸	۰/۰۲	۰/۱۲۶	۰/۰۱۹	۰/۱۲۳	۰/۷۹۳	۰/۰۰۰۴	۰/۳۱۴	۰/۰۱۵
روغن ماهی	۰/۱۳۳	۰/۲۶۷	۰/۲۴۹	۰/۰۷۹	۰/۶۸۱	۰/۰۷	۰/۰۰۴	۰/۷۵۴	۳/۹۷۶
نشاسته	۲۱/۷۱۴	۱/۹۰۳	۰/۰۰۲	۲۹/۹۲	۴/۸۵۵	۰/۵۸۸	۲۹/۶۹۴	۵/۳۷۹	۰
لسیتین	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
مکمل معدنی[1]	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
مکمل ویتامینی[2]	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
منوکلسیم‌فسفات	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲
درصد پروتئین‌خام	۲۵	۲۵	۲۵	۳۰	۳۰	۳۰	۳۵	۳۵	۳۵
درصد چربی خام	۴	۸	۱۲	۴	۸	۱۲	۴	۸	۱۲
درصد کربوهیدرات خام	۵۶	۵۸	۵۰	۵۰	۴۳	۳۶	۳۶	۴۴	۲۹

۱- هر ۱۰۰۰ گرم پرمیکس معدنی حاوی: IU ۱۶۰۰۰۰۰ ویتامین A، IU ۴۰۰۰۰۰ ویتامین D3، ۳۰ گرم ویتامین E، ۱۰۰ گرم تیامین، ۸ گرم ریبوفلاوین، ۸ گرم پیریدوکسین، ۳ گرم اسیدفولیک، ۰/۰۱ گرم سیانوکوبالامین، ۱۰۰ گرم ویتامین C، ۱۰ گرم ویتامین K3، ۱۰ گرم بیوتین، ۲۰ گرم BHT و ۱۰۰ ویتامین اینوزیتول است.

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

سنتز cDNA

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

طراحی پرایمر

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

[۱] National Center for Biotechnology Information

جدول ۲ مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش.

نام پرایمر	توالی (´۳-´۵)	دمای اتصال (°C)	کاربرد
Ghrelin q-PCRF	ATGTTTCTGCTCCTGTGTGT	۵۹	سنجش کمی بیان ژن اشتها
Ghrelin q-PCRR	GCTTCTCTTCTGCCCACTCT		
lyz q-PCRF	GGCAGTGGTGTTTTTGTGTC	۵۹	بیان ژن لایزوزیم
lyz q-PCRR	CGTAGTCCTTCCCCGTATCA		
TNF-1α q-PCRF	CTGCTTCACGCTCCATAAGA	۵۹	بیان ژن TNF-1α
TNF-1α q-PCRR	CTGGTCCTGGTCATCTCTCC		
β- actin q-PCRF	AGCAGATGTGGATCAGCAAG	۵۹	ژن مرجع
β- actin q-PCRR	TACCTCCCTTTGCCAGTTTC		

انجام Real-time PCR (qRT- PCR)

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

آنالیز آماری

برای انجـام Real Time تمامی مراحل زمانی ذکر شده ارزیابی و میزان بیان ژن در دستگاه به صورت Ct ثبت شد. منحنی استاندارد با اسـتفاده از نسـبت‌های مختلف رقیق‌سازی cDNA، سری‌های رقیق‌سازی از ۱ به ۱۰ تا ۱ به ۲۰۰ رسم و بازدهی PCR با استفاده از رابط $E\% = \left(10^{1/slope - 1}\right) \times 100$ (Radonic et al., 2004) و تغییرات نسبی بیان ژن‌های هدف با دو بار مشتق‌گیری از ($۲^{Ct-\Delta\Delta}$) محاسبه شد (Livak and Schmittgen, 2001). در بین زمان‌های مورد مطالعه مرحله‌ای که کمترین Ct را داشت، به‌عنوان کالیبراتور به منظور ارزیابی بیان نسبی ژن هدف استفاده شد.

برای بررسی داده‌ها، ابتدا نرمال بودن آنها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. سپس برای بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها از آنالیز واریانس دو طرفه (Two-Way ANOVA) استفاده شد و در صورت معنی دار بودن، به کمک آزمون Tukey در سطح کمتر از ۵٪ مقایسات چندگانه انجام شد. آزمون‌ها در محیط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد.

نتایج

شاخص‌های رشد

شاخص‌های وزن نهایی، افزایش وزن بدن، درصد افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی در تیمار ۳۵٪ پروتئین نسبت به تیمارهای ۲۵ و ۳۰٪ و در تیمار ۳۰٪ نسبت به ۲۵٪ به طور معنی‌دار بالاتر بود ($p<۰/۰۵$). با افـزایش چربی جیره، افزایـش معنی‌داری در وزن نهایی، افزایش وزن بدن و نرخ رشد ویژه در تیمار ۱۲٪ نسبت به ۸ و ۴٪؛ درصد افزایش وزن بدن در تیمار ۱۲٪ نسبت به ۴٪؛ ضریب تبدیل غذایی در تیمار ۱۲٪ نسبت به تیمار ۸ و ۴٪ و در تیمار ۸٪ نسبت به تیمار ۴٪ مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). اثر متقابل پروتئین و چربی نیز به طـور معنی‌داری باعث افزایش شاخص‌های رشد شد ($p<۰/۰۵$)، به طوری که بالاترین میزان رشد در تیمار ۳۵٪ پروتئین و ۱۲٪ چربی مشاهده شد ($p<۰/۰۵$) (جدول ۳).

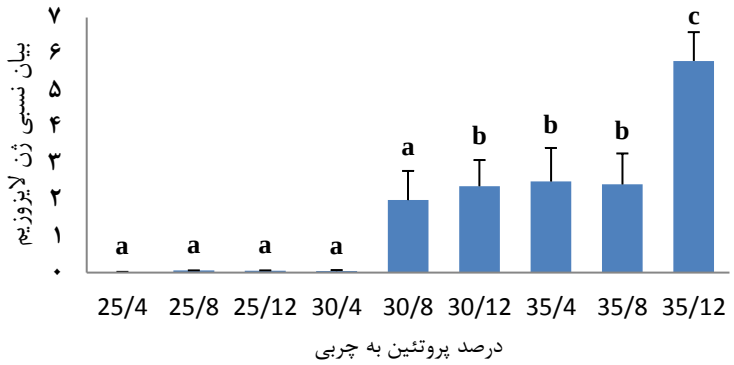
جدول ۳ مقایسه میانگین (± انحراف معیار) شاخص‌های رشد بچه ماهی زبرا نسبت به اثر متقابل سطوح پروتئین به چربی.

تیمارها	وزن اولیه (گرم)	وزن نهایی (گرم)	افزایش وزن بدن (گرم)	درصد افزایش وزن بدن (درصد)	نرخ رشد ویژه (درصد/روز)	ضریب‌تبدیل غذایی
۴/۲۵	۱/۱۳ ± ۰/۰۷	۲/۰۰ ± ۰/۱^{a}	۰/۸۵ ± ۰/۰۳^{a}	۷۵/۳۲ ± ۳/۰۶^{a}	۱/۷۰ ± ۰/۰۶^{a}	۲/۲۰ ± ۰/۰۸^{f}
۸/۲۵	۱/۳۱ ± ۰/۱۱	۲/۲۸ ± ۰/۰۹^{b}	۰/۹۶ ± ۰/۴۰^{b}	۷۳/۸۶ ± ۸/۸۰^{b}	۱/۹۲ ± ۰/۰۷^{b}	۱/۹۵ ± ۰/۰۸^{e}
۱۲/۲۵	۱/۲۹ ± ۰/۷۸	۲/۲۸ ± ۰/۲۴^{b}	۱/۰۰ ± ۰/۲۰^{b}	۷۷/۶۴ ± ۵/۰۰^{b}	۲/۰۰ ± ۰/۰۵^{b}	۱/۸۸ ± ۰/۰۵^{e}
۴/۳۰	۱/۳۹ ± ۰/۳۲	۲/۸۱ ± ۰/۲۴^{c}	۱/۴۲ ± ۰/۰۸^{b}	۱۰۷/۰۴ ± ۲۸/۴۵^{b}	۲/۸۴ ± ۰/۱۷^{b}	۱/۳۲ ± ۰/۰۸^{d}
۸/۳۰	۱/۰۸ ± ۰/۰۶	۲/۷۱ ± ۰/۰۱^{c}	۱/۶۳ ± ۰/۰۵^{c}	۱۵۱/۷۸ ± ۱۴/۱۰^{b}	۳/۲۷ ± ۰/۱۱^{c}	۱/۱۵ ± ۰/۰۴^{d}
۱۲/۳۰	۱/۲۸ ± ۰/۲۸	۳/۱۱ ± ۰/۲۰^{d}	۱/۸۳ ± ۰/۰۹^{d}	۱۴۸/۳۲ ± ۳۶/۶۷^{c}	۳/۶۷ ± ۰/۱۸^{d}	۱/۰۳ ± ۰/۰۵^{c}
۴/۳۵	۱/۱۸ ± ۰/۱۰	۳/۰۹ ± ۰/۰۷^{d}	۱/۹۰ ± ۰/۰۳^{e}	۱۶۲/۵۰ ± ۱۶/۴۳^{c}	۳/۸۱ ± ۰/۰۶^{e}	۰/۹۸ ± ۰/۰۱^{b}
۸/۳۵	۱/۱۶ ± ۰/۰۹	۳/۱۴ ± ۰/۱۰^{d}	۱/۹۸ ± ۰/۰۱^{e}	۱۷۰/۵۶ ± ۱۲/۱۱^{c}	۳/۹۵ ± ۰/۰۲^{e}	۰/۹۵ ± ۰/۰۰^{b}
۱۲/۳۵	۱/۲۵ ± ۰/۰۵	۳/۸۱ ± ۰/۲۲^{e}	۲/۵۵ ± ۰/۲۳^{e}	۲۰۴/۰۹ ± ۲۲/۲۷^{c}	۵/۱۱ ± ۰/۴۷^{e}	۰/۷۴ ± ۰/۰۷^{a}

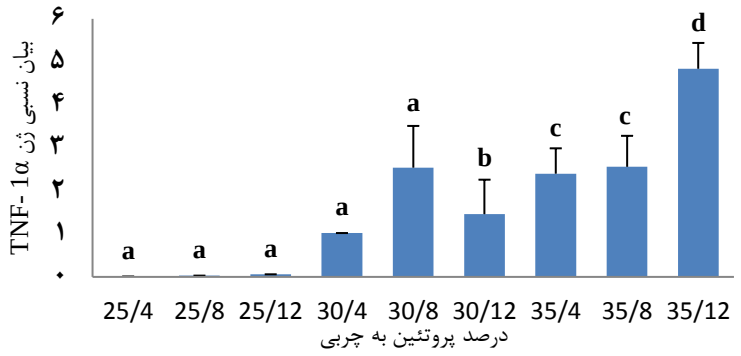
در هر ستون حروف انگلیسی متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$).

بیان ژن

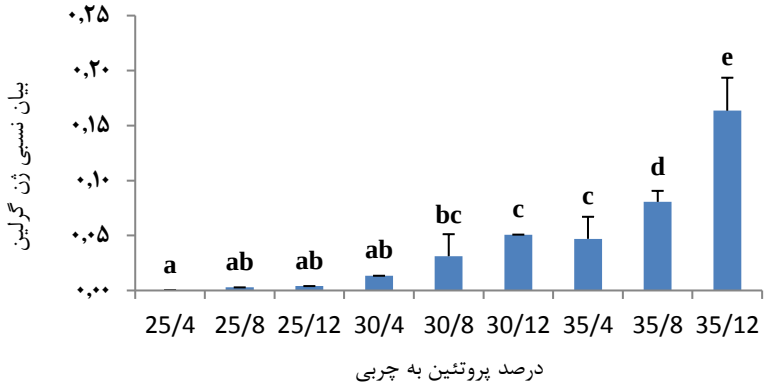
در این مطالعه با افزایش پروتئین میزان بیان ژن‌های ایمنی و اشتها در در تیمار ۳۵٪ نسبت به تیمارهای ۲۵ و ۳۰٪ به‌طور معنی‌دار افزایش نشان داد ($p<۰/۰۵$). با افزایش چربی جیره، بیان TNF- 1α افزایش معنی‌دار نداشت ($p>۰/۰۵$)، اما بیان ژن لایزوزیم در تیمار ۱۲٪ نسبت به تیمارهای ۸ و ۴٪ و نیز بیان ژن گرلین در تیمار ۱۲٪ نسبت به ۴٪ به‌طور معنی‌دار افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). اثر متقابل پروتئین و چربی نیز به طور معنی‌دار باعث افزایش بیان ژن‌های لایزوزیم (شکل ۱)، TNF- 1α (شکل ۲) و همچنین، ژن گرلین (شکل ۳) شد ($p<۰/۰۵$)، به‌طوری‌که تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۲۵٪ پروتئین و ۴٪ چربی کم‌ترین و تیمار ۳۵٪ پروتئین و ۱۲٪ چربی بیش‌ترین میزان بیان این ژن‌ها را نشان دادند. یافته‌های این تحقیق مشخص کرد که پروتئین و چربی جیره می‌توانند در بهبود عملکرد دستگاه ایمنی و اشتها در گورخرماهی نقش داشته باشند.



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



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



شکل ۳ سطوح بیان ژن گرلین تحت تأثیر سطوح مختلف پروتئین به چربی جیره در گورخرماهی.

بحث

رشد بدن فرآیند زیست‌شناختی دقیق و کاملی است که حاصل اثر عوامل ژنتیک و هورمونی بوده و همچنین، به‌طور مشخص، وابسته به ترکیبات غذایی مورد استفاده موجودات است (Beckman, 2011). پروتئین گران‌ترین ماده تشکیل دهنده جیره ماهی بوده و در واقع یک ماده مغذی ضروری است که برای اطمینان از سلامتی و رشد سلولی باید به مقادیر کافی تأمین شود. پروتئین‌های رژیم غذایی منبع اسیدهای آمینه ضروری هستند و نیتروژن را برای سنتز اسیدهای آمینه غیرضروری فراهم می‌کنند (Craig and Helfrich, 2002). کمبود اسیدهای آمینه ضروری می‌تواند منجر به اختلال در رشد، کاهش وزن زنده و کاهش بازدهی جیره و همچنین، کاهش مقاومت در برابر بیماری‌ها و اختلال در مکانیسم‌های پاسخ ایمنی در ماهی شود. کمبود پروتئین در رژیم غذایی می‌تواند به کاهش فعالیت لایزوزیم و محتوای پروتئین C واکنش پذیر در ماهی شود (یوسفی و حسینی‌فر، ۱۳۹۵). چربی‌ها هم منبع مهم انرژی هستند و هم اسیدهای چرب ضروری، فسفولیپیدها، استرول‌ها و ویتامین‌های محلول در چربی را که برای عملکرد مناسب فرآیندهای فیزیولوژیک و حفظ ساختار زیست‌شناختی و عملکرد غشاهای سلولی ضروری‌اند، را فراهم می‌کنند (Watanabe, 1982). کمیت و کیفیت آن‌ها در غذا می‌تواند با رشد، سوخت ساز لیپید، تغییرات بافت‌شناسی در کبد و روده و نیز مقاومت ماهی مرتبط باشد (Kalogeropoulos et al. 1992). بنابراین، تنظیم و افزایش کارایی دستگاه ایمنی در ماهیان از طریق دستکاری جیره‌های غذایی ابزاری قدرتمند و موثر جهت حفظ سلامت ماهی و کاهش تلفات است (قائدی و همکاران، ۱۳۹۳). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزایش پروتئین و چربی جیره و نیز اثر متقابل آن‌ها باعث افزایش شاخص‌های رشد و بیان ژن گرلین در گورخرماهی می‌شود. گرلین هورمون اشتهاست که مهمترین عامل برای ترشح آن، تغذیه است، به طوری که غلظت پلاسمایی آن طی روزه‌داری و گرسنگی افزایش و با دریافت غذا کاهش می‌یابد (Kojima and Kangawa, 2004). در راستای نتایج این تحقیق، افشار مازندران (۱۳۸۱) بیان کرد که کمبود پروتئین سبب کاهش میزان

رشد و بازدهی غذایی، بی‌اشتهایی، کاهش تعادل ازت و غلظت پروتئین سرم خون، کم‌خونی، تجمع چربی در کبد و کاهش ساخت هورمـون‌ها و آنـزیم‌ها در بـدن ماهی می‌شود. غضنفری (۱۳۸۸) نیز با بررسی تأثیر محدودیت غذایی و سطوح مختلف انرژی و پروتئین جیره بر عملکرد و بیان ژن گرلین در جوجه‌های گوشتی مشاهده کرد که با کاهش پروتئین جیره، بیان این ژن نیز کاهش می‌یابد. در تحقیقی دیگر، Schuchardt و همکاران (۲۰۰۸) با مطالعه بر روی ماهی خوراکی دندان‌دار قرمز (*Pagrus pagrus*) مشاهده کردند که میزان افزایش وزن بدن با افزایش چربـی از ۱۰ به ۱۵ ٪ در جیـره غذایی بهبـود می‌یابد. Kim و همکاران (۲۰۱۲) نیز با بررسی تأثیر سطوح مختلف پروتئین (۳۰،۲۰ و ۴۰٪) و چربی (۹ و ۱۷٪) جیره بر رشد و ترکیب بدن گربه ماهی شرقی دور (*Silurus asotus*) جوان بیشترین میزان رشد را در تیمارهای تغذیه شده با جیره حاوی ۴۰٪ پروتئین و ۱۷٪ چربی گزارش کردند. در مطالعه‌ای دیگر Chai و همکاران (۲۰۱۳) با بررسی تأثیر پروتئین (۳۶، ۴۰، ۴۴، ۴۸ و ۵۲٪) و چربی (۹ و ۱۵٪) جیره بر روی عملکرد رشد ماهی شوریده ژاپنی (*Nibea japonica*) مشاهده کردند که ماهیان تغذیه شده با جیره ۴۸٪ پروتئین و ۹٪ چربی بهترین رشد را از خود نشان دادند.

لایزوزیم در بسیاری از مهره داران وجود دارد و یکی از شاخص‌های دفاعی در برابر عوامل بیماری‌زاست که در ترشحات موکوسی، آبشش‌ها، بافت‌های کلیه، طحال، دستگاه گوارش و سرم خون یافت می‌شود (سلیقه زاده و همکاران، ۱۳۹۴؛ Iwama and Nakanishi, 1996). همچنین، در رابطه با التهابات، مولکول سایتوکینی فاکتور نکروز کننده تومور (TNF) نقش مهمی در ایمنی دارد. این مولکول به دنبال تحریک دستگاه ایمنی از گلبول‌های سفید ترشح می‌شود و علاوه بر خون، در کلیه نیز به میزان زیاد تجمع و ترشح دارد (Grayfer et al. 2008). در مطالعه حاضر، به خوبی نشان داده شد که بیان ژن‌های لایزوزیم و TNF- 1α تحت تأثیر افزایش سطوح پروتئین و چربی جیره و اثر متقابل آنها بوده است. هم‌راستا با نتایج بررسی حاضر، Huang و Chang (۲۰۱۵) گزارش کردند که میزان لایزوزیم در ماهی کپور آینه‌ای (*Cyprinus carpio*) با افزایش پروتئین جیره، به‌طور معنی‌دار افزایش می‌یابد. YildIrim-Aksoy و همکاران (۲۰۰۹) نیز با افزودن ۳ تا ۶٪ چربی به جیره گربه ماهی آفریقایی (*Ictalurus punctatus*) افزایش معنی‌دار فعالیت لایزوزیم سرم را نسبت به گروه شاهد مشاهده کردند. در مطالعه‌ای دیگر در ماهی *Larmichthys crocea* تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر متوسط n-3 HUFA، میزان رشد، پاسخ ایمنی غیراختصاصی، بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی (TLR_{22} و MyD_{88}) و مقاومـت مـاهی نسبت به آلودگی با انگل‌ها افزایش یافت و دلیل این امر این‌گونه تفسیر شد که n-3 HUFA جیره با تغییر سطوح بیان mRNA مربوط به این دو ژن، می‌تواند ایمنی و مقاومت به بیماری را تنظیم کند (Zuo et al. 2012).

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

منابع

افشار مازندران، ن. ۱۳۸۱. راهنـمای عملی تغـذیه و نهـاده‌های غذایی و دارویی آبزیان در ایران. انتشارات نوربخش ۲۱۶ ص.

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

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

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

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

چربی جیره بر عملکرد رشد بچه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum* Kamensky, 1901). مجله علمی شیلات ایران ۲۲: ۱۱۶-۱۰۱.

نویریان، ح.، مصطفی زاده، س.، طلوعی، م.ح. ۱۳۸۴. بررسی تاثیر سطوح مختلف پروتئین بر روی معیارهای شاخص رشد بچه ماهی (*Rutilus frisii kutum*). پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان ۱۸: ۶۸ -۶۱.

نویریان، ع.ح.، شعبانی‌پور، ن.، زمانی کیاسج محله، ح.ع.، خادم، ه. ۱۳۸۶. بررسی اثرات سطوح مختلف چربی بر روی معیارهای شاخص رشد بچه ماهی سفید جنوب دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*). پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان ۲۰: ۴۳-۳۵.

یوسفی، س.، حسینی فر، س.ح. ۱۳۹۵. انتقال مادری ایمنی در ماهیان با تاکید بر ماهیان زینتی. آبزیان زینتی ۳: ۸-۵.

Beckman, B.R. 2011. Perspectives on concordant and discordant relations between insulin-like growth factor 1 (IGF1) and growth in fishes. General and Comparative Endocrinology 170: 233-252.

Chai, X.J., Ji, W.X., Han, H., Dai, Y.X., Wang, Y. 2013. Growth, feed utilization, body composition and swimming performance of giant croaker, *Nibea japonica* Temminck and Schlegel, fed at different dietary protein and lipid levels. Aquaculture Nutrition 19: 928-935.

Craig, S., Helfrich, L.A. 2002. Undrestanding fish nutrition, and feeds and feeding Extension Specialists, Virginia-Maryland College of Veterinary Medicine, and Department of Fisheris and Wildlife Sciences,Virginia Tech, 420-256.

Crawford, A.D., Esguerra, C.V, Witte, P.A.M. 2008. Fishing for drugs from nature: zebra fish as a technology platform for natural product discovery. Planta Medica 74: 624-632.

De Almeida Bicudo, A.J., Sado, R.Y., Cyrino, J.E.P. 2009. Growth and haematology of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fed diets with varyingprotein to energy ratio. Aquaculture Research 40: 486-495.

Fox, B.K., Breves, J.P., Davis, L.K., Pierce, A.L., Hirano. T., Grau, E.G. 2010. Tissue-specific regulation of the growth hormone/ insulin-like growth factor axis during fasting and refeeding: Importance of muscle expression of IGF-I and IGF-II Mrna in the tilapia. General and Comparative Endocrinology 166: 573-580

Ghosh, S. Sinha, A., Sahu, C. 2007. Effect of probotic on reproductive performance in female live-bearing ornamental fish. Aquaculture Research 38: 518-526.

Grayfer, L., Walsh, J.G., Belosevic, M. 2008. Characterization and functional analysis of goldfish tumor necrosis factor alfa. Developmental and Comparative Immunology 32: 532-543.

Huang, j., Xu, Q., Chang, Y. 2015. Effect of temperature and dietry protein on gene expression of Hsp70 and Wap65 and immunity juvenile mirror carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture Research 46: 2776-2788.

Iwama, G., Nakanishi, T. 1996. The Fish Immune System. Organism, Pathogen and Environment. Academic Press, 395 p.

Kalogeropoulos., N. Alexis., M.N., Henderson, R.J. 1992. Effects of dietary soybean and cog liver oil levels on growth and body composition of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture 104: 293-308.

Kojima, M., Kangawa, K. 2004. Ghrelin: structure and function. Physiological Reviews 85: 495-512.

Lee, S.M., Kim, K.M. 2005. Effect of various levels of lipid exchanged with dextrin at different protein level in diet on growth and body composition of juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture Nutrition 11: 435-442.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{\Delta\Delta}$ C (T) Method. Methods 25: 402-408.

MacKenzie, D.S., VanPutte, C.M., Leiner, K.A. 1998. Nutrient regulation of endocrine function in fish. Aquaculture 161: 3-25.

Mandal, B., Mukherjee, A., Banerjee, S. 2010. Growth and pigmentation development efficiencies in fantail guppy (*Poecilia reticulate*) fed with commercially available feeds. Agriculture. Agriculture and Biology 1: 1264-1267.

Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I,M., Landt, O., Siegert, W., Nitsche, A. 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. Biochemical and Biophysical Research Communications 313: 856-862.

Rahimnejad, S., Lee, K.J. 2014. Dietary Isoleucine influences non-specific immune response in juvenile Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fisheries and Aquatic Sciences 14: 853-862.

Schuchardt, D., Vergara, J.M., Fernandez-Palacios, H., Kalinowski, C.T., Hernandez- Cruz, C.M., Izquierdo, M.S., Robaina, L. 2008. Effects of different dietary protein and lipid levels on growth, feed utilization and body composition of red porgy (*Pagrus pagrus*) fingerlings. Aquaculture Nutrition 14: 1-9.

Shalaby, A.M., Khattab, Y.A., Abdel Rahman, A.M. 2006. Effects of (*Allium sativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile tilapia (*Ooreochromis niloticus*). Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases 12: 172-201.

Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C. 2008. The behavior and ecology of the Zebra fish, *Danio rerio*. Biological Reviews 83: 13-34.

Tissera, K. 2012. The Global Ornamental Fish Industry: An outlook on the First Decade of the New Millennium. International Conference on the Global Ornamental Fish Industry–Way Forward. February 2012, Cochin, Kerala, India.

Watanabe, T. 1982. Lipid nutrition in fish. Comparative Biochemistry and Physiology 73: 3-15.

Wren, A.M., Small, C.J., Ward, H.L., Murphy, K.G., Dakin, C.L., Taheri, S., Kennedy, A.R., Roberts, G.H., Morgan, D.G., Ghatei, M.A., Bloom, S.R. 2001. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. Endocrinology 141: 4325-4328.

YildIrim-Aksoy, M., Lim. C., Shelby, R. H., klesius, P.H. 2009. Increasing fish oil levels in commercial diets influences hematological and hmmunological responses of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. ournal of the World Aquaculture Society 40: 76-86.

Zon, L.I., Peterson, R.T. 2005. In vivo drug discovery in the Zebrafish. Natural Review Drug Discovery 4: 35-44.

Zuo, R., Ai, Q., Mai, K., Xu, W., Wang, J., Xu, H., Liufu. Z., Zhang, Y. 2012. Effects of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids on growth, nonspecific immunity, expression of some immune related genes and disease resistance of large yellow croaker (*Larmichthys crocea*) following natural infestation of parasites (*Cryptocaryon irritans*). Fish and Shellfish Immunology 32: 249-258.

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

Fareideh Riki[1], Mohammad Sudagar[1], Hamed Paknejad[1], Siamak Yousefi Siyahkalrudy[2]

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

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

Received 26 May 2019; accepted 20 September 2019

Abstract

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

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

Corresponding author: sudagar.2015@gmail.com