Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics

Print ISSN: 2345-427X
Online ISSN: 2345-4288

Investigation of the effect of supplemented diet with rice husk extract (*Oryza sativa*) on growth performance and some related genes expression (GH, IGF-1)

Mostafa Saberiyan Juybari[1], Seyyed Mehdi Hosseinifard[*2], Hamed Manouchehri[3], Shayan Ghobadi[4], Reza Changizi[5]

1. Dept. of Aquaculture, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran. E-mail: saberian@yahoo.com
2. Corresponding Author, Dept. of Aquatic Animal Health, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran. E-mail: sm_hosseinifard@yahoo.com
3. Dept. of Aquaculture, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran. E-mail: hdmanuchehri@gmail.com
4. Dept. of Aquaculture, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran. E-mail: shgh_science@yahoo.com
5. Dept. of Aquaculture, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran. E-mail: rech76ir@gmail.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 12.19.2022
Revised: 01.28.2023
Accepted: 02.12.2023

Keywords:
Gene expressions,
Growth,
Ozone fish,
Rice husk extract

ABSTRACT

Despite the high amount of indigestible carbohydrates in rice husk as a natural source of prebiotics, it cannot be used directly in fish diet whose diet is more carnivorous. Hence, the aim of this research was conducted to investigation of rice husk extract on growth performance and expression of related genes (GH and IGF-1) in ozone fish fingerlings. For this aim, the number of 120 pieces of healthy ozone fish fingerlings (50 ± 2.6 g) was purchased and then was randomly transferred in tanks with a water volume of 1000 liters. They were fed for 60 days with different levels of rice husk extract in the basic diet (crud protein: 44.5%) including 0.5 , 1 and 2 g Kg^{-1} of diet along with a control group (with three replicates) at the rate of 5% of body weight. At the end of the trial, growth performance was evaluated by biometrical assay completely randomly. Also, brain tissue was sampled to investigate the expression of genes involved in growth (GH, IGF-1). The results showed that feeding ozone fish fingerlings with different levels of rice husk extract had a significant effect on the growth performance and the expression of related genes in treatments compared to the control group ($P<0.05$). So that the best results were observed in treatment fed with 2 g of rice husk extract in per kilogram of diet ($P<0.05$). In general, the results showed that using rice husk extract was able to improve the growth performance and the expression of related genes involved in growth in ozone fish fingerlings, and the best level recommended in this study was 2 grams in per kilogram of diet.

Cite this article: Saberiyan Juybari, Mostafa, Hosseinifard, Seyyed Mehdi, Manouchehri, Hamed, Ghobadi, Shayan, Changizi, Reza. 2024. Investigation of the effect of supplemented diet with rice husk extract (*Oryza sativa*) on growth performance and some related genes expression (GH, IGF-1). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 12 (4), 75-90.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/japu.2023.20903.1733
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان

شاپا چاپی: ۲۳٤٥-٤۲۷X
شاپا آنلاین: ۲۳٤٥-٤۲۸۸

بررسی اثر مکمل‌سازی جیره با عصاره پوسته برنج (*Oryza sativa*) روی عملکرد رشد و بیان برخی از ژن‌های وابسته به رشد (GH و IGF-1) در ماهی ازون‌برون (*Acipenser stellatus*)

مصطفی صابریان جویباری[۱]، سیدمهدی حسینی‌فرد*[۲]، حامد منوچهری[۳]، شایان قبادی[٤]، رضا چنگیزی[٥]

۱. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران. رایانامه: saberian@yahoo.com
۲. نویسنده مسئول، گروه بهداشت حیوانات آبزی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران. رایانامه: sm_hosseinifard@yahoo.com
۳. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران. رایانامه: hdmanuchehri@gmail.com
٤. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران. رایانامه: shgh_science@yahoo.com
٥. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران. رایانامه: rech76ir@gmail.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۱/۰۹/۲۸
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۱/۱۱/۰۸
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۱/۱۱/۲۳

واژه‌های کلیدی:
بیان ژن،
رشد،
عصاره پوسته برنج،
ماهی ازون‌برون

چکیده

علی‌رغم بالابودن میزان کربوهیدرات غیرقابل‌هضم در پوسته برنج به‌عنوان منبع طبیعی پری‌بیوتیک، نمی‌توان از آن به‌طور مستقیم در جیره ماهیانی که رژیم غذایی آن‌ها بیش‌تر به‌سمت گوشتخواری است، استفاده کرد. از این‌رو پژوهش حاضر با هدف بررسی عصاره پوسته برنج روی عملکرد رشد و بیان برخی از ژن‌های وابسته به رشد در ماهی ازون‌برون انجام شد. بدین‌منظور، تعداد ۱۲۰ قطعه بچه‌ماهی ازون‌برون (۲/٦±۵۰ گرم) به‌صورت تصادفی در تانک‌هایی با حجم آب ۱۰۰۰ لیتر به مدت ٦۰ روز با سطوح مختلف عصاره پوسته برنج در جیره غذایی پایه (پروتئین خام: ٤٤/۵ درصد) شامل ۰/۵، ۱ و ۲ گرم عصاره پوسته برنج در کیلوگرم جیره به همراه یک گروه شاهد (سه تکرار) به میزان ۵ درصد وزن بدن مورد تغذیه قرار گرفتند. در پایان دوره، برای بررسی عملکرد رشد زیست‌سنجی به‌طور کاملاً تصادفی صورت گرفت. هم‌چنین، برای بررسی بیان ژن‌های دخیل در رشد (GH، IGF-1) از بافت مغز نمونه‌برداری شد. یافته‌های حاصل نشان داد که تغذیه بچه‌ماهیان ازون‌برون با سطوح متفاوت عصاره پوسته برنج تأثیر معناداری در عملکرد رشد گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه شاهد داشت (P<۰/۰۵). به‌طوری‌که بهترین نتایج در گروه تغذیه شده با ۲ گرم عصاره پوسته برنج در کیلوگرم جیره مشاهده شد. هم‌چنین، بیان ژن‌های دخیل در رشد (GH، IGF-1) در گروه تغذیه شده با ۲ گرم عصاره پوسته برنج در کیلوگرم جیره به‌طور معناداری بیش‌تر از گروه شاهد مشاهده شد. (P<۰/۰۵). به‌طورکلی، نتایج نشان داد که استفاده از عصاره پوسته برنج توانست

سبب بهبود رشد و بیان نسبی ژن‌های وابسته به رشد در بچه‌ماهیان ازون‌برون شود. بهترین سطح پیشنهادی در پژوهش حاضر، میزان ۲ گرم در کیلوگرم جیره معرفی گردید.

استناد: صابریان جویباری، مصطفی، حسینی‌فرد، سیدمهدی، منوچهری، حامد، قبادی، شایان، چنگیزی، رضا (۱۴۰۲). بررسی اثر مکمل‌سازی جیره با عصاره پوسته برنج (*Oryza sativa*) روی عملکرد رشد و بیان برخی از ژن‌های وابسته به رشد (GH و IGF-1) در ماهی ازون‌برون (*Acipenser stellatus*). *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ۱۲ (۴)، ۹۰-۷۵.
DOI: 10.22069/japu.2023.20903.1733

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

ماهیان خاویاری یکی از قدیمی‌ترین گروه ماهیان غضروفی- استخوانی یا فسیل‌های به‌جامانده از دوره‌های قبل از ژوراسیک‌اند. در میان ماهیان خاویاری، گونه ازون‌برون (*Acipenser stallatus*) یکی از گونه‌های مهم ماهیان خاویاری است که جمعیت قابل‌توجهی را در دریای خزر به خود اختصاص داده است. از مزیت‌های این گونه می‌توان به کیفیت بالای گوشت، بازارپسندی فوق‌العاده آن، مدت زمان کم‌تر برای رسیدن به مرحله بلوغ و تولید خاویار اشاره کرد. این گونه به علت صید بی‌رویه، تخریب زیستگاه‌های طبیعی و آلودگی آب در معرض خطر انقراض قرار گرفته است (۱ و ۲). پرورش ماهی ازون‌برون تا اندازه بازاری می‌تواند به کاهش فشار بر جمعیت طبیعی آن در دریای خزر، تامین نیاز جهانی به گوشت و خاویار آن کمک کند (۳ و ٤).

پرورش موفقیت‌آمیز ماهیان بستگی به قابلیت دسترسی به غذای مناسب جهت تغذیه دارد تا بتواند سلامت و رشد ماهیان را تضمین کند. توسعه آبزی‌پروری و افزایش تقاضا برای آبزیان باعث افزایش تراکم پرورش در استخرها و در نتیجه افزایش استرس و شیوع بیماری‌ها شده است. تاکنون داروهای شیمیایی زیادی به‌طور گسترده برای جلوگیری از بروز بیماری و درمان آن‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند، اما این داروها باعث اثرات منفی زیادی مانند: آلودگی محیط زیست، ایجاد ضرر برای سلامتی انسان، ایجاد مقاومت در گونه‌های باکتریایی و انباشته شدن در بافت‌های بدن آبزیان می‌شوند (۵).

در چند سال اخیر، توجه زیادی به استفاده از ترکیبات گیاهی به‌عنوان دارو برای کنترل و درمان بیماری‌های آبزیان به‌عنوان جایگزینی برای داروهای شیمیایی شده است. این ترکیبات گیاهی به‌ندرت باعث ایجاد مقاومت دارویی در میکروب‌ها می‌شوند و ترکیبات حاصل از آن‌ها به نسبت داروهای مصنوعی راحت‌تر تجزیه می‌شوند. قرار گرفتن این ترکیبات در جیره آبزیان راه‌حل مناسبی در راستای پیشگیری از بروز بیماری و بهبود عملکرد رشد، تغذیه و افزایش تولید می‌باشد (٦ و ۷). از جمله ترکیبات گیاهی که روی رشد و ایمنی آبزیان تأثیر مثبت داشتند می‌توان به قارچ خوراکی (۸، ۹، ۱۰)، سیر (۱۱)، زنجبیل (۱۲)، گزنه (۱۳ و ١٤)، انبه (۱۳)، زیره سیاه (۱۵) و آلوئه‌ورا (١٦) اشاره کرد.

یکی دیگر از ترکیبات گیاهی که در سال‌های اخیر مورد توجه پژوهش‌گران قرار گرفته است برنج (*Oryza sativa*) است. پوسته برنج غلافی است که اطراف سبوس و برنج سفید را در بر می‌گیرد. در واقع، تقریباً یک پنجم وزن شلتوک برنج به پوسته آن اختصاص دارد که چربی پایین و فیبر زیادی دارد (۱۷). تولید سالیانه شلتوک برنج حدود دومیلیون و نهصد تن است. هم‌چنین، با توجه به این موضوع که ضایعات ۲۰ درصدی پوسته برنج در شالیکوبی‌های سنتی همواره وجود دارد، بنابراین می‌توان دریافت که سالانه حدود ٦۰۰ هزار تن پوسته برنج بدون هیچ‌گونه استفاده دور ریخته می‌شود و بدین‌صورت آلودگی محیط زیست را در پی دارد (۱۸). اگرچه، پژوهش‌گران در گذشته پوسته خارجی برنج را فاقد هر گونه ماده مغذی می‌دانستند (۱۹)، اندازه‌گیری‌ها نشان داد که پوسته خارجی برنج حاوی ۹۰-۹۲ درصد ماده خشک، ٤-٦ درصد چربی، ١٦-۱۷ درصد خاکستر، ۳/۲-۲/۵ درصد پروتئین خام، ۲۵۰۰-۳۰۰۰ کیلوکالری در کیلوگرم انرژی خام و ۳٤-٤۵ درصد فیبر خام می‌باشد (۲۰). هم‌چنین، پژوهش‌ها نشان داد که ۷۵-۹۰ درصد از پوسته برنج از مواد آلی و بقیه آن از ترکیبات معدنی تشکیل شده است. بخش آلی پوسته خارجی برنج شامل سلولز و همی‌سلوز به میزان ۵۰ درصد و لیگنین به‌میزان ۲٦ درصد است، سایر

پلی‌ساکاریدهای موجود در پوسته برنج شامل آرابینوز، گالاکتوز، مانوز، گلوکز و زایلوز است. هم‌چنین، سهم عمده مواد معدنی آن سیلیکا است، این موضوع نشان می‌دهد این محصول حاوی مقادیر متنابهی فیبر (عمدتاً نامحلول) است (۱۹، ۲۱، ۲۲). بنابراین، می‌توان از این ترکیب به‌عنوان ماده‌ای که دارای خاصیت پری‌بیوتیکی است، اشاره کرد.

تاکنون از پوسته برنج به‌عنوان ماده خوراکی در تغذیه نشخوارکنندگان به‌طور معمول استفاده می‌شده است. این درحالی است که استفاده از این ماده خوراکی در خوراک طیور و آبزیان به‌علت غلظت مواد مغذی پایین‌تر، بالابودن محتوای سیلیکا و خاکستر، خصوصیات سایشی و پرکنندگی با محدودیت‌هایی مواجه است (۲۳). از آن‌جایی‌که برنج نقش به‌سزایی در تامین انرژی جوامع انسانی دارد و پوسته خارجی باقی‌مانده طی پروسه بوجاری اغلب کاربرد ثابتی نداشته و به‌جز مواردی معدود از مصارف صنعتی و یا مصرف به‌عنوان بستر در مزارع پرورش طیور، بخش اعظم آن معدوم می‌گردد (۱۹) و تاکنون پژوهش مجزا و اختصاصی در خصوص اثر عصاره پوسته برنج روی عملکرد رشد ازون برون جوان صورت نگرفته است؛ بنابراین، هدف از انجام این پژوهش، بررسی اثر افزودن سطوح متفاوت عصاره پوسته برنج روی عملکرد رشد و بیان برخی از ژن‌های دخیل در رشد (GH، IGF-1) در ماهی ازون‌برون بود.

مواد و روش‌ها

تهیه و پرورش بچه‌ماهی‌های ازون‌برون: تعداد ۱۲۰ قطعه بچه‌ماهی ازون‌برون با میانگین وزنی ۲/٦±۵۰ گرم از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید رجایی واقع در شهرستان ساری (استان مازندران) تهیه گردید. قبل از انتقال ماهیان به مخازن نگهداری، حمام نمک اولیه به‌میزان ۳ درصد انجام گرفت (۲٤). سپس، بچه‌ماهیان بعد از گذشت مدت زمان ۲ هفته جهت سازگاری با شرایط آزمایش، به تانک‌های از پیش آماده شده منتقل شدند. ارتفاع آب برای تمام تانک‌ها مساوی (۲۵) و در حد ۱±٤۰ سانتی‌متر و حجم آبگیری برای تانک‌ها ۱۰۰۰ لیتر در نظر گرفته شد (۲٦).

تهیه عصاره پوسته برنج: برای تهیه عصاره پوسته برنج، مقدار ۱ کیلوگرم پوسته برنج با ۱۰ لیتر آب مقطر به‌مدت ۵ ساعت در دمای ۹۰-۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از خنک شدن از صافی عبور داده شد. عصاره آبی مربوطه با ٤ برابر حجم از اتانول ۹۵ درصد مخلوط شد تا پلی‌ساکاریدهای خام رسوب دهند در این مرحله، محتوای پروتئین و نشاسته که شامل پلی‌ساکاریدهای خام بود، طبق روش انجمن شیمیدانان رسمی تجزیه و تحلیل با کد ۱۹۹/٤۳ و با استفاده از کیت سنجش فیبر رژیمی کل (ساخت ایرلند) حذف شد. پس از تیمار آنزیمی، پلی‌ساکاریدهای غیرقابل هضم تحت تیمار یک شبه، با اتانول در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد رسوب داده شدند. پلی‌ساکاریدهای غیرقابل‌هضم پوسته برنج در آب مقطر داغ حل شده، فیلتر شده و برای استفاده‌های بعدی خشک شدند. دلمه‌های به‌دست آمده پس از خشک شدن آسیاب و سپس این پودر در سطوح مختلف و براساس جدول ۱ به جیره بچه‌ماهیان ازون‌برون افزوده شد (۲٦).

نحوه تیماربندی بچه‌ماهیان ازون‌برون: بچه‌ماهیان در ٤ گروه (۳ گروه تیمار و ۱ گروه شاهد) هر کدام با ۳ تکرار در هر گروه به‌مدت ۲ ماه (٦۰ روز) با جیره حاوی سطوح متفاوت عصاره پوسته برنج تغذیه شدند. غذای مورد نیاز به‌صورت دستی آماده شد (جدول ۲) که حاوی آرد گندم، پودر ماهی، آرد ذرت، سویا، روغن ماهی، روغن سویا، کیتین ویتامین، مواد معدنی و عصاره پوسته برنج بود (۲۷). هم‌چنین، آنالیز تقریبی ترکیب جیره‌های آزمایشی در جدول ۳ آورده شده است (۲۸).

جدول ۱- نحوه تیماربندی بچه‌ماهی ازون‌برون به‌مدت ٦۰ روز (۲۰).

تیماربندی	عصاره پوسته برنج (گرم در کیلوگرم جیره)
گروه شاهد	۰
تیمار ۱	۰/۵
تیمار ۲	۱
تیمار ۳	۲

جدول ۲- جیره غذایی بچه‌ماهی ازون‌برون انگشت‌قد طی دوره پرورش (گرم در کیلوگرم وزن خشک جیره) (۲۷).

گروه	پودر ماهی	آرد گندم	آرد ذرت	سویا	روغن ماهی	روغن سویا	ویتامین*	مواد معدنی**	لیسیتین	عصاره پوسته برنج (گرم)
شاهد	٤۵۰	۸۰	۸۰	۲۰۰	۱۰۰	٦۰	۱۵	۱۰	۵	۰
تیمار۱	٤۵۰	۸۰	۸۰	۲۰۰	۱۰۰	٦۰	۱۵	۱۰	۵	۰/۵
تیمار۲	٤۵۰	۸۰	۸۰	۲۰۰	۱۰۰	٦۰	۱۵	۱۰	۵	۱
تیمار۳	٤۵۰	۸۰	۸۰	۲۰۰	۱۰۰	٦۰	۱۵	۱۰	۵	۲

*مخلوط ویتامین (گرم در ۱۰۰ گرم مخلوط ویتامین به جز ویتامین A وD_3): ویتامین A: ۱۸۰۰۰۰ واحد بین‌المللی، ویتامین D_3: ٦۰۰۰۰ واحد بین‌المللی، ویتامین E: ٤، ویتامین C: ٦، K_3: ۰/۳، تیامین: ۰/٦، ریبوفلاوین: ۰/٦، نیاسین: ۲، پیریدوکسین: ۰/٤، پنتوتنیک اسید: ۳/۵، بیوتین: ۰/۵، فولیک اسید: ۰/۳، سیانوکوبال آمین: ۰/۸، اینوزیتول: ۲

**مخلوط مواد معدنی (گرم در ۱۰۰ گرم مخلوط مواد معدنی): آهن: ۲/۵، منیزیم: ۳، پتاسیم: ۳/۵، منگنز، ۱/۷، کبالت: ۰/۰۵، مس: ۰/۵، سلنیوم: ۰/۲۵، ید: ۰/۱

جدول ۳- آنالیز تقریبی ترکیب جیره‌های آزمایشی.

ترکیبات	درصد
پروتئین خام	٤٤/۵
چربی خام	۱۹/۸
خاکستر	۱۳/٤
فیبر	۲/۲
رطوبت	۸/۷

بررسی شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب: غذادهی بچه‌ماهیان به میزان ۵ درصد وزن بدن (۲۹) در دو نوبت در شبانه‌روز (ساعت ۸ صبح و ٦ عصر) انجام گرفت. آب مخازن به‌طور مداوم و با دبی ۰/۵ لیتر در ثانیه تعویض می‌شد. برای جلوگیری از تأثیر شرایط محیطی آزمایش، فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب در زمان‌بندی مشخص و برای ثابت نگه داشته شدن در حد مشخص شده هر هفته اندازه‌گیری شدند؛ به‌طوری‌که دمای آب (با استفاده ار دماسنج جیوه‌ای، Mahiran Aquarium Thermometer) به‌طور

روزانه و در سه نوبت، اکسیژن محلول با استفاده از اکسی‌متر، دستگاه EUTECH مدل DO6 و pH با استفاده از پی‌اچ‌متر ISTA مدل I-818 نیز به‌طور هفتگی اندازه‌گیری گردید. بر این اساس، محدوده دمایی بین ۲±۱۸ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۰/۲±۸/۹ میلی‌گرم در لیتر و pH ۰/۰۲±۷/۹ تقریباً ثابت بود. هم‌چنین شرایط نوری نیز به صورت طبیعی در نظر گرفته شده بود (۲۵).

اندازه‌گیری شاخص‌های رشد: زیست‌سنجی بچه‌ماهیان در ابتدا و انتهای آزمایش انجام شد. از این‌رو، از خط‌کش با دقت ۱ میلی‌متر برای اندازه‌گیری طول بچه‌ماهیان و از ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ گرم برای اندازه‌گیری وزن آن‌ها استفاده گردید. شاخص‌های رشد شامل: وزن نهایی، درصد افزایش وزن، نرخ رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی و نرخ غذاگیری روزانه در تمامی گروه‌ها با استفاده از رابطه‌های زیر محاسبه گردید (۳۰، ۳۱، ۳۲، ۳۳).

۱۰۰ × [(گرم) وزن اولیه بدن / ((گرم) وزن اولیه بدن – (گرم) وزن نهایی بدن)] = (٪) درصد افزایش وزن بدن

۱۰۰ × [طول دوره پرورش بر حسب روز / (لگاریتم طبیعی وزن اولیه بدن – لگاریتم طبیعی وزن نهایی بدن)] = (روز / درصد وزنی) نرخ رشد ویژه

[(گرم) افزایش وزن / (گرم) مقدار غذای مصرف شده] = ضریب تبدیل غذایی

بررسی بیان نسبی ژن‌های وابسته به رشد: به‌منظور بررسی بیان ژن‌های مرتبط با رشد (GH, IGF-1) در پایان آزمایش، از هر تکرار ماهیان ازون‌برون ۲ قطعه ماهی به‌طور کاملاً تصادفی صید و تحت شرایط استریل از مغز آن‌ها نمونه‌برداری شد. نمونه‌های گرفته شده از ماهیان بلافاصله در ازت مایع (با دمای ۱۹۶– درجه سانتی‌گراد) فریز شدند؛ سپس در فریزر ۸۰– درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند (۳٤). در این آزمایش استخراج RNA بر اساس روش Awad و همکاران (۳۵) توسط ماده هضم‌کننده RNAx-Plus و با رعایت دستورالعمل پیشنهادی توسط شرکت سازنده انجام شد. ارزیابی کیفی RNA کل توسط دستگاه الکتروفورز و ژل آگارز ۱ درصد و کمیت (غلظت) RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ (ساخت آمریکا) تعیین گردید. سنتز cDNA با استفاده از مسترمیکس شرکت جینت بایو محصول کشور کره و طبق دستورالعمل درج شده توسط شرکت سازنده انجام شد. به این صورت که ۵ ماکرولیتر از RNA که قبلاً آماده شده با ۱ ماکرولیتر آغازگر الیگودی تی به میکروتیوپ‌های جدید و استریل اضافه شد و با آب عاری از نوکلئاز به حجم ۱۰ ماکرولیتر مستر حاوی آنزیم ریورس ترانسکریپتاز به آن اضافه شد. در نهایت با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٦۰ دقیقه و ۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد و سپس محلول حاوی cDNA به حجم ۲۰ ماکرولیتر به دمای ۸۰– منتقل شد. توالی آغازگر اختصاصی برای ژن رشد (GH)، فاکتورشبه انسولین (IGF-1) و ژن کنترل داخلی در جدول ٤ آورده شده است. Real time PCR در تیوپ‌های مخصوص آن و در ۳ تکرار تکنیکی برای هر تیمار صورت گرفت که محتویات هر تیوپ به مقدار ۲۰ میکرولیتر شامل: ۱۰ میکرولیتر بافر سایبرگرین، ۱ میکرولیتر آغازگر پیش‌رونده، ۱ میکرولیتر آغازگر پس‌رونده، ۲/۸ میکرولیتر آب تزریق، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تگ پلیمراز و ۵ میکرولیتر cDNA رقیق شده بود (۲۲).

جدول ٤- آغازگر اختصاصی برای ژن رشد (GH)، فاکتورشبه انسولین (IGF-1) و ژن کنترل داخلی (۳٦).

نام آغازگر		توالی (´۳-´۵)	دمای‌اتصال‌آغازگرها (سانتی‌گراد)	طول قطعه (bp)	کارایی پرایمر
Beta-actin	آغازگر رفت (F)	AGGTCATCACCATCGGCAAT	۵۸	۱٤۰	۹۸
	آغازگر برگشت (R)	GATGTCCACGTCGCACTTCT			
GH	آغازگر رفت (F)	GTGGTCAAACTCCGCAAGA	۵۹	۲۳۰	۹٦
	آغازگر برگشت (R)	GCCAGTAAGGAGGATGAGGA			
IGF-1	آغازگر رفت (F)	CAGGGGCATTGGTGTGA	۵۵	۱۵٤	۹۵
	آغازگر برگشت (R)	GCAGCGTGTCTACAAGC			

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. داده‌های مربوط به بیان نسبی رشد، ابتدا توسط فرمول $۲^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta\Delta Ct$ برابر است با ΔCt ژن هدف منهای ΔCt کالیبراتور) آنالیز شدند (۳۷). سپس، تمام داده‌های به‌دست آمده از پژوهش حاضر جهت بررسی نرمالیتی با استفاده از آزمون کولوموگروف اسمیرنوف بررسی شدند. سپس، با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد در نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۱ استفاده شد. هم‌چنین، تمامی نمودارها و جدول‌ها در محیط آفیس ۲۰۱۳ رسیم گردیدند.

نتایج و بحث

عملکرد رشد: نتایج حاصل از بررسی شاخص‌های رشد بچه‌ماهیان ازون‌برون تغذیه شده با سطوح متفاوت عصاره پوسته برنج در جدول ۵ آورده شده است. براساس نتایج مشخص گردید که بهترین عملکرد رشد شامل: وزن نهایی، درصد افزایش وزن، نرخ رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی به‌طور معناداری در تیمار ۳ (۲ گرم عصاره) مشاهده شد ($P<۰/۰۵$) و گروه شاهد پایین‌ترین عملکرد رشد و بیش‌ترین ضریب تبدیل غذایی را داشت ($P<۰/۰۵$). با این‌حال، نرخ غذاگیری روزانه برای تمامی گروه‌ها مشابه یکدیگر بود ($P>۰/۰۵$).

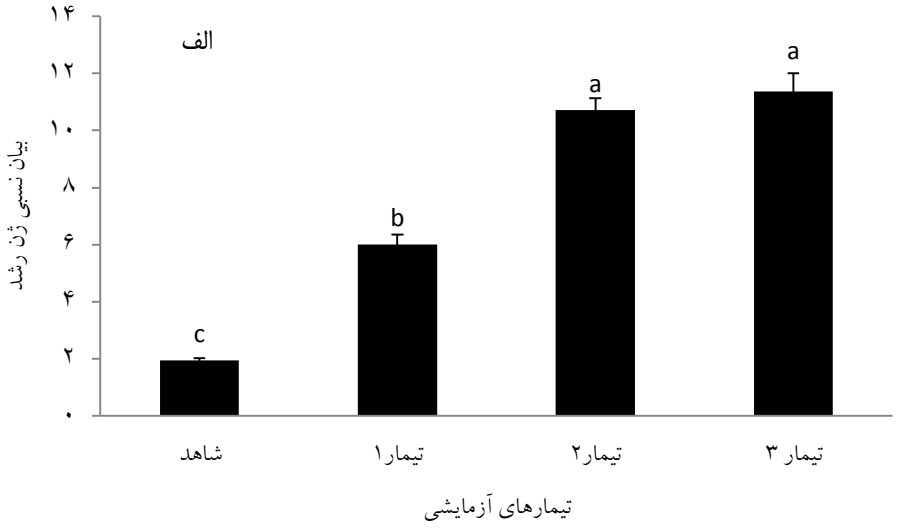
جدول ۵- بررسی شاخص‌های رشد بچه‌ماهیان ازون‌برون تغذیه شده با سطوح متفاوت عصاره پوسته برنج به‌مدت ٦۰ روز.

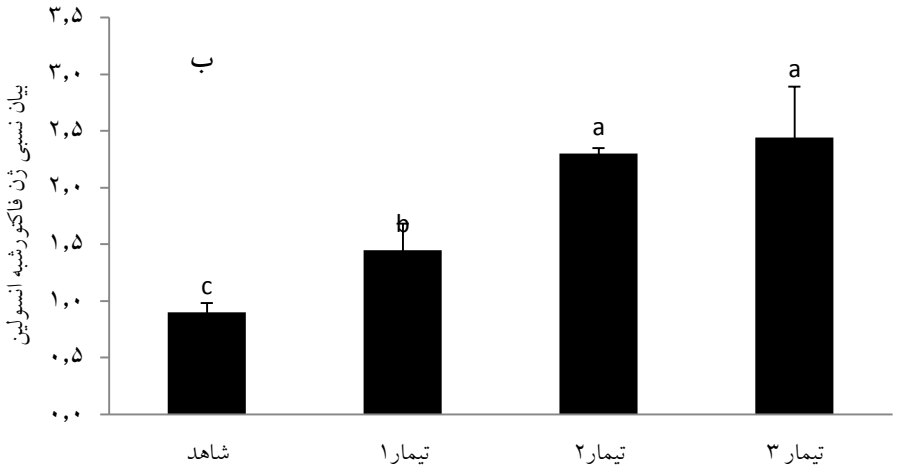
	گروه شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
وزن اولیه (گرم)	۵۰/۰۳ ± ۰/۷^{a}	٤۹/۹۸ ± ۲/۱۷^{a}	۵۱/۰۰ ± ۰/۱۹^{a}	۵۰/۳۷ ± ۱/۰۰^{a}
وزن نهایی (گرم)	٦٤/۲۰ ± ۰/٦۸^{d}	٦۸/۱۰ ± ۰/۸۷^{c}	۷۳/۱۳ ± ۰/۳۸^{b}	۷٦/۰۰ ± ۰/۲٦^{a}
طول نهایی (سانتی‌متر)	۳۷/۹۰ ± ۰/۸۰^{c}	۳۹/۱٦ ± ۰/۲۵^{b}	٤۰/٦۳ ± ۰/۲۱^{a}	٤۰/۹۷ ± ۰/۱۵^{a}
درصد افزایش وزن بدن	۲۹/۳۵ ± ۵/۹۰^{b}	۳٤/۵۸ ± ۵/۲۹^{ab}	٤٤/٤۱ ± ۳/۷۲^{a}	٤٦/۰۳ ± ۷/۹۰^{a}
ضریب تبدیل غذایی	۱/۹٦ ± ۰/۰۵^{a}	۱/۸۸ ± ۰/۰۸^{a}	۱/۷۳ ± ۰/۰۳^{b}	۱/٦۰ ± ۰/۰٤^{c}
نرخ رشد ویژه (درصد در روز)	۰/٤۲ ±۰/۰۷^{c}	۰/٤۹ ± ۰/۰٦^{b}	۰/٦۱ ± ۰/۰٤^{a}	۰/٦۲ ± ۰/۰۸^{a}
نرخ غذاگیری روزانه (گرم)	۰/۸٤ ± ۰/۱۷^{a}	۰/۹۳ ± ۰/۱۲^{a}	۱/۰٦ ± ۰/۰٦^{a}	۱/۰۱ ± ۰/۱۲^{a}

ملاحظات: گروه شاهد: گروه تغذیه شده با جیره غذایی پایه و بدون عصاره، تیمار ۱: ۰/۵ گرم عصاره پوسته برنج، تیمار ۲: ۱ گرم عصاره پوسته برنج، تیمار ۳: ۲ گرم عصاره پوسته برنج

حروف لاتین متفاوت نشان‌دهنده وجود معناداری در هر ردیف می‌باشد ($P<۰/۰۵$)

بیان نسبی ژن‌های وابسته به رشد: نتایج حاصل از بررسی بیان نسبی ژن‌های دخیل در رشد ماهیان ازون برون تغذیه شده با سطوح متفاوت عصاره پوسته برنج نشان داد که بیشترین بیان نسبی ژن‌های GH و IGF-1 در گروه تغذیه شده با ۲ گرم عصاره پوسته برنج مشاهده شد (شکل ۱)، که به‌طور معناداری با گروه شاهد اختلاف معنادار داشت (P <۰/۰۵). بااین‌حال، میزان بیان نسبی این دو ژن در تیمار ۲ و ۳ با یکدیگر اختلاف معنادار نداشت (P>۰/۰۵) (شکل ۱).





شکل ۱- بررسی نسبی بیان ژن‌های وابسته به رشد: الف) GH و ب) IGF-1 در بچه‌ماهیان ازون‌برون تغذیه شده با سطوح متفاوت عصاره پوسته برنج به مدت ۶۰ روز.

ملاحظات: گروه شاهد: گروه تغذیه شده با جیره غذایی پایه، تیمار ۱: ۰/۵ گرم عصاره پوسته برنج، تیمار ۲: ۱ گرم عصاره پوسته برنج، تیمار ۳: ۲ گرم عصاره پوسته برنج

***حروف لاتین متفاوت نشان‌دهنده وجود معناداری در هر ستون می‌باشد (P<۰/۰۵)**

در صنعت پرورش ماهیان، بیش از ۵۰ درصد هزینه‌های تولید مربوط به تامین غذا می‌شود (۳۸). از این‌رو، استفاده از فناوری‌های نوین در افزایش بهره‌وری بیش‌تر و همسو با آن کاهش هزینه تولید از مهم‌ترین اهداف در آبزی‌پروری پایدار است (۳۹). امروزه، بیش‌ترین مطالعات در حوزه آبزی‌پروری پایدار در ارتباط با استراتژی‌های تغذیه و بهینه‌سازی ترکیبات غذایی برای گونه‌های مهم ماهیان تجاری قابل پرورش در مزارع پرورشی به‌خصوص ماهیان خاویاری می‌باشد (٤۰). این مطالعات در جهت افزایش کارایی ترکیبات مغذی جیره یعنی پروتئین‌ها و چربی جیره بوده که سبب افزایش قابلیت هضم آن‌ها گردد. تغذیه مناسب به‌عنوان شاخص حیاتی در ارتقاء رشد طبیعی و سلامت موجود در نظر گرفته می‌شود. بنابراین، دستیابی به الگوها و عوامل آنابولیکی که بتواند افزایش عملکرد رشد را به همراه داشته باشد، از اهداف مهم مدیریت مزارع پرورشی قلمداد می‌گردد. بهینه‌سازی شاخص‌های تغذیه‌ای و سلامت می‌تواند باعث سازگاری اکولوژیکی، رشد بهتر و کاهش تلفات سنگین در پرورش آبزیان گردد (٤۱).

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که بهترین عملکرد رشد شامل: وزن نهایی، درصد افزایش وزن، نرخ رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی به‌طور معناداری در تیمار ۳ (۲ گرم عصاره) وجود داشت. پوسته برنج منبع غنی از فیبرهای نامحلول ااست که به‌طور عادی غیرقابل هضم می‌باشند و به همین دلیل دارای خاصیت پری‌بیوتیکی است (٤۲). براساس گزارش‌های، پری‌بیوتیک یک ماده غذایی غیرقابل‌هضم است که با تحریک انتخابی رشد و/یا فعالیت یک یا تعداد محدودی از باکتری‌ها در روده میزبان، سلامت آن را به‌طور مفید تحت‌تأثیر قرار می‌دهد (٤۳). با توجه به سازوکار پری‌بیوتیک‌ها روی ارتقاء رشد و جمعیت میکروبی باکتری‌های مفید روده، هضم و جذب مواد غذایی به‌طور غیرمستقیم افزایش می‌یابد و سبب بهبود کارایی تغذیه در بدن میزبان می‌گردد (٤٤)؛ به‌طوری‌که باکتری‌های مفید روده از پری‌بیوتیک‌ها استفاده می‌کنند و با افزایش تولید آنزیم‌های خارج سلولی هضم مواد غذایی روده را افزایش می‌دهند (٤۵). در تطابق با نتایج پژوهش حاضر می‌توان به مطالعات Liu و همکاران (٤٦)، Yousefian و Amiri (٤۷)، Ringø و همکاران (٤۸)، Mohammadian و همکاران (٤۹) و Sîrbu و همکاران (۵۰) اشاره کرد که همگی این مطالعات اثرات مثبت پری‌بیوتیک‌ها را روی افزایش رشد میزبان گزارش کردند. با این وجود، Akrami و همکاران (۵۱) گزارش کردند که استفاده از جیره حاوی پری‌بیوتیک نه تنها هیچ اثری روی رشد فیل‌ماهیان جوان نداشت، بلکه سبب کاهش برخی از شاخص‌های رشد شد. البته، کاهش برخی از پارامترهای رشد در گروه‌های تیمار ممکن است به‌دلیل تأثیر برخی دیگر از پارامترهای مؤثر در محل آزمایش یا وضعیت خود ماهی باشد، نه بر اثر تأثیر مکمل پری‌بیوتیکی. بااین‌حال، می‌توان چنین نتیجه گرفت که به‌طورکلی مکمل پری‌بیوتیکی تأثیر مثبت روی رشد فیل‌ماهیان جوان نداشته است (٤۷).

هورمون رشد (GH) هورمونی چندکاربره است که در تنظیم فرآیندهای متعدد و پیچیده فیزیولوژیک بدن از جمله تسریع رشد سوماتیکی، رشد و نمو گنادی، ذخیره انرژی، تنظیم متابولیسم چربی‌ها، پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها، تنظیم اسمزی، کارکردهای سیستم ایمنی، تولیدمثل، دگردیسی و تکوین، اشتها و رفتارهای اجتماعی مشارکت دارد (٤۸، ۵٤). اسیدهای آمینه دریافت شده از جیره غذایی در پلاسما به داخل سلول‌ها انتقال می‌یابند و در ساختمان پروتئین‌ها شرکت کرده و به صورت ATP به‌عنوان انرژی ذخیره می‌شوند که این امر به تسهیل فرآیند پروتئین‌سازی توسط هورمون رشد کمک

می‌نماید (٥٤، ٥٥). در پژوهش حاضر، مشخص گردید که مقدار بیان نسبی ژن GH در تیمارهای آزمایشی در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معناداری افزایش یافت. این افزایش را می‌توان چنین توجیه نمود که عصاره پوسته برنج با دارابودن مقدار زیادی کربوهیدرات غیرقابل‌هضم که دارای پتانسیل بالقوه به‌عنوان یک پری‌بیوتیک طبیعی است، توانست با تأثیر روی جمعیت میکروبی مفید روده میزبان، هضم مواد غذایی را افزایش داده و با جذب حداکثری اسیدهای آمینه سبب افزایش میزان ترشح هورمون رشد در این تیمارهای آزمایشی شود. در تطابق با نتایج مطالعه حاضر می‌توان به پژوهش‌های Xu و همکاران (٥٦)، Midhun و همکاران (٥٧) و Yilmaz و همکاران (٥٨) اشاره کرد که بیان کردند پس از مکمل‌سازی جیره غذایی گونه‌های مورد بررسی با مکمل‌های پری‌بیوتیکی، بیان نسبی ژن GH در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت.

فاکتور رشد شبه انسولین-١ یا همان IGF-1 (سوماتومدین C) یکی از اعضای خانواده IGFها است. IGF-1 پروتئینی است که از لحاظ ساختار مولکولی بسیار شبیه انسولین است و در رشد موجودات نقش مهمی بر عهده دارد. ژن IGF-1 از جمله مهم‌ترین ژن‌های مرتبط با رشد و توسعه بافت‌های بدن حیوانات می‌باشد (٥٩). مطالعات نشان داده است که غلظت IGF-1 در پلاسما در زمان بلوغ و رشد آبزیان به حداکثر میزان خود می‌رسد. عوامل مختلفی مانند رژیم غذایی، شرایط محیطی و شاخص‌های ژنتیکی می‌توانند در کنترل غلظت IGF-1 تأثیرگذار باشند. بررسی‌ها نشان داده‌اند که جیره‌های غذایی در مقایسه با سایر فاکتورها تأثیر به‌سزایی در میزان پاسخ گیرنده‌های هورمون IGF-1 در بافت کبد دارند بنابراین می‌توان سطوح فاکتور رشد شبه انسولین ١ را با انتخاب جیره مناسب تحت‌تأثیر قرار داد (٦٠، ٦١). در پژوهش حاضر، بیان نسبی ژن IGF-1 در گروه‌های تیمارشده با عصاره پوسته برنج در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معناداری افزایش یافت. از آن‌جایی‌که یکی از فعالیت‌های هورمون IGF-1 جذب گلوکز و اسیدهای آمینه از روده میزبان است (٦١، ٦٢)، در پژوهش حاضر، با افزایش میزان هضم مواد غذایی زمینه برای افزایش بیان ژن IGF-1 در گروه‌های تیمار افزایش یافت. زیرا مواد غذایی زیادی در نتیجه فعالیت‌های پروبیوتیک‌ها (جمعیت میکروبی مفید روده) در دسترس قرار گرفته و میزان این مواد در بدن میزبان افزایش می‌یابد، بنابراین میزان بیش‌تری از هورمون IGF-1 برای جذب این مواد غذایی هضم شده در گروه‌های تیمار نیاز است. از این‌رو، افزایش بیان نسبی ژن IGF-1 را در گروه‌های تیمار می‌توان توجیه نمود. در تطابق با نتایج حاصل از پژوهش حاضر می‌توان به پژوهش‌های Hsiao و همکاران (٦٣)، El-Hawarry و همکاران (٦٤) و Abu-Elala و همکاران (٦٥) اشاره کرد که گزارش کردند رژیم غذایی غنی‌شده با پری‌بیوتیک‌ها سبب افزایش بیان نسبی ژن IGF-1 در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه شاهد گردید.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی، نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که استفاده از عصاره پوسته برنج توانست سبب بهبود عملکرد رشد و بیان نسبی ژن‌های دخیل در رشد در بچه‌ماهیان ازون‌برون شود. هم‌چنین مشخص گردید که بهترین سطح پیشنهادی این عصاره در بین تیمارهای آزمایشی میزان ٢ گرم عصاره در کیلوگرم جیره بود. ازآن‌جایی‌که پوسته برنج از ضایعات کشاورزی به‌دست می‌آید فاقد خطرات زیست‌محیطی بوده، بنابراین، به‌دلیل دارا بودن خاصیت بالقوه پری‌بیوتیکی می‌تواند در جیره غذایی بچه‌ماهی ازون‌برون به‌عنوان یک محرک ایمنی استفاده گردد.

منابع

1. Nazari, R., Makhdumi, Ch., & Naqvi, A. (2010). The effect of heat on the growth and maturation of farmed beluga, *Fisheries Journal*, 3 (1), 1-16.
2. Hatami, A. S., Paknejad, H., & Sodagar, M. (2022). The effect of adding Top3 biotronics to the diet on growth indicators, mucus and blood immunity and the expression of growth-related genes (GH, Ghrelin, IGF-1) in Iranian tasmahi (*Acipenser persicus*). *Animal Physiology and Development Quarterly Journal*, 14 (4), 17-34.
3. Khara, H., Falahatkar, B., Maknetkhah, B., Rahbar, M., & Ahmadnejad, M. (2013). The effect of 17-beta-estradiol hormone injection on hematological changes of juvenile ozone fish (*Acipenser stellatus*). *Marine Biology*, 6(21), 73-78.
4. Golsfid, S. A., Abdul Maliki, Sh., Behrouz Khosh Qalb, M. R., Jalilpour, J., Halachian, A., Alizadeh Roudpashti, M., & Seyed Hosni, M. H. (2022). Quantitative and qualitative survey of baby sturgeons until release in Sefidroud river. *Scientific Journal of Fisheries*, 30 (2), 93-102.
5. Zakariaee, H., Sodagar, M., Hosseini, S. P., Paknejad, H., & Baroah, K. (2019). The effect of using a synbiotic produced from button mushroom extract with two species of lactic acid bacteria on the activity of digestive enzymes, carcass composition, growth and intestinal microbial flora in zebrafish (*Danio rerio*). Khorramshahr Marine Sciences and Techniques, in press.
6. Raisi, M., Fakhrian, M., Jafarian, M., & Varshoui, H. (2013). Studying the effect of essential oils of some plants on the non-specific immunity of asterliad fish (*Acipenser ruthenus*). *Scientific Research Journal of Marine Biology*, 6(1), 23-28.
7. Zare, A., Nazerian, S., Taheri Mirquaid, A., & Ebrahimzadeh, S. M. (2018). Investigating the effect of the active ingredient of turmeric plant (*Curcuma longa* L.) on the hematological factors of *juvenile bluga*. *Journal of Veterinary Research*, 74(2), 199-208.
8. Zakariaee, H., Sudagar, M., Hosseini, S. S., Paknejad, H., & Baruah, K. (2021). In vitro Selection of Synbiotics and in vivo Investigation of Growth Indices, Reproduction Performance, Survival, and Ovarian Cyp19α Gene Expression in Zebrafish *Danio rerio*. *Frontiers in Microbiology*, 12.
9. Ahmed, M., Abdullah, N., Shuib, A. S., & Razak, S. A. (2017). Influence of raw polysaccharide extract from mushroom stalk waste on growth and pH perturbation induced-stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 468, 60-70.
10. Van Doan, H., Doolgindachbaporn, S., & Suksri, A. (2016). Effects of Eryngii mushroom (*Pleurotus eryngii*) and *Lactobacillus plantarum* on growth performance, immunity and disease resistance of Pangasius catfish (*Pangasius bocourti*, Sauvage 1880). *Fish physiology and biochemistry*, 42 (5), 1427-1440.
11. Nya, E. J., & Austin, B. (2009). Use of garlic, Allium sativum, to control *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of fish diseases*, 32 (11), 963-970.
12. Nya, E. J., & Austin, B. (2009). Use of dietary ginger, *Zingiber officinale* Roscoe, as an immunostimulant to control *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of fish diseases*, 32 (11), 971-977.
13. Awad, E., & Austin, B. (2010). Use of *lupin*, *Lupinus perennis*, *mango*, *Mangifera indica*, and *stinging nettle*, *Urtica dioica*, as feed additives to prevent *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of fish diseases*, 33 (5), 413-420.
14. Awad, E., Mitchell, W. J., & Austin, B. (2011). Effect of dietary supplements on cytokine gene expression in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of fish diseases*, 34 (8), 629-634.
15. Elkamel, A. A., & Mosaad, G. M. (2012). Immunomodulation of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, by

Nigella sativa and *Bacillus subtilis*. *Journal of Aquaculture & Research Development*, 3 (6).
16. Gabriel, N. N., Qiang, J., He, J., Ma, X. Y., Kpundeh, M. D., & Xu, P. (2015). Dietary Aloe vera supplementation on growth performance, some haemato-biochemical parameters and disease resistance against *Streptococcus iniae* in tilapia (GIFT). *Fish & Shellfish Immunology*, 44 (2), 504-514.
17. Yazdani, N., Mohammad Bagherzadeh, M., & Zakari, A. R. (2013). Microwave synthesis of silicon carbide from activated rice husk ash. *Scientific Research Quarterly of Ceramic Science and Engineering*, 3 (4), 19-27.
18. Salarinia, A., Afzali, N., Hosseini Vashan, S. J., & Bashti, M. (2017). The effect of surface and particle size of insoluble polysaccharides of rice hulls and oat hulls on performance, carcass characteristics and intestinal morphology of broiler chickens. *Animal Production*, 20 (4), 625-639.
19. Abazari, A., Navidshah, B., Mirzaei Agje Qeshlaq, F., & Nick Bean, S. (2016). Effect of rice husk consumption level on small intestine morphology in broiler chickens. National conference on the development of agricultural economy with the approach of national determination and jihadi management.
20. Sadeghi, A., Toghyani, M., & Gheisari, A. (2015). Effects of various fiber types and choice. *International Journal of Agriculture and Biology*. 12, 531-536.
21. Kameli, M., Tarshizi Karimi, M. A., & Rahimi, Sh. (2015). The effect of adding rice husk on performance, carcass traits, blood biochemical parameters and thyroid hormones of broiler chickens. *Livestock Products Research*, 14, 82-89.
22. Yang, L. C., Hsieh, C. C., & Lin, W. C. (2015). Characterization and immunomodulatory activity of rice hull polysaccharides. *Journal homepage*. 124, 150-156.
23. Yaqubfar, A. (2016). Carbohydrates in poultry nutrition. Merzdanash Publishing House - Abengah. Tehran Iran.
24. Kim, J. G., Yousef, A. E., & Dave, S. (1999). Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. *Journal of food protection*, 62(9), 1071-1087.
25. Falahatkar, B., Rahdari, A., Efatpanah, A., Maknetkhah, B., & Defense, S. (2018). Determining the most suitable percentage of feeding in the breeding of fish fry of different sizes. *Aquatic Nutrition*, 5(2), 17-26.
26. Iri, Y., Haqazih, M., Haqpanah, A., Khoshbavar Rostami, H. A., Qaravi, B., Ker, A. V., Ker, N. M., & Lakzaei, F. (2014). The effect of prebiotic oligofructose on the growth performance, survival and blood indices of Ozone fish fry. *Scientific Journal of Fisheries*, 24 (1), 97-108.
27. Jalali, M. A., Ahmadifar, E., Sudagar, M., & Takami, G. A. (2009). Growth efficiency, body composition, survival and haematological changes in great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1758) juveniles fed diets supplemented with different levels of Ergosan. *Aquaculture Research*, 40 (7), 804-809.
28. AOAC. (1996). Official method of analysis of the association of official analytical chemists. Association of official analytical chemists, Arlington, VA, USA.
29. Lee, D. H., Lim, S. R., Han, J. J., Lee, S. W., Ra, C. S., & Kim, J. D. (2014). Effects of dietary garlic powder on growth, feed utilization and whole body composition changes in fingerling sterlet sturgeon, *Acipenser ruthenus*. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 27 (9), 1303-1310.
30. Tacon, A. G. J. (1990). Standard method for nutritional and feeding of farmed fish and shrimp. Universidad del Mar, México Biblioteca del Campus Puerto Ánge, 1. 117p.
31. Bekcan, S., Dogankaya, L., & Cakirogullari, G. C. (2006). Growth and body composition of European catfish (*Silurus glanis* L.) fed diets containing different percentages of protein. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*, 58 (2), 137-142.

32. Hevrøy, E., Espe, M., Waagbø, R., Sandnes, K., Ruud, M., & Hemre, G. I. (2005). Nutrient utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed increased levels of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. *Aquaculture Nutrition*, 11, 301-313.
33. Ai, Q., Mai, K., Tan, B., Xu, W., Duan, Q., Ma, H., & Zhang, L. (2006). Replacement of fish meal by meat and bone meal in diets for large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Aquaculture*, 260, 255-263.
34. Miandare, H. K., Farahmand, H., Akbarzadeh, A., Ramezanpour, S., Kaiya, H., Miyazato, M., Rytkönen, K.T., & Nikinmaa, M. (2013). Developmental transcription of genes putatively associated with growth in two sturgeon species of different growth rate, *General and comparative endocrinology*, 182, 41-47.
35. Awad, A. S., Kamel, R., & Sherief, M. A. E. (2011). Effect of thymoquinone on hepatorenal dysfunction and alteration of CYP3A1 and spermidine/ spermine N-1-acetyl-transferase gene expression induced by renal ischaemia–reperfusion in rats. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 63 (8), 1037-1042.
36. Paknejad, H., Enayat, T., Safari, R., & Hosseinifar, S. H. (2019). Study of GH and Ghrelin genes expression during the larvae developmental period in *Danio rerio*. *Nova Biologica Reperta*. 6 (2), 148-154.
37. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*. 30, 36-36.
38. Forster, I., Higgs, D. A., Dosanjh, B. S., Rowshandeli, M., & Parr, J. (1999). Potential for dietary phytase to improve the nutritive value of canola protein concentrate and decrease phosphorus output in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) held in 11 ºC fresh water. *Aquaculture*, 179 (1-4), 109-125.
39. Bajlan, B., Zakeri, M., Musavi, S.M. Yavari, V., & Rajabzadeh, E. (2017). Effects of dietary supplementation of synbiotic on growth performance, feed utilization and body biochemical composition of Benni, *Mesopotamichthys sharpeyi*. *Journal: Animal Research (Biology of Iran)*. 30 (4), 1-14.
40. Daniels, C. L., Merrifield, D. L., Ringø, E., & Davies, S. J. (2013). Probiotic, prebiotic and synbiotic applications for the improvement of larval European lobster (*Homarus gammarus*) culture. *Aquaculture*, 416, 396-406.
41. Olsen, A. B., Melby, H. P., Speilberg, L., Evensen, Ø., & Håstein, T. (1997). *Piscirickettsia salmonis* infection in Atlantic salmon *Salmo salar* in Norway--epidemiological, pathological and microbiological findings. *Diseases of aquatic organisms*, 31 (1), 35-48.
42. Bach-Knudsen, K. E. (1997). Carbohydrates and lignin contents of plant materials used in animal. *Animal Feed Science and Technology*, 67, 319-338.
43. Ganguly, S., Dora, K. C., Sarkar, S., & Chowdhury, S. (2013). Supplementation of prebiotics in fish feed: a review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 23 (2), 195-199.
44. Hoseinifar, S. H., Esteban, M. Á., Cuesta, A., & Sun, Y. Z. (2015). Prebiotics and fish immune response: a review of current knowledge and future perspectives. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 23(4), 315-328.
45. Rohani, M. F., Islam, S. M., Hossain, M. K., Ferdous, Z., Siddik, M. A., Nuruzzaman, M., Padeniya, U., Brown, C., & Shahjahan, M. (2021). Probiotics, prebiotics and synbiotics improved the functionality of aquafeed: Upgrading growth, reproduction, immunity and disease resistance in fish. Fish & Shellfish Immunology.
46. Liu, J., Li, M., Wang, R., & Qian, Y. (2021). Protective effect of moderate dietary cellulose against antibiotic-induced growth retardation, blood deterioration and immunosuppression in juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). Aquaculture Research, 52 (12), 6000-6008.

47. Yousefian, M., & Amiri, M. S. (2009). A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp. *African Journal of Biotechnology*, 8 (25).
48. Ringø, E., Olsen, R. E., Gifstad, T. Ø., Dalmo, R. A., Amlund, H., Hemre, G. I., & Bakke, A. M. (2010). Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquaculture Nutrition*, 16 (2), 117-136.
49. Mohammadian, T., Ghanei-Motlagh, R., Molayemraftar, T., Mesbah, M., Zarea, M., Mohtashamipour, H., & Nejad, A. J. (2021). Modulation of growth performance, gut microflora, non-specific immunity and gene expression of proinflammatory cytokines in shabout (*Tor grypus*) upon dietary prebiotic supplementation. *Fish & Shellfish Immunology*, 112, 38-45.
50. Sîrbu, E., Dima, M. F., Tenciu, M., Cretu, M., Coadă, M. T., Țoțoiu, A., Cristea, V., & Patriche, N. (2022). Effects of Dietary Supplementation with Probiotics and Prebiotics on Growth, Physiological Condition, and Resistance to Pathogens Challenge in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fishes, 7(5), 273.
51. Akrami, R., Hajimoradlou, A., Abbas, M., & Abdolmohammad, A. K. (2009). Effect of dietary prebiotic inulin on growth performance, intestinal microflora, body composition and hematological parameters of juvenile beluga, *Huso huso* (Linnaeus, 1758). *Journal of the World Aquaculture Society*, 40 (6), 771-779.
52. Canosa, L. F., Chang, J. P., & Peter, R. E. (2007). Neuroendocrine control of growth hormone in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 151 (1), 1-26.
53. Hemre, G. I., Mommsen, T. P., & Krogdahl, Å., (2002). Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquaculture nutrition*, 8 (3), 175-194.
54. Tu, Y., Xie, S., Han, D., Yang, Y., Jin, J., & Zhu, X. (2015). Dietary arginine requirement for gibel carp (*Carassis auratus* gibelio var. CAS III) reduces with fish size from 50 g to 150 g associated with modulation of genes involved in TOR signaling pathway. *Aquaculture*, 449, 37-47.
55. Mommsen, T. P. (2001). Paradigms of growth in fish. Comparative biochemistry and physiology part B: *Biochemistry and molecular biology*, 129 (2-3), 207-219.
56. Xu, W., Lutz, C. G., Taylor, C. M., & Ortega, M. C. (2022). Improvement of Fish Growth and Metabolism by Oligosaccharide Prebiotic Supplement. *Aquaculture Nutrition*, 2022.
57. Midhun, S. J., Arun, D., Edatt, L., Sruthi, M. V., Thushara, V. V., Oommen, O. V., Sameer Kumar, V. B., & Divya, L. (2016). Modulation of digestive enzymes, GH, IGF-1 and IGF-2 genes in the teleost, Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) by dietary curcumin. *Aquaculture international*, 24 (5), 1277-1286.
58. Yilmaz, S., Ergün, S., Şahin, T., Çelik, E. Ş., & Abdel-Latif, H.M. (2022). Effects of dietary reishi mushroom (*Ganoderma lucidum*) on the growth performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* juveniles. *Aquaculture*, 739057.
59. Scanes, C. G., Dunnington, E. A., Buonomo, F. C., Donoghue, D. J., & Siegel, P. B. (1989). Plasma concentrations of insulin like growth factors (IGF-) I and IGF-II in dwarf and normal chickens of high and low weight selected lines. Growth, development, and aging: GDA, 53(4), 151-157.
60. Berishvili, G., Baroiller, J. F., Eppler, E., & Reinecke, M. (2010). Insulin-like growth factor-3 (IGF-3) in male and female gonads of the tilapia: Development and regulation of gene expression by growth hormone (GH) and 17α-ethinylestradiol (EE2). *General and comparative endocrinology*, 167 (1), 128-134.
61. Li, M., Raine, J. C., & Leatherland, J. F. (2007). Expression profiles of growth-related genes during the very early development of rainbow trout embryos reared at two incubation temperatures. *General and comparative endocrinology*, 153 (1-3), 302-310.
62. Wilkinson, R. J., Porter, M., Woolcott, H., Longland, R., & Carragher, J. F. (2006). Effects of aquaculture related

stressors and nutritional restriction on circulating growth factors (GH, IGF-I and IGF-II) in Atlantic salmon and rainbow trout. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: *Molecular & Integrative Physiology,* 145 (2), 214-224.

63. Hsiao, C. M., Wu, Y. S., Nan, F. H., Huang, S. L., Chen, L., & Chen, S. N. (2016). Immunomodulator 'mushroom beta glucan'induces Wnt/β catenin signalling and improves wound recovery in tilapia and rat skin: a histopathological study. *International wound journal,* 13 (6), 1116-1128.
64. El-Hawarry, W. N., Shourbela, R. M., Haraz, Y. G., Khatab, S. A., & Dawood, M. A. (2021). The influence of carbon source on growth, feed efficiency, and growth-related genes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared under biofloc conditions and high stocking density. *Aquaculture*, 542, 736919.
65. Abu-Elala, N. M., El-Sayed Ali, T., Ragaa, N. M., Ali, S. E., Abd-Elsalam, R. M., Younis, N. A., Abdel-Moneam, D. A., Hamdien, A. H., Bonato, M., & Dawood, M. A. O. (2021). Analysis of the productivity, immunity, and health performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock-fed dietary fermented extracts sourced from *Saccharomyces cerevisiae* (Hilyses): A Field Trial. Animals 2021, 11, 815.