Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

*Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*

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

# The effect of Levabon®diet supplement on growth efficiency and growth, immune and antioxidant related genes expression in common carp (*Cyprinus carpio*)

**Ahmad Eslamifar[1], Hamed Paknejad[*2], Mohammad Sudagar[3], Seyed Hossein Hoseinifar[4], Ali Shabani[5]**

1. Ph.D. Student, Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: eslamifarahmad@gmail.com
2. Corresponding Author, Associate Prof., Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: hkolangi@gmail.com
3. Associate Prof., Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: sudagar_m@yahoo.com
4. Associate Prof., Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: hoseinifar@gau.ac.ir
5. Associate Prof., Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: shabani@gau.ac.ir

**Article Info**

**Article type:**
Full Length Research Paper

**Article history:**
Received: 07.31.2022
Revised: 08.22.2022
Accepted: 09.10.2022

**Keywords**:
Antioxidant enzyme,
Common carp,
Growth,
Immune system,
*Saccharomyces cerevisiae*

**ABSTRACT**

The aim of this study was to investigate the effect of Levabon® (autolyzed yeast, *Saccharomyces cerevisiae*) on growth efficiency, the expression of growth (IGF-I), immune (TNF-1α, LYZ) and antioxidant (CAT, SOD) related genes in the intestinal and liver tissue of common carp (*Cyprinus carpio*). The fish (n=240; 14.53 ± 0.67 g) were fed with 0.0, 0.3, 0.6, and 0.9% of Levabon® in 12 tanks (250 L) with three replicates (each with 20 fish) for 8 weeks. At end of experiment, fish were weighted and liver and intestinal tissue were collected. RNA was extracted from tissue samples and cDNA was synthesized and the expression of related genes was measured by real time PCR with specific primers. The results of measured experimental indices revealed that there is no significant difference in the growth performance and intestinal *lysozyme* (LYZ) gene expression among experimental treatments. The expression of TNF-1α, IGF-I, SOD and CAT genes in the intestinal and liver tissues showed a significant difference between the experimental treatments and the control, and the highest gene expression was observed in the 0.6% experimental treatment ($P<0.05$). Overall, these results suggested that inclusion of Levabon in common carp diet had no significant effect on growth performance but can beneficially effect on immune and antioxidant system.

Cite this article: Eslamifar, Ahmad, Paknejad, Hamed, Sudagar, Mohammad, Hoseinifar, Seyed Hossein, Shabani, Ali. 2024. The effect of Levabon®diet supplement on growth efficiency and growth, immune and antioxidant related genes expression in common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 13 (1), 127-139.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/japu.2024.20392.1693
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان

شاپا چاپی: ۲۳۴۵-۴۲۷X
شاپا آنلاین: ۲۳۴۵-۴۲۸۸

# اثر مکمل خوراکی لوابون بر کارایی رشد و بیان ژن‌های مرتبط با رشد، سیستم ایمنی و آنتی‌اکسیدانی در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

**احمد اسلامی‌فر[۱]، حامد پاک‌نژاد*[۲]، محمد سوداگر[۳]، سید حسین حسینی‌فر[۴]، علی شعبانی[۵]**

۱. دانشجوی دکتری گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: eslamifarahmad@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، دانشیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: hkolangi@gmail.com

۳. دانشیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: sudagar_m@yahoo.com

۴. دانشیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: hoseinifar@gau.ac.ir

۵. دانشیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: shabani@gau.ac.ir

**اطلاعات مقاله**

**نوع مقاله:**
مقاله کامل علمی- پژوهشی

**تاریخ دریافت:** ۱۴۰۱/۰۵/۰۹
**تاریخ ویرایش:** ۱۴۰۱/۰۵/۳۱
**تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۱/۰۶/۱۹

**واژه‌های کلیدی:**
آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی،
رشد،
ساکرومایسس سرویزیه،
سیستم ایمنی،
کپور معمولی

**چکیده**

این پژوهش به منظور تعیین اثر لوابون (مخمر اتولیز شده *Saccharomyces cerevisiae*) بر کارایی رشد، بیان برخی ژن‌های مرتبط با رشد (IGF-I)، سیستم ایمنی (LYZ و TNF-1α) و آنتی‌اکسیدانی (SOD و CAT) در بافت روده و کبد ماهی کپورمعمولی انجام شد. تعداد ۲۴۰ قطعه ماهی با میانگین وزنی ۰/۶۷± ۱۴/۵۳ گرم در ۱۲ حوضچه فایبرگلاس ۲۵۰ لیتری در قالب یک طرح کاملاً تصادفی شامل ٤ تیمار و ۳ تکرار توزیع شدند. ماهیان به‌طور روزانه به‌میزان ۳ درصد وزن بدن با جیره‌های غذایی حاوی سطوح ۰، ۰/۳، ۰/٦ و ۰/۹ درصد لوابون به‌ازای هر کیلوگرم جیره به مدت ۸ هفته غذادهی شدند (به ترتیب تیمار شاهد، اول، دوم و سوم). در پایان آزمایش ماهیان وزن‌گیری و از بافت کبد و روده نمونه‌برداری انجام شد. RNA از نمونه‌های بافتی استخراج و cDNA سنتز و با آغازگرهای اختصاصی توسط Real time PCR میزان بیان ژن‌های مرتبط اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد در عملکرد رشد بین تیمارهای آزمایشی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. میزان بیان ژن لیزوزیم (LYZ) در بافت روده در بین تیمارهای آزمایشی و تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداد. میزان بیان ژن‌های TNF-1α، IGF-I، SOD و CAT در بافت روده و کبد بین تیمارهای آزمایشی و تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان داد و بیش‌ترین میزان بیان ژن در تیمار

آزمایشی دوم مشاهده گردید (P<۰/۰۵). بنابراین سطوح مختلف لوابون بر عملکرد رشد ماهی کپور معمولی اثر معنی‌داری نداشت و استفاده از سطح ۰/٦ درصد در افزایش بیان ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ماهی کپور معمولی مؤثر می‌باشد.

استناد: اسلامی‌فر، احمد، پاک‌نژاد، حامد، سوداگر، محمد، حسینی‌فر، سید حسین، شعبانی، علی (۱۴۰۳). اثر مکمل خوراکی لوابون بر کارایی رشد و بیان ژن‌های مرتبط با رشد، سیستم ایمنی و آنتی‌اکسیدانی در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ۱۳ (۱)، ۱۳۹-۱۲۷.

DOI: 10.22069/japu.2024.20392.1693

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

## مقدمه

صنعت آبزی‌پروری رشد و توسعه قابل‌توجهی داشته است، به‌طوری‌که میزان تولیدات آبزی‌پروری از ۳۶ میلیون تن در سال ۱۹۹۷ به ۱۱۲ میلیون تن در سال ۲۰۱۷ رسیده است و سهم ماهی کپور معمولی در این سال‌ها بین ٦-٤ درصد گزارش شده است (۱). کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) از رده ماهیان استخوانی و متعلق به خانواده کپورماهیان است و در حوضه‌های دریای خزر و تمام حوضه‌های آبریز ایران پراکنش دارد (۲). این گونه استنوهالین آب شیرین است و دمای بهینه برای رشد آن حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد است (۳). کپور معمولی از جمله ماهیان گرمابی و سومین گونه معروف جهان محسوب می‌شود که به طور گسترده به سرتاسر دنیا معرفی شده است و به عنوان یکی از گونه‌های مهم پرورشی در دنیا می‌باشد که از ارزش تجاری بالایی نیز برخوردار است (٤). در کنار رشد قابل‌توجه صنعت آبزی‌پروری در سال‌های اخیر، این صنعت همواره با مشکلاتی مانند: تغییر کیفیت آب، مشکلات تغذیه‌ای، بروز بیماری‌ها مواجه بوده است، به‌طوری‌که شیوع بیماری‌ها گسترش اقتصادی این صنعت را در بسیاری از کشورهای جهان تحت‌تأثیر قرار داده است (۵).

در طی سالیان گذشته استفاده پیشگیرانه و درمانی از آنتی‌بیوتیک‌ها مرسوم بود، که این استفاده بیش از حد پیامدهایی مانند: ظهور باکتری‌های مقاوم، باقی‌ماندن بقایای آنتی‌بیوتیکی در گوشت ماهیان و ریسک آن در تغذیه انسانی و نیز آلودگی‌های زیست‌محیطی را به‌دنبال داشته است (٦) بنابراین استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در بسیاری از کشورها به واسطه وضع قوانین، محدود و یا ممنوع شده است (۷) که این مورد سبب توسعه استفاده از محرک‌های ایمنی به‌عنوان یک راهکار جایگزین در جهت تحریک ایمنی و کاهش ریسک بروز بیماری‌ها شده است (۸).

همه موجودات زنده دارای سیستم‌های محافظت‌کننده در مقابل واکنش‌های رادیکال‌های آزاد هستند که از آن جمله می‌توان به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و استرس اکسیداتیو اشاره کرد (۹) در واقع این سیستم‌های محافظت‌کننده قادر هستند در شرایط طبیعی بین تولید و حذف گونه‌های فعال اکسیژنی تعادل ایجاد کنند. اختلال در این فرایند منجر به برهم خوردن سیستم هومئوستاز بدن و ایجاد استرس اکسیداتیو در سلول‌های مختلف موجودات زنده می‌شود (۱۰). آنزیم‌های کاتلاز CAT و سوپر اکسید دیسموتاز SOD از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هستند که در بافت کبد بیش‌ترین میزان فعالیت را دارند و به نظر می‌رسد دلیل اهمیت این آنزیم‌ها به خاطر جایگاه ویژه واکنش‌های اکسیدانی چندگانه و حداکثر تولید رادیکال‌های آزاد در این اندام باشد. از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز، اولین سد دفاعی موجودات از جمله آبزیان در شرایط استرس است و ارزیابی آن می‌تواند در بررسی وضعیت سیستم ایمنی به کار برده شود (۱۱).

علاوه بر تقویت سیستم ایمنی آبزیان، رشد مطلوب نیز در صنعت آبزی‌پروری از اهمیت اقتصادی بالایی برخوردار است (۱۲). یکی از روش‌های قابل طرح جهت افزایش توان سیستم ایمنی و رشد در آبزیان استفاده از مکمل‌های غذایی دارای خواص دوگانه محرک ایمنی و رشد در تغذیه آبزیان می‌باشد (۱۳). در طی سال‌های اخیر، راهکارهای مختلفی برای دستکاری و بهبود ترکیبات ریزپرزهای روده شامل آنزیم‌ها و ترکیبات اساسی در هضم و جذب مواد غذایی در میزبان‌های مختلف ازجمله: انسان، دام و سایر حیوانات به منظور هضم بهتر غذا، ایمنی و افزایش مقاومت و به دنبال آن افزایش رشد اقتصادی مورد بررسی پژوهش‌گران قرارگرفته است (١٤). یکی از این راهکارها، استفاده از مکمل‌های خوراکی

پروبیوتیک، پربیوتیک، سین‌بیوتیک و پارابیوتیک در جیره‌های غذایی می‌باشد.

کبد و روده دو عضو اصلی دستگاه گوارش در آبزیان می‌باشند. کبد کارخانه اصلی بدن است و در سوخت‌وساز غذا اهمیت بسیار زیادی دارد. مولکول‌های غذا از روده و خون وارد آن شده و به پروتئین، قند و چربی مورد نیاز بدن ماهی تبدیل می‌شوند (۱۵). کبد یک اندام ایمونولوژیک مرکزی است و به طور مداوم در معرض آنتی‌ژن‌ها و اندوتوکسین‌های موجود در میکروبیوتای روده می‌باشد (۱٦). روده هم محل اصلی جذب مواد مغذی و ورود به خون و انتقال به سایر ارگان‌ها می‌باشد. در مطالعات زیادی که در زمینه افزودنی‌ها و مکمل‌های غذایی در آبزیان انجام شده است دو بافت کبد و روده مورد توجه بوده است.

در مطالعه‌ای اثر مخمر *Debaryomyces hansenii* بر وضعیت سیستم ایمنی و سطح بیان برخی از ژن‌های دخیل در ایمنی ماهی باس دریایی انجام شد و مشخص گردید که به دنبال استفاده از دوز ۱۰٦ $CFUg^{-1}$ پس از چهار هفته به صورت خوراکی بیان ژن TNF-1α در روده نسبت به گروه شاهد افزایش یافت، اگرچه در کبد و قسمت قدامی فوق کلیه به ترتیب کاهش و تغییر پیدا نکرده بود (۱۷).

بیان ژن‌های TNF-1α و IL-1b در بافت کلیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) توسط باکتری لاکتوباسیلوس (LAB) در مواجهه با باکتری *Lactococcus garvieae* افزایش قابل‌توجهی نسبت به گروه شاهد نشان دادند (۱۸).

در مطالعه‌ای در خصوص اثر به کارگیری پروبیوتیک *lactobacillus acidophilus* بر بیان ژن مرتبط با ایمنی TNF-1α و TNF-2α در ماهی طلایی (*Carassius auratus gibelio*) بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از پروبیوتیک در سطح ۱۰۸×٦ باکتری به‌ازای گرم، سبب افزایش معنی‌دار در بیان ژن‌های دخیل در ایمنی می‌شود (۱۹).

در ماهی کپور معمولی ۱۰ گرمی با مکمل‌های ۲ درصد رافینوز، ۱۰۸×٦ $CFUg^{-1}$ از باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و ترکیب دو مکمل تغذیه شد تأثیر قابل‌ملاحظه‌ای روی بیان ژن لیزوزیم در پوست ماهی در ماهیان تغذیه شده با لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نسبت به گروه شاهد گزارش شد در حالی‌که مکمل‌های فوق تأثیر معنی‌داری در بیان ژن TNFα نسبت به گروه شاهد نشان ندادند (۲۰).

تلاش برای رسیدن به سطح بالاتر و کیفیت بیش‌تر در تولید آبزیان منجر به معرفی محصولات پربیوتیکی با کیفیت شد. از جمله این محصولات Levabon® می‌باشد. لوابون یک افزودنی کاربردی برای تغذیه آبزیان و محصول اتولیزشده مخمر *Saccharomyces cerevisiae* است که توسط تکنولوژی فرایند داخلی برای تخریب اتولیتیک استاندارد سلول مخمر تولید شده است. این محصول مخمر غنی از مواد زیستی فعال و مواد مغذی مانند: اسید آمینه ضروری، پپتید، کربوهیدرات دیواره سلولی، نوکلئوتیدها و ویتامین B است (۲۱).

در مطالعه‌ای از اشکال مختلف پروبیوتیک، پربیوتیک و سین‌بیوتیک ساکرومایسیس سرویزیه در ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) ۸۰ گرمی استفاده شد که در ماهیانی که از سطح ۲ گرم در کیلوگرم ساکرومایسیس سرویزیه ® BGY35 به‌صورت پروبیوتیک، پربیوتیک و سین‌بیوتیک استفاده شد افزایش عملکرد رشد و شاخص‌های ایمنی سلولی و خونی نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید (۲۲).

با توجه به اهمیت محرک‌های خوراکی رشد و ایمنی در بهبود عملکرد آبزی‌پروری و پیشگیری و مقابله با بیماری‌ها (۵ و ۸)، تعیین مقادیر مناسب استفاده از مکمل‌های خوراکی در گونه‌های مختلف آبزی از جمله ماهی کپور معمولی ضرورت دارد. در این مطالعه اثر مخمر اتولیزشده ساکرومایسس

سرویزیه (لوابون) در جیره بر کارایی رشد، بیان ژن‌های مرتبط با رشد (فاکتور رشد شبه انسولین IGF-I)، سیستم ایمنی (لیزوزیم Lyz و فاکتور نکروزدهنده تومور آلفا TNF-1α) و آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز CAT و سوپر اکسید دیسموتاز SOD) در بافت کبد و روده ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بررسی می‌شود.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه از تاریخ ۱۳۹۸/۶/۵ تا تاریخ ۱۳۹۸/۸/۱ به‌مدت ۵۶ روز در محل آزمایشگاه تحقیقات آبزیان شهید فضلی برآبادی، گروه تکثیر و پرورش آبزیان دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. ماهیان از یکی از مراکز تکثیر و پرورش ماهی شهرستان گنبد خریداری شدند. به‌منظور حذف اثرات استرس ناشی از انتقال، قبل از شروع آزمایش ماهیان به مدت ۲ هفته در آزمایشگاه نگهداری شدند. بعد از سازگاری کامل ماهیان به شرایط پرورشی و غذایی، تعداد ۲۰ قطعه ماهی بعد از زیست‌سنجی اولیه با میانگین وزنی ۱۴/۵۳±۰/۶۷ گرم به‌طور تصادفی در ۱۲ حوضچه فایبرگلاس با ابعاد ۱×۱ متر با عمق ۵۰ سانتی‌متر و حجم آب ۲۵۰ لیتر به منظور پرورش توزیع شدند. در طول دوره آزمایش میانگین دمای آب ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد، pH ۷/۸±۰/۱۴ و میزان اکسیژن آب ۲±۶/۸ میلی‌گرم در لیتر بود (از دستگاه اکسی‌متر و پی‌اچ متر آزمایشگاه تحقیقات آبزیان شهید فضلی برآبادی استفاده شد). این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی شامل ٤ تیمار در ۳ تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل تغذیه ماهی کپورمعمولی با جیره‌های غذایی حاوی سطوح ۰، ۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹ درصد لوابون می‌باشد که سطوح به‌کار رفته در دامنه مطالعه انجام شده در جوجه‌های گوشتی (۲۳) و سایر آبزیان از جمله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و می‌باشد (۲٤). ماهیان هر تیمار با جیره‌های غذایی به‌صورت دستی و بر اساس حداکثر ۳ درصد وزن توده زنده در ۳ نوبت به مدت ۵۶ روز تغذیه شدند.

برای تهیه جیره آزمایشی ابتدا میزان غذا و افزودنی لوابون برای هر تیمار در دوره آزمایش محاسبه شد. سطوح مورد مطالعه لوابون در مقدار مشخصی آب حل و به جیره غذایی پایه (سایز پیش‌پرواری با قطر ۳ میلی‌متر شرکت فرادانه- جدول ۱) اضافه شد. خمیر به دست آمده از چرخ گوشت با اندازه چشمه ۳ میلی‌متر عبور داده شد و در مجاورت هوا خشک گردید و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد فریزر نگهداری شد (۲۵).

**جدول ۱- ترکیب و درصد اجزای جیره تجاری مورد استفاده در تغذیه ماهی کپور معمولی.**

| اجزای جیره | پروتئین خام | چربی خام | فیبرخام | خاکستر | رطوبت | فسفر |
|---|---|---|---|---|---|---|
| درصد اجزای جیره | ۳۸ | ۸ | ۷ | ۱۰ | ۱۱ | ۱ |

برای آگاهی از عملکرد جیره‌های غذایی و چگونگی رشد ماهی‌ها، در ابتدا و انتهای دوره پرورش وزن هر ماهی با استفاده از ترازوی دیجیتال با ۰/۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. وزن متوسط، میزان رشد روزانه، ضریب رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی از جمله مهم‌ترین فاکتورهایی هستند که مطابق رابطه‌های زیر مورد بررسی قرار گرفت (۲۶).

تعداد ماهیان / وزن کل ماهیان = وزن متوسط

وزن ابتدایی – وزن نهایی = افزایش وزن

۱۰۰ × وزن اولیه / (وزن اولیه – وزن نهایی) = درصد افزایش وزن بدن

۱۰۰ × (جمع ماهیان تلف شده و باقی‌مانده / تعداد ماهیان زنده مانده) = درصد بقاء

۱۰۰× [تعداد روزهای پرورش/ (لگاریتم طبیعی وزن اولیه – لگاریتم طبیعی وزن نهایی)] = ضریب رشد ویژه

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

جهت ارزیابی بیان نسبی ژن‌ها در انتهای دوره پرورش، ۳ عدد ماهی از هر تکرار به صورت تصادفی صید، با استفاده از پودر گل میخک (۲۰۰ ppm) بیهوش و کشته شدند شدند سپس با استریل کردن سطح بدن (الکل) توسط تیغ اسکالپل استریل از بافت روده و کبد آن‌ها جهت اندازه گیری بیان ژن‌های مدنظر نمونه برداشت و برای کاهش سریع دمای آن، بلافاصله تیوپ‌های استریل حاوی نمونه به ازت مایع منتقل و سپس تا زمان انجام آزمایش‌های مولکولی در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. (۲۷).

در مرحله استخراج RNA نمونه‌های نگهداری شده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد به سرعت از فریزر خارج و جهت جلوگیری از ذوب شدن بافت‌ها در مجاورت ازت مایع داخل هاون چینی کوبیده و تبدیل به پودر شدند (این کار جهت شکسته شدن دیواره سلولی انجام می‌گیرد) و قبل از این‌که به آن‌ها اجازه ذوب شدن داده شود به ویال‌های استریل ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و این ویال‌ها فوراً وارد ازت مایع شدند. مراحل بعدی استخراج مطابق دستورالعمل RNAX-Plus solution بود. کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز (۱ درصد) ارزیابی شد و به‌منظور ارزیابی کمی RNA غلظت آن در موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر محاسبه شد. در نهایت پس از حذف DNA از نمونه‌های RNA استخراج شده سنتز cDNA با استفاده از مستر میکس سنتز cDNA شرکت جینت بایو محصول کشور کره مطابق دستورالعمل ان انجام شد. به‌منظور انجام PCR ۱۰ میکرولیتر بافر سایبرگرین، ۰/۲ میکرولیتر آغازگر پیش‌رونده ژن هدف یا رفرنس، ۰/۲ میکرولیتر آغازگر پس‌رونده ژن هدف یا رفرنس، ٦/٤ میکرولیتر آب DEPC، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تگ پلی‌مراز، ۲ میکرولیتر cDNA و ۱ میکرولیتر دی متیل سولفواکساید اضافه شد و در دستگاه Real time PCR قرار داده شد. نتایج به‌دست آمده تحت عنوان CT بود که نشان‌دهنده تعداد چرخه‌هایی است که سیگنال فلورسنت نسخه‌های ژنی را شناسایی می‌کند. PCR برای هر تیمار در ٤ تکرار تکنیکی انجام شد (۲۸).

در نهایت تغییرات نسبی بیان ژن‌ها با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ ($\Delta\Delta Ct$) برابر است با $\Delta Ct$ ژن هدف منهای $\Delta Ct$ کالیبراتور) (۲۹) در فضای نرم‌افزار اکسل تبدیل به بیان نسبی ژن‌های موردنظر نسبت به ژن رفرنس β-actin گردید. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولوموگروف اسمیرنوف آزمایش شد و جهت بررسی اختلاف معنی‌دار نیز از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه دانکن انجام گرفت. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه و آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۵ انجام شد. در رسم نمودارها از نرم‌افزار EXCEL نسخه ۲۰۱۳ استفاده شد.

## نتایج

**نتایج شاخص‌های رشد:** برای آگاهی از عملکرد جیره‌های غذایی و چگونگی رشد ماهی‌ها، در ابتدا و انتهای دوره پرورش وزن هر ماهی با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد. وزن متوسط، میزان رشد روزانه، ضریب رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی مورد بررسی قرار گرفت. در روز اول آزمایش بین تیمار شاهد و سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری در میانگین وزن اولیه مشاهده نشد. در پایان آزمایش نیز بین تیمار شاهد با سایر تیمارها و هم‌چنین تیمارهای اول، دوم و سوم با یکدیگر هیچ تفاوت معنی‌داری در میانگین وزن پایانی مشاهده نشد. در مورد سایر شاخص‌ها شامل افزایش وزن، درصد افزایش وزن، درصد بقاء، ضریب رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی نیز بین تیمار شاهد و تیمارهای اول، دوم و سوم هیچ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲) ($P<۰/۰۵$).

**جدول ۲- مقایسه میانگین (± انحراف معیار) شاخص‌های عملکرد رشد در تیمارهای مختلف (n=۳).**

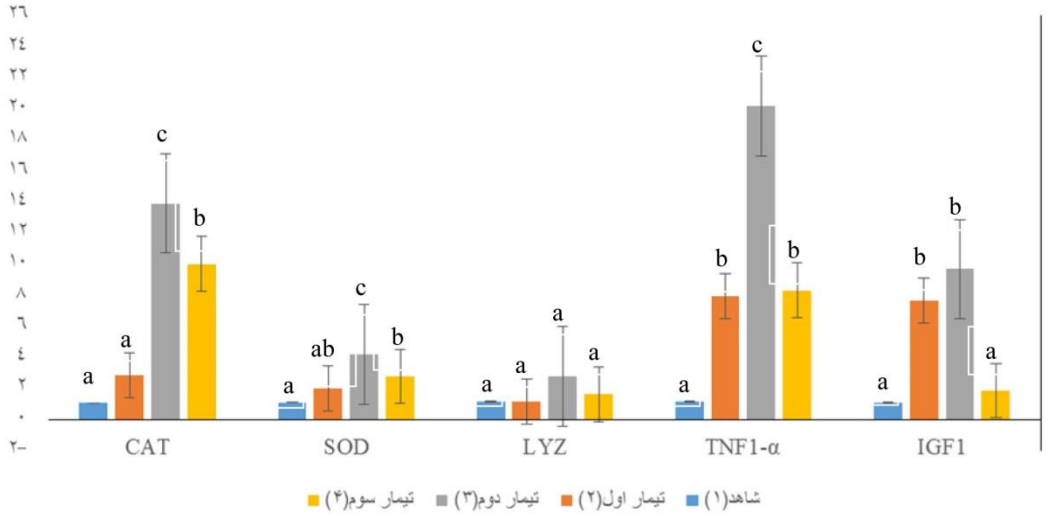
| شاخص‌های رشد | شاهد | تیمار اول | تیمار دوم | تیمار سوم |
|---|---|---|---|---|
| میانگین وزن اولیه (گرم) | ۱۴/۹۳±۰/۴۷[a] | ۱۴/۵۵±۰/۸۵[a] | ۱۴/۵۰±۰/۶۳[a] | ۱۴/۳۷±۰/۴۶[a] |
| میانگین وزن پایانی (گرم) | ۲۰/۲۸±۰/۷۳[a] | ۱۹/۸۸±۰/۵۳[a] | ۱۹/۳۹±۱/۹۲[a] | ۲۰/۵۲±۰/۶۴[a] |
| میانگین افزایش وزن (گرم) | ۵/۳۵±۰/۴۰[a] | ۵/۳۳±۱/۰۴[a] | ۴/۸۹±۱/۳۷[a] | ۶/۱۵±۰/۲۳[a] |
| میانگین درصد افزایش وزن بدن (درصد) | ۳۵/۸۵±۲/۵۲[a] | ۳۶/۹۶±۹/۰۸[a] | ۳۳/۵۵±۸/۰۹[a] | ۴۲/۸۱±۱/۳۲[a] |
| میانگین درصد بقاء (درصد) | ۱۰۰±۰/۰[a] | ۹۷/۷۷±۳/۸۵[a] | ۱۰۰±۰/۰[a] | ۱۰۰±۰/۰[a] |
| میانگین ضریب رشد ویژه (درصد) | ۰/۲۱±۰/۰۱۱[a] | ۰/۲۲±۰/۰۴۵[a] | ۰/۲۰±۰/۰۴۱[a] | ۰/۲۵±۰/۰۰۵[a] |
| میانگین ضریب تبدیل غذایی (گرم) | ۱/۳۸±۰/۱۰[a] | ۱/۳۸±۰/۲۷[a] | ۱/۲۶±۰/۳۵[a] | ۱/۵۹±۰/۰۶[a] |

حروف غیرمشترک در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد ($P<۰/۰۵$)

**نتایج بیان ژن**

**میزان بیان ژن فاکتورهای مرتبط بارشد، سیستم ایمنی و آنتی‌اکسیدانی:** با توجه به سطوح مختلف لوابون موجود در جیره‌های غذایی میزان بیان ژن فاکتور رشد شبه انسولین I (IGF-I) در کبد ماهی کپور معمولی در تیمارهای اول و دوم آزمایشی اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نشان داد درحالی‌که در تیمار سوم آزمایشی هیچ تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد مشاهده نشد. در تیمارهای آزمایشی بین تیمار سوم با تیمار اول و دوم تفاوت معنی‌داری مشاهده و در تیمار اول و دوم آزمایشی با هم اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. میزان بیان ژن فاکتور مهارکننده تومور آلفا (TNF-1α) در روده ماهیان تیمارهای اول، دوم و سوم اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نشان دادند. در این تیمارها کم‌ترین میزان بیان ژن در تیمار شاهد مشاهده شد. تیمار اول و سوم با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. تیمار دوم با بیش‌ترین میزان بیان ژن اختلاف معنی داری با تیمار اول و سوم نشان داد. میزان بیان ژن آنزیم لیزوزیم (LYZ) در روده ماهیان بین تیمارهای اول، دوم و سوم اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد مشاهده نشد. در بین تیمارهای آزمایشی نیز تیمار اول، دوم و سوم با

یکدیگر تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. میزان بیان ژن آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) در کبد ماهی کپور معمولی، تیمارهای دوم و سوم اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نشان دادند اما بین تیمار اول با تیمار شاهد اختلاف معنی داری مشاهده نشد. در بین تیمارهای آزمایشی نیز تیمار اول و سوم با یکدیگر تفاوت معنی داری نشان ندادند. تنها در تیمار دوم با بیش‌ترین میزان بیان ژن آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز اختلاف معنی‌داری با دو تیمار اول و سوم مشاهده شد. میزان بیان ژن آنزیم کاتالاز (CAT) در کبد ماهی کپور معمولی، تیمارهای دوم و سوم اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نشان دادند اما در مقایسه تیمار اول با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در بین تیمارهای آزمایشی نیز تیمار اول، دوم و سوم با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نشان دادند (P<۰/۰۵) (شکل ۱).




**شکل ۱- مقایسه میانگین (± انحراف معیار) میزان بیان نسبی ژن فاکتور رشد شبه انسولین I (IGF-I)، فاکتور مهارکننده تومور آلفا (TNF-1α)، آنزیم لیزوزیم (Lyz)، آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آنزیم کاتالاز (CAT) در تیمارهای مختلف در کل دوره آزمایش در بافت کبد و روده (n=۳).**

## بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که سطوح مختلف استفاده شده از لوابون علی‌رغم این‌که در سطح ۰/۹ درصد بیش‌ترین میزان افزایش وزن و ضریب رشد ویژه را در عملکرد رشد نشان می‌دهد ولی این افزایش‌ها در مقایسه با سایر تیمارها معنی‌دار نمی‌باشد و سایر شاخص‌های کارایی رشد و تغذیه در این مطالعه اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی و شاهد نشان ندادند. بنابراین سطوح مختلف لوابون بر عملکرد رشد و تغذیه ماهی کپور معمولی بی‌تأثیر بود. این نتیجه همراستا با سایر مطالعات انجام شده در گونه‌های مختلف ماهیان نمی‌باشد. در مطالعه‌ای که در مرکز آبزی‌پروری تغذیه کاربردی (ACAN) در تایلند اثر لوابون در گونه تیلاپیای قرمز (*O. mossembicus* × *O. niloticus*) بر عملکرد رشد آزمایش شد. نتایج حاصل نشان داد که لوابون نرخ رشد ویژه (SGR) را ۵ درصد افزایش داد و با افزودن ۰/٤ درصد لوابون به رژیم غذایی ضریب میزان تبدیل مواد غذایی (FCR) ٤ درصد کاهش یافت (۳۰). پاسوز و همکاران (۲۰۱۷) اثر لوابون را

به میزان ٦ گرم در کیلوگرم جیره غذایی روی رشد و پاسخ ایمنی ماهی سی‌باس اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) تحت شرایط استرس‌زا بررسی کردند و پژوهش‌های آن‌ها میزان رشد بهتر، وضعیت ایمنی افزایش یافته و کاهش آسیب‌های اکسیداتیو لیپیدی کبدی ناشی از استرس جمعیت و هم‌چنین آسیب DNA عضلانی ناشی از استرس هیپوکسی را نشان داد (۲۱). در بررسی سطوح ۲/۵، ٤ و ۵/۵ درصد عصاره مخمر ساکرومایسیس سرویزیه در لارو کپور معمولی سطوح ۲/۵ و ٤ درصد رشد و ضریب تبدیل غذایی معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان دادند (۳۱). در پژوهش دیگری که از پنج سطح ۰، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ و ۱ گرم بر کیلوگرم پروبیوتیک ساکرومایسیس سرویزیه در بچه‌ماهیان نورس کپور معمولی استفاده شد نیز سطوح ۰/۵ و ۰/۷ گرم افزایش معنی‌دار شاخص‌های رشد را نشان داد (۳۲). به‌نظر می‌رسد ویژگی‌های مختلف مانند گونه‌های پروبیوتیک، ماهی، سن، دوز و طول مصرف پروبیوتیک، شرایط پرورش مانند دما و غیره می‌توانند تفاوت‌های قابل‌توجهی در نتیجه استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری ایجاد کنند (۳۳ و ۳٤).

درحالی‌که در این مطالعه شاخص‌های عملکرد رشد در استفاده از سطوح مختلف لوابون تفاوت معنی‌داری نشان ندادند اما در بررسی میزان بیان ژن IGF-1 تیمارهای با سطح مصرف ۰/۳ و ۰/٦ درصد لوابون، افزایش معنی داری از میزان بیان ژن IGF-1 را در بافت کبد نشان دادند. نتیجه مطالعه حاضر همسو با بررسی اثر پربیوتیک AMAX بر بیان ژن هورمون‌های مرتبط با رشد GH و IGF-1 در ماهی کپور معمولی می‌باشد که افزایش چند برابری میزان بیان ژن IGF-1 را در بافت کبد و مغز هموژن شده نسبت به گروه شاهد نشان داد (۳۵). فاکتور رشد شبه انسولین به‌صورت غیرمستقیم فعالیت‌های هورمون رشد را از طریق یک مکانیسم بازخورد منفی که مانع رونویسی و ترشح هورمون رشد می‌شود، کنترل می‌کند. در ماهی‌ها سطح بیان ژن IGF-1 به‌صورت مستقیم با نرخ تغذیه و رشد در ارتباط است (۳٦). در واقع بیان معنی‌دار ژن IGF-1 در بافت کبد در مطالعه حاضر می‌تواند نشانگر احتمال اثرگذاری بر عملکرد رشد ماهی در مطالعات با دوره‌های زمانی طولانی‌تر استفاده از پربیوتیک تجاری لوابون در تغذیه ماهی کپور باشد.

سطوح مختلف لوابون میزان بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز را در کبد ماهی کپور معمولی به‌طور معنی‌داری افزایش داد که بیش‌ترین میزان در سطح ۰/٦ درصد مشاهده شد. این نتایج منطبق است با مطالعه اثر سطح ۲ درصد پربیوتیک‌های گالاکتو الیگوساکارید (GOS)، اینولین (INL) و فروکتوالیگو ساکارید (FOS) در ماهی کپور معمولی که میزان بیان ژن‌های آنزیم‌های گلوتاتیون اس ترانسفراز α (GST-a)، گلوتاتیون ردوکتاز (GR) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) را در بافت روده افزایش داد (۳٤).

نتایج به‌دست آمده در این پژوهش نشان داد سطوح مختلف لوابون تأثیر معنی‌داری در میزان بیان ژن لیزوزیم در بافت روده نداشت اما میزان بیان ژن فاکتور مهارکننده تومور آلفا (TNF-1α) در استفاده از لوابون در تیمارها افزایش معنی‌داری در بافت روده نشان داد. با در نظر گرفتن اهمیت آنزیم لیزوزیم در سیستم ایمنی ذاتی و توجه به قدرت و طیف گسترده فعالیت‌های لیتیکی این آنزیم (۳۷) شناسایی ژن‌های کدگذاری شده آن و تنظیم آن توسط پاتوژن‌ها و یا افزایش‌دهنده‌های ایمنی به منظور بهبود استراتژی‌های مدیریت بیماری‌ها در بحث آبزی‌پروری مهم است (۳۸). نتایج مطالعه حاضر همسو با مطالعات انجام شده از تأثیر پربیوتیک‌های گالاکتو الیگوساکارید

(GOS)، اینولین (INL) و فروکتوالیگو ساکارید (FOS) بر افزایش بیان ژن لیزوزیم در بافت روده بوده که تأثیر معنی‌داری مشاهده نشد و تنها دو پربیوتیک گالاکتو الیگوساکارید (GOS) و اینولین (INL) افزایش معنی‌داری از بیان ژن فاکتور مهارکننده تومور آلفا را در بافت روده ماهی کپور معمولی نشان دادند (۳۳). در بافت قدامی کپور معمولی نیز پربیوتیک‌های گالاکتو الیگوساکارید (GOS)، اینولین (INL) و فروکتوالیگو ساکارید (FOS) بر میزان بیان ژن آنزیم لیزوزیم تأثیر معنی‌داری نداشت درحالی‌که در میزان بیان ژن فاکتور مهارکننده تومور آلفا پربیوتیک‌های اینولین و فروکتوالیگو ساکارید (FOS) افزایش معنی‌داری در تولید TNF-1α نشان دادند (۳٤).

پژوهش حاضر نشان داد که محصول تجاری لوابون (مخمر اتولیزشده ساکرومایسیس سرویزیه) می‌تواند در بهبود شاخص‌های ایمنی و آنتی‌اکسیدانی کپور معمولی (SOD، CAT، TNF-1α) مفید باشد در حالی‌که از نظر تأثیر در کارایی شاخص‌های رشد اثر معنی‌داری را نشان نداد. بنابراین پیشنهاد می‌گردد آزمایش‌های بیش‌تری در ماهی کپور معمولی در غلظت‌های مختلف، سنین مختلف و دوره‌های زمانی طولانی‌تر در استفاده از لوابون انجام گردد.

## سپاسگزاری

به این وسیله از تمام کسانی که در انجام این پژوهش ما را همیاری نمودند سپاسگزاری می‌نمایم.

## منابع

1.Naylor, R. L., Hardy, R. W., Buschmann, A. H., Bush, S. R., Cao, L., & Daneh, H. (2021). A 20-year retrospective review of global aquaculture. *Nature*. 591, 551-563.

2.Sattari, M., Shahsoni, D., & Shafi'i, Sh. (2012). Fishology (2) (systematic). *Haqhshenas Publications*. 502 p.

3.Metz, J. R., Van den Burg, E. H., Wendelaar Bonga, S. E., & Flik, G. (2003). Regulation of branchial $Na^+/K^+$-ATPase in common carp (*Cyprinus carpio*) acclimated to different temperatures. *The Journal of Experimental Biology*. 206, 2273-2280.

4.Rahman, M. M. (2015). Role of common Carp (*Cyprinus carpio*) in aquaculture production systems. *Frontiers in Life Science*. 1-12.

5.Hoseinifar, S. H., Ringø, E., Shenavar Masouleh, A., & Esteban, M. Á. (2014). Probiotic, prebiotic and synbiotic supplements in sturgeon aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture* 6, 1-14.

6.Tangestani, R., Doughikollaee, E., Ebrahimi, E., & Zare, P. (2011). Effects of garlic essential oil as an immunostimulant on hematological indices of juvenile beluga (*Huso huso*). *Journal of Veterinary Research*. 66, 209-216, 279.

7.Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*. 8, 1137-1144.

8.Pohlenz, C., & Gatlin III, D. M. (2014). Interrelationships between fish nutrition and health. *Aquaculture*. 431, 111-117.

9.Braz-Mota, S., Campos, D. F., Mac Cormack, T. J., Duarte, R. M., Val, A. L., Almeida-Val, V. M. F. (2018). Mechanisms of toxic action of copper and copper nanoparticles in two Amazon fish species: Dwarf cichlid (*Apistogramma agassizii*) and cardinal tetra (*Paracheirodon axelrodi*). *Science of the Total Environment*. 630, 1168-1180.

10.Burgos-Aceves, M. A., Cohen, A., Smith, Y., & Faggio, C. (2018). MicroRNAs and their role on fish oxidative stress during xenobiotic environmental exposures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 148, 995-1000.

11. Bahorun, T., Soobrattee, M. A., Luximon-Ramma, V., & Aruoma, O. I. (2006). Free Radicals and Antioxidants in Cardiovascular Health and Disease. *Internet Journal of Medical Update*. 1 (2), 25-41.
12. Aksnes, A., Izquierdo, M. S., Robaina, L., Vergara, J. M., & Montero, D. (1997). Influence of fish meal quality and feed pellet on growth, feed efficiency and muscle composition in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 153, 251-261.
13. Zoreyeh Zahra, S. J., Sharif Rouhani, M., Mehrabi, M. R., & Sepahdari, A. (2013). The Role of Health Care and Aquatic Diseases Research in Increasing the Productivity of Cold Fish in the Country. *Second National Conference on the Development and Production of Cold Fish*. 614-618.
14. Burr, G., Gatlin, D., & Ricke, S. (2007). Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 36 (4), 425-36.
15. Jalali Jafari, B., & Miyar, M. (2000). Fish diseases of Salmon and Trout. Noorbakhsh Publications. First Edition. 254p. [Translated in Persian]
16. Heymann, F., & Tacke, F. (2016). Immunology in the liver-from homeostasis to disease. *Nat. Rev. Gastro. Hepat.* 13, 88-110. **doi: 10.1038/ nrgastro.2015.200.**
17. Reyes-Becerril, M., Salinas, I., Cuesta, A., Meseguer, J., Tovar-Ramirez, D., Ascencio-Valle, F., & Esteban, M. Á. (2008). Oral delivery of live yeast *Debaryomyces hansenii* modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & shellfish immunology*. 25, 731-739**.**
18. Perez-Sanchez, T., Balcazar, J. L., Merrifield, D. L., Carnevali, Q., Gioacchini, G., Blas, I. D., & Ruiz-Zarzuela, I. (2011). Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during (*Lactococcus garvieae*) infection. *Fish and Shellfish*, 31, 291-236.
19. Hosseini, M., Kolangi Miandare, H., Hoseinifar, S. H., & Yarahmadi, P., (2016). Dietary Lactobacillus acidophilus modulated skin mucus protein profile, immune and appetite genes expression in gold fish (*Carassius auratus gibelio*). *Fish and Shellfish Immunology*, 59, 149-154.
20. Hoseinifar, S. H., Hosseini, M., Paknejad, H., Safari, R., & Jafar, A. (2018). Effect of dietary supplement *raffinose*, *Lactobacillus acidophilus* and the combination of two supplements on the expression of lysozyme and TNF-a genes in common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*. 7 (1), 35-41.
21. Passos, R. M. H. (2017). Effect of Levabon® Aquagrow E on the growth performance and immune response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) under stress conditions. M.Sc. Thesis, Instituto Politecnico De Leiria, 45 p.
22. Abu-Elala, N., Marzouk, M., & Moustafa, M. (2013). Use of different *Saccharomyces cerevisiae* biotic forms as immune-modulator and growth promoter for *Oreochromis niloticus* challenged with some fish pathogens. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*.1, 21-29.
23. Daneshyar, F., Hosseini, S. M., & Yaqubfar, A. (2019). The effect of non-starch polysaccharides of food sources on performance, relative efficiency of energy and protein with carcass characteristics of broiler chickens. *Journal of Animal Production of Tehran University*. 21 (2), 233-246.
24. Pouramini, M., Kamali, A., Haji Moradlou, A. M., Ghorbani, R., & Alizadeh, M. (2009). Investigation of feeding with *Saccharomyces cerevisiae* yeast as a probiotic, on the resistance to salinity stress and histology of the digestive tract of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of New Technologies in Aquaculture Development*. 2 (1), 33-40.

25.Chitsaz, H., Akrami, R., & Arab Arkadeh, M. (2016). Effect of dietary synbiotics on growth, immune response and body composition of Caspian roach (*Rutilus rutilus*). *Iranian Journal Fisheries Sciences*, 15, 170-182.
26.Pouomong, V., & Mbonglang, J. (1993). Effect of feeding rate on the growth of tilapia (*O. niloticus*) in earthen ponds. *Bamidegh*. 45, 147-53.
27.Romanov, D., Divashuk, M., Havey, M. J., & Khrustaleva, L. (2015). Tyramide-FISH mapping of single genes for development of an integrated recombination and cytogenetic map of chromosome 5 of *Allium cepa* L. *Genome*. **doi: 10.1139/gen-2015-0019.**
28.Safari, R., Hoseinifar, S. H., Nezhadmoghadam, S. H., & Jafar Node, A. (2016). Transciptomic study of mucosal immune, antioxidant and growth related genes and non-specific immune response of common carp (*Cyprinus carpio*) fed dietary Ferula (*Ferula assafoetida*). *Fish and Shellfish Immunology*, 31, 1-16.
29.Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 25, 402-408.
30.Rui, G., & Santos, G. (2015). Good Gut Health is Essential to Growth Enhancement. *Aquaculture Scoop*, 50-54.
31.Jafarian, H. A., Sahandi, J., & Jafarian, S. (2013). Studying the efficiency of diet supplemented with *Saccharomyces cerevisiae* yeast extract in increasing the growth, survival and resistance of common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*. 2 (4), 129-141.
32.Iri, M., Bivareh, M. R., Ranjdoost, M., Jafarian, H. A., & Jafarian, S. (2018). Investigating the effects of different levels of prebiotic Imax Ultra (saturated yeast *Saccharomyces cerevisiae*) on the parameters of growth, survival, feeding efficiency and resistance to environmental stresses in common carp juveniles (*Cyprinus carpio* Linnaeus. 1758). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*. 7 (1), 11-25.
33.Ramos, M. A., Weber, B., Gonçalves, J. F., Santos, G. A., Rema, P., & Ozorio, R. O. A. (2013). Dietary probiotic supplementation modulated gut microbiota and improved growth of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comparative biochemistry and physiology.
34.Hoseinifar, S. H., Ahmadi, A. R., Khalili, M., Raeisi, M., Doan, H. V., & Caipang, C. M. (2017). The study of antioxidant enzymes and immune-related genes expression in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings fed different prebiotics. *Aquaculture Research*. 48, 5447-5454.
35.Niki Maleki, Z., Shabani, A., & Safari, R. (2019). The effects of separate and combined use of probiotic (*Lactobacillus casei*) and prebiotic (A-MAX) in diet on the expression of growth-related genes (GH and IGF1) in common carp (*Cyprinus carpio*) fry. *Journal of Animal Environment*. 11, 237-242.
36.Beckman, B. R., Fairgrieve, W., Cooper, K. A., Mahnken, C. V. W., & Beamish, R. J. (2004a). Evaluation of endocrine indices of growth in individual postsmolt coho salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.* 133, 1057-1067.
37.Hew, C. L., Fletcher, G. L., & Davies, P. L. (1995). Transgenic salmon: tailoring the genome for food production. *Journal of tailoring the genome for food production. Journal of Fish Biology* 47(sA), 1-19.
38.Bu, X., Du, X., Zhou, W., Zhao, X., & Wang, J. (2008). Molecular cloning, recombinant expression and characterization of lysozyme from Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) *Chinese Journal of Biotechnology*. 24 (5), 723-732.