

The effects of nucleotide on growth factors and growth related genes (GH and IGF) of Caspian roach (*Rutilus Caspicus*)

Marjan Hosseini¹, Hamed Paknejad^{*2}, Mohammad Sudagar³,
Hossein Anvarifar⁴, Seyed Pezhman Hosseini Shekarabi⁵

1. Ph.D. Student of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: marjanhosseini1370@gmail.com
2. Corresponding Author, 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. Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: sudagar@gau.ac.ir
4. University of Applied Science and Technology, Provincial Unit Golestan, Gorgan, Iran. E-mail: anvarifar_hossein@yahoo.co.uk
5. Dept. of Fisheries Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. E-mail: hosseini.pezhman@yahoo.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 08.01.2023
Revised: 08.30.2023
Accepted: 08.30.2023

Keywords:
Aquaculture,
Caspian roach,
Growth factor,
Gene expression,
Nucleotide

ABSTRACT

Caspian roach is one of the valuable fish of the Caspian Sea, which is released into the Caspian sea through artificial reproduction to restore stocks every year, so improving its diet to achieve more resistant and high quality fish is one of the important goals of aquaculture. The purpose of this study was to evaluate the effects of nucleotide on growth factors and growth related genes (GH and IGF) of Caspian roach (*Rutilus Caspicus*) so 1500 fish fry with the average weight of 0.5 ± 0.01 g were divided into 12 fiberglass tanks (400 L) and fed on 0, 0.3, 0.6 and 1.2 g/kg nucleotide for 8 weeks. At the end of the experiment the fish were biometry and brain and liver tissue were separated. Results showed that, final weight (FW), weight gain (WG) and specific growth rate (SGR) had significant differences at 0.6 and 1.2 g with control ($P < 0.05$). The lowest food conversation ratio (FCR) at significant difference with control was observed at 1.2 g ($P < 0.05$). GH and IGF genes expression at 0.6 and 1.2 g showed remarkable differences with control ($P < 0.05$). It can be concluded that, dietary nucleotide could improve growth factor in Caspian roach.

Cite this article: Hosseini, Marjan, Paknejad, Hamed, Sudagar, Mohammad, Anvarifar, Hossein, Hosseini Shekarabi, Seyed Pezhman. 2025. The effects of nucleotide on growth factors and growth related genes (GH and IGF) of Caspian roach (*Rutilus Caspicus*). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 13 (4), 65-75.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/japu.2023.21626.1806

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

اثرات سطوح مختلف مکمل نوکلئوتید جیره بر عملکرد رشد و بیان ژن‌های مرتبط با رشد (GH و IGF) ماهی کلمه خزری (*Rutilus caspicus*)

مرجان حسینی^۱، حامد پاک‌نژاد^{۲*}، محمد سوداگر^۳، حسین انوری‌فر^۴، سید پژمان حسینی شکرابی^۵

۱. دانشجوی دکتری شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: marjanhoseini1370@gmail.com
۲. نویسنده مسئول، گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: hkolangi@gmail.com
۳. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: sudagar@gau.ac.ir
۴. دانشگاه علمی کاربردی، واحد استان گلستان، گرگان، ایران. رایانامه: anvarifar_hossein@yahoo.co.uk
۵. گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. رایانامه: hosseini.pezhman@yahoo.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی- پژوهشی	ماهی کلمه (<i>Rutilus rutilus</i>) یکی از ماهیان با ارزش دریای خزر است که هر ساله جهت بازسازی ذخایر از طریق تکثیر مصنوعی به دریا رهاسازی می‌شود بنابراین بهبود رژیم غذایی آن برای رسیدن به ماهیان مقاوم‌تر و با کیفیت‌تر از اهداف مهم آبی‌پروری می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثر نوکلئوتید بر فاکتورهای رشد و بیان ژن‌های GH و IGF ماهی کلمه می‌باشد. به همین منظور تعداد ۱۵۰۰ قطعه بچه‌ماهی نارس کلمه با میانگین وزنی 0.1 ± 0.05 گرم در ۱۲ تانک ۴۰۰ لیتری توزیع شدند و با سطوح ۰ (شاهد)، ۰/۳ (تیمار ۱)، ۰/۶ (تیمار ۲) و ۱/۲ (تیمار ۳) گرم بر کیلوگرم نوکلئوتید به مدت ۸ هفته تغذیه شدند. در پایان دوره پرورش زیست‌سنجی جهت ارزیابی فاکتورهای رشد انجام شد و از بافت‌های مغز و کبد جهت تست‌های ژنتیکی نمونه‌برداری انجام گرفت. نتایج نشان داد که میزان وزن نهایی (FW)، افزایش وزن (WG) و نرخ رشد ویژه (SGR) در تیمارهای ۰/۶ و ۱/۲ گرم اختلاف معنی‌داری با شاهد داشتند ($P < 0.05$). کم‌ترین میزان ضریب تبدیل غذایی با اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه شاهد در تیمار ۱/۲ گرم بود ($P < 0.05$). سطح بیان ژن‌های GH و IGF نیز در تیمارهای ۰/۶ و ۱/۲ گرم اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد نشان داد ($P < 0.05$). از این پژوهش می‌توان چنین استنباط کرد که استفاده از نوکلئوتید در جیره غذایی ماهی کلمه می‌تواند منجر به بهبود عملکرد رشد شود.
واژه‌های کلیدی: آبی‌پروری، بیان ژن، عملکرد رشد، ماهی کلمه، نوکلئوتید	

استناد: حسینی، مرجان، پاک‌نژاد، حامد، سوداگر، محمد، انوری‌فر، حسین، حسینی شکرابی، سید پژمان (۱۴۰۳). اثرات سطوح مختلف مکمل نوکلئوتید جیره بر عملکرد رشد و بیان ژن‌های مرتبط با رشد (GH و IGF) ماهی کلمه خزری (*Rutilus caspicus*).

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان، ۱۳ (۴)، ۶۵-۷۵.

DOI: 10.22069/japu.2023.21626.1806



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

ماهی کلمه یا تلاجی متعلق به خانواده کپورماهیان یکی از گونه‌های مهم و با ارزش دریای خزر است. این ماهی به‌عنوان یک منبع غذایی برای فیل‌ماهی دریای خزر محسوب می‌شود (۱). طی سال‌های اخیر عوامل متعددی مانند صید بیش از اندازه و از بین رفتن مکان‌های طبیعی تخم‌ریزی، این گونه در معرض خطر انقراض قرار گرفته و این مسأله می‌تواند عواقب جبران‌ناپذیری برای اکوسیستم دریا و اقتصاد مردم منطقه به‌دنبال داشته باشد. از این‌رو یکی از مهم‌ترین اهداف سازمان شیلات ایران جهت حفظ و بازسازی ذخایر این است که هر ساله میلیون‌ها قطعه بچه‌ماهی را از طریق تکثیر نیمه‌مصنوعی و مصنوعی تولید و به دریای خزر رهاسازی می‌کند (۲). به‌منظور رسیدن به در صد بالایی از موفقیت در امر رهاسازی بچه‌ماهیان، کیفیت پرورش آن‌ها قبل از رهاسازی بسیار دارای اهمیت می‌باشد بنابراین یکی از راهکارهایی که در تکثیر و پرورش صنعتی ماهیان به‌صورت گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد فرموله کردن غذا با تعیین احتیاجات غذایی گونه می‌باشد. این روش سبب می‌شود که ماهیان با کیفیت‌تر و مقاوم‌تری تولید شود. یکی از روش‌های تولید بچه‌ماهیان با کیفیت‌تر استفاده از مکمل‌های غذایی به‌منظور افزایش رشد و بهبود سیستم ایمنی می‌باشد (۳). نوکلئوتیدها از جمله مکمل‌های غذایی مهمی هستند که امروزه در صنعت آبی‌پروری مورد استفاده قرار می‌گیرند. نوکلئوتیدها ترکیبات داخل سلولی با وزن ملکولی پایین هستند که نقش‌های مهمی در ارتباط با فرآیندهای بیوشیمیایی ایفا می‌کنند (۴). در شرایط نرمال نوکلئوتیدها از طریق مسیر salvage (بازیافت سلول‌های مرده) و یا از طریق مسیر *de novo* یعنی سنتز از طریق امینواسیدها ساخته می‌شوند و به‌نظر می‌رسد که میزان تولید نوکلئوتید از این دو مسیر کافی باشد. اما در شرایط

استرس‌زا از جمله عفونت‌ها، در طول دوره‌های رشد سریع و تکامل، سنتز نوکلئوتید از مسیر *de novo* محدود شده و در این شرایط نوکلئوتید به‌عنوان یک ماده ضروری قلمداد می‌شود (۵). در ارتباط با نوکلئوتید و اثرات آن بر آبزبان مطالعات گسترده‌ای انجام شده است. علاوه‌بر دلپذیری غذا، رفتارهای تغذیه‌ای و بیوسنتز امینواسیدهای غیر ضروری، اخیراً منبع خارجی نوکلئوتید به‌عنوان یک مکمل در جیره غذایی ماهی جهت افزایش ایمنی و مقاومت در برابر بیماری‌ها شناخته شده است (۶). پژوهش‌های انجام شده روی ماهی نشان داده است که جیره حاوی نوکلئوتید باعث بهبود رشد در مراحل اولیه تکامل، افزایش کیفیت لاروها از طریق تقویت مولدین، تغییر و اصلاح ساختار روده، افزایش مقاومت به استرس و تحریک پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی و ایمنی اختصاصی می‌شود. در سال‌های گذشته گزارش‌های متعددی مبنی بر استفاده از نوکلئوتیدها در جیره غذایی ماهی انجام شده است. تغذیه ماهیان سی‌باس اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) به مدت ۶ هفته با جیره حاوی نوکلئوتید استخراج شده از مخمر (*Saccharomyces cerevisiae*) در سطح ۰/۳ درصد منجر به بهبود عملکرد رشد و افزایش پرزهای سطح روده شد (۷). اثرات استفاده از نوکلئوتید استخراج شده از مخمر در سطوح ۰، ۰/۵، ۱/۵ و ۲/۵ گرم در جیره ماهی تیلاپای نیل گزارش شد. استفاده از سطح ۲/۵ گرم منجر به افزایش عملکرد رشد، کارایی تغذیه و نرخ کارایی پروتئین شد. هم‌چنین سطح آنزیم‌های لیپاز و آمیلاز را نیز افزایش داد. سطح بیان ژن‌های گرلین (*Ghrelin*) و فاکتور شبه انسولین (*IGF*) نیز در تیمارهای ۱/۵ و ۲/۵ گرم نیز بالاتر از گروه شاهد گزارش شد (۸). به‌کارگیری جیره حاوی محصولات مرتبط با نوکلئوتید (۰/۳ درصد اینوزین و ۰/۱ درصد نوکلئوزید) باعث افزایش بیان ژن فاکتور

شبه انسولینی (IGF-I) در ماهی سی‌بریم قرمز شد که این امر می‌تواند دلیل محکمی برای افزایش میزان رشد این گونه باشد (۶). هرچند، هنوز اطلاعات کافی در ارتباط با مکانیسم‌هایی که طی آن‌ها نوکلئوتیدها می‌توانند سب بهبود رشد و ایمنی آبزیان شوند، وجود ندارد. بنابراین انجام مطالعات گسترده در ارتباط با موضوعات مذکور جهت رسیدن به درک بهتر و جامع‌تر از نوکلئوتیدها و اثرات آن‌ها بر ماهی امری ضروری تلقی می‌شود (۶) بنابراین هدف از این مقاله، استفاده از سطوح مختلف نوکلئوتیدبر عملکرد رشد و بیان ژن‌های GH و IGF ماهی کلمه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی و شرایط آزمایشگاهی: تعداد ۱۵۰۰ قطعه بچه‌ماهی نارس کلمه با میانگین وزنی $0/1 \pm 0/5$ از کارگاه تکثیر و پرورش سیجوال واقع در استان گلستان تهیه و توسط کیسه‌های پلاستیکی حاوی اکسیژن (حجم آب به هوا ۱ به ۴) به آزمایشگاه شهید ناصر فضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شدند. بچه‌ماهیان جهت سازگاری

با شرایط آزمایشگاه در تانک‌های ۴۰۰ لیتری توزیع شده و حدود ۲ هفته با جیره پایه تغذیه شدند. **آماده‌سازی جیره غذایی:** پس از تعیین احتیاجات غذایی ماهی کلمه، جیره‌نویسی انجام شد و مواد اولیه از کارخانه خوراک دام و آبزیان شمال تهیه و به سالن و نیرو منتقل شدند. و با استفاده از دستگاه‌های مورد نیاز تیمارهای غذایی مختلف آزمایش ساخته شدند. ابتدا مواد خشک جیره با هم مخلوط شدند و سپس روغن ماهی و روغن سویا و مقدار کمی آب به ترکیبات خشک اضافه شدند تا حالت خمیری پیدا کنند. خمیر حاصل از دستگاه چرخ گوشت با اندازه چشمه ۲ میلی‌متر به آرامی عبور داده شد. رشته‌های به‌وجود آمده در فضای آزاد خشک شدند و سپس توسط دست به ذرات کوچک‌تر خرد شدند و آنالیز تقریبی جیره در جدول ۱ آورده شده است. سطوح مختلف مکمل نوکلئوتید نیز قبل از اضافه کردن مواد اولیه مایع به ترکیبات خشک و برای هر تیمار به‌صورت جداگانه اضافه شد. در این آزمایش از نوکلئوتید ۳۰ درصد (Nucleoforce Fish™, Bioiberica, Spain) استفاده شد.

جدول ۱- آنالیز تقریبی جیره ماهی کلمه (*Rutilus caspicus*).

Table 1. Approximate Analysis of the Diet of Caspian Roach (*Rutilus caspicus*).

تیمارها				شاهد	اجزای جیره
تیمار ۳	تیمار ۲	تیمار ۱	تیمار ۰		
۴۰/۰	۴۰/۰	۴۰/۰	۴۰/۰	۴۰/۰	آرد ماهی
۲۲/۰	۲۲/۴	۲۱/۳	۲۰/۵	۲۰/۵	آرد گندم
۱۳	۱۳	۱۳	۱۳	۱۳	آرد سویا
۲/۴	۳/۱	۴	۴	۴	گلوتن گندم
۳/۰	۳/۰	۳/۰	۳/۰	۳/۰	روغن سویا
۳/۰	۳/۰	۳/۰	۳/۰	۳/۰	روغن ماهی
۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵	مکمل معدنی
۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵	مکمل ویتامین
۲/۰	۲/۰	۲/۰	۲/۰	۲/۰	همبند
۱/۸	۱/۸	۱/۸	۱/۸	۱/۸	ضد قارچ
۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	آنتی‌اکسیدان
۱/۲	۰/۶	۰/۳	۰/۰	۰/۰	نوکلئوتید
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	جمع کل

ادامه جدول ۱-

Continue Table 1.

تیمارها				شاهد	اجزای جیره
تیمار ۳	تیمار ۲	تیمار ۱	تیمار ۳		
آنالیز تقریبی جیره (درصد ماده خشک)					
۹۰/۲۵	۹۰/۲۵	۹۰/۲۴	۹۰/۲۴	۹۰/۲۴	ماده خشک
۳۸/۷۵	۳۸/۸۴	۳۸/۹۱	۳۸/۸۸	۳۸/۸۸	پروتئین خام
۹/۹۳	۱۰/۰۱	۱۰/۱۲	۱۰/۰۴	۱۰/۰۴	چربی خام
۱۰/۶۶	۱۰/۴۹	۱۰/۳۵	۱۰/۳	۱۰/۳	خاکستر
۲/۱۶	۲/۰۵	۲/۱	۲/۰۷	۲/۰۷	فیبر
۱۷/۹۵	۱۸/۰۲	۱۸/۰۶	۱۸/۰۶	۱۸/۰۶	انرژی (MJ Kg ⁻¹)

کیفیت آب در حد اپتیمم نگهداری شد. نیم ساعت پس از غذادهی میزان غذای مانده در کف تانک‌های پرورش جمع‌آوری شده و پس از خشک شدن توزین می‌شد.

فاکتورهای رشد: پس از ۵۶ روز تغذیه با جیره حاوی مکمل نوکلئوتید، به‌منظور ارزیابی فاکتورهای رشد، ماهیان به‌مدت ۲۴ ساعت غذادهی نشدند و پس از زیست‌سنجی نهایی فاکتورهای رشد از جمله وزن نهایی (FW)، افزایش وزن (WG)، نرخ رشد ویژه (SGR)، ضریب تبدیل غذایی (FCR)، کارایی پروتئین (PER)، کارایی چربی (LER)، فاکتور وضعیت (CF)، نرخ رشد متابولیک (MGR) و نرخ بقا (SR) طبق رابطه‌های زیر محاسبه شد:

تیمار بندی و شرایط پرورش: ماهیان کلمه با میانگین وزن 0.01 ± 0.05 با تراکم ۱۰۰ قطعه ماهی در هر تانک ۴۰۰ لیتری توزیع شدند. تیمارهای آزمایش شامل ۴ سطح نوکلئوتید ۰ (شاهد)، ۰/۳ (تیمار ۱)، ۰/۶ (تیمار ۲) و ۱/۲ (تیمار ۳) در ۱ کیلوگرم جیره (g/kg) و هر تیمار دارای ۳ تکرار بود. ماهیان روزانه ۴ بار و در حد سیری به‌مدت ۸ هفته تغذیه شدند. همه فاکتورهای فیزیوشیمیایی آب از جمله دما (24.38 ± 0.05 °C)، اکسیژن محلول (6.19 ± 0.05 mg/L)، pH (7.42 ± 0.23)، شوری (g/L) (0.03 ± 0.16)، آمونیاک (0.15 ± 0.03)، نیتريت (0.03 ± 0.02 mg/L) و سختی (175 ± 5 mg/L) روزانه اندازه‌گیری می‌شد. علاوه بر این نصف حجم آب روزانه تعویض می‌شد و

$$\text{افزایش وزن (درصد)} = ((\text{وزن نهایی} - \text{وزن اولیه}) / \text{وزن اولیه}) \times 100$$

$$\text{نرخ رشد ویژه (درصد)} = ((\text{لگاریتم وزن نهایی} - \text{لگاریتم وزن اولیه}) / \text{مدت زمان پرورش}) \times 100$$

$$\text{ضریب تبدیل غذایی} = \text{مقدار غذای خورده شده} / \text{مقدار وزن اضافه شده}$$

$$\text{کارایی پروتئین} = \text{مقدار وزن اضافه شده (گرم)} / \text{مقدار پروتئین مصرفی (گرم)}$$

$$\text{کارایی چربی} = \text{مقدار وزن اضافه شده (گرم)} / \text{مقدار چربی مصرفی (گرم)}$$

$$\text{نرخ رشد متابولیک} = \text{افزایش وزن} \times (GBW/1000)^{-0.8} / t$$

$$\text{نرخ بقا (درصد)} = (\text{تعداد ماهیان در انتهای دوره پرورش} / \text{تعداد ماهیان در ابتدای دوره پرورش}) \times 100$$

انجام **Real time PCR**: ریل تایم PCR نیز در ویال‌های مخصوص آن انجام شد. هر تیمار شامل ۴ تکرار تکنیکی بود و محتویات هر ویال ۲۰ میکرولیتر بود. مستر میکس حاوی ۱۰ میکرولیتر بافر سایبر گرین، ۱ میکرولیتر آغازگر پیش رونده ژن هدف، ۱ میکرولیتر آغازگر پس‌رونده ژن هدف، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تگ پلیمرز و ۶/۴ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز بود. هر ویال مخصوص PCR، محتوی ۲ میکرولیتر cDNA و ۱۸ میکرولیتر مستر بود.

طراحی پرایمر: در هنگام طراحی آغازگر مناسب طبق توالی mRNA ژن‌های موردنظر نکاتی مانند: طول رشته آغازگر، مکان صحیح چسبیدن آغازگرهای پیش‌رونده و پس‌رونده و هم‌چنین دمای ذوب دارای اهمیت می‌باشند. پرایمرهای GH، IGF و β actine به‌عنوان ژن رفرنس در بانک ژنی NCBI و با استفاده از نرم‌افزار PRIMER3.0 طراحی شدند.

نمونه‌برداری از مغز و کبد: در این مطالعه جهت بررسی میزان بیان ژن رشد (GH) و فاکتور شبه‌انسولینی (IGF) به‌ترتیب بافت مغز و کبد توسط ست تشریح استریل شده جدا شدند. نمونه‌برداری در شرایط کاملاً استریل و پس از اتمام هشت هفته تغذیه با جیره غنی شده با مکمل نوکلئوتید انجام گرفت. ماهیان توسط پودر گل میخک (۲۰۰ mg/L) بیهوش شدند و بافت‌های مغز و کبد جدا شده، در ویال‌های استریل قرار گرفتند و بلافاصله به نیتروژن مایع منتقل شدند. نمونه‌های بافتی تا زمان استخراج RNA در فریزر ۸۰- نگهداری شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA طبق دستورالعمل شرکت سازنده و توسط ماده هضم‌کننده RNX-Plus انجام شد. هم‌چنین سنتز cDNA با استفاده از مستر میکس سنتز cDNA شرکت جینت بایو محصول کشور کره و طبق دستورالعمل آن انجام شد.

جدول ۲- توالی پرایمرهای مورد استفاده برای ارزیابی بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی.

Table 2. Primer Sequences Used for Evaluating Relative Gene Expression.

نام ژن	توالی ژن	طول رشته (bp)	دمای ذوب (°C)	کارایی پرایمر (%)	شماره دسترسی
GH	F: GTCTCAAACAGCCTGACGGT R: GGAAGCTCTCTCTGACGCTG	110	62 64	98	374264143
IGF	F: GCGCCTTGAGATGTA CTGTG R: GGGTTCTTTGCTGTCCTGGTG	193	62 64	98	374264151
β -Actine	F: CCCTGCATGGATGTGTGGAT R: GGGTGACACCATCACCAGAG	189	64 62	99	DQ061948.1

یک‌طرفه (ANOVA) استفاده شد و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون آماری Tukey در سطح اطمینان ۵ درصد استفاده شد. سطوح معنی‌داری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Spss نسخه ۲۲ یا ویرایش ۲۲ انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: قبل از انجام آزمون آماری داده‌ها، جهت توزیع نرمال داده‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف Kolmogorov – Smirnov استفاده شد. تغییر در بیان نسبی ژن‌ها توسط روش منحنی ذوب ارزیابی شد. فاکتورهای رشد و بیان نسبی ژن‌های GH و IGF از طریق آنالیز واریانس

نتایج و بحث

بود و تیمار ۰/۶ و ۱/۲ گرم اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشتند ($P < 0/05$). کم‌ترین میزان ضریب تبدیل غذایی (FCR) نیز در تیمار ۱/۲ گرم و بیش‌ترین ضریب تبدیل غذایی در گروه شاهد مشاهده شد اما بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0/05$). کارایی چربی و نرخ رشد متابولیک در تیمار ۰/۶ و تیمار ۱/۲ گرم در سطح معنی‌داری نسبت به گروه شاهد اندازه‌گیری شد ($P < 0/05$).

فاکتورهای رشد: نتایج به‌دست آمده از ارزیابی فاکتورهای رشد بچه‌ماهیان کلمه تحت‌تأثیر استفاده از جیره مکمل شده با سطوح مختلف نوکلئوتید در جدول ۳ خلاصه شده است. نتایج نشان داد که با افزایش سطح مصرف نوکلئوتید در جیره میزان وزن نهایی (FW)، افزایش وزن (WG) و نرخ رشد ویژه (SGR) افزایش یافت. به‌طوری‌که بالاترین مقدار این فاکتورها در ماهیان تغذیه شده با ۱/۲ گرم نوکلئوتید

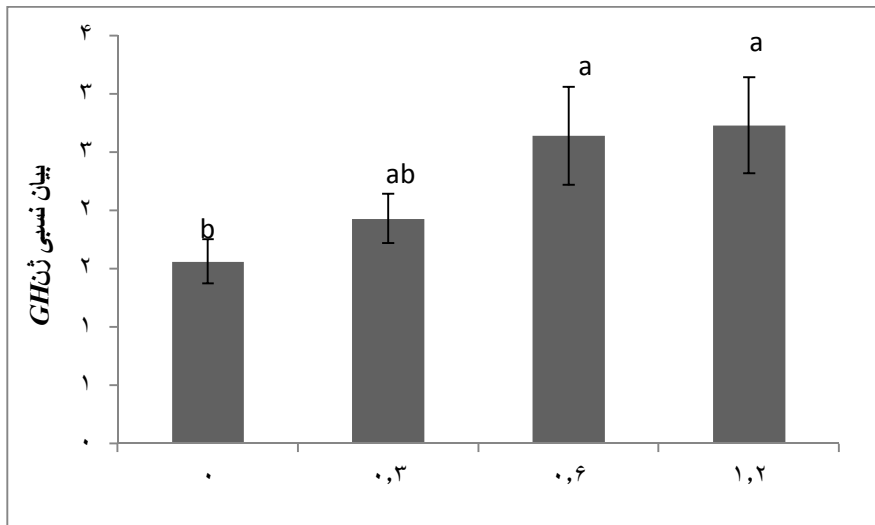
جدول ۳- عملکرد رشد بچه‌ماهیان کلمه تغذیه شده با جیره حاوی سطوح مختلف نوکلئوتید به مدت ۸ هفته.

Table 3. Growth Performance of Caspian Roach Fry Fed with Diets Containing Different Levels of Nucleotides for 8 Weeks.

P-value		سطوح مختلف مکمل نوکلئوتید (g/kg)				فاکتورهای رشد
Quadratic	Linear	۱/۲ گرم	۰/۶ گرم	۰/۳ گرم	۰	
۰/۶۹۹	۰/۴۴۱	۰/۵ ± ۰/۰۱	۰/۵ ± ۰/۰۱	۰/۵ ± ۰/۰۱	۰/۵ ± ۰/۰۱	وزن اولیه (گرم)
۰/۰۰۳	۰/۰۰۱	۲/۲۶ ± ۰/۱۱ ^a	۲/۱۷ ± ۰/۲۳ ^a	۱/۹۹ ± ۰/۲۲ ^{ab}	۱/۶۲ ± ۰/۱۰ ^b	وزن نهایی (گرم)
۰/۰۰۳	۰/۰۰۱	۱/۷۵ ± ۰/۱۰ ^a	۱/۶۵ ± ۰/۲۲ ^a	۱/۴۷ ± ۰/۲۳ ^{ab}	۱/۱۱ ± ۰/۱۰ ^b	افزایش وزن (گرم)
۰/۰۰۳	۰/۰۰۱	۲/۶۴ ± ۰/۰۸ ^a	۲/۵۱ ± ۰/۱۵ ^a	۲/۴۱ ± ۰/۲۳ ^{ab}	۲/۰۷ ± ۰/۱۴ ^b	نرخ رشد ویژه (درصد/روز)
۰/۰۱۵	۰/۰۰۸	۱/۱۲ ± ۰/۰۹ ^b	۱/۱۶ ± ۰/۱۷ ^b	۱/۲۸ ± ۰/۲۲ ^{ab}	۱/۵۰ ± ۰/۲۰ ^a	ضریب تبدیل غذایی
۰/۰۲۱	۰/۰۰۹	۰/۰۲ ± ۰/۰۰ ^a	۰/۰۲ ± ۰/۰۰ ^a	۰/۰۲ ± ۰/۰۰ ^{ab}	۰/۰۲ ± ۰/۰۰ ^b	کارایی پروتئین (درصد)
۰/۰۱۷	۰/۰۰۷	۰/۰۹ ± ۰/۰۱ ^a	۰/۰۸ ± ۰/۰۱ ^a	۰/۰۸ ± ۰/۰۱ ^{ab}	۰/۰۶ ± ۰/۰۱ ^b	کارایی چربی (درصد)
۰/۰۰۸	۰/۰۰۳	۱۲/۰۸ ± ۰/۳۸ ^a	۱۱/۶۸ ± ۰/۳۳ ^a	۱۱/۳۱ ± ۰/۹۷ ^{ab}	۱۰/۱۷ ± ۰/۶۶ ^b	نرخ رشد متابولیک
-	-	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	بازماندگی (درصد)

معنی‌داری نسبت به ماهیان گروه شاهد بالاتر بود ($P < 0/05$). بین تیمارهای ۰/۳، ۰/۶ و ۱/۲ گرم نوکلئوتید اختلاف معنی‌داری در بیان ژن GH مشاهده نشد ($P > 0/05$).

بیان ژن GH: تغییرات سطح بیان ژن GH بچه‌ماهیان کلمه تحت‌تأثیر سطوح مختلف مکمل نوکلئوتید در شکل ۱ خلاصه شده است. بیان نسبی mRNA ژن GH در بچه‌ماهیان کلمه تحت‌تأثیر تغذیه با جیره حاوی ۰/۶ و ۱/۲ گرم نوکلئوتید به‌طور

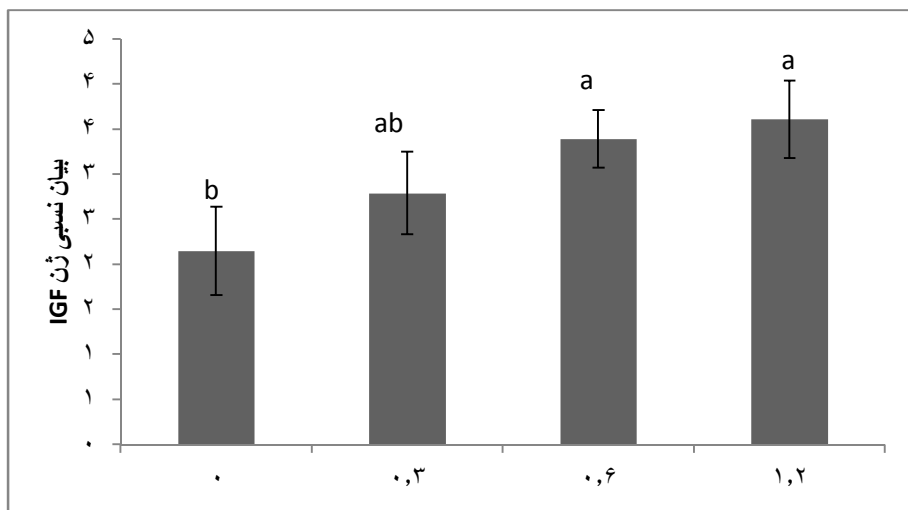


شکل ۱- روند تغییرات بیان ژن GH در بچه‌ماهیان کلمه تغذیه شده با سطوح ۰، ۰/۳، ۰/۶ و ۱/۲ گرم نوکلئوتید. حروف مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

Figure 1. Changes in GH Gene Expression in Caspian Roach Fry Fed with Different Levels of Nucleotides (0, 0.3, 0.6, and 1.2 g). Different letters indicate significant differences.

اختلاف معنی‌داری در سطح بیان این ژن با شاهد نشان دادند ($P < 0.05$). بین تیمارهای مختلف نوکلئوتید باهم اختلاف معنی‌داری در میزان بیان ژن IGF مشاهده نشد ($P > 0.05$). تیمار ۰/۳ گرم نوکلئوتید نیز اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان نداد ($P > 0.05$).

بیان ژن IGF: نتایج به‌دست آمده از اندازه‌گیری بیان ژن IGF در شکل ۲ گزارش شده است. روند بیان ژن IGF الگویی مشابه با بیان ژن GH نشان داد. طبق نتایج، بالاترین سطح بیان ژن IGF در گروه ماهیانی بود که در جیره آن‌ها از ۱/۲ گرم نوکلئوتید استفاده شده بود و تیمارهای ۰/۶ و ۱/۲ گرم نوکلئوتید



شکل ۲- روند تغییرات بیان ژن IGF در بچه‌ماهیان کلمه تغذیه شده با سطوح ۰، ۰/۳، ۰/۶ و ۱/۲ گرم نوکلئوتید. حروف مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

Figure 2. Changes in IGF Gene Expression in Caspian Roach Fry Fed with Different Levels of Nucleotides (0, 0.3, 0.6, and 1.2 g). Different letters indicate significant differences.

بحث و نتیجه گیری

مطالعات بسیاری اثرات مثبت استفاده از نوکلئوتیدها را در جیره آبزیان بر روی عملکرد رشد و سیستم ایمنی ماهی گزارش کرده اند (۶). نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که تغذیه بچه ماهیان کلمه با جیره حاوی مکمل نوکلئوتید در سطح 0.6 g kg^{-1} و $1/2$ تأثیرات مثبتی را بر عملکرد رشد این گونه در مقایسه با گروه شاهد اعمال کردند. به طوری که میزان وزن نهایی، افزایش وزن و نرخ رشد ویژه در این تیمارها در سطح معنی داری بالاتر از گروه شاهد بود. هم راستا با نتایج به دست آمده از این مطالعه پژوهشگران گزارش کردند که استفاده از 500 mg kg^{-1} نوکلئوتید در جیره غذایی ماهی سی‌باس اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) باعث بهبود عملکرد رشد، نرخ بقا و کارایی تغذیه شد (۱۰). نتایج بسیاری از مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که استفاده از جیره غنی شده با نوکلئوتید می‌تواند عملکرد رشد را در گونه‌های سی‌بریم (۱۱، ۱۲ و ۱۳) ماهی زبرا (۱۴) و تیلپای نیل (۱۵ و ۱۶) به شکل مثبتی تحت تأثیر قرار دهد. اگرچه تاکنون مکانیسم دقیقی از چگونگی عملکرد جیره حاوی نوکلئوتید بر بهبود عملکرد رشد و کارایی تغذیه گزارش نشده است، این فرضیه وجود دارد که تغذیه با نوکلئوتید می‌تواند منجر به تحریک تقسیمات سلولی در ماهیان شود (۱۷). علاوه بر این استفاده از منبع خارجی نوکلئوتید در تغذیه می‌تواند سبب اصلاح جمعیت باکتریایی روده میزبان شود که این امر منجر به افزایش هضم مواد غذایی و متعاقباً بهبود عملکرد رشد و کارایی تغذیه می‌شود (۷، ۱۸ و ۱۹). همچنین برخی از پژوهشگران معتقدند که افزایش رشد ناشی از مصرف جیره حاوی نوکلئوتید می‌تواند به دلیل اثر جاذب شیمیایی (chemo-attractive effect) نوکلئوتیدها به دلیل وجود بعضی از مواد مانند آدنوزین

مونوفسفات، اینوزین مونوفسفات، اوریدین مونوفسفات و آدنوزین دی فسفات در آن‌ها باشد (۱۶). در مطالعه حاضر عملکرد رشد تحت تأثیر استفاده از 0.6 g kg^{-1} و $1/2$ نوکلئوتید بهبود یافت که این امر می‌تواند دلیل روشنی بر افزایش تقاضای ماهیان برای جیره حاوی نوکلئوتید در مراحل اولیه زندگی باشد (۱۶). از طرفی دیگر بهبود شاخص‌های رشد سوماتیک در ماهیان تغذیه شده با جیره مکمل شده با نوکلئوتید به افزایش بیان ژن‌های کدکننده رشد نیز مربوط می‌شود. اثر متقابل بین ژن‌های مهم در رشد (GH و IGF) میزان رشد را در ماهیان همانند سایر مهره‌داران کنترل می‌کند (۲۰). GH یک هورمون پپتیدی است که عمدتاً توسط سلول‌های سوماتوتروفیک هیپوفیز پیشین تولید و آزاد می‌شود. ترشح این هورمون الگویی ضربانی دارد و توسط هورمون‌های هیپوتالاموس تنظیم می‌شود (۲۰). IGF یک هورمون پلی‌پپتیدی تک‌رشته‌ای است که بسیاری از فعالیت‌های ارتقادهنده رشد هورمون GH را میانجیگری می‌کند (۲۱). بنابراین GH و IGF برای حفظ هومئوستازی سلولی و رشد و توسعه ماهیچه‌ها و اسکلت ماهیان بسیار ضروری هستند (۲۱). هورمون رشد (GH) آزاد شده از غده هیپوفیز توسط جریان خون به گیرنده‌های خود در سطح بافت هدف (کبد) متصل می‌شود و سبب فعال‌سازی یک سری گیرنده دیگر می‌شود. این فرآیند منجر به تحریک سنتز و آزادسازی IGF-I در گردش خون می‌شود. در این زمان IGF آزاد شده درون پلاسما از طریق یک جریان بازخورد منفی منجر به سرکوب ترشح GH از غده هیپوفیز می‌شود (۲۰). در مطالعه انجام شده سطح بیان ژن‌های GH و IGF در ماهیان تغذیه شده با 0.6 g kg^{-1} و $1/2$ به طور قابل ملاحظه‌ای بالاتر از ماهیان تغذیه شده با جیره پایه (گروه شاهد) بود و این دو تیمار رشد بالاتری را نیز نسبت به گروه شاهد نشان دادند. بنابراین طبق این

نهایت منجر به افزایش سنتز IGF-I می‌شود. از مطالعه انجام شده می‌توان چنین نتیجه گرفت که استفاده از سطح ۱/۲ گرم نوکلئوتید در جیره غذایی ماهی کلمه می‌تواند بهبود عملکرد رشد را در این گونه به همراه داشته باشد.

نظریه می‌توان چنین استنباط کرد که عملکرد رشد بیش‌تر در تیمارهای $0/6 \text{ g kg}^{-1}$ و $1/2$ ممکن است ناشی از افزایش ناگهانی سطح بیان GHR (گیرنده هورمون رشد) باشد که باعث افزایش ظرفیت اتصال GH به گیرنده‌های خود در سطح کبد شده و در

منابع

- Kottelat, M. J. (2007). Hand book of European freshwater fishes. *Publications Kottelat, Cornol and Freyhof, Berlin*, 96 (3), 725-727.
- Ghaninejad, D., Moghim, M., & Parafkandeh, F. (2000). A report of Caspian Sea bony fishes stock assessment. Research Center of Fisheries of Gilan Province.
- Rufchaei, R., Hoseinifar, S. H., Mirzajani, A., & Van Doan, H. (2017). Dietary administration of Pontogammarus maeoticus extract affects immune responses, stress resistance, feed intake and growth performance of Caspian roach, *Rutilus caspicus* fingerlings. *Fish & Shellfish Immunology*, 63, 196-200.
- Gil, A. (2002). Modulation of the immune response mediated by dietary nucleotides. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56 (3), 1-4.
- Quan, R., Barness, L. A., & Uauy, R. (1990). Do infants need nucleotide supplemented formula for optimal nutrition. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 11 (4), 429-434.
- Hossain, M. S., Koshio, S., & Kestemont, P. (2020). Recent advances of nucleotide nutrition research in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, 12 (2), 1028-1053.
- Bowyer, P. H., El-Haroun, E. R., Hassaan, M., Salim, H., & Davies, S. J. (2019). Dietary nucleotides enhance growth performance, feed efficiency and intestinal functional topography in European Seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture Research*, 50 (7), 1921-1930.
- Selim, K. M., Reda, R. M., Mahmoud, R., & El-Araby, I. E. (2020). Effects of nucleotides supplemented diets on growth performance and expressions of ghrelin and insulin-like growth factor genes in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied Aquaculture*, 32 (2), 157-174.
- Hossain, M. S., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Sony, N. M., Dawood, M. A., ... & Fujieda, T. (2016). Efficacy of nucleotide related products on growth, blood chemistry, oxidative stress and growth factor gene expression of juvenile red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture*, 464, 8-16.
- Magouz, F. I., Abdel-Rahim, M. M., Lotfy, A. M., Mosbah, A., Alkafafy, M., Sewilam, H., & Dawood, M. A. (2021). Dietary nucleotides enhanced growth performance, carcass composition, blood biochemical, and histology features of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture Reports*, 20, 100738.
- Hossain, M. S., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Sony, N. M., Dawood, M. A., & Fujieda, T. (2016). Efficacy of nucleotide related products on growth, blood chemistry, oxidative stress and growth factor gene expression of juvenile red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture*, 464, 8-16.
- Hossain, M. S., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., & Sony, N. M. (2017). Supplementation of cytidine monophosphate enhanced growth, immune response and stress resistance of red sea bream, *Pagrus major* juvenile. *Aquaculture*, 473, 366-374.
- Hossain, M. S., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., & Sony, N. M. (2017). Dietary supplementation of uridine monophosphate enhances

- growth, hematological profile, immune functions and stress tolerance of juvenile red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture*, 475, 29-39.
14. Guo, X., Li, J., Ran, C., Wang, A., Xie, M., Xie, Y., & Zhou, Z. (2019). Dietary nucleotides can directly stimulate the immunity of zebrafish independent of the intestinal microbiota. *Fish & shellfish immunology*, 86, 1064-1071.
15. Kader, M. A., Bulbul, M., Abol-Munafi, A. B., Asaduzzaman, M., Mian, S., Noordin, N. B. M., & Koshio, S. (2018). Modulation of growth performance, immunological responses and disease resistance of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) by supplementing dietary inosine monophosphate. *Aquaculture Reports*, 10, 23-31.
16. Barros, M. M., Guimarães, I. G., Pezzato, L. E., de Oliveira Orsi, R., Fernandes Junior, A. C., Teixeira, C. P., ... & Padovani, C. R. (2015). The effects of dietary nucleotide mixture on growth performance, haematological and immunological parameters of Nile tilapia. *Aquaculture Research*, 46 (4), 987-993.
17. Borda, E., Martinez-Puig, D., & Cordoba, X. (2003). Well-balanced nucleotide supply makes sense. *Feed. Mix*, 11 (6), 24-26.
18. Gupta, S., Lokesh, J., Abdelhafiz, Y., Siriappagouder, P., Pierre, R., Sørensen, M., & Kiron, V. (2019). Macroalga-derived alginate oligosaccharide alters intestinal bacteria of Atlantic salmon. *Frontiers in microbiology*, 10, 2037.
19. Hoseinifar, S. H., Soleimani, N., & Ringø, E. (2014). Effects of dietary fructo-oligosaccharide supplementation on the growth performance, haemato-immunological parameters, gut microbiota and stress resistance of common carp, *Cyprinus carpio* fry. *British Journal of Nutrition*, 112 (8), 1296-1302.
20. Picha, M. E., Turano, M. J., Beckman, B. R., & Borski, R. J. (2008). Endocrine biomarkers of growth and applications to aquaculture: a minireview of growth hormone, insulin-like growth factor (IGF)-I, and IGF-binding proteins as potential growth indicators in fish. *North american journal of aquaculture*, 70 (2), 196-211.
21. Velloso, C. P. (2008). Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. *British journal of pharmacology*, 154 (3), 557-568.

