

اثر افزایش تراکم نگهداری بر عملکرد رشد، غلظت هورمون کورتیزول و بیان ژن پروتئین شوک حرارتی در ماهی قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

- سعید زاهدی: گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
- آرش اکبرزاده*: گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
- جلیل مهرزاد: گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، ایران
- احمد نوری: گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
- محمد هرسیج: گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبدکاووس، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۷

چکیده

تراکم نگهداری به عنوان یک عامل استرسزای مزمن در آبی پروری تلقی می شود. هدف از این مطالعه، مقایسه عملکرد رشد، تغییرات هورمون کورتیزول و بیان آم آر ان ای ژن پروتئین شوک حرارتی (HSP۷۰) ماهی قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در دو تراکم نگهداری متداول کشور در سیستم پرورشی باز می باشد. به این منظور، قزل آلائی جوان تمام ماده با دو تراکم نگهداری ۲۴ (تراکم متوسط) و ۴۴ (تراکم بالا) کیلوگرم بر مترمکعب و تراکم بارگذاری ۱ لیتر بر دقیقه به ازای هر کیلوگرم ماهی به مدت ۶۰ روز مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصله کاهش معنی دار میانگین وزن نهایی ماهیان را در تراکم بالا و به میزان ۶/۲٪ در مقایسه با تیمار تراکم متوسط نشان داد. با این وجود، افزایش تراکم نگهداری اثری بر طول کل، چنگالی و استاندارد در پایان آزمایش نداشت. همچنین، افزایش تراکم نگهداری هیچ گونه تغییر معنی داری را در طول نسبی باله های سینه ای، شکمی، مخرجی، پشتی و دمی پس از دو ماه موجب نشد. از سوی دیگر، درصد افزایش وزن، افزایش وزن روزانه، نرخ رشد ویژه و ضریب رشد حرارتی در تیمار تراکم بالا، کاهش معنی داری را در مقایسه با تیمار تراکم متوسط نشان داد. در مقابل، تغییرات ضریب چاقی فاقد اختلاف معنی دار بود. افزایش تراکم نگهداری موجب افزایش ضریب تغییرات وزن ماهیان و ضریب تبدیل غذایی گردید. مقادیر گلوکز و هورمون کورتیزول خون فاقد تغییر معنی دار بین دو تیمار آزمایشی بود. در پایان، مقادیر بیان ژن HSP۷۰ ماهیچه در سطح آم آر ان ای افزایش معنی داری را در تیمار تراکم بالا در مقایسه با تراکم متوسط نشان داد. نتایج این مطالعه نشان می دهد که افزایش تراکم نگهداری در محدوده تراکم های مجاز در سیستم های فاقد اکسیژن دهی، می تواند موجب ایجاد استرس در ماهیان شده که به صورت تغییر برخی از پارامترهای رشدی مورد بررسی در این مطالعه و نیز افزایش میزان بیان آم آر ان ای HSP۷۰ مشاهده گردید. لذا افزایش تراکم نگهداری، بایستی توأم با به کارگیری تمهیدات مدیریتی صحیح و رهیافت تغذیه ای در جهت تقلیل استرس مربوطه و تقویت سیستم ایمنی ماهی باشد.

کلمات کلیدی: قزل آلائی رنگین کمان، تراکم نگهداری، کورتیزول، HSP۷۰



مقدمه

استرس در ماهیان پرورشی از اهمیت شایانی برخوردار است که از دو منظر سلامت و تولید می‌تواند مورد ارزیابی قرار گیرد. عملیات پرورش ماهی برای ماهیان عاری از استرس نبوده و اقدامات گوناگونی که طی یک عملیات پرورشی در واحدهای تولیدی انجام می‌شود، هم‌چون دست‌کاری، رقم‌بندی، جابجایی، حمل و نقل، درمان بیماری‌ها و تراکم نگهداری (Stocking density) می‌تواند به‌عنوان عوامل استرس‌زا محسوب شود (Ellis و همکاران، ۲۰۰۲). تراکم نگهداری که به‌صورت زی‌توده ماهی به‌ازای واحد حجم آب تعریف می‌شود، به‌عنوان یک عامل مهم در مدیریت آبی پروری تلقی شده که در ارتباط با آسایش ماهی و تولید سیستم است و نقش کلیدی را در اقتصاد تولید بر عهده دارد. چراکه بسیاری از پرورش‌دهندگان خواهان افزایش تراکم نگهداری طی دوره پرورشی به‌منظور افزایش تولید مزرعه می‌باشند تا بدین وسیله بیشینه بهره‌برداری از آب و فضای پرورشی را بنمایند. تعیین نیازهای ایمن و بهینه مکانی امر مشکلی است و درکی پیرامون تراکم‌های بهینه برای اندازه‌های مختلف و نیز گونه‌های مختلف پرورشی وجود ندارد. از طرف دیگر، تراکم نگهداری در شرایط پرورش متراکم ماهی به‌عنوان یک عامل استرس‌زای مزمن و دارای ماهیت طولانی درنظر گرفته می‌شود که می‌تواند اثرات سوئی بر بسیاری از جنبه‌های زیست‌شناسی ماهی و در سطوح مختلف داشته باشد (Ellis و همکاران، ۲۰۰۲؛ Conte، ۲۰۰۴؛ North و همکاران، ۲۰۰۶). ماهیان پرورشی در تراکم‌های بالای پرورشی، کاهش عملکرد رشد را از خود نشان می‌دهند. شرایط استرس‌زا، ممکن است بر مصرف خوراک اثر گذارد که بنابراین، اثر مستقیمی بر رشد و نیز، ضریب تبدیل غذایی ماهی دارد (Ellis و همکاران، ۲۰۰۲). از طرف دیگر، کاهش مصرف خوراک (Vijayan و Leatherland، ۱۹۸۸)، تغییر برهم‌کنش‌های اجتماعی (Papoutsoglou و همکاران، ۱۹۹۸) و تغییر کیفیت آب (Pickering و Pottinger، ۱۹۸۷) ممکن است منجر به افزایش نیازهای متابولیکی و هزینه بیش‌تر انرژی برای تامین رشد شود. با این وجود، هنوز مشخص نیست که آیا کاهش عملکرد رشد ماهی در تراکم‌های بالای پرورشی، ناشی از شرایط زیرحد بهینه فاکتورهای کیفی آب است (مثل سطح پایین اکسیژن، افزایش آمونیاک آب یا افزایش سطوح دی‌اکسیدکربن) یا ناشی از خود تراکم و ازدحامی است که ماهی در سطوح بالاتر پرورشی تجربه می‌کند که می‌تواند موجب رفتار تهاجمی ماهی یا تغییر برهم‌کنش‌های اجتماعی شود. با این وجود، به‌نظر می‌رسد که چنین اثراتی مختص به گونه باشند (Pickering و Pottinger، ۱۹۸۷؛ Ellis و همکاران، ۲۰۰۲). Holm و همکاران (۱۹۹۰) در مطالعه‌ای پیرامون اثر تراکم نگهداری و رژیم غذایی بر سرعت رشد

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) نشان دادند که بالاترین و پایین‌ترین سرعت رشد ویژه به‌ترتیب مربوط به تیمار دارای پایین‌ترین و بالاترین تراکم ذخیره‌سازی است و سرعت رشد با افزایش دفعات غذادهی افزایش می‌یابد. در مقابل، مطالعه‌ای روی قزل‌آلای رنگین‌کمان در سه تراکم ۱۰، ۴۰ و ۸۰ کیلوگرم بر مترمکعب نشان داد که بالاترین تراکم ذخیره‌سازی اثر قابل ملاحظه‌ای بر سرعت رشد یا شاخص‌های فیزیولوژیکی ماهی قزل‌آلا ندارد (North و همکاران، ۲۰۰۶). مطالعه روی باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*) نشان داد که بیان ژن HSP۷۰ در بین سه تراکم مورد آزمایش ۱۰، ۸۰ و ۱۰۰ کیلوگرم بر مترمکعب، افزایش معنی‌داری را فقط در بالاترین تراکم از خود نشان می‌دهد (Gornati و همکاران، ۲۰۰۴). اندازه‌گیری میزان استرس در گونه‌های پرورشی تحت سیستم‌های پرورشی مختلف، بخش مهمی از ایجاد شیوه‌های مدیریتی مناسب بوده و نیز، اطلاعاتی پیرامون سلامت ماهی به‌دست می‌دهد. استرس مزمن بر رشد و متابولیسم از طریق عمل هورمون کورتیزول اثر می‌گذارد و به‌همین جهت، افزایش مقادیر نشانگرهای استرسی هم‌چون کورتیزول و گلوکز در بسیاری از گونه‌های پرورشی مواجه با استرس تراکم نگهداری بالا نشان داده شده است (Tort و همکاران، ۱۹۹۶). سیستم‌های هورمونی دخیل در تنظیم رشد ممکن است توسط استرس با فعال شدن محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-غده‌بین‌کلیوی تحت تاثیر قرار گیرند و به‌طور کلی، کورتیزول و کتکل‌آمین‌ها دارای اثر منفی بر هورمون‌های آنابولیک می‌باشند (Rotllant و همکاران، ۲۰۰۰). در دست داشتن نشانگرهای زیستی دقیق در سطح آم‌آران‌ای به تشخیص شرایط استرسی در زودترین زمان ممکن کمک می‌کند. ساخت آم‌آران‌ای کدکننده پروتئین‌های مرتبط با استرس، یک پاسخ اولیه به شرایط استرسی است که آن را می‌توان با پی‌سی‌آر مورد شناسایی قرار داد (Gornati و همکاران، ۲۰۰۴). پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs= Heat shock proteins) کاپرون‌های ملکولی با حفاظت بالا هستند که دارای طیف گسترده‌ای از عملکردها در موجودات زنده می‌باشند. به‌همین جهت، ساخت این پروتئین‌ها تحت شرایط سلولی استرس‌زا مثل درجه حرارت بالا، نبود اکسیژن، آسیب بافتی، التهاب، فلزات سنگین، تابش، افزایش کلسیم، کمبود گلوکز، سرطان و عفونت باکتریایی افزایش می‌یابد. HSPها در سلول‌ها از تجمع پروتئینی جلوگیری و به پیچ‌خوردگی پروتئین‌های جدید کمک می‌کنند. این پروتئین‌ها، نشانگرهای زیستی دقیقی جهت ارزیابی میزان سلامت موجود و مواجهه آن با شرایط استرسی محسوب می‌شوند (Basu و همکاران، ۲۰۰۲؛ Gornati و همکاران، ۲۰۰۴). قزل‌آلای رنگین‌کمان مهم‌ترین ماهی پرورشی سردابی ایران می‌باشد که دارای جایگاه ویژه‌ای در سبد مصرف خانواده‌های ایرانی است. با توجه به ضرورت حرکت به سمت سیستم‌هایی با تولید و

خارج می‌شدند. طی مدت آزمایش، فاکتورهای کیفی آب استخرها با نمونه‌برداری از لوله خروجی مرکزی به‌طور مرتب و براساس جدول زمانی مدنظر اندازه‌گیری می‌شدند که عبارت بودند از: درجه حرارت به‌صورت ۴ بار طی روز با استفاده از دماسنج دیجیتالی (چین)، اکسیژن محلول به‌طور روزانه با استفاده از اکسی‌متر (YSI 550, YSI inc, USA)، پی‌اچ به‌طور روزانه با استفاده از مولتی‌متر (AZ instrument, Taiwan)، آموناک با استفاده از کولوریمتر به‌طور روز در میان (Hanna instrument, USA) و هدایت الکتریکی هر دو هفته یک‌بار با استفاده از مولتی‌متر (AZ instrument, Taiwan).

نمونه‌برداری ماهیان: مرگ و میر ماهیان به‌طور روزانه ثبت می‌گردید. نمونه‌برداری از ماهیان قطع غذا شده در روز ۶۰ از شروع آزمایش و در ساعت ۹ صبح با برداشت تصادفی ۲ عدد ماهی از هر تکرار (۶ ماهی به‌ازای هر تیمار) توسط تور دستی انجام شد. پس از بی‌هوشی به کمک محلول ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پودر گل میخک، طول کل، چنگالی و استاندارد (تخته زیست‌سنجی)، وزن (ترازو) و اندازه باله‌ها (کولیس) اندازه‌گیری شد (North و همکاران، ۲۰۰۶) و خون‌گیری از رگ دمی به‌میزانی نزدیک به ۲ سی‌سی انجام گرفت که فوراً داخل لوله محتوی ماده ضدانعقاد ریخته شده و جهت انجام آنالیز به آزمایشگاه منتقل شد.

اندازه‌گیری پارامترهای رشد و سنجش بیوشیمیایی خون: سانتریفیوژ نمونه‌های خون در ۱۵۰۰ دور بر دقیقه و به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و پلاسما حاصله برای سنجش گلوکز و هورمون کورتیزول مورد استفاده قرار گرفت. هم‌چنین، یک برش کوچکی (یک گرم) از عضله سفید سمت چپ بدن استحصال که با سرم فیزیولوژیک انسانی شست و شو گردید. سپس نمونه داخل میکروتیوپ مخصوص گذاشته شده و در مخزن ازت منجمد گردید و در فریزر 80°C - نگهداری شد (Montserrat و همکاران، ۲۰۰۷). پارامترهای مرتبط با رشد و تغذیه براساس فرمول‌های زیر مورد محاسبه قرار گرفتند (Liu و همکاران، ۲۰۱۷):

$100 \times \text{تعداد اولیه ماهیان} / \text{تعداد نهایی ماهیان} = \text{نرخ بقا}$

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

$\text{تعداد روز} / (\text{وزن اولیه} - \text{وزن نهایی}) = \text{افزایش وزن روزانه}$

$100 \times \text{تعداد روزهای پرورش} / (\text{لگاریتم طبیعی وزن اولیه} - \text{لگاریتم طبیعی وزن نهایی}) = \text{نرخ رشد ویژه}$

$100 \times (\text{میانگین درجه حرارت آب} \times \text{تعداد روز}) / (10^{13} \text{ وزن اولیه} - 10^{13} \text{ وزن نهایی}) = \text{ضریب رشد حرارتی}$

$100 \times \text{طول چنگالی}^3 / \text{وزن کل} = \text{ضریب چاقی فولتون}$

$100 \times \text{میانگین وزن انفرادی ماهیان} / \text{انحراف معیار وزن انفرادی ماهیان} = \text{ضریب تغییرات وزنی}$

$\text{تفاضل وزن نهایی و وزن اولیه} / \text{غذای مصرف شده} = \text{ضریب تبدیل غذایی}$

فن‌آوری بالاتر که به‌طور عمده براساس تراکم‌های نگهداری بالا طراحی می‌شوند و عدم درک صحیح پیرامون اثرات واقعی تراکم نگهداری بالا بر رشد و سلامت ماهی، این مطالعه به بررسی اثر افزایش تراکم نگهداری بر عملکرد رشد و استرس قزل‌آلای رنگین‌کمان در سن پرورشی می‌پردازد. هدف از تحقیق حاضر، مقایسه اثر دو تراکم نگهداری متداول کشور به‌صورت تراکم متوسط و بالا در شرایط بدون اکسیژن‌دهی و با تراکم بارگذاری یکسان بر برخی از پارامترهای رشد، هورمون کورتیزول (به عنوان شاخص استرس) و بیان ژن HSP70 ماهیچه‌ای در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

ماهیان و شرایط آزمایشگاهی: ابتدا در اواخر بهمن ماه سال ۱۳۹۵، بچه‌ماهیان تمام ماده قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن 27.0 ± 8 گرم از مرکز حدواسط صدف ۲ به مرکز حدواسط و پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان صدف ۱ واقع در شهرستان تربت حیدریه توسط تانکر پلاستیکی منتقل و با تراکم تقریبی ۱۲ کیلوگرم بر مترمکعب رهاسازی شدند. آدآپتاسیون به‌مدت ۴ هفته در استخرهای هشت ضلعی (حجم مفید ۲۵۰۰ لیتر و عمق ۰/۷ متر و سطح آینه ۴ متر مربع) موجود در سوله حدواسط مرکز و تحت رژیم نوری طبیعی انجام شد. طی این مدت، ماهیان به‌مقدار ۱/۳٪ زی‌توده با خوراک اکستروژن قزل‌آلای رنگین‌کمان (اسکرتینگ، ایتالیا)، به‌صورت دستی و دو بار در روز در ساعات ۹ صبح و ۱۶ بعد از ظهر تغذیه شدند. در روز شروع آزمایش، ماهیان (میانگین وزنی 40.4 ± 10 گرم و میانگین طول $33/1 \pm 0/1$ سانتی‌متر) در دو تراکم متوسط (۲۴ کیلوگرم بر مترمکعب و نزدیک به متوسط تراکم استخرهای آبراهه‌ای کشور) و بالا (۴۰ کیلوگرم بر مترمکعب و نزدیک به تراکم مخازن پرورشی کشور) در استخرهای هشت ضلعی مشابه دوره آدآپتاسیون، در سه تکرار ذخیره‌سازی شدند. تراکم بارگذاری یکسان ۱ لیتر بر دقیقه به‌ازای هر کیلوگرم ماهی برای هر دو تراکم مورد آزمون ایجاد شد. آب ورودی هر دو سیستم از آب چشمه صدف ۱ (با درجه حرارت $13/5$ درجه سانتی‌گراد، پی‌اچ ۷/۲ و هدایت الکتریکی ۷۰۰ میکروموس بر سانتی‌متر) تامین می‌گردید که قبل از ورود به سوله هوادهی می‌شد. هم‌چنین هوادهی در داخل استخرهای هر دو سیستم به کمک سنگ هوای متصل به پمپ دمنده هوای سالی (چین) انجام می‌شد. تراکم نگهداری در تیمار تراکم بالا پس از رسیدن به ۴۴ کیلوگرم بر مترمکعب حفظ گردید که نزدیک به بیشینه تراکم‌های استخرهای فاقد اکسیژن‌دهی در کشور می‌باشد. به‌منظور حفظ تراکم نگهداری نزدیک به مقادیر یاد شده، تعداد معینی از ماهیان به‌طور هفتگی و با انجام زیست‌سنجی از استخرهای پرورشی



تفاضل (سی تی ژن هدف در تیمار آزمایشی منهای سی تی ژن مرجع در تیمار آزمایشی) و (سی تی ژن هدف در تیمار شاهد منهای سی تی ژن کالیبراتور در تیمار شاهد) می باشد. ژن بتا اکتین که به عنوان ژن مرجع مورد استفاده قرار گرفت، همان کالیبراتور در فرمول فوق می باشد.

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. میانگین داده ها با استفاده از آزمون t-student مورد مقایسه قرار گرفتند. داده های آزمایش به صورت خطای استاندارد $\pm$ میانگین نشان داده شده اند. برای پردازش داده ها نرم افزار اکسل و جهت انجام آنالیز و مقایسه میانگین ها از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد.

نتایج

میانگین فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی اندازه گیری شده برای آب استخرهای پرورشی در دو تراکم مورد آزمون، اختلاف معنی داری را نشان نداد. میانگین دما طی دوره یک ماهه آزمایش 14 ± 0.3 درجه سانتی گراد، اکسیژن محلول 7.7 ± 0.5 میلی گرم بر لیتر، پی اچ 7.2 ± 0.1 ، آمونیاک یونیزه نشده $0.02 <$ میلی گرم بر لیتر و هدایت الکتریکی 15 ± 690 میکروموس بر سانتی متر بود. مرگ و میر ماهیان طی مدت ۶۰ روزه آزمایش به ترتیب ۱/۵ و ۲/۵ درصد در دو تراکم متوسط و بالا بود. زیست سنجی مرتبط با وزن و طول ماهیان در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج حاصله کاهش معنی دار میانگین وزن نهایی ماهیان را در تیمار تراکم بالا نسبت به تیمار تراکم متوسط نشان می دهد، به طوری که میانگین وزنی به میزان $6/2$ درصد در پایان آزمایش کاهش نشان داد ($p < 0.05$). نتایج حاصل از زیست سنجی طول کل، چنگالی و استاندارد، اختلاف معنی داری بین دو تیمار تراکم نشان نداد ($p > 0.05$). هم چنین، اختلاف طول نسبی باله ها به رغم کاهش ناچیز در تیمار تراکم بالا (به جز افزایش اندک در باله سینه ای) از لحاظ آماری معنی دار نبود ($p > 0.05$ ، جدول ۳). برخی از پارامترهای مرتبط با رشد ماهیان مورد محاسبه در این مطالعه، در جدول ۴ نشان داده شده است. همان طور که ملاحظه می شود در پایان نمونه برداری، درصد افزایش وزن، افزایش وزن روزانه، نرخ رشد ویژه و ضریب رشد حرارتی کاهش معنی داری را طی افزایش تراکم نشان داد ($p < 0.05$). اما ضریب چاقی فولتون در دو تیمار تراکم مورد آزمون اختلاف معنی داری را نشان نداد ($p > 0.05$). افزایش تراکم نگهداری به میزان حدود 84 ٪، موجب افزایش ضریب تغییرات وزنی به میزان $12/5$ ٪ گردید ($p < 0.05$). هم چنین، ضریب تبدیل غذایی در تیمار تراکم بالا افزایش معنی داری را در مقایسه با تراکم متوسط نشان داد ($p < 0.05$ ، جدول ۳). تغییرات مقادیر گلوکز و هورمون کورتیزول پلاسما در ماهیان دو تیمار تراکم، فاقد هرگونه اختلاف معنی دار می باشد ($p > 0.05$ ، شکل ۱ الف و ب). نتایج حاصله از آزمایش، نشان دهنده

مقادیر گلوکز خون توسط دستگاه اتو آنالایزر (BT 3000plus, Biotechnica instrument, Italy) و مقادیر هورمون کورتیزول خون با استفاده از کیت الایزا مورد سنجش قرار گرفت (Diagnostics Biochem Canada Inc, Ontario, Canada).

پی سی آر کمی: استخراج آران ای از ۵۰ میلی گرم بافت عضله سفید منجمد با استفاده از کیت استخراج و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد (NucleoSpin Machery-Nagel). برای حذف آلودگی احتمالی با دی ان ای، تیمار با آنزیم DNase I انجام شد (NucleoSpin). کیفیت و کمیت آران ای تخلیص شده به ترتیب با انجام الکتروفورز روی ژل آگارز $1/5$ ٪ و اندازه گیری نسبت جذب در $260/280$ نانومتر با دستگاه نانودراپ مورد بررسی قرار گرفت (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). برای ساخت دی ان ای مکمل، ۲ میکروگرم از آران ای استخراجی به عنوان الگو با استفاده از کیت مربوطه (Thermo scientific, USA) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده به دی ان ای مکمل تبدیل و در دمای 20°C - نگهداری شد. طراحی آغازگر مناسب برای ژن پروتئین شوک حرارتی و ژن مرجع بتا اکتین بر اساس توالی موجود برای قزل آلا ی رنگین کمان در بانک ژن ان سی بی ای و با استفاده از نرم افزار پرایمر ۳ (نسخه ۴) (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) صورت پذیرفت و با انجام بلاست مورد تایید قرار گرفت. توالی های آغازگرهای پیش رو و پس رو ژن مذکور و ژن مرجع بتا اکتین در جدول ۱ نشان داده شده است. آغازگرهای مورد نظر توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی سنتز شدند. پی سی آر کمی با استفاده از مستر میکس ($5 \times \text{HOT FIREPoI}^{\circledR}$) دستگاه ریل تایم (EvaGreen[®] qPCR Mix Plus, no ROX; Solis BioDyne Inc.) و آغازگرهای مذکور انجام شد. پی سی آر کمی شامل مرحله واسرشت سازی اولیه در 95°C به مدت ۱۰ دقیقه و سپس، انجام ۴۰ چرخه تکثیر شامل واسرشت سازی در 95°C به مدت ۲۰ ثانیه، اتصال در 60°C به مدت ۲۰ ثانیه و بسط در 72°C به مدت ۲۰ ثانیه و یک مرحله توقف انجام شد.

جدول ۱: آغازگرهای مورد استفاده برای مطالعه پی سی آر کمی

ژن	پس رو (۵' → ۳')	پیش رو (۵' → ۳')
HSP70	TTGAAGTAGGCAGGGACTGTG	GAACAAATCCTTCAACCCAGAG
β -ACT	GGCACCTAATCACCTCTGAC	CTTGACGCTTAAAGTCTTGGTC

قرائت میزان نور فلئورسانس در انتهای هر چرخه توسط دستگاه ریل تایم انجام و میزان بیان ژن در دستگاه به صورت سی تی ثبت شد. برای آنالیز مقدار بیان نسبی ژن هدف HSP70 نسبت به ژن مرجع بتا اکتین بر حسب سی تی حاصله توسط نرم افزار کیو پی سی آر، از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak و Schmittgen, ۲۰۰۱) گردید که $\Delta\Delta Ct$ برابر با

شکل ۲ نشان داده شده است. بیان ژن HSP70 طی ۶۰ روز نگهداری ماهیان در تراکم بالا، افزایش معنی داری را نسبت به تیمار تراکم متوسط نشان داد به طوری که نسبت بیان به میزان ۲/۹ برابر افزایش داشت ($p < 0.05$ ، شکل ۲).

افزایش غلظت هورمون کورتیزول پلاسمای خون در تیمار تراکم بالا نسبت به تیمار تراکم متوسط است ولی این افزایش از لحاظ آماری معنی دار نمی باشد ($p > 0.05$). نتایج حاصل از بررسی بیان نسبی آم آر ان ای ژن HSP70 در عضله سفید ماهیان قزل آلا رنگین کمان جوان در

جدول ۲: میانگین وزن نهایی (گرم)، میانگین طول نهایی کل، چنگالی و استاندارد (سانتی متر) قزل آلا رنگین کمان جوان در دو تراکم نگهداری متوسط و بالا

سیستم باز	وزن نهایی	طول کل نهایی	طول چنگالی نهایی	طول استاندارد نهایی
تراکم متوسط	$10.51 \pm 677/44^a$	$0.22 \pm 38/26^a$	$0.24 \pm 37/81^a$	$0.24 \pm 35/31^a$
تراکم بالا	$7.61 \pm 635/15^b$	$0.25 \pm 38/41^a$	$0.27 \pm 37/21^a$	$0.21 \pm 35/62^a$

دادهای ارائه شده خطای استاندارد $\pm$ میانگین می باشد. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بین دو تیمار در روز نمونه برداری می باشد ($p < 0.05$).

جدول ۳: طول نسبی باله های سینه ای، شکمی، مخرجی، پشتی و دم قزل آلا رنگین کمان جوان در دو تراکم نگهداری متوسط و بالا

سیستم باز	باله سینه ای	باله شکمی	باله مخرجی	باله پشتی	باله دم
تراکم متوسط	$9/46 \pm 0/29$	$8/83 \pm 0/29$	$9/49 \pm 0/38$	$7/42 \pm 0/48$	$7/72 \pm 0/13$
تراکم بالا	$9/61 \pm 0/18$	$8/61 \pm 0/29$	$9/27 \pm 0/36$	$7/17 \pm 0/41$	$7/51 \pm 0/28$

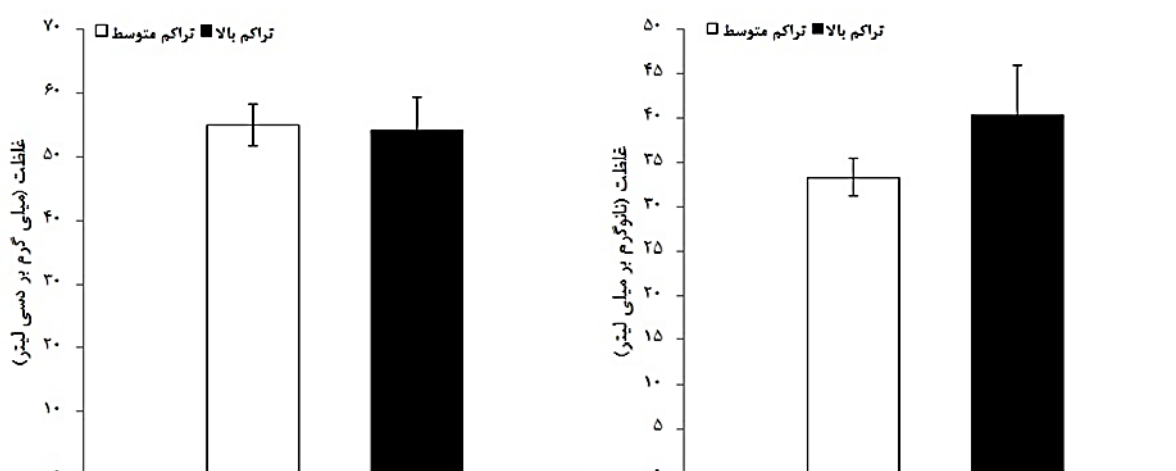
دادهای ارائه شده خطای استاندارد $\pm$ میانگین می باشد.

جدول ۴: میزان افزایش وزن (%، افزایش وزن روزانه (گرم)، نرخ رشد ویژه (%، ضریب رشد حرارتی (%، ضریب چاقی فولتون (%، ضریب

تغییرات وزنی (گرم) و ضریب تبدیل غذایی قزل آلا رنگین کمان جوان در دو تراکم نگهداری متوسط و بالا

سیستم باز	افزایش وزن (%)	افزایش وزن روزانه (گرم)	نرخ رشد ویژه (%)	ضریب رشد حرارتی (%)	ضریب چاقی فولتون (%)	ضریب تغییرات وزنی (گرم)	ضریب تبدیل غذایی
تراکم متوسط	$3/88 \pm 74/65^a$	$0.21 \pm 4/69^a$	0.3 ± 0.187^a	$0.48 \pm 11/18^a$	$0.01 \pm 1/24^a$	0.22 ± 14^b	$1/0.3^b$
تراکم بالا	$2/69 \pm 60/69^b$	$0.14 \pm 2/9^b$	0.3 ± 0.176^b	$0.38 \pm 9/61^b$	$0.02 \pm 1/23^a$	0.19 ± 16^a	$1/1.5^a$

دادهای ارائه شده خطای استاندارد $\pm$ میانگین می باشد. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بین دو تیمار در روز نمونه برداری می باشد ($p < 0.05$).

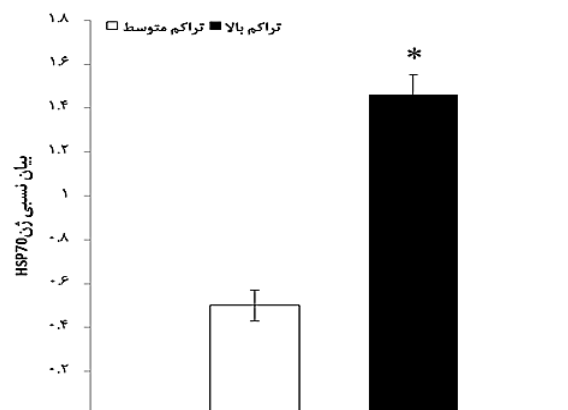


شکل ۱: تغییرات مقادیر گلوکز (الف) و کورتیزول (ب) پلازما (خطای استاندارد $\pm$ میانگین، $n=5-6$ در قزل آلا رنگین کمان *O. mykiss*) جوان در دو تراکم نگهداری متوسط و بالا



بیشتر مطالعات پیشین بر سنین انگشت قدی و نوجوانی، ماهی جوان انتخاب گردید. افزایش تراکم نگهداری به میزان ۸۴٪ در این مطالعه، موجب کاهش ۶/۲٪ متوسط وزن کل ماهیان طی دوره ۶۰ روزه شد ولی تغییر معنی داری در طول های مورد اندازه گیری مشاهده نگردید. به طور کلی، کاهش رشد به عنوان شاخص مناسبی برای استرس مزمن در نظر گرفته می شود (Valenzuela و همکاران، ۲۰۱۷). افزایش تراکم نگهداری در قزل آلا، موجب کاهش رشد می شود (Ellis و همکاران، ۲۰۰۲؛ Suárez و همکاران، ۲۰۱۵). Naderi و همکاران (۲۰۱۷ الف) با آزمایش ۶۰ روزه دو تراکم ۲۰ و ۸۰ کیلوگرم بر مترمکعب در قزل آلا رنگین کمان، کاهش معنی دار وزن نهایی، درصد افزایش وزن، نرخ رشد ویژه، مقدار خوراک گیری و ضریب تبدیل غذایی را در تیمار ۲۰ نسبت به تراکم ۸۰ نشان دادند. این کاهش رشد در تراکم های بالا پرورشی، غالباً مرتبط با کاهش مصرف غذا دانسته می شود (Boujard و همکاران، ۲۰۰۲). در این مطالعه، با توجه به انجام غذادهی متناسب بازی توده پرورشی و همچنین، خورده شدن کل غذای توزیع شده توسط ماهیان، مقدار غذای مصرفی نمی تواند دلیلی بر کاهش وزن مشاهده شده باشد. هرچند، کاهش اشتها برای دریافت غذای اضافی (بیشتر از مقدار محاسبه شده توسط جدول غذادهی اسکرینینگ) در تیمار تراکم بالا به ویژه در وعده غذایی عصر مشهود بود. کاهش میزان اشتها و سطح سیری در تراکم بالا احتمالاً ریشه عصبی-هورمونی دارد چراکه افزایش فعالیت سراتونرژیک مغزی در قزل آلا طی تجربه تراکم بالا نشان داده شده است (Laursen و همکاران، ۲۰۱۳). بنابراین، افزایش نیازهای متابولیکی به جهت تغییر در متابولیسم ماهی طی استرس مزمن تراکم نگهداری و اختلالات تغذیه ای هم چون کاهش راندمان غذایی (با توجه به افزایش ضریب تبدیل غذایی در تراکم بالا در این مطالعه) می تواند دلیلی بر کاهش وزن گیری ماهیان طی دوره ۶۰ روزه باشد. مقابله با شرایط استرسی در کل، نیاز ماهی به انرژی را می افزاید که برای رشد غیرقابل جبران است (Wendelaar Bonga، ۱۹۹۷).

تراکم نگهداری بر خوردگی باله در قزل آلا رنگین کمان اثر دارد (Ellis و همکاران، ۲۰۰۲؛ North و همکاران، ۲۰۰۶) که می تواند ناشی از ساییدگی، رفتار تهاجمی و کاهش کیفیت آب باشد (Ellis و همکاران، ۲۰۰۲؛ North و همکاران، ۲۰۰۶؛ Laursen و همکاران، ۲۰۱۳). باله های قزل آلاهای تیمار تراکمی ۴۰ و ۸۰ کیلوگرم بر مترمکعب، کوتاه تر از تیمار ۱۰ کیلوگرم بر مترمکعب بود (North و همکاران، ۲۰۰۶). در مقابل، عدم وجود تغییر معنی دار در مطالعه حاضر هم خوان با نتایج Laursen و همکاران (۲۰۱۳) است که خوردگی در هیچ کدام از باله ها (به جز باله دمی و باله شکمی سمت چپ) را با افزایش تراکم تا ۱۴۰ کیلوگرم بر مترمکعب مشاهده نمودند. با توجه به تراکم بارگذاری



شکل ۲: بیان نسبی آم آر ان ای ژن HSP70 عضله سفید (خطای استاندارد $\pm$ میانگین، $n=5-6$) در قزل آلا رنگین کمان (*O. mykiss*) جوان در دو تراکم نگهداری متوسط و بالا (علامت * نشان دهنده اختلاف معنی دار بین دو تیمار در روز نمونه برداری می باشد ($p < 0.05$))

بحث

طی این مطالعه، افزایش تراکم نگهداری در سنین پروراری در قزل آلا رنگین کمان جوان، کاهش متوسط وزن را بدون تغییر طول ماهیان و تغییر طول نسبی باله ها موجب شد که کاهش برخی از پارامترهای محاسبه شده مرتبط با رشد نیز در این راستا می باشد. همچنین افزایش تراکم نگهداری، اثری بر مقادیر فاکتورهای بیوشیمیایی مرتبط با استرس نداشت. اما افزایش تراکم نگهداری باعث افزایش مقادیر آم آر ان ای ژن مرتبط با استرس HSP70 در عضله ماهیچه گردید. اگرچه یکی از استراتژی های مفید در جهت افزایش تولید ماهی به ازای واحد حجم فضای پرورشی، افزایش تراکم نگهداری می باشد ولی اثرات افزایش تراکم به خوبی درک نشده است. در بیش تر مواقع، در گونه های تراکم پذیری هم چون قزل آلا رنگین کمان، تغییرات مشاهده شده حین افزایش تراکم، به تغییر عوامل کیفی آب نسبت داده می شود (Ellis و همکاران، ۲۰۰۲). در بسیاری از گونه های ماهیان، کاهش کیفیت آب، منجر به کاهش در مصرف غذا، رشد و نقص عملکردهای فیزیولوژیک می شود (Person-Le Ruyet و همکاران، ۲۰۰۸). به همین منظور، در این مطالعه سعی شد با رعایت تراکم بارگذاری یکسان بین دو تیمار و استفاده از استخرهای هشت ضلعی با قابلیت خودپالایی بالا، این مورد به حداقل رسانده شود و شرایط پرورشی بهینه ای حین آزمایش تراکم فراهم گردد. همچنین، با توجه به این که طی دوره پرورشی غالباً تراکم نگهداری بالا در اواخر دوران پرورشی و در سنین جوانی یا آغاز بلوغ مشاهده می شود و از طرفی، با توجه به تفاوت های ذاتی در پاسخ به استرس تراکم با تغییر سن (Bagley و همکاران، ۱۹۹۴) و تمرکز

مقادیر گلوکز و کورتیزول پلاسما تغییر معنی داری را بین دو تراکم مورد آزمون نشان نمی دهد ولی افزایش بیان ژن HSP۷۰، ایجاد شرایط استرس مزمن را تایید می کند که با توجه به تغییرات مشاهده شده حین افزایش تراکم در عملکرد رشد قابل تایید است. در مدیریت تولید ماهی در استخرها، ایجاد راهکارهایی برای افزایش توان خوراک گیری، بهبود راندمان غذایی و تقویت سیستم ایمنی برای مقابله با استرس مزمن در زمان تجربه تراکم های نگهداری بالا به جهت نیل به شرایط بهینه تولیدی ضروری می نماید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از جناب آقایان دکتر بهزاد محمدی و مهندس شاه ولی (آزمایشگاه دامپزشکی ثامن)، دکتر محسن نواری، دکتر یاسر سلحشورو محسن زاده (دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه)، مهندس محمدرضا مهدیزاده و مهندس خسرو شیرقاضی (شیلات خراسان رضوی) و مهندس محمدرضا عباسپور (جهاد کشاورزی تربت حیدریه) به جهت مساعدت هایی که جهت انجام این تحقیق نمودند، ابراز می دارند. همچنین از آقایان عرفان زاهدی و امیرعباس هادوی و پرسنل زحمتکش مزارع صدف ۱ و ۲ آقایان رضاییان، فرزانه، پرهیزگار و قلی زاده برای کمک های بی دریغشان صمیمانه تشکر می گردد.

منابع

1. Aksakal, E.; Ekinci, D.; Erdogan, O.; Beydemir, S.; Alim, Z. and Ceyhan, S.B., 2011. Increasing stocking density causes inhibition of metabolic-antioxidant enzymes and elevates mRNA levels of heat shock protein 70 in rainbow trout. *Livestock. Sci.* Vol. 141, pp: 69-70.
2. Bagley, M.J.; Bentley, B. and Gall, G.A., 1994. A genetic evaluation of the influence of stocking density on the early growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, Vol. 121, No. 4, pp: 313-326.
3. Basu, N.; Todgham, A.E.; Ackerman, P.A.; Bibeau, M.R.; Nakano, K.; Schulte, P.M. and Iwama, G.K., 2002. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene*. Vol. 295, No. 2, pp: 173-183.
4. Boujard, T.; Labbe, L. and Auperin, B., 2002. Feeding behavior, energy expenditure and growth of rainbow trout in relation to stocking density and food accessibility. *Aquaculture Res.* Vol. 33, No. 15, pp: 1233-1242.
5. Conte, F.S., 2004. Stress and the welfare of cultured fish. *Appl. Anim. Behav. Sci.* Vol. 86, pp: 205-223.
6. Ellis, T., North, B.; Scott, A.P.; Bromage, N.R.; Porter, M. and Gadd, D., 2002. The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *J. Fish. Biol.* Vol. 61, No. 3, pp: 493-531.
7. Gornati, R.; Papis, E.; Rimoldi, S.; Terova, G.; Saroglia, M. and Bernardini, G., 2004. Rearing density influences the

یکسان در این مطالعه، کیفیت بالای آب کارگاه و عدم به کارگیری تراکم های خیلی بالا و همچنین، شرایط هیدرولیکی مناسب استخرهای هشت ضلعی می تواند دلیل عدم مشاهده خوردگی باله با افزایش تراکم تا حد ۴۴ کیلوگرم بر مترمکعب باشد.

گلوکز و کورتیزول خون به عنوان شاخص پاسخ استرسی، تغییر معنی داری را حین افزایش ۶۰ روزه تراکم نگهداری نشان ندادند. تغییرات گلوکز و کورتیزول غالباً طی ساعات و روزهای نخست پاسخ استرسی مشاهده می شود (Zahedi و همکاران، ۲۰۱۳، ۲۰۱۴) که غالباً با گذشت زمان به جهت مکانیزم های هموستازی و تطابق محور هیپوتالاموس-هیپوفیز - غده بین کلیوی به سطوح اولیه بر می گردد (Naderi و همکاران، ۲۰۱۷ ب). به همین جهت، کورتیزول نشانگر زیستی مناسبی برای مطالعه پاسخ استرسی طولانی مدت هم چون مواجهه با تراکم نگهداری بالا نمی باشد (Kebus و همکاران، ۱۹۹۲؛ Ellis و همکاران، ۲۰۰۲؛ Trenzado و همکاران، ۲۰۰۷؛ Naderi و همکاران، ۲۰۱۷ الف و ب).

افزایش تراکم نگهداری، افزایش معنی دار مقادیر آم آر ای HSP۷۰ ماهیچه را پس از گذشت ۶۰ روز در تیمار تراکم بالا نسبت به تراکم متوسط موجب شد. اثر تراکم نگهداری بر القاء بیان HSP۷۰ در سطح آم آر ای و پروتئین به اثبات رسیده است (Gornati و همکاران، ۲۰۰۴؛ Küçükbay و همکاران، ۲۰۰۹؛ Naderi و همکاران، ۲۰۱۷ الف). HSP۷۰ در عملکردهای متفاوتی هم چون تعمیر و حفاظت از پروتئین های عضلانی و هدایت پروتئین های ناقص به مسیر انهدام در شرایط استرسی نقش دارد (Basu و همکاران، ۲۰۰۲). مقادیر بیان آم آر ای ژن HSP۷۰ به طور معنی داری با افزایش تراکم ماهی به ۲۵ و ۳۰ کیلوگرم بر متر مربع افزایش می یابد و این افزایش، مرتبط با استرس حاصله در اثر تراکم دانسته شد (Aksakal و همکاران، ۲۰۱۱). بیان ژن HSP۷۰ در بین سه تراکم ۸۰، ۱۰ و ۱۰۰ کیلوگرم بر مترمکعب در باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*)، افزایش معنی داری را فقط در بالاترین تراکم از خود نشان داد (Gornati و همکاران، ۲۰۰۴). نتایج این مطالعه نشان می دهد که نشانگر مولکولی انتخاب شده، حتی با گذشت ۶۰ روز نسبت به تیمار با تراکم پایین تر، افزایش دارد که نشان دهنده حفظ مسیر سیگنالدهی HSP۷۰ است. همچنین، نقش HSP۷۰ در پاسخ ایمنی با توجه به ایجاد استرس در ماهی، نباید از نظر دور داشته شود (Yarahmadi و همکاران، ۲۰۱۶).

به طور خلاصه، تراکم نگهداری ۴۴ کیلوگرم بر مترمکعب، نسبت به تیمار ۲۴ کیلوگرم بر متر مکعب، کاهش اندک عملکرد رشد ماهیان را با گذشت زمان ایجاد می کند که احتمالاً ناشی از اختلالات تغذیه ای و افزایش نیازهای انرژی حین افزایش تراکم می باشد. همچنین، اگرچه



- (*Sparus aurata*) during Prolonged Crowding Stress: Differential Regulation of Adrenocorticotropin Hormone and α -Melanocyte-Stimulating Hormone Release by Corticotropin Releasing Hormone and Thyrotropin Releasing Hormone. Gen. Comp. Endocrinol. Vol. 119, pp: 152-163.
۲۲. Suárez, M.D.; Trenzado, C.E.; García-Gallego, M.; Furné, M.; García-Mesa, S.; Domezain, A.; Alba, I. and Sanz, A., 2015. Interaction of dietary energy levels and culture density on growth performance and metabolic and oxidative status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquac. Eng. Vol. 67, pp: 59-66.
 ۲۳. Tort, L.; Sunyer, J.O.; Gomez, E. and Molinero, A., 1996. Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. Vet. Immunol. Immunopathol. Vol. 51, pp: 179-188.
 ۲۴. Trenzado, C.E.; de la Higuera, M. and Morales, A.E., 2007. Influence of dietary vitamins E and C and HUFA on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) performance under crowding conditions. Aquaculture. Vol. 263, No. 1, pp: 249-258.
 ۲۵. Valenzuela, C.A.; Zuloaga, R.; Mercado, L.; Einarssdottir, I.E.; Bjornsson, B.T.; Valdes, J.A. and Molina, A., 2017. Chronic stress inhibits growth and induces proteolytic mechanisms through two different non-overlapping pathways in the skeletal muscle of a teleost fish. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. Integr. Comp. Physiol. pp: ajpregu 00009.
 ۲۶. Vijayan, M.M. and Leatherland, J.F., 1988. Effect of stocking density on the growth and stress response in brook charr, *Salvelinus fontinalis*. Aquaculture. Vol. 75, pp: 159- 170.
 ۲۷. Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. Physiol. Rev. Vol. 77, pp: 591-625.
 ۲۸. Yarahmadi, P.; Miandare, H.K.; Fayaz, S. and Caipang, C.M.A., 2016. Increased stocking density causes changes in expression of selected stress-and immune-related genes, humoral innate immune parameters and stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology. Vol. 48, pp: 43-53.
 ۲۹. Zahedi, S.; Mirvaghefi, A.; Rafati, M. and Mehrpoosh, M., 2013. Cadmium accumulation and biochemical parameters in juvenile Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, upon sublethal cadmium exposure. Comp. Clin. Pathol. Vol. 22, No. 5, pp: 805-813.
 ۳۰. Zahedi, S.; Mirvaghefi, A.; Rafati, M.; Rafiee, G.; Mojazi Amiri, B.; Hedayati, M.; Makhdooni, C. and Zarei Dangesaraki, M., 2014. The effect of sub-lethal exposure to copper and the time course of recovery in clean water on biochemical changes in juvenile fish (*Acipenser persicus*). Mar. Freshwat. Behav. Physiol. Vol. 47, No. 4, pp: 253-264.
 - expression of stress-related genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). Gene. Vol. 34, pp: 111- 118.
 ۸. Holm, J.C.; Refstie, T. and Bø, S., 1990. The effect of fish density and feeding regimes on individual growth rate and mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. Vol. 89, No. 3-4, pp: 225-232.
 ۹. Kebus, M.J.; Collins, M.T.; Brownfield, M.S.; Amundson, C.H.; Kayes, T.B. and Malison, J.A., 1992. Effects of rearing density on the stress response and growth of rainbow trout. J. Aquat. Anim. Health. Vol. 4, No. 1, pp: 1-6.
 ۱۰. Küçükbay F.Z.; Yazlak, H.; Karaca, I.; Sahin, N.; Tuzcu, M.; Cakmak, M.N. and Sahin, K., 2009. The effects of dietary organic or inorganic selenium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under crowding conditions. Aquaculture Nutr. Vol. 15, No. 6, pp: 569-576.
 ۱۱. Laursen, D.C.; Silva, P.I.; Larsen, B.K. and Höglund, E., 2013. High oxygen consumption rates and scale loss indicate elevated aggressive behaviour at low rearing density, while elevated brain serotonergic activity suggests chronic stress at high rearing densities in farmed rainbow trout. Physiol. Behav. Vol. 122, pp: 147-154.
 ۱۲. Liu, B.; Liu, Y. and Sun, G., 2017. Effects of stocking density on growth performance and welfare-related physiological parameters of Atlantic salmon *Salmo salar* L. in recirculating aquaculture system. Aquaculture Res. Vol. 48, No. 5, pp: 2133-2144.
 ۱۳. Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. Methods. Vol. 25, No. 4, pp: 402-408.
 ۱۴. Montserrat, N.; Gabillard, J.C.; Capilla, E.; Navarro, M.I. and Gutiérrez, J., 2007. Role of insulin, insulin-like growth factors, and muscle regulatory factors in the compensatory growth of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). Gen. Comp. Endocrinol. Vol. 150, No. 3, pp: 462-474.
 ۱۵. Naderi, M.; Keyvanshokoo, S.; Salati, A.P. and Ghaedi, A., 2017a. Effects of chronic high stocking density on liver proteome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish. Physiol. Biochem. pp: 1-13.
 ۱۶. Naderi, M.; Keyvanshokoo, S.; Salati, A.P. and Ghaedi, A., 2017b. Effects of dietary vitamin E and selenium nanoparticles supplementation on acute stress responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) previously subjected to chronic stress. Aquaculture. Vol. 473, pp: 215-224.
 ۱۷. North, B.P.; Turnbull, J.F.; Ellis, T.; Porter, M.J.; Migaud, H.; Bron, J. and Bromage, N.R., 2006. The impact of stocking density on the welfare of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. Vol. 255, No. 1, pp: 466-479.
 ۱۸. Papoutsoglou, S.E.; Tziha, G.; Vrettos, X. and Athanasiou, A., 1998. Effects of stocking density on behaviour and growth rate of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles reared in a closed circulated system. Aquac. Eng. Vol. 18, pp: 135- 144.
 ۱۹. Person-Le Ruyet, J.; Labbé, L.; Le Bayon, N.; Severe, A.; Roux, A.; Delliou, H. and Quémène, L., 2008. Combined effects of water quality and stocking density on welfare and growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Living. Resour. Vol. 21, pp: 185-190.
 ۲۰. Pickering, A.D. and Pottinger, T.G., 1987. Poor water quality suppresses the cortisol response of salmonid fish to handling and confinement. J. Fish. Biol. Vol. 30, pp: 41-50.
 ۲۱. Rotllant, J.; Balm, P.H. M.; Ruane, N.M.; Perez-Sanchez, J. and Wendelaar-Bonga, S.E., 2000. Pituitary Proopiomelanocortin-Derived Peptides and Hypothalamic Pituitary-Interrenal Axis Activity in Gilthead Sea Bream

