# اثر به‌کارگیری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی (*Lactobasillus casei*) در جیره غذایی بر بیان ژن ویتلوژنین (Vtg) در ماهی گورخری (*Danio rerio*)


- **اکرم سدنی**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- **رقیه صفری***: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- **محمدرضا ایمانپور**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- **علی جافر**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران


تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۷

## چکیده

**این مطالعه با هدف بررسی تأثیرسطوح مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی (*Lactobasillus casei*) درجیره غذایی بربیان ژن ویتلوژنین (vtg) در ماهی گورخری (*Danio rerio*) انجام شد. تعداد ٦٠٠ قطعه بچه‌ماهی‌گورخری با میانگین وزنی ۰/۰۱±۰/۱۵ گرم در ٤ تیمار و ۳ تکرار با جیره غذایی پایه همراه با سه سطح پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی (CFU/gr $۱۰^{۵}$، $۱۰^{٦}$ و $۱۰^{۷}$) به‌مدت ٦ هفته تغذیه شدند. بعد از این دوره و مشخص شدن جنسیت، جنس نر از آزمایش خارج و جنس ماده به‌مدت ۱ ماه به‌وسیله همان جیره‌های پروبیوتیک تغذیه شدند. در انتهای دوره جهت مطالعات ژنتیکی از کبدماهیان نمونه‌برداری و استخراج RNA انجام شد. برای سنتزcDNA ازکیت Superscript RTase استفاده شد و cDNA حاصله با استفاده از پرایمرهای ژن مذکور و ژن بتا اکتین به‌عنوان ژن رفرنس در Real Time PCR استفاده شد. ارزیابی بیان ژن افزایش بیان را در تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد. میزان بیان ژن ویتلوژنین درگروه تغذیه شده با CFU/gr $۱۰^{۷}$ و $۱۰^{٦}$، افزایش معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) با تیمار پروبیوتیکی CFU/gr $۱۰^{۵}$ نشان داد. نتایج مطالعه حاضرنشان می‌دهد که استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌تواند به‌عنوان یک راهبرد جدید در بهبود عملکرد تولیدمثلی مورد توجه قرار گیرد.**

**کلمات کلیدی:** زرده‌سازی، پروبیوتیک، ماهی گورخری، بیان ژن



* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: fisheriessafari@yahoo.com

## مقدمه

صنعت تکثیر و پرورش ماهیان زینتی مفرح و سودآور بوده و تجارت جهانی آن با میانگین سود سالانه حدود ۱۴ درصد در حال افزایش بوده (Barney و همکاران، ۲۰۰۸) و به‌صورت یک زیر بخش مستقل، حجم بالایی را در تجارت به‌خود اختصاص خواهد داد (ناجی و همکاران، ۱۳۹۰). سالیانه حدود ۴۰۰۰ گونه ماهی آب شیرین و ۱۴۰۰ گونه ماهی آب‌شور در سطح بین‌المللی تجارت می‌شود (Zhou و همکاران، ۲۰۰۹). در ایران نیز در دو دهه اخیر تولید و واردات این ماهیان به‌شدت رشد یافته و سهم قابل‌توجهی از اشتغال را به‌خود اختصاص داده است. با توجه به این‌که توسعه آبزی‌پروری در جهان امروز در اقتصاد کشورهای مختلف نقش بسیار مهمی دارد، انجام تحقیقات کاربردی درزمینه‌های مختلف تکثیر و پرورش ماهیان زینتی ازجمله بهبود رشد، افزایش مقاومت، پاسخ ایمنی و نیز بهبود وضعیت تکثیر امری ضروری می‌باشد (Hoseinifar و همکاران، ۲۰۱۵). ماهیان آکواریومی همواره در معرض استرس‌های بیولوژیک مانند بیماری‌زای باکتریایی، قارچی، انگلی و هم‌چنین انواع استرس‌های غیربیولوژیک هم‌چون تنش‌های دمایی، افزایش غلظت متابولیت‌هایی نظیر آمونیاک قرار دارند (پورداوود و همکاران، ۱۳۸۹). تغییرات هورمونی ناشی از استرس‌ها و هم‌چنین اختلالات تغذیه‌ای منتج از عدم رعایت اصول غذادهی و عدم استفاده از جیره‌های مغذی و اختصاصی هرگونه در آکواریوم باعث تضعیف سیستم ایمنی ماهیان می‌شود (Hoseinifar و همکاران، ۲۰۱۵). در کنار شرایط فیزیکوشیمیایی، موفقیت در تکثیر بستگی به دسترسی به غذای مناسب جهت تغذیه مولدین دارد تا سلامتی و رشد را هم برای مولدین و هم برای نوزادان آن فراهم آورد (Giri و همکاران، ۲۰۰۲؛ Carnevali و همکاران، ۲۰۱۶). بنابراین استفاده از مکمل‌های غذایی مناسب (پروبیوتیک‌ها، پربیوتیک‌ها، گیاهان و مواد مغذی) که بتوانند کیفیت باروری و سلامت مولدین و کیفیت سلول‌های جنسی را افزایش داده و پارامترهای رشد و بقاء را در لارو و بچه‌ماهیان بهبود دهند می‌تواند از استراتژی‌های مناسب در مدیریت کارگاه‌های ماهیان زینتی باشد. در ماهیان توسعه گناد ماده به دو فاز رشد و رسیدگی تقسیم می‌شود. در فاز رشد ویتلوژنین تحت کنترل هورمون ۱۷ بتا استرادیول در سلول‌های کبدی تولید و توسط سیستم جریان خون به تخمک‌ها انتقال پیدا کرده و در توسعه و رسیدگی آن نقش پیدا می‌کنند (Anderson و همکاران، ۱۹۹۶). در لایه تکا کلسترول تحت فعل و انفعالات آنزیمی به تستسترون تبدیل شده و در ادامه تستوسترون در لایه گرانولوزا به‌منظور تولید هورمون استروئیدی همانند استرادیول آروما تازه می‌شود. (Nayak، ۲۰۱۰؛ Abasali و Mohamad، ۲۰۱۰؛ Barney و همکاران، ۲۰۰۸؛ Degani، ۱۹۹۳). در زمینه استفاده از پروبیوتیک‌ها در زمینه تولیدمثل آبزیان مطالعات اندک و محدود به استفاده از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس راموناس در ماهی گورخری(Carnevali و همکاران، ۲۰۱۳)، پریمالاک در ماهی پلاتی(Imanpoor و Roohi، ۲۰۱۶)، وی‌بکت در ماهی مولی سیاه (Giorgini و همکاران، ۲۰۱۰)، لاکتوباسیلوس راموناس در مار ماهی اروپایی (Vílchez و همکاران، ۲۰۱۵)، لاکتوباسیلوس راموناس در ماهی گورخری (Gioacchini و همکاران، ۲۰۱۰؛ ۲۰۱۱؛ ۲۰۱۲؛ ۲۰۱۵)، باسیلوس سابتیلوس در ماهیان زنده‌زا (Ghosh و همکاران، ۲۰۰۷)، لاکتوباسیلوس راموناس و کازئی در ماهی گورخری (Chen و همکاران،۲۰۱۴)،لاکتوباسیلوس‌راموناس‌درماهی گورخری (Giorgini و همکاران، ۲۰۱۰)، لاکتوباسیلوس راموناس در ماهی کیلی فیش (Lombardo و همکاران، ۲۰۱۱)، اسیدلاکتیکی در ماهی گورخری (Washburn و همکاران، ۲۰۱۵) و لاکتوباسیلوس راموناس و اسید لاکتیکی در ماهی قرمز (احمدنیای‌مطلق و همکاران، ۱۳۹۵) می‌باشد که هر کدام بخشی از فرایند تولیدمثل را در سطح مولکولی و بیان برخی ژن‌های مرتبط یا نتاج حاصله بررسی نموده‌اند. اما تاکنون در زمینه‌به‌کارگیری‌پروبیوتیک‌لاکتوباسیلوس‌کازئی بربیان ژن ویتلوژنین مطالعه‌ای انجام نشده است. بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی ژن مذکور در جنس ماده ماهی زبرا صورت پذیرفت.

## مواد و روش‌ها

**تهیه ماهی:** جهت انجام آزمایش، تعداد ۶۰۰ قطعه ماهی زبرا گورخری حدود ۲۰ روزه با میانگین وزنی۰/۰۱±۰/۱۵ گرم از کارگاه تکثیر و پرورش ماهی زینتی گرگان ماهی در استان گلستان تهیه و به سالن آبزی‌پروری شهید ناصرفضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انتقال یافتند. لارو ماهیان گورخری ۲۰ روز پس از هچ به‌مدت ۱/۵ ماه با افزودن پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی درجیره‌غذایی در ۴ تیمار آزمایشی،سه سطح پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی (CFU/gr $۱\times۱۰^{۵}$ ،$۱\times۱۰^{۶}$ و $۱\times۱۰^{۷}$) و یک گروه شاهد (با ۳ تکرار) (Vílchez و همکاران، ۲۰۱۵) تغذیه شدند. بعد از این دوره و مشخص شدن جنسیت، جنس نر از آزمایش خارج و جنس ماده به مدت ۱ ماه به‌وسیله همان جیره‌های پروبیوتیک تغذیه شدند.

**نمونه‌برداری:** در پایان دوره از بافت کبد به‌منظور بررسی ژن ویتلوژنین در شرایط استریل نمونه برداشته شد. ماهیان قبل از نمونه‌برداری توسط پودر گل میخک با دز ppm ۲۰۰ بی‌هوش شدند. کبد جمع‌آوری و به‌داخل تیوپ‌های انتقال داده شد و بلافاصله تیوپ‌ها به مخزن ازت منتقل و در پایان نمونه‌برداری، نمونه‌ها در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و تا زمان استفاده

جهت استخراج RNA در آن‌جا نگه‌داری شدند.

**استخراج و ارزیابی کمی RNA:** RNA کل از ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه بافت کبد هموژن شده با ازت مایع با استفاده از بیوزول و طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Biozol-Bioflux- Bioer) استخراج شد. کمیت و کیفیت RNA استخراجی با استفاده از اسپکتروفتومتر و ژل آگاروز بررسی شد.

**سنتز cDNA:** سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (Superscript RTase) و طبق دستورالعمل آن انجام شد. ۵ میکرولیتر از RNA که قبلاً آماده‌شده به‌همراه ۱ میکرولیتر آغازگر الیگوبه تیوپ‌های جدید اضافه شد و با آب عاری از نوکلئاز به حجم ۱۰ میکرولیتر رسید. سپس بر روی بلوک حرارتی در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه انکوبه گردید و سپس به‌روی یخ انتقال داده شد و ۱۰ میکرولیتر مستر حاوی آنزیم ریورس‌ترانسکریپتاز به آن اضافه شد. در نهایت با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ دقیقه و ۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد و سپس محلول حاوی cDNA به حجم ۲۰ میکرولیتر به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

**واکنش Real_time PCR:** واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز کمی با استفاده از کیت سایبر شرکت بیوپارس (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی) در دستگاه iQ5 شرکت (BIO-RAD, USA) در ۴ تکرار تکنیکی در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از ۱۰ میکرولیتر بافر سایبر گرین، ۱ میکرولیتر آغازگر پیش‌رو ژن هدف و رفرنس (۱۰ پیکومول)، ۱ میکرولیتر آغازگر پس‌رو ژن هدف و رفرنس (۱۰ پیکومول)، ۲/۸ میکرولیتر آب مقطر، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تگ پلیمراز (۵U) و ۵ میکرولیتر cDNA رقیق‌شده (۲ نانوگرم در میکرولیتر) در دمای اتصال ۵۸ درجه سانتی‌گراد انجام شد (جدول ۱).

**جدول۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه**

| نام پرایمر | توالی (′۳-′۵) | دمای اتصال (°C) |
|---|---|---|
| Vtg1 q-PCRF | GCCAAAAAGCTGGGTAAACA | ۵۸ |
| Vtg1 q-PCRR | AGTTCCGTCTGGATTGATGG | |
| β- actin q-PCRF | AGCAGATGTGGATCAGCAAG | ۵۸ |
| β- actin q-PCRR | TACCTCCCTTTGCCAGTTTC | |

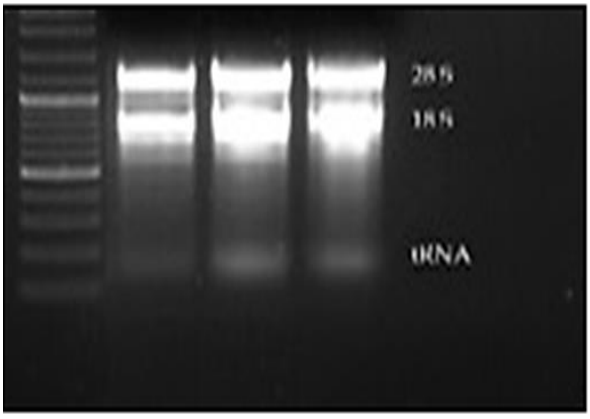
**تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها:** داده‌های مربوط به بیان نسبی ژن با استفاده از فرمول ΔΔCt (ΔΔct برابر است با ΔCt ژن هدف منهای ΔCt کالیبراتور) آنالیز و سپس نرمال بودن دادها با استفاده از آزمون کولوموگروف اسمیرنوف تست شد. سپس توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح اطمینان ۹۵ درصد تست شدند. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار نمایش داده شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۰ ترسیم شد.

## نتایج

**نتایج ارزیابی کیفی و کمی RNA:** از لحاظ کمی و کیفی RNA استخراج شده مورد ارزیابی قرار گرفت اعداد به‌دست آمده از سنجش RNA در محدوده ۱/۷ تا ۲/۲ قرار داشتند که بیان‌کننده غلظت مناسب RNA جهت سنتز cDNA است (جدول۲). در بررسی کیفی RNAها با استفاده از ژل الکتروفورز وجود ۲ باند مشخص ۱۸S و ۲۸S نشان‌دهنده کیفیت مناسب RNA است (شکل ۱).

**جدول۲: کمیت RNA استخراج شده از کبد ماهی گورخری**

| نمونه | ۲۶۰ | ۲۸۰ | ۲۶۰/۲۸۰ |
|---|---|---|---|
| کبد تیمار ۱ | ۱/۸۵ | ۰/۰۹ | ۱/۹ |
| کبد تیمار ۱ | ۱/۳ | ۰/۷ | ۱/۸۵ |
| کبد تیمار ۲ | ۱/۲۴ | ۰/۶ | ۲/۱ |
| کبد تیمار ۲ | ۱/۲ | ۰/۷ | ۱/۷ |
| کبد تیمار ۳ | ۱/۶ | ۰/۷ | ۲/۲۵ |
| کبد تیمار ۳ | ۱/۷ | ۱ | ۱/۷ |
| کبد تیمار ۴ | ۲/۱ | ۱/۰۴ | ۱/۹ |

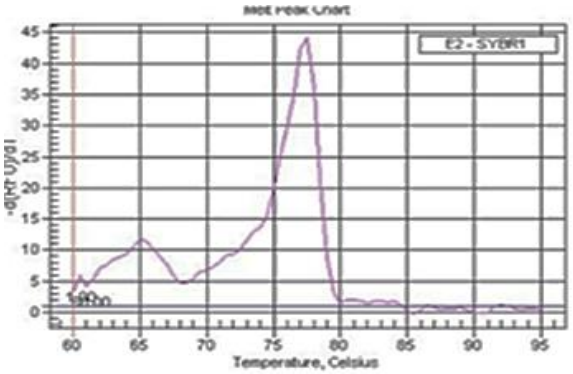



**شکل۱: کیفیت RNA استخراج‌شده از کبد ماهی گورخری روی ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید. در نمونه‌های استخراج شده دو باند متعلق به ۱۸S rRNA و ۲۸ S می‌باشند.**

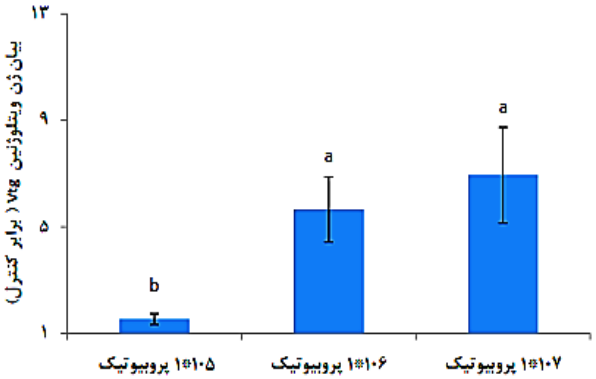
**نتایج بررسی عملکرد اختصاصی آغازگرها از طریق منحنی ذوب:** پیک مشاهده شده در منحنی ذوب آغازگر برای هر محصول، بیانگر وجود یک محصول ویژه و تکثیر اختصاصی است (شکل ۲).

**ارزیابی بیان ژن زرده‌سازی (Vitellogenin):** ارزیابی بیان ژن (Vtg) نیز افزایش بیان این ژن را در گروه تغیه شده با پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی نسبت به گروه شاهد نشان داد. هم‌چنین در

گروه تغذیه‌شده با ($1\times10^{5}$ ،$1\times10^{6}$ و $1\times10^{7}$ CFU/gr) میزان بیان ژن به‌ترتیب ۰/۵۷، ۴/۵ و ۵/۷ برابر گروه شاهد بود که الگوی افزایشی وابسته به دوزی را نشان می‌دهد.اختلاف معنی‌داری در میزان بیان در گروه تغذیه‌شده با $10^{7}$ و $10^{6}$ پروبیوتیک با گروه تغذیه شده با $10^{5}$ مشاهده شد ($P<0/05$) (شکل ۳).




**شکل ۲: منحنی ذوب ترسیم شده از غلظت‌های سریالی برای آغازگر Vtg**




**شکل۳: تغییرات بیان نسبی ژن زرده سازی (Vtg) به بتا اکتین در ماهی گورخری تغذیه‌شده با سطوح مختلف پروبیوتیک**

حروف کوچک اختلاف معنی‌دار ($P<0/05$) بین تیمارها را نشان می‌دهد.

## بحث

مطالعات زیادی در رابطه با تأثیر جیره‌های حاوی مکمل‌های غذایی ازجمله پروبیوتیک‌ها برفعالیت‌های زیستی و فیزیولوژیک آبزیان صورت گرفته است. اما در ارتباط با ماهیان زینتی و به‌ویژه در رابطه با تولیدمثل مطالعات اطلاعات کمی در دسترس است(Zhou وهمکاران، ۲۰۰۹؛ Hoseinifar، ۲۰۱۵ و ۲۰۱۶). گزارش‌شده است که به‌کارگیری هورمون‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها، مکمل‌های گیاهی در جیره غذایی مولدین می‌توانند اثرات زیادی بر جوامع میکروبی و فعالیت آن‌ها در دستگاه گوارش مولدین داشته باشند (Nayak، ۲۰۱۰؛ Washburn و همکاران، ۱۹۹۰). مکانیسم چگونگی تاثیر ترکیبات پروبیوتیکی بر فاکتورهای تولیدمثلی و باروری مولدین به‌دنبال بهبود فلور باکتریایی به‌خوبی مشخص نشده است (Carnevali و همکاران، ۲۰۱۶). به‌نظر می‌رسد تغذیه ماهیان مولد با پروبیوتیک‌ها در جیره می‌توانند سبب بازسازی و تقویت توازن میکروبی روده شده و از طریق افزایش مواد معدنی در دسترس، ویتامین‌ها و تولید آنزیم‌های گوارشی مهم و یا متابولیت‌ها بر تولیدمثل ماهیان مؤثر باشند (Holzapfel و همکاران، ۱۹۹۸). در مطالعه حاضر بیان ژن‌های مرتبط بارشداووسیت ویتلوژنین در تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک در مقایشه با کنترل به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) افزایش یافت. این نکته قبلاً به اثبات رسیده است که تغذیه مولدین در طی مراحل مختلف تأثیرات مختلفی بر کیفیت تخمک تولیدی دارد. تحقیقات نشان داده‌اند که ترکیب غذایی زرده و کیفیت تخمک به شکل معنی‌داری تحت تأثیر جیره غذایی مولدین است. ویتلوژنین، ترکیب فسفولیپو پروتئینی است که تحت تأثیر هورمون ۱۷ بتا استرادیول در کبد ساخته‌شده و از طریق جریان خون به گناد انتقال داده می‌شود (Imanpoor و Roohi، ۲۰۱۶). از طرفی دیگر در مطالعات گذشته مشخص‌شده است که یکی از مکانیسم‌های عمل باکتری‌های پروبیوتیک تحریک فرایند تخمیر در دستگاه گوارش میزبان می‌باشد که در طی این فرایند متابولیت‌هایی ازجمله اسیدهای چرب کوتاه زنجیر در دستگاه گوارش تولیدشده و از طریق جریان خون به کبد منتقل می‌شوند. بنابراین احتمالاً می‌توان بهبود وضعیت تولیدمثلی را به اسیدهای چرب کوتاه زنجیر تولیدی که می‌توانند در زرده‌سازی مورد استفاده قرار گیرند نسبت داد. مشخص شده است که جیره‌های غذایی با ترکیبات مختلف به شکل معنی‌داری پارامترهای تولیدمثلی، باروری و کیفیت تخم و لارو را در مولدین ماده به‌خصوص در مورد ماهیان تخم‌ریزی مداوم با دوره‌های کوتاه تخم‌ریزی که فرایند زرده‌سازی (ویتلوژنین) و رهاسازی تخمک (اوولاسیون) در مدت‌زمان کوتاه‌تری اتفاق می‌افتد نسبت به ماهیانی که در طول سال فقط یک‌بار تخم‌ریزی می‌کنند، می‌توانند تحت تأثیر قرار دهند (Washburn و همکاران، ۱۹۹۰؛ Ghosh و همکاران، ۲۰۰۷). در مطالعات گذشته نیز این نکته به‌اثبات رسیده است که جیره‌های غنی به‌خصوص از نظر میزان پروتئین به شکل مؤثری می‌توانند در ماهیان تخم‌ریزی مداوم فواصل بین دو تخم‌ریزی را کوتاه‌تر کنند(Degani و همکاران، ۱۹۹۳).به‌علاوه بررسی بیان ژن سیتوکروم $P^{19}$($cyp^{19a}$) افزایشی معنی‌داری در گروه پروبیوتیک نشان‌داد که این ژن کدکننده آنزیم دخیل در تبدیل نهایی تستوسترون به استرادیول در تخمدان می‌باشد(Gioacchini و همکاران، ۲۰۱۱). Ghosh و همکاران(۲۰۰۷)بامطالعه اثرات باکتری پروبیوتیکی *Bacillus subtilis* جداشده از روده کپور مریگال (*Cirrhinus mrigala*) برعملکرد تولیدمثلی چهارگونه ازماهیان زینتی زنده‌زا شامل

گوپی، مولی، دم‌شمشیری سبز و پلتی مشاهده نمودند که استفاده از پروبیوتیک سبب بهبود معنی‌دار (P<۰/۰۵) شاخص گنادوسوماتیک و هم‌آوری تخم‌ریزی ماهیان ماده در همه گونه‌های موردنظر شد. هم‌چنین بررسی طول و وزن بچه ماهی‌ها در تمام گونه‌های تغذیه‌شده با پروبیوتیک به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵ ) بیش‌تر از گروه شاهد بود. علاوه بر این تلفات و بدشکلی بچه‌ماهیان در تیمار تغذیه‌شده با پروبیوتیک کاهش یافت. بررسی آماری نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که اثرات مثبت پروبیوتیک وابسته به دوز نبوده و استفاده از مقادیر بیش‌تر، لزوماً منجر به عملکرد تولیدمثلی بهتری در مولدین نمی‌گردد. Abasali و Mohamad (۲۰۱۱) اثرات استفاده از مخلوط پروبیوتیک تجاری پریمالاک، متشکل ازنسبت مساوی باکتری‌های بیفیدوباکتریوم ترموفیلوم، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس کازئی، انتروکوکوس فیسیوم را در جیره ماهی پلتی بررسی و بهبود شاخص گنادوسوماتیک در مولدین ماده‌ها تغذیه‌شده با پروبیوتیک و هم‌چنین طول و میزان بازماندگی بیش‌تری را در لاروها مقایسه با گروه شاهد نشان دادند. هرچند از نظر وزن و میزان بدشکلی تفاوت معنی‌داری بین تیمار پروبیوتیک و شاهد مشاهده نشد (P≥۰/۰۵). هم‌چنین در مطالعه‌اثر سطوح مختلف پروبیوتیک پریمالاک بر روی ماهی دم‌شمشیری (*Xiphophorus helleri*)افزایش معنی‌دار شاخص‌های گنادوسوماتیک، باروری و بقای لارو را مشاهده نمودند(Abasali و Mohamad، ۲۰۱۰). تغذیه ماهی گورخری با جیره حاوی Lb. rhamnosus (به‌میزان $10^6$ CFU در گرم) به‌مدت ۱۰ روز به‌طور معنی‌داری سبب افزایش اوولاسیون تخم‌ها و بالارفتن نرخ تفریخ و سرعت بیش‌تر تکوین جنینی گردید(Gioacchiniو همکاران، ۲۰۱۰). Lombardoو همکاران (۲۰۱۱) اثرات پروبیوتیک Lb. rhamnosus را در سطح $CFU10^6$ به‌ازای گرم در جیره غذایی Killifish بررسی و مشاهده نمودند که تغذیه مولدین Killifish با Lb. rhamnosus به‌مدت ده روز سبب افزایش معنی‌دار هم‌آوری (افزایش دو برابری در مقایسه با گروه شاهد) و مقادیر بالاتر شاخص گنادوسوماتیک (افزایش پانزده درصدی در مقایسه با گروه شاهد) گردید (Lombardo و همکاران، ۲۰۱۱). اگرچه به‌کارگیری Lb. rhamnosus در جیره غذایی مولدین اثر معنی‌داری بر سرعت تکامل جنینی نداشت، میزان بازماندگی جنین به‌طور معنی‌داری در تیمار پروبیوتیک افزایش یافت. هم‌چنین لاروهای به‌دست‌آمده از مولدین تحت تیمار با پروبیوتیک میزان وزن و طول کل بیش‌تری در مقایسه با گروه شاهد داشتند. هم‌چنین نتایج به‌دست آمده از مطالعات صورت پذیرفته در سطح مولکولی در ناحیه تخمدان ماهی‌های تغذیه شده با پروبیوتیک افزایش بیان ژن‌های کدکننده سیگنال‌هایی که فاز رسیدگی را تحریک می‌کنند (مانند ژن‌های Ihr، ۲۰B-hsd، mprB، cyclinB، ActivinBA1، smad2)، را همراه با کاهش بیان ژن‌های کد کننده فاکتورهایی که مانع رسیدگی اووسیت می‌شوند (مانند tgfB1، gdf9 و bmp15) نشان داد. در مطالعه‌ای دیگر که بر روی ماهی گورخری (*Danio rerio*) انجام شد مشخص شد که پروبیوتیک Lactobacillus rhamnosus IMC 501 به‌شکل معنی‌داری میزان شاخص گنادوسوماتیک و باروری این ماهی را افزایش داده بود. نتایج این مطالعه نشان داد که افزایش شاخص گنادوسوماتیک و باروری در ارتباط با افزایش میزان بیان ژن‌های سیتوکروم P19، ویتلوژنین کبدی و هم‌چنین ایزوفورم آلفارسپتورهای استرادیول بوده‌است(Gioacchiniو همکاران، ۲۰۱۱). هم‌چنین همین محققین نشان دادند که در هر دو سطح گوارشی و مغزی استفاده از پروبیوتیک سبب افزایش معنی‌دار بیان ژن لپتین می‌شود که یک هورمون کلیدی در هموستازی انرژی و کارکردهای نوروآندوکراین می‌باشد. این نتایج نشان می‌دهند که پروبیوتیک می‌تواند به‌طور غیرمستقیم از طریق فعال‌سازی یک هورمون متابولیک قوی مانند لپتین عمل کند. غفاری‌فارسانی و همکاران (۱۳۹۵) از پروبیوتیک پریمالاک در جیره مولدین ماهی سورم طلایی استفاده و افزایش معنی‌داری فاکتورهای عملکردی تولیدمثل ازجمله درصد لقاح، هم‌آوری کاری، درصد هچ و بازماندگی لارو در ماهیان تغذیه‌شده با پریمالاک را گزارش نمودند. درمجموع نتایج مطالعات انجام‌شده حاکی از اهمیت پروبیوتیک‌ها در عملکرد تولیدمثلی آبزیان است و استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌تواند به‌عنوان یک راهبرد جدید در بهبود عملکرد تولیدمثلی موردتوجه قرار گیرد.

## منابع


۱. **پورداوود، م.؛ سجادی، م. و بحری، ا.، ۱۳۸۹.** بررسی اثرات جیره‌های غذایی حاوی مخمر ساکارومایسیس سرویزیا بر رشد، زنده‌مانی و مقاومت در برابر استرس‌های محیطی ماهی سوروم (*Heros severus* ). مجله علمی آبزیان و شیلات. دوره ۱، شماره ۱، صفحات ۲۳ تا ۳۱.

۲. **غفاری‌فارسانی، ح.؛ حسینی‌فر، س.ح.؛ قشلاقی، پ. و شهبازی‌ناصرآباد، س.، ۱۳۹۵.** تأثیر جیره‌های غذایی حاوی سطوح مختلف پروبیوتیک پریمالاک بر وضعیت تولیدمثلی مولدین، بقای لارو، عملکرد رشد بچه ماهیان سورم طلایی*Heros severus*. مجله علوم آبزی‌پروری. دوره ۴، شماره ۱، صفحات ۱۲ تا ۲۳.

۳. **ناجی، ز.؛ مهدوی‌شهری، ن.؛ قاسم‌زاده، ف.؛ شاهسونی، د. و بهنام‌رسولی، م.، ۱۳۹۰.** تأثیر علف‌کش آترازین بر فرایند اووژنز در گورخر ماهی *Danio rerio*. مجله سلول و بافت. دوره ۲، شماره ۲، صفحات ۱۴۷ تا ۱۵۵.

۴. **Abasali, H. and Mohamad, S., 2010.** Effect of dietary supplementation with probiotic on reproductive performance

of female livebearing ornamental fish. Research Journal of Animal Sciences. Vol. 4, No. 4, pp: 103-107.

۵. **Abasali, H. and Mohamad, S., 2011.** Effect of Dietary Probiotic Level on the reproductive performance of female platy Xiphophorus maculatus. Agricultural Journal. Vol. 6, No. 3, pp: 119-123.

۶. **Anderson, M.J.; Miller, M.R. and Hinton, D.E., 1996.** In vitro modulation of 17-β-estradiol-induced vitellogenin synthesis: Effects of cytochrome P4501A1 inducing compounds on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells. Aquatic Toxicology. Vol. 34, No. 4, pp: 327-350.

۷. **Barney, M.L.; Patil, J.G.; Gunasekera, R.M. and Carter, C.G., 2008.** Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in the common carp (*Cyprinus carpio*): sexual dimorphism and onset of ontogenic expression. General and comparative endocrinology. Vol. 156, No. 3, pp: 499-508.

۸. **Carnevali, O.; Maradonna, F. and Gioacchini, G., 2017.** Integrated control of fish metabolism, wellbeing and reproduction: The role of probiotic. Aquaculture. Vol. 472, pp: 144-155.

۹. **Chen, X.; Jiang, S.; Gu, Y. and Shi, Z., 2014.** Molecular characterization and expression of cyp19a gene in *Carassius auratus*. Journal of fish biology. Vol. 85, No. 2, pp: 516-522.

۱۰. **Chitra, G. and Krishnaveni, N., 2013.** Effect of probiotics on reproductive performance in female livebearing ornamental fish Poecilia sphenops. International Journal of Pure and Applied Zoology. Vol. 1, No. 3, pp: 249-254.

۱۱. **Degani, G., 1993.** Growth and body composition of juveniles of *Pterophyllum scalare* (*Lichtenstein*) (Pisces; *Cichlidae*) at different densities and diets. Aquaculture research. Vol. 24, No. 6, pp: 725-730.

۱۲. **Ghosh, S.; Sinha, A. and Sahu, C., 2007.** Effect of probiotic on reproductive performance in female livebearing ornamental fish. Aquaculture research. Vol. 38, No. 5, pp: 518-526.

۱۳. **Gioacchini, G.; Dalla Valle, L.; Benato, F.; Fimia, G.M.; Nardacci, R.; Ciccosanti, F. and Carnevali, O., 2013.** Interplay between autophagy and apoptosis in the development of *Danio rerio* follicles and the effects of a probiotic. Reproduction, Fertility and Development. Vol. 25, No. 8, pp: 1115-1125.

۱۴. **Gioacchini, G.; Lombardo, F.; Merrifield, D.; Silvi, S.; Cresci, A.; Avella, M. and Carnevali, O., 2011.** Effects of probiotics on Zebrafish reproduction. J Aquac Res Dev S. doi:10.4172/2155-9546.S1-002.

۱۵. **Gioacchini, G.; Maradonna, F.; Lombardo, F.; Bizzaro, D.; Olivotto, I. and Carnevali, O., 2010.** Increase of fecundity by probiotic administration in zebrafish (*Danio* rerio). Reproduction. Vol. 140, No. 6, pp: 953-959.

۱۶. **Giorgini, E.; Conti, C.; Ferraris, P.; Sabbatini, S.; Tosi, G. Rubini, C. and Carnevali, O., 2010.** Effects of *Lactobacillus rhamnosus* on zebrafish oocyte maturation: an FTIR imaging and biochemical analysis. Analytical and bioanalytical chemistry. Vol. 398, No. 7-8, pp: 3063-3072.

۱۷. **Giri, S.; Sahoo, S.; Sahu, B.; Sahu, A.; Mohanty, S.; Mukhopadhyay, P. and Ayyappan, S., 2002.** Larval survival and growth in Wallago attu (*Bloch and Schneider*): effects of light, photoperiod and feeding regimes. Aquaculture. Vol. 213, No. 1-4, pp: 151-161.

۱۸. **Holzapfel, W.H.; Haberer, P.; Snel, J. and Schillinger, U., 1998.** Overview of gut flora and probiotics. International journal of food microbiology. Vol. 41, No. 2, pp: 85-101.

۱۹. **Hoseinifar, S.H.; Roosta, Z.; Hajimoradloo, A. and Vakili, F., 2015.** The effects of *Lactobacillus acidophilus* as feed supplement on skin mucosal immune parameters, intestinal microbiota, stress resistance and growth performance of black swordtail (*Xiphophorus helleri*). Fish & shellfish immunology. Vol. 42, No. 2, pp: 533-538.

۲۰. **Imanpoor, M.R. and Roohi, Z., 2016.** Effects of Sangrovit-supplemented diet on growth performance, blood biochemical parameters, survival and stress resistance to salinity in the Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. Aquaculture research. Vol. 47, No. 9, pp: 2874-2880.

۲۱. **Lombardo, F.; Gioacchini, G. and Carnevali, O., 2011.** Probiotic-based nutritional effects on killifish reproduction. Fish Aquacult J FAJ. 33 p.

۲۲. **Nayak, S.K., 2010.** Role of gastrointestinal microbiota in fish. Aquaculture research. Vol. 41, No. 11, pp: 1553-1573.

۲۳. **Vílchez, M.C.; Santangeli, S.; Maradonna, F.; Gioacchini, G.; Verdenelli, C.; Gallego, V. and Carnevali, O., 2015.** Effect of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* on the expression of genes involved in European eel spermatogenesis. Theriogenology. Vol. 84, No. 8, pp: 1321-1331.

۲۴. **Washburn, B.S.; Frye, D.J.; Hung, S.S.; Doroshov, S.I. and Conte, F.S., 1990.** Dietary effects on tissue composition, oogenesis and the reproductive performance of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. Vol. 90, No. 2, pp: 179-195.

۲۵. **Zhou, X.X.; Wang, Y.B. and Li, W.F., 2009.** Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. Aquaculture. Vol. 287, No. 3-4, pp: 349-353.