

اثر به کارگیری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی (*Lactobasillus casei*) در جیره غذایی بر بیان ژن ویتلوژنین (Vtg) در جنس ماده ماهی گورخری (*Danio rerio*)

اکرم سدنی، رقیه صفری*، محمدرضا ایمانپور، علی جعفرنوده

گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

*نویسنده مسئول: fisheriessafari@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۷/۳/۲۰

تاریخ دریافت: ۹۷/۱/۲۵

چکیده

در این تحقیق تأثیر سطوح مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی (*Lactobasillus casei*) در جیره غذایی بر بیان ژن ویتلوژنین (Vtg) در ماهی گورخری (*Danio rerio*) بررسی شد. تعداد ۶۰۰ قطعه بچه ماهی گورخری با میانگین وزنی 0.15 ± 0.01 گرم در ۴ تیمار و ۳ تکرار با جیره‌ی غذایی پایه همراه با سه سطح پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی (10^6 ، 10^5 و 10^4 CFU/gr) به مدت ۶ هفته تغذیه شدند. بعد از این دوره و مشخص شدن جنسیت، جنس نر از آزمایش خارج و جنس ماده به مدت ۱ ماه به وسیله همان جیره‌های پروبیوتیک تغذیه شدند. در انتهای دوره جهت مطالعات ژنتیکی از کبد ماهیان نمونه برداری و استخراج RNA انجام شد. برای سنتز cDNA از کیت Superscript RTase استفاده شد و cDNA حاصله با استفاده از پرایمرهای ژن مذکور و ژن بتا کاتین به عنوان ژن رفرنس در Real Time PCR استفاده شد. ارزیابی بیان ژن، افزایش بیان را در تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک در مقایسه با تیمار کنترل نشان داد. میزان بیان ژن ویتلوژنین در گروه تغذیه شده با 10^6 و 10^5 CFU/gr، افزایش معنی داری ($P < 0.05$) با تیمار پروبیوتیکی 10^4 CFU/gr نشان داد. نتایج نشان داد استفاده از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی می‌تواند در بهبود عملکرد تولید مثلی ماهی زبرا به عنوان یک گونه مدل مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: زرده سازی، پروبیوتیک، ماهی گورخری، تولید مثل، بیان ژن.

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 et al., 2008) و به صورت یک زیر بخش مستقل، حجم بالایی را در تجارت به خود اختصاص خواهد داد (ناجی و همکاران، ۱۳۹۰). سالیانه حدود ۴۰۰۰ گونه ماهی آب شیرین و ۱۴۰۰ گونه ماهی آب شور در سطح بین المللی تجارت می‌شود. در ایران نیز در دو دهه اخیر تولید و واردات این ماهیان به شدت رشد یافته و سهم قابل توجهی از اشتغال را به خود اختصاص داده است. با توجه به این که توسعه آبی-پروری در جهان امروز در اقتصاد کشورهای مختلف نقش بسیار مهمی دارد، انجام تحقیقات کاربردی در زمینه‌های مختلف تکثیر و پرورش ماهیان زینتی از جمله بهبود رشد، افزایش مقاومت، پاسخ ایمنی و نیز بهبود وضعیت تکثیر امری ضروری می‌باشد

(Hoseinifar et al., 2015).

ماهیان آکواریومی همواره در معرض استرس‌های بیولوژیک مانند بیماری‌زای باکتریایی، قارچی، انگلی و همچنین انواع استرس‌های غیر بیولوژیک 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 et al., 2015). در کنار شرایط فیزیکی و شیمیایی، 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 et al., 2002; Carnevalli et al., 2017). بنابراین استفاده از مکمل‌های غذایی مناسب (پروبیوتیک‌ها، پریبیوتیک‌ها، گیاهان و مواد مغذی) که بتوانند کیفیت باروری و

عملکرد تولید مثل را در سطوح مختلف مورد بررسی قرار داده‌اند. اما تاکنون در زمینه به‌کارگیری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی بر بیان 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 وزنی 0.1 ± 0.15 گرم از کارگاه تکثیر و پرورش ماهی زینتی گرگان ماهی در استان گلستان تهیه و به سالن آبی‌پروری شهید ناصر فضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انتقال یافتند. لارو ماهیان گورخری ۲۰ روز پس از تفریح به مدت ۱/۵ ماه با افزودن پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی در جیره غذایی در ۴ تیمار آزمایشی، سه سطح پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی (CFU/gr) 10^6 ، 10^5 و 10^4 و یک گروه شاهد (با ۳ تکرار) (Vilchez et al., 2015) تغذیه شدند. بعد از این دوره و مشخص شدن جنسیت، جنس نر از آزمایش خارج و جنس ماده به مدت ۱ ماه به وسیله همان جیره‌های پروبیوتیک تغذیه شدند.

نمونه‌برداری: در پایان دوره از بافت کبد به منظور بررسی ژن ویتلوژنین در شرایط استریل نمونه برداشته شد. ماهیان قبل از نمونه‌برداری توسط پودر گل میخک با دز ۲۰۰ ppm بی‌هوش شدند. کبد جمع‌آوری و به داخل تیوپ‌های انتقال داده شد و بلافاصله تیوپ‌ها به تانک 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: کل RNA از ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه بافت کبد هموژن شده با ازت مایع با استفاده از بیوزول و طبق دستورالعمل شرکت

سلامت مولدین و کیفیت سلول‌های جنسی را افزایش داده و پارامترهای رشد و بقا را در لارو و بچه ماهیان 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 et al., 1996). در لایه تکا کلسترون تحت فعل و انفعالات آنزیمی به تستسترون تبدیل شده و در ادامه تستوسترون در لایه ی گرانولوزا به منظور تولید هورمون استروئیدی همانند استرادیول آروماتاز می‌شود (Nagahama et al., 1991; Berg et al., 2005; Drummond et al., 2006).

در زمینه استفاده از پروبیوتیک‌ها در زمینه تولید مثل آبزیان مطالعات اندک و محدود به استفاده از استفاده از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس راموناس در ماهی گورخری (Carnovali et al., 2013)، پریمالاک در ماهی پلاتی (Abasali and Mohammad, 2010)، وی‌بکت در ماهی مولی سیاه (Chitra and Krishnaveni, 2013)، لاکتوباسیلوس راموناس در مار ماهی اروپایی (Vilchez et al., 2015)، لاکتوباسیلوس راموناس در ماهی گورخری (Gioacchini et al., 2010; 2011, 2012; 2015)، باسیلوس سابتیلوس در ماهیان زنده‌زا (Ghosh et al., 2007)، لاکتوباسیلوس راموناس و کازئی در ماهی گورخری (کین و همکاران، ۲۰۱۴)، لاکتوباسیلوس راموناس در ماهی گورخری (Giorgini et al., 2010)، لاکتوباسیلوس راموناس در ماهی کیلی فیش (Lombardo et al., 2011)، اسید لاکتیکی در ماهی گورخری (Valcarce et al., 2015) و لاکتوباسیلوس راموناس و اسید لاکتیکی در ماهی قرمز (احمدنای مطلق، ۱۳۹۵) می‌باشد که هر کدام

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه.

نام پرایمر	توالی (۵'-۳')	دمای اتصال (C°)
Vtg1 q-PCR ^F	GCCAAAAAGCTGGGTAAACA	۵۸
Vtg1 q-PCR ^R	AGTTCCGTCTGGATTGATGG	
β -actin q-PCR ^F	AGCAGATGTGGATCAGCAAG	۵۸
β -actin q-PCR ^R	TACCTCCCTTTGCCAGTTTC	

و سپس نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولوموگروف-اسمیرنوف بررسی شدند. 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 $\pm$ 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

ارزیابی کیفی و کمی RNA: از لحاظ کمی و کیفی RNA استخراج شده مورد ارزیابی قرار گرفت. ارزیابی کمی RNA با استفاده از اسپکتروفتومتر غلظت RNA را در محدوده ۲/۲-۱/۷ نشان داد که بیان کننده غلظت مناسب RNA است (جدول ۲). در بررسی کیفی RNAها با استفاده از ژل الکتروفورز وجود ۲ باند مشخص ۱۸S و ۲۸S نشان دهنده کیفیت مناسب RNA است (شکل ۱).

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 تغذیه شده با پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی نسبت به گروه کنترل نشان داد. همچنین در گروه تغذیه‌شده با 10^4 CFU/gr، 10^6 و 10^7 (۱) میزان بیان ژن به‌ترتیب ۰/۵۷، ۴/۵ و ۵/۷ برابر گروه

سازنده (Biozol-Bioflux- Bioer) استخراج شد. کمیت و کیفیت RNA استخراجی با استفاده از اسپکتروفتومتر و ژل آگاروز بررسی شد.

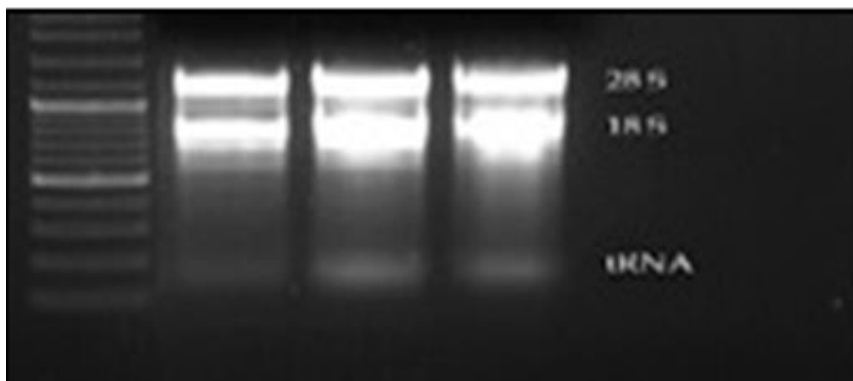
سنتز cDNA: سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (Superscript RTase) و طبق دستورالعمل آن انجام شد. ۵ μ l از RNA که قبلاً آماده‌شده به‌همراه ۱ μ l آغازگر الیگو به تیوپ‌های جدید اضافه شد و با آب عاری از نوکلئاز به حجم ۱۰ μ l رسید. سپس بر روی بلوک حرارتی در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه انکوبه گردید و سپس به روی یخ انتقال داده شد و ۱۰ μ l 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 μ l به فریزر -۸۰ منتقل شد.

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

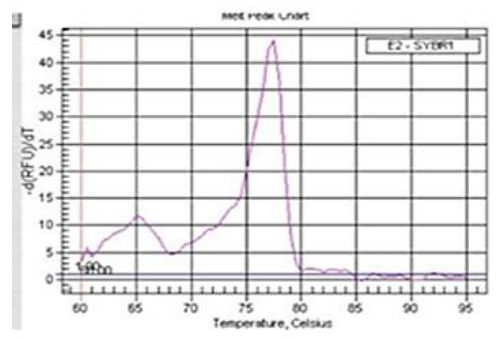
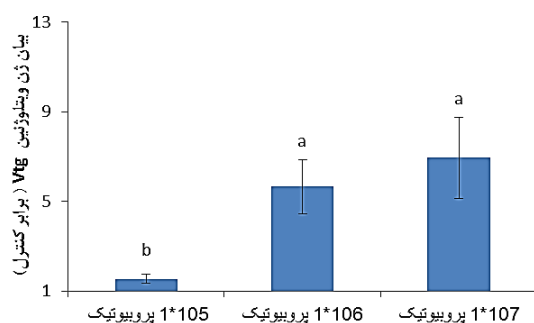
تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌های مربوط به بیان نسبی ژن با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (برابر $\Delta\Delta Ct$) است با ΔCt ژن هدف منهای ΔCt کالیبراتور) آنالیز

جدول ۲- کمیت RNA استخراج شده از کبد ماهی گورخری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر.

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



شکل ۱ - کیفیت RNA استخراج شده از کبد ماهی گورخری روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید (در نمونه های استخراج شده دو باند متعلق به S 28 و S rRNA 18 می باشند).



شکل ۲ - تغییرات بیان نسبی ژن زرده سازی (Vtg) به بتاکتین در ماهی گورخری تغذیه شده با سطوح مختلف پروبیوتیک (حروف متفاوت اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) بین تیمارها را نشان می دهد).

شکل ۲ - منحنی ذوب ترسیم شده از غلظت های سریالی برای آغازگر vtg.

کنترل بود که الگوی افزایشی وابسته به دوزی را نشان می دهد. اختلاف معنی داری در میزان بیان در گروه تغذیه شده با 10^6 و 10^7 پروبیوتیک با گروه تغذیه شده با 10^5 مشاهده شد ($P < 0.05$) (شکل ۳).

بحث

مطالعات زیادی در رابطه با تأثیر جیره های حاوی مکمل های غذایی از جمله پروبیوتیک ها بر فعالیت های زیستی و فیزیولوژیک آبزیان صورت گرفته است. اما در ارتباط با ماهیان زینتی و به ویژه در رابطه با

تولیدمثل مطالعات اطلاعات کمی در دسترس است (Zhou et al., 2009; Hoseinifar et al., 2015). به کارگیری هورمون ها، آنتی بیوتیک ها، مکمل های گیاهی در جیره غذایی مولدین می توانند اثرات زیادی بر جوامع میکروبی و فعالیت آن ها در دستگاه گوارش مولدین داشته باشند (Nayak, 2010; Sullam et al., 2012). مکانیسم چگونگی تأثیر ترکیبات پروبیوتیکی بر فاکتورهای تولیدمثلی و باروری مولدین به دنبال بهبود فلور باکتریایی به خوبی مشخص نشده است (Carnevali et al., 2017)، ولی به نظر می -

رسد 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 et al., 1998). در مطالعه حاضر بیان ژن ویتلوژنین در تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک در مقایسه با کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. تغذیه مولدین در طی مراحل مختلف تأثیرات مختلفی بر کیفیت تخمک تولیدی دارد و ترکیب غذایی زرده و کیفیت تخمک به شکل معنی‌داری تحت تأثیر جیره غذایی مولدین می‌باشد. 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 (ایمانپور و زادمجید، ۱۳۹۹). از طرف دیگر مشخص شده است که یکی از مکانیسم‌های عمل باکتری‌های پروبیوتیک تحریک فرایند تخمیر در دستگاه گوارش می‌باشد. که در طی این فرایند متابولیت‌هایی از جمله اسیدهای چرب کوتاه زنجیر در دستگاه گوارش تولید شده و از طریق جریان خون به کبد منتقل می‌شوند و می‌توانند در زرده‌سازی مورد استفاده قرار گرفته و موجب بهبود وضعیت تولیدمثل گردند. جیره‌های غذایی با ترکیبات مختلف به شکل معنی‌داری پارامترهای تولیدمثل، 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 (Vashburn et al., 1990; Ghosh et al., 2007). جیره‌های غنی به‌خصوص از نظر میزان پروتئین به شکل مؤثری می‌توانند در ماهیان تخم‌ریزی مداوم فواصل بین دو تخم‌ریزی را کوتاه‌تر کنند (Degani, 1993). Ghosh و همکاران (۲۰۰۷) با مطالعه اثرات

باکتری پروبیوتیکی *Bacillus subtilis* جدا شده از روده کپور مریگال (*Cirrhinus mrigala*) بر عملکرد تولیدمثل چهار گونه از ماهیان زینتی زنده‌زا شامل گویی، مولی، دم‌شمشیری سبز و پلتي مشاهده نمودند که استفاده از پروبیوتیک سبب بهبود معنی‌دار شاخص گنادوسوماتیک و همآوری تخم‌ریزی ماهیان ماده در همه گونه‌های مورد نظر شد. همچنین بررسی طول و وزن بچه ماهی‌ها در تمام گونه‌های تغذیه‌شده با پروبیوتیک به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) بیشتر از گروه شاهد بود. علاوه بر این تلفات و بدشکلی بچه ماهیان در تیمار تغذیه‌شده با پروبیوتیک کاهش یافت. نتایج نشان داد که اثرات مثبت پروبیوتیک وابسته به دوز نبوده و استفاده از مقادیر بیشتر، لزوماً منجر به عملکرد تولیدمثل بهتری در مولدین نمی‌گردد. Abasali و Mohamad (۲۰۱۱) اثرات استفاده از مخلوط پروبیوتیک تجاری پریمالاک، متشکل از نسبت مساوی باکتری‌های بیفیدوباکتریوم ترموفیلم، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس کازئی، انتروکوکوس فیسیوم را در جیره ماهی پلتي بررسی و بهبود شاخص گنادوسوماتیک در مولدین ماده‌ها تغذیه شده با پروبیوتیک و همچنین طول و میزان بازماندگی بیشتری را در لاروها مقایسه با گروه شاهد نشان دادند. هر چند از نظر وزن و میزان بدشکلی تفاوت معنی‌داری بین تیمار پروبیوتیک و شاهد مشاهده نشد. همچنین در مطالعه اثر سطوح مختلف پروبیوتیک پریمالاک بر روی ماهی دم شمشیری (*Xiphophorus helleri*) افزایش معنی‌دار شاخص‌های گنادوسوماتیک، باروری و بقای لارو را مشاهده نمودند (Abasali and Mohamad, 2010). تغذیه ماهی گورخری با جیره حاوی *Lb. rhamnosus* (به میزان 10^6 CFU در گرم) به مدت ۱۰ روز به‌طور معنی‌داری سبب افزایش اوولاسیون تخم‌ها و بالا رفتن نرخ تفریح و سرعت بیشتر تکوین جنینی گردید (Giorgini et al., 2010). Lambardo و همکاران (۲۰۱۱) اثرات پروبیوتیک *L. rhamnosus* را در

سطح 10^6 CFU به ازای گرم در جیره غذایی Killifish بررسی و مشاهده نمودند که تغذیه مولدین با *L. rhamnosus* به مدت ده روز سبب افزایش معنی دار همآوری (افزایش دو برابری در مقایسه با گروه شاهد) و مقادیر بالاتر شاخص گنادوسوماتیک (افزایش ۱۵ درصدی در مقایسه با گروه شاهد) گردید (Lambardo et al., 2011). اگر چه به کارگیری *Lb. rhamnosus* در جیره غذایی مولدین اثر معنی داری بر سرعت تکامل جنینی نداشت، میزان بازماندگی جنین به طور معنی داری در تیمار پروبیوتیک افزایش یافت همچنین لاروهای به دست آمده از مولدین تحت تیمار با پروبیوتیک میزان وزن و طول کل بیشتری در مقایسه با گروه شاهد داشتند. همچنین نتایج مطالعات صورت پذیرفته در سطح مولکولی در ناحیه تخمدان ماهی-های تغذیه شده با پروبیوتیک افزایش بیان ژن های کد کننده سیگنال هایی که فاز رسیدگی را تحریک می کنند (مانند ژن های *Ihr*, *20B-hsd*, *mprB*, *cyclinB*, *ActivinBA1*, *smad2*)، را همراه با کاهش بیان ژن های کد کننده فاکتورهای که مانع رسیدگی اووسیت می شوند (مانند *tgfb1*, *gdf9* و *bmp15*) نشان داد. در مطالعه ای دیگر که بر روی ماهی گورخری (*Danio rerio*) انجام شد مشخص شد که پروبیوتیک IMC 501 *L. rhamnosus* به شکل معناداری 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 ژن های سیتوکروم P19، ویتلوژنین کبدی و همچنین ایزوفورم آلفا رسپتورهای استرادیول بوده است (Giocchini et al., 2011). همچنین همین محققین نشان دادند که در هر دو سطح گوارشی و مغزی استفاده از پروبیوتیک سبب افزایش معنی دار بیان ژن لپتین می شود که یک هورمون کلیدی در هموستازی انرژی و کارکردهای نورواندوکراین می باشد. این نتایج نشان می دهد که پروبیوتیک می تواند

به طور غیرمستقیم از طریق فعال سازی یک هورمون متابولیک قوی مانند لپتین عمل کند. احمدنای مطلق (۱۳۹۵) از باکتری های *L. rhamnosus* و *Pediococcus acidilactici* در جیره ماهی مولد ماهی قرمز استفاده و افزایش کارایی تولیدمثل در ماهی قرمز مشاهده نمودند. غفاری فارسانی و همکاران (۱۳۹۵) از پروبیوتیک پریمالاک در جیره مولدین ماهی سورم طلایی استفاده و افزایش معنی-داری فاکتورهای عملکردی تولیدمثل از جمله درصد لقاح، همآوری کاری، درصد تفریح و بازماندگی لارو در ماهیان تغذیه شده با پریمالاک را گزارش نمودند. به عنوان نتیجه گیری نهایی، مطالعه حاضر نشان داد که پروبیوتیک لاکتوباسیلوس می تواند در بهبود زرده سازی و عملکرد تولید مثلی ماهی گورخری استفاده شود و با توجه به مدل بودن این گونه استفاده از پروبیوتیک ها می تواند در بهبود عملکرد تولیدمثلی سایر آبزیان مورد توجه قرار گیرد.

منابع

- ایمانپور م.ر.، زادمجید و. ۱۳۸۸. مقدمه ای بر تکثیر ماهیان. انتشارات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۱۹۶ صفحه.
- احمدنای مطلق ح.ر. ۱۳۹۵. اثرات به کارگیری لاکتوباسیلوس راموناس واسید لاکتیکی بر شاخص های تولیدمثلی ماهی قرمز. رساله دکتری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۱۰۰ صفحه.
- غفاری فارسانی ح.، حسینی فر س.ح.، قشلاقی پ.، شهبازی ناصرآباد س. ۱۳۹۵. تأثیر جیره های غذایی حاوی سطوح مختلف پروبیوتیک پریمالاک بر وضعیت تولیدمثلی مولدین، بقای لارو، عملکرد رشد بچه ماهیان سورم طلایی *Heros severus*. نشریه علمی پژوهشی علوم آبی پروری، ۱۰:۱-۱۰.
- ناجی ز.، مهدوی شهری ن.، قاسمزاده ف.، شاهسونی د.و، بهنام رسولی م. ۱۳۹۰. تأثیر علف کش آترازین بر فرایند اووژنز در گورخر ماهی *Danio rerio*. نشریه علمی پژوهشی سلول و بافت. ۱۰:۱-۲.
- Abasali H., Mohamad S. 2010. Effect of

- Fimia G.M., Nardacci R., Ciccocanti F., 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* 25(8), 1115-1125.
- Gioacchini G., Lombardo F., Merrifield D., Silvi S., Cresci A., Avella M., Carnevali O. 2011. Effects of probiotics on Zebrafish reproduction. *Journal of Aquaculture Research Development* 1, 1-10.
- Gioacchini G., Maradonna F., Lombardo F., Bizzaro D., Olivotto I., Carnevali O. 2010. Increase of fecundity by probiotic administration in zebrafish (*Danio rerio*). *Reproduction* 140(6), 953-959.
- Giorgini E., Conti C., Ferraris P., Sabbatini S., Tosi G., Rubini C., Carnevali O. 2010. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* on zebrafish oocyte maturation: an FTIR imaging and biochemical analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398(7-8), 3063-3072.
- Giri S., Sahoo S., Sahu B., Sahu A., Mohanty S., Mukhopadhyay P., Ayyappan S. 2002. Larval survival and growth in *Wallago attu* (Bloch and Schneider): effects of light, photoperiod and feeding regimes. *Aquaculture* 213(1-4), 151-161.
- Holzapfel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 41(2), 85-101.
- Hoseinifar S.H., Roosta Z., Hajimoradloo A., 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 and Shellfish Immunology* 42(2), 533-538.
- Imanpoor M.R., 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* 47(9), 2874-2880.
- Lombardo F., Gioacchini G., Carnevali O. 2011. Probiotic-based nutritional effects on killifish reproduction. *Fish Aquaculture Journal* 1:10-33.
- Nagahama Y., Matsuhisa A., Wamatsu T., Sakai N., Fukao S. 1991. A mechanism dietary supplementation with probiotic on reproductive performance of female livebearing ornamental fish. *Research Journal of Animal Sciences*, 4(4), 103-107.
- Abasali H., Mohamad S. 2011. Effect of Dietary Probiotic Level on the reproductive performance of female platy *Xiphophorus maculatus*. *Agricultural Journal* 6(3), 119-123.
- Anderson M.J., Miller M.R., 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* 34(4), 327-350.
- Barney M.L., Patil J.G., Gunasekera R.M., 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* 156(3), 499-508.
- Berg A.H., Thomas P., Olsson P.E. 2005. Biochemical characterization of the Arctic char (*Salvelinus alpinus*) ovarian progesterone membrane receptor. *Biological Endocrinology* 3: 1-10.
- Carnevali O., Maradonna F., Gioacchini G. 2017. Integrated control of fish metabolism, wellbeing and reproduction: The role of probiotic. *Aquaculture* 472, 144-155.
- Chen X., Jiang S., Gu Y., Shi Z. 2014. Molecular characterization and expression of cyp19a gene in *Carassius auratus*. *Journal of Fish Biology* 85(2), 516-522.
- Chitra G., Krishnaveni N. 2013. Effect of probiotics on reproductive performance in female livebearing ornamental fish *Poecilia spheops*. *International Journal of Pure and Applied Zoology* 1(3), 1-10.
- Degani G. 1993. Growth and body composition of juveniles of *Pterophyllum scalare* (Lichtenstein)(Pisces; Cichlidae) at different densities and diets. *Aquaculture Research* 24(6), 725-730.
- Drummond A.E. 2006. The role of steroids in follicular growth. *Biological Endocrinology* 4, 1-10.
- Ghosh S., Sinha A., Sahu C. 2007. Effect of probiotic on reproductive performance in female livebearing ornamental fish. *Aquaculture Research* 38(5), 518-526.
- Gioacchini G., Dalla Valle L., Benato F.,

- for the action of pregnant mare serum gonadotropin on aromatase activity in the ovarian follicles of the medaka, *Oryzias latipes*. *Expression Zoology*, 259, 1-10.
- Nayak S.K. 2010. Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research* 41(11), 1553-1573.
- Sullam K.E., Essinger S.D., Lozupone C. A., Connor M.P., Rosen G.L., Knight R., Russell J.A. 2012. Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis. *Molecular Ecology* 21(13), 3363-3378.
- Qin C., Xu L., Yang Y., He S., Dai Y., Zhao H., Zhou Z. 2014. Comparison of fecundity and offspring immunity in zebrafish fed *Lactobacillus rhamnosus* CICC 6141 and *Lactobacillus casei* BL23. *Reproduction* 147, 53-64.
- Valcarce D.G., Pardo M.A., Riesco M.F., Cruz Z., Robles V. 2015. Effect of diet supplementation with a commercial probiotic containing *Pediococcus acidilactici* (Lindner, 1887) on the expression of five quality markers in zebrafish (*Danio rerio* (Hamilton, 1822)) testis. *Journal of Applied Ichthyology*, 1-4.
- Vílchez M.C., Santangeli S., Maradonna F., Gioacchini G., Verdenelli C., Gallego V., Carnevali O. 2015. Effect of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* on the expression of genes involved in European eel spermatogenesis. *Theriogenology* 84(8), 1321-1331.
- Washburn B.S., Frye D.J., Hung S.S., Doroshov S.I., Conte F.S. 1990. Dietary effects on tissue composition, oogenesis and the reproductive performance of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 90(2), 179-195.
- Zhou X.-X., Wang Y.-b., Li W.-f. 2009. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. *Aquaculture* 287(3-4), 349-353.

Effect of dietary administration of *Lactobacillus casei* on vitellogenin gene expression in female zebrafish (*Danio rerio*)

Akram Sadani, Roghieh Safari*, Mohamadreza Imanpour, Ali Jafar Nodeh

Department of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources,
Gorgan, Iran.

*Corresponding author: fisheriessafari@yahoo.com

Received: 2018/4/14

Accepted: 2018/6/10

Abstract

The present study investigates the effect of different levels of probiotic *Lactobasillus casei* on expression of vitellogenin (Vtg) gene in Zebrafish (*Danio rerio*). For this purpose, Zebrafish with average weight of 0.15 ± 0.01 gr fed on diet supplemented with 0%, 10^5 , 10^6 and 10^7 CFU/gr of probiotic for 6 weeks. After this period and sex determination, females fed with probiotic for 1 month. At the end of feeding trial, RNA extracted from liver and brain, cDNA synthesized with Superscript RTase kit and PCR were done using Vtg primer and Beta-actin as housekeeping gene. Evaluation reproduction gene expression showed increase in fish fed probiotic compare to control. Vtg gene expression showed significant increases in fish fed 10^6 and 10^7 CFU/gr of probiotic compared to 10^5 . According to the results it seems that using probiotic could consider as a new strategy for improving reproductive performance.

Keywords: Vitellogenin, Probiotic, Zebrafish, Reproduction, Gene expression.