

برآورد نسبت RNA/DNA در مراحل اولیه رشد لاروهای حاصل از تلاقی مولدین تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) در یک طرح فاکتوریل

علی حلاجیان^{۱*}، حسینعلی عبدالحی^۲، عبدالاحد شادپرور^۳، مهتاب یارمحمدی^۱، رضوان اله کاظمی^۱، ایوب یوسفی جوردهی^۱، بابک تیزکار^۴، حسین محمدی پرشکوه^۵، سیدعلی موسوی^۱

۱- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر، رشت، ایران

۲- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، تهران، ایران

۳- گروه علودامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۴- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مرکز علمی کاربردی میرزا کوچک خان، رشت، ایران

۵- مرکز بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری دکتر شهید بهشتی، رشت، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱/۳۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۹

چکیده

بررسی نسبت RNA/DNA یا (R/D) به عنوان یک ابزار سریع و کارآمد برای تعیین وضعیت رشد ماهی مورد استفاده قرار گیرد بر همین اساس این تحقیق با هدف برآورد نسبت R/D در لاروهای تولید شده از تلاقی سه مولد ماده با سه مولد نر تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) وحشی که از سواحل جنوبی دریای خزر در استان گیلان صید شده بودند، در یک طرح آزمایشی فاکتوریل ۳×۳ انجام شد. بدین ترتیب ۹ تیمار شامل تلاقی‌های F1M1، F1M2، F1M3، F2M1، F2M2، F2M3، F3M1، F3M2 و F3M3 (هر تیمار با سه تکرار) ایجاد شد. لاروهای حاصل از این تیمارها در یک شرایط دمایی و تغذیه‌ای یکسان به مدت ۱۲۰ روز نگهداری شدند. برای برآورد نسبت R/D طی چهار مرحله در طول آزمایش از لاروها نمونه برداری صورت گرفت. نتایج نشان داد که نسبت R/D با رشد ماهی افزایش یافته بطوریکه مرحله K (۱۲۰ روز پس از تفریح) بیشترین نسبت R/D دیده شده است. از لحاظ تیمار بندی نسبت R/D تیمار ۵ (F2M2) با 0.939 ± 0.06 بیشترین و تیمار ۲ (F1M2) با 0.500 ± 0.02 نانوگرم بر میکرولیتر کمترین مقدار بود. در نتیجه گیری نهایی می‌توان بیان نمود که غلظت RNA و DNA به سرعت با افزایش سن تاسماهی ایرانی، افزایش یافته و به دنبال آن با افزایش نسبت R/D در ماهی که در پاسخ به وضعیت تغذیه ماهی عمل می‌کند، همراه بوده که آن را می‌توان به تغییر رژیم غذایی در طول پرورش لارو نسبت داد. بر همین اساس می‌توان بیان داشت که با برآورد نسبت R/D اطلاعات مفیدی از وضعیت رشد و تغذیه لاروها بدست آورد.

کلمات کلیدی: تاسماهی ایرانی، طرح فاکتوریل، لارو، نسبت RNA/DNA

* عهده‌دار مکاتبات (✉). alihallajian@gmail.com

مقدمه

سواحل جنوبی دریای خزر دارای رودخانه‌های متعددی می‌باشد که اکثراً محل مهاجرت و تخم‌ریزی ماهیان مهاجر می‌باشند (چکمه دوز قاسمی و بهمنش، ۱۳۹۴). در این بین تاسماهی ایرانی پراکنش وسیعی را در کلیه مناطق دریای خزر و حوزه آبریز آن دارد اما بیشتر جمعیت آن در سواحل جنوبی و جنوب شرقی دریای خزر مشاهده می‌شود. عموماً عمر طولانی دارند و دیر به بلوغ جنسی می‌رسند بطوریکه نرها در ۸ سالگی و ماده‌ها در ۱۲ سالگی بالغ می‌شوند و جهت تخم‌ریزی به رودخانه‌های آب شیرین مانند سفیدرود مهاجرت می‌کنند (شریعتی، ۱۳۸۹).

در سال‌های اخیر آلودگی‌های صنعتی و شهری، ماهیگیری غیرمسئولانه، تغییرات زیست محیطی محل‌های مهاجرت طبیعی و کاهش دبی آب رودخانه‌ها در فصل مهاجرت تکثیر سبب کاهش ذخایر ماهیان دریای خزر شده (شریفی و همکاران، ۱۳۹۵) و بر همین اساس در کشور جهت ایجاد گله‌های مولد پرورشی، بازاری و تولید خاویار و حفظ ذخایر با رهاسازی آنها به رودخانه‌ها، تنها با تکثیر مصنوعی و پرورش گونه‌های مختلف به منظور تولید صنعتی خاویار امکان‌پذیر است تا به این وسیله علاوه بر تولید خاویار موردنیاز، با کاهش صید این ماهیان در حفظ منابع موجود دریا کمک شود.

در سال‌های اخیر، انواع مختلفی از تکنیک‌ها از جمله مورفولوژیکی، بافت شناسی، و شاخص‌های بیوشیمیایی برای ارزیابی وضعیت رشد لارو و بچه ماهیان توسعه یافته و امروزه نیاز به هدایت و تحقیقات گسترده‌ای از نشانگرهای حساس به شرایط رشد

مخصوصاً اسید نوکلئیک در لاروها می‌باشد (Rooker and Holt, 1996). مراحل آغازین تکامل ماهیان از مراحل بسیار بحرانی است که می‌تواند به طور مستقیم رشد و بازماندگی را به شدت تحت تاثیر خود قرار دهد (کاظمی و همکاران، ۱۳۹۸)، از این رو اسیدهای نوکلئیک نقش عمده‌ای در رشد و توسعه لاروها بازی می‌کنند. میزان اسید دئوکسی ریبونوکلئیک (DNA)، حامل اطلاعات ژنتیکی، تحت تغییر شرایط زیست محیطی پایدار است و از آن به عنوان یک شاخص زیست توده (Dortch *et al.*, 1983) و تعداد سلول استفاده می‌شود ولی ریبونوکلئیک اسید (RNA) به طور مستقیم در سنتز پروتئین درگیر می‌باشد، در نتیجه رشد لارو وابسته به مقدار RNA در دسترس، می‌باشد. بنابراین نسبت غلظت اسید ریبونوکلئیک (RNA) به غلظت اسید دئوکسی ریبونوکلئیک (DNA) بافت‌های بدن یک شاخص مفید از وضعیت رشد در مطالعات لارو ماهی است، بطوریکه مقدار DNA در هر سلول یک گونه در بافت‌های سوماتیک ثابت بوده، در حالی که مقدار RNA (در درجه اول با ریبوزوم مرتبط) با نرخ سنتز پروتئین متفاوت است. از آنجائیکه رشد لاروها از طریق سنتز پروتئین صورت می‌گیرد، نسبت RNA/DN (R/D) به طور بالقوه می‌تواند برای ارزیابی وضعیت رشد در هر زمان استفاده شود. نسبت R به D ثابت کرده است که یکی از پارامترهای بیوشیمیایی ارزشمند برای مطالعه رشد در موجودات زنده و همچنین برای توسعه لاروهای ماهی است (Buckley *et al.*, 1999; Westerman and Holt, 1994; Clemmesen, 1988). چون DNA یک پیش نیاز برای

سنتز RNA که به نوبه خود یک نیاز برای سنتز پروتئین است.

مطالعه و اطلاعات بدست آمده از نسبت R/D در کاربرد اسیدهای نوکلئیک بعنوان رشد و شرایط تغذیه‌ای لارو ماهیان از جمله لارو تاسماهی ایرانی می‌تواند پایه و اساس مطالعات آینده این گونه از بچه ماهیان باشد (Tong et al., 2010; Tanaka et al., 2007). متأسفانه تاکنون در ایران تحقیقات و گزارشاتی در خصوص برآورد نسبت R/D لارو ماهیان استخوانی و ماهیان خاویاری صورت نگرفته است، ولی در خارج از کشور در لارو آبزیانی همچون ماهی، میگو، صدف و خرچنگ در حالت‌های گرسنگی، تغذیه شده و حتی در شرایط محیطی متفاوت (Raae et al., 1988; Buckley et al., 1999; Stierhoff et al., 2009; Amaral et al., 2009; Tillner et al., 2015; Hufnagl and Temming, 2018) گزارشات زیادی شده است. بر همین اساس این تحقیق برای اولین بار در ایران با هدف برآورد نسبت R/D که شاخصی از رشد و شرایط تغذیه‌ای در لارو ماهیان را نشان می‌دهد، بر روی لارو تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) حاصل از مولدین دریایی که از سواحل جنوبی دریای خزر در استان گیلان صید شده بودند، در یک طرح آزمایشی به انجام رسید.

مواد و روش ها

۶ عدد از مولدین تاسماهی ایرانی (۳ عدد مولد ماده و سه عدد مولد نر) که در سال ۱۳۹۵ به روش دام گوش گیر در سواحل جنوب غربی دریای خزر (سواحل استان گیلان) صید و به مرکز بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری شهید بهشتی واقع در سدسنگر رشت انتقال، و از لحاظ ظاهری سالم بودند، برای اجرای این تحقیق

انتخاب گردید. تحریک مولدین و آمادگی برای اسپرم دهی و اوولاسیون بر اساس دستورالعمل Mohammadi و همکاران (۲۰۱۵) از روش تزریق زیرجلدی با هورمون LHRH-A2 استفاده گردید.

پس از بررسی آزمایشگاهی کمی و کیفی اسپرم (جدول ۱) و تخمک (جدول ۲)، از هر مولد ۳۰۰ گرم تخمک برای انجام تکثیر در این تحقیق برداشته و در سه لگنچه (هر لگنچه حاوی ۱۰۰ گرم تخمک) ریخته شد. عملیات تکثیر براساس روش مرسوم مراکز تکثیر ماهیان خاویاری به روش نیمه خشک، در یک طرح فاکتوریل ۳×۳ با تلاقی فردی یک نر با ۳ ماده صورت گرفت. بر همین اساس این تحقیق شامل ۹ تیمار بترتیب F2M3، F2M2، F2M1، F1M3، F1M2، F1M1، F3M1، F3M2 و F3M3 بود. تخم‌های لقاح یافته هر لگنچه بطور مساوی در ۳ پاکت انکوباتور بعنوان تکرار هر تیمار ریخته شد. بررسی فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب انکوباتورها به طور همزمان در هر پاکت انکوباتور که با یک منبع تأمین آب تغذیه می‌شد نیز انجام گرفت. دمای و اکسیژن محلول آب توسط ترمومتر و اکسی متر دیجیتال مدل HACH ساخت آمریکا و pH آب بوسیله دستگاه pH متر مدل 330i/SET (WTW) ساخت آلمان هر روز صبح و بعدازظهر اندازه‌گیری گردید. بر همین اساس فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب انکوباتورهای اندازه‌گیری شده از زمان لقاح تا تفریخ لاروها در مدت ۶ روز بدین صورت بود که حداقل، حداکثر و متوسط دمای آب بترتیب ۱۷، ۲۰/۱ و ۱۸/۲±۱/۳۴ درجه سانتی گراد، حداقل، حداکثر و متوسط اکسیژن محلول آب بترتیب ۶/۳، ۹/۵ و ۸/۱±۱/۰۹ میلی گرم در لیتر و حداقل، حداکثر و متوسط pH آب بترتیب ۶/۸، ۷/۹ و

۷/۵ ± ۰/۴۱ برای تمامی تیمارها بود. تخم گشایی در ۱۸/۲ ± ۱/۳۴ سانتی گراد، پس از گذشت ۶ روز (۲۶۲۱ درجه - ساعت بعبارتی در ۱۰۹ درجه - روز) رخ داد.

جدول ۱: برخی از فاکتورهای اندازه گیری شده اسپرم مولدین نر مورد مطالعه

شماره ماهی	pH	درصد اسپرماتوکریت	درصد تحرک اسپرم	اسمولاریته اسپرم (mOsm/l)	مدت زمان تحرک (ثانیه)	کیفیت تحرک اسپرم	تراکم اسپرم (سلول در میلی لیتر)
۱	۹/۳۵	۱۱	۵۰	۱۵۴	۱۹۵	متوسط	$3/356 \times 10^9$
۲	۹/۶۷	۱۰	۶۰	۱۴۶	۱۱۰	متوسط	$2/550 \times 10^9$
۳	۹/۴	۸	۸۰	۱۹۳	۲۶۰	خوب	$1/051 \times 10^9$

جدول ۲: برخی از فاکتورهای اندازه گیری شده تخمک مولدین ماده مورد مطالعه

شماره ماهی	وزن کل تخمک (kg)	متوسط تعداد در گرم (عدد)	متوسط قطر تخمک (mm)	متوسط تعداد میکروپیل (عدد)	درصد GV
۱	۲/۸	۵۴	۳/۲	۶	۸/۶
۲	۴/۲	۵۲	۳/۵	۸	۸/۸
۳	۴/۲	۴۹	۳/۵	۹	۸/۹

حدود ۱۰ گرم لاروهای تازه تفریخ شده از هر تیمار با متوسط وزن ۲۱/۸ میلی گرم، از انکوباسیون به وان های ۲۰۰ لیتری موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر منتقل گردید. لاروها به مدت ۴ ماه از زمان تفریخ در وان های مجهز به ورودی و خروجی آب چاه و اکسیژن هوا بودند، نگهداری شدند. لاروها در طول مدت ۱۲۰ روز آزمایش پس از جذب کیسه زرده ابتدا از غذای زنده شامل آرتمیا، دافنی، گاماروس و کرم قرمز منجمد (طی ۴ مرحله در روز) و سپس از غذای گرانوله (کنسانتره) (طی ۳ مرحله در روز)، تغذیه شدند (حلاجیان، ۱۳۹۷).

جهت بررسی کمیت اسیدهای نوکلئیک RNA و DNA و همچنین برآورد نسبت RNA/DNA یا (R/D) طی چهار مرحله و در هر مرحله تعداد ۳۰ عدد از لارو و بچه ماهیان در زیر هود لامینار پس از خشک کردن بدن آنها با پارچه تمیز، وزن و طول کل شان را

با استفاده از ترازو با دقت ۰/۰۰۱ گرم و خط کش فلزی به دقت یک میلی متر اندازه گیری و سپس نمونه های هر تیمار جهت سنجش نسب در ویال های RNAs ریخته و تا زمان آزمایش در فریزر منفی ۸۰ درجه نگهداری شد. مراحل نمونه برداری شامل مرحله A (۱۰ روز پس از تفریخ) (حاوی کیسه زرده)، مرحله D (۴۵ روز پس از تفریخ)، F (۹۰ روز پس از تفریخ) و مرحله K (۱۲۰ روز پس از تفریخ) بود. نسبت R/D اسید نوکلئیک بافت ماهی با استفاده از روش Schmidt-Thannhauser اصلاح شده توسط Amaral و همکارانش (۲۰۰۸) برآورد گردید (حلاجیان، ۱۳۹۷).

برای تجزیه و تحلیل آماری ابتدا نرمال بودن داده ها با استفاده از تست ناپارامتریک Kolmogorov-smirnov اثبات گردید، سپس با استفاده از واریانس یک طرفه، دو طرفه از نوع تیپ ۳ (TYP III) برای تعیین اثر متقابل بین زمان نمونه برداری با نسبت R/D و با استفاده از

آزمونهای معنادار توکی (HSD) و نرم افزارهای SPSS²⁰ و آگسل تحت ویندوز انجام شد.

استخراج شده در نمونه‌ها ناچیز بوده، زیرا هر دو نسبت ۲۳۰/۲۶۰ و ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر در هر مرحله از نمونه برداری برای RNA و DNA بین ۱/۶ تا ۲/۱ بوده است، و نتایج برآورد نسبت بین اسیدهای نوکلئیک (R/D) در جدول ۴ و همچنین اسیدهای نوکلئیک استخراج شده RNA و DNA در جدول ۵ نشان داده شده است.

نتایج

نتایج زیست سنجی لاروها و بچه ماهیان طی ۴ مرحله نمونه برداری برای هریک از تیمارها در جدول ۳ آورده شده است. مقدار آلودگی اسیدهای نوکلئیک

جدول ۳: زیست سنجی مراحل نمونه برداری در کل تیمارهای مورد آزمون ($\pm SE$ میانگین)

مرحله K	مرحله F	مرحله D	مرحله A	مراحل زیست سنجی
(۱۲۰ روز پس از تفریخ)	(۹۰ روز پس از تفریخ)	(۴۵ روز پس از تفریخ)	(۱۰ روز پس از تفریخ)	
۵/۳۳	۴	۰/۶	۰/۰۳	حداقل
۳۵/۱۸	۱۹/۳۱	۲/۲۴	۰/۰۵	حداکثر
۱۱/۱۸۳±۴/۹۹ ^a	۵/۷۶۹±۲/۱۳۷ ^b	۱/۰۲۹±۰/۳۴ ^c	۰/۰۳۸±۰/۰۰۴ ^d	متوسط
۱۱/۶۰	۹/۵۰	۴/۷۰	۱/۵۰	حداقل
۲۲/۵۰	۱۸/۵۰	۸/۱۰	۲/۱۰	حداکثر
۱۴/۸۸۰±۲/۰۶۱ ^a	۱۱/۱۹۹±۳۳۹۱ ^b	۵/۹۵۱±۰/۷۲ ^c	۱/۸۵۸±۰/۱۲ ^d	متوسط

حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنادار آماری بین مراحل نمونه برداری هاست، $P < ۰/۰۵$

جدول ۴: برآورد نسبت RNA/DNA یا (R/D) استخراج شده از نمونه‌های مورد آزمون (میکروگرم بر میکرولیتر)

تیمار	مراحل نمونه برداری				متوسط تیمارها
	A	D	F	K	
(۱)F1M1	۱/۰۸±۰/۱۵	۰/۳۰۶±۰/۰۴	۰/۴۶±۰/۰۴	۰/۵۸۳±۰/۰۴	۰/۶۰۷±۰/۰۳
(۲)F1M2	۰/۹۶±۰/۱۵	۰/۳۸۰±۰/۰۴	۰/۵۵۲±۰/۰۶	۰/۶۷۰±۰/۰۴	۰/۵۰۰±۰/۰۲
(۳)F1M3	۰/۶۵±۰/۱۲	۰/۴۸۳±۰/۰۵	۰/۵۳۳±۰/۰۳	۰/۶۵۶±۰/۰۶	۰/۵۸۰±۰/۰۱
(۴)F2M1	۰/۷۸±۰/۱۴	۰/۳۱۳±۰/۰۶	۰/۶۰۳±۰/۰۳	۰/۵۹۰±۰/۰۶	۰/۵۷۱±۰/۰۲
(۵)F2M2	۱/۸۷±۰/۱۷	۰/۵۳۶±۰/۰۶	۰/۶۲۰±۰/۰۳	۰/۷۲۳±۰/۰۶	۰/۹۳۹±۰/۰۶
(۶)F2M3	۱/۰۵±۰/۱۲	۰/۲۳±۰/۰۳	۰/۵۶۰±۰/۰۴	۰/۷۵۳±۰/۰۵	۰/۶۴۹±۰/۰۳
(۷)F3M1	۱/۱۴±۰/۱۴	۰/۲۴۶±۰/۰۴	۰/۵۶۰±۰/۰۵	۰/۸۲۰±۰/۰۳	۰/۶۹۲±۰/۰۴
(۸)F3M2	۰/۸۰±۰/۱۳	۰/۴۲±۰/۰۵	۰/۶۰±۰/۰۵	۰/۷۰۶±۰/۰۴	۰/۶۳۱±۰/۰۲
(۹)F3M3	۰/۶۰±۰/۰۶	۰/۴۶۳±۰/۰۳	۰/۶۵۶±۰/۰۶	۰/۶۴۳±۰/۰۳	۰/۵۹۱±۰/۰۱
متوسط مراحل نمونه برداری	۰/۹۶±۰/۱۵	۰/۳۸۰±۰/۰۴	۰/۵۵۲±۰/۰۶	۰/۶۷۰±۰/۰۴	

جدول ۵: تعیین کمیت غلظت اسیدهای نوکلئیک DNA و RNA استخراج شده از لاروهای تاسماهی ایرانی

اسیدهای نوکلئیک	تیمارها								
	F3M3	F3M2	F3M1	F2M3	F2M2	F2M1	F1M3	F1M2	F1M1
	مراحل								
A	غلظت (ng/ul)	۷۰۰/۷	۸۳۰/۲	۶۷۴/۵	۶۶۹/۰۱	۵۹۳/۱	۷۰۰/۶	۱۰۱۷/۶	۸۸۹/۸۴
	۲۳۰/۲۶۰	۲/۰۶	۱/۷۸	۱/۸۱	۱/۸۷	۲/۱	۲/۰۵	۲	۲/۱
	۲۶۰/۲۸۰	۱/۶	۱/۶۱	۱/۶۲	۱/۶۳	۱/۶۶	۱/۶۵	۱/۶۱	۱/۶
D	غلظت (ng/ul)	۱۰۷۴/۴	۱۲۳۵/۱	۱۴۸۰/۸	۱۳۲۶/۵	۱۳۱۰/۱	۱۲۶۲/۵	۱۳۱۲/۱	۱۲۲۲/۸
	۲۳۰/۲۶۰	۱/۶۷	۱/۸۳	۱/۹۲	۱/۶	۱/۸۱	۱/۷۲	۱/۶۱	۱/۶۷
	۲۶۰/۲۸۰	۱/۷	۱/۶۹	۱/۷	۱/۷۱	۱/۶۷	۱/۷۶	۱/۷	۱/۷۳
F	غلظت (ng/ul)	۱۵۲۰/۵	۱۴۱۳/۱	۱۲۲۰/۷	۱۰۲۵/۱	۱۵۰۲/۶	۱۹۳۱/۱	۱۴۱۳/۹	۱۲۴۴/۱
	۲۳۰/۲۶۰	۱/۶۹	۱/۶	۱/۶	۱/۶۱	۱/۶۴	۱/۶۶	۱/۶	۱/۶۳
	۲۶۰/۲۸۰	۲/۰۳	۲/۰۹	۱/۸۴	۲/۰۶	۱/۸	۲/۱	۲/۰۳	۲
K	غلظت (ng/ul)	۱۲۰۷/۷	۱۳۶۱/۴	۱۱۰۶/۵	۱۲۶۹/۶	۱۵۸۹/۹	۱۶۰۲/۳	۱۷۰۳/۲	۱۲۶۶/۹
	۲۳۰/۲۶۰	۱/۶۳	۱/۶۵	۱/۷۳	۱/۶۹	۱/۷۶	۱/۶۱	۱/۶۴	۱/۶۳
	۲۶۰/۲۸۰	۲/۰۹	۲/۱	۱/۸۵	۱/۸۴	۲/۰۶	۲/۰۳	۱/۸۸	۱/۹۳
A	غلظت (ng/ul)	۴۶۰/۸	۵۳۸/۸	۳۷۳/۹	۵۹۱/۹	۹۶۸/۹	۷۹۴/۳	۸۵۶/۸	۶۷۶/۶
	۲۳۰/۲۶۰	۱/۶۳	۲/۱	۱/۸	۱/۶۳	۲/۱	۱/۹۸	۱/۹۲	۱/۹۴
	۲۶۰/۲۸۰	۱/۶۴	۱/۶۲	۱/۷۵	۱/۶۵	۱/۶۹	۱/۷۵	۱/۶۵	۱/۸
D	غلظت (ng/ul)	۷۲۹/۷۶	۸۶۰/۵	۷۲۷/۹	۷۲۹/۹	۸۲۵/۱	۶۴۵/۸	۶۱۰/۹	۷۱۱/۳
	۲۳۰/۲۶۰	۱/۶۷	۱/۶	۱/۶۵	۱/۶۱	۱/۶	۱/۶	۱/۶۲	۱/۶
	۲۶۰/۲۸۰	۱/۹۹	۱/۷۴	۱/۸۲	۱/۹۹	۱/۷	۲/۰۷	۱/۹۲	۱/۸۹
F	غلظت (ng/ul)	۷۵۴/۹	۷۱۳/۱	۸۲۸/۸	۸۱۸/۶	۶۲۷/۵	۷۳۷/۹	۷۱۰/۲	۸۸۵/۱
	۲۳۰/۲۶۰	۱/۶۳	۱/۶۲	۱/۶۵	۱/۶۷	۱/۶۳	۱/۶۵	۱/۶۴	۱/۶۴
	۲۶۰/۲۸۰	۲/۰۴	۱/۹۸	۱/۹۳	۲/۰۹	۱/۹۷	۱/۸۹	۲/۰۳	۱/۹۵
K	غلظت (ng/ul)	۹۵۷/۶	۷۰۸/۷	۹۷۸/۴	۶۲۴/۴	۶۳۶/۱	۹۷۸/۵	۷۵۹/۶	۹۱۷/۱
	۲۳۰/۲۶۰	۱/۶	۱/۶	۱/۶۴	۱/۶۸	۱/۹	۱/۹	۱/۸۹	۱/۸۷
	۲۶۰/۲۸۰	۱/۷۳	۱/۶۷	۱/۷	۱/۹۴	۲/۰۲	۲/۰۴	۲/۰۷	۲/۰۴

نتایج نسبت R/D بدست آمده از لحاظ مراحل نمونه‌برداری مرحله A با $0/96 \pm 0/15$ بیشترین نسبت و مرحله D با $0/380 \pm 0/04$ کمترین نسبت را به خود اختصاص داده‌اند. از لحاظ تیماری نیز، تیمار F1M2 (۰/۵۰±۰/۰۲) کمترین نسبت و تیمار F2M2 (۰/۹۳۹±۰/۰۶) بیشترین نسبت را به خود اختصاص داده

بودند (جدول ۳). ولی نسبت R/D در سایر مراحل نمونه برداری با رشد ماهی افزایش یافته است. حداقل نسبت R/D ملاحظه شده در تیمار F2M3 (۰/۲۳±۰/۰۳) مربوط به مرحله D نمونه برداری و حداکثر در تیمار F2M2 (۱/۸۷±۰/۱۷) مربوط به مرحله A بوده است.

A، F و K مشاهده گردیده ($P \leq 0.05$) ولی در بین تیمارهای مرحله D اختلاف معنی داری مشاهده نگردید ($P \geq 0.05$).

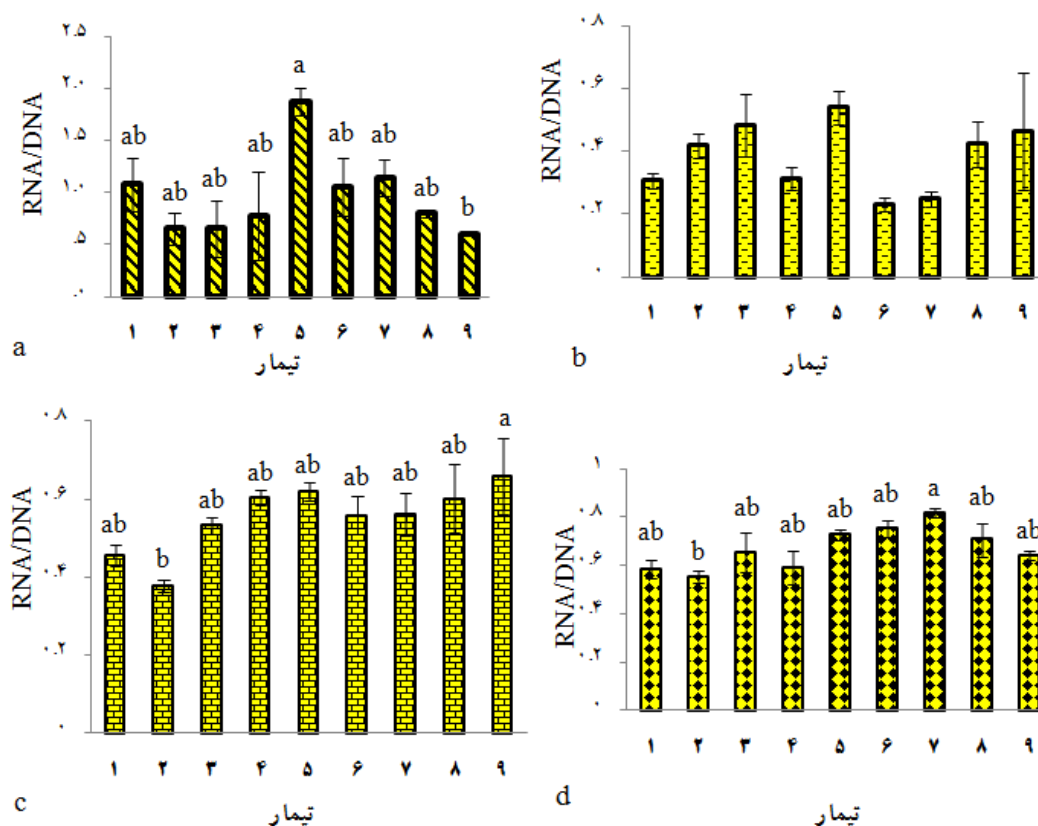
بر اساس آزمون آنالیز واریانس و توکی نسبت R/D محاسبه شده برای کل مراحل نمونه برداری معنی دار بوده ($P \leq 0.05$) و از لحاظ مراحل نمونه برداری (جدول ۶) اختلاف معنی داری در بین تیمارهای مراحل

جدول ۶: تست آنالیز واریانس هر یک از مراحل نمونه برداری در تاسماهی ایرانی

Sig.	F	میانگین مربعات	df	مجموع مربعات	
۰/۰۴۹	۲/۵۲۸	۰/۴۷۴	۸	۳/۷۸۸	بین گروه
		۰/۱۸۷	۱۸	۳/۳۷۲	درون گروه
			۲۶	۷/۱۶۰	مجموع
۰/۱۲۰	۱/۹۱۴	۰/۰۳۶	۸	۰/۲۹۰	بین گروه
		۰/۰۱۹	۱۸	۰/۳۴۱	درون گروه
			۲۶	۰/۶۳۲	مجموع
۰/۰۳۷	۲/۷۲۸	۰/۰۲۳	۸	۰/۱۸۲	بین گروه
		۰/۰۰۸	۱۸	۰/۱۵۰	درون گروه
			۲۶	۰/۳۳۲	مجموع
۰/۰۱۶	۳/۳۲۴	۰/۰۲۳	۸	۰/۱۸۵	بین گروه
		۰/۰۰۷	۱۸	۰/۱۲۵	درون گروه
			۲۶	۰/۳۱۰	مجموع

است که بیشترین نسبت در تیمار ۹ و کمترین آن در تیمار ۲ بوده است ($P \leq 0.05$). همچنین تیمار ۲ و ۹ اختلاف معنی داری را با یکدیگر نشان دادند ($P \leq 0.05$) و بین سایر تیمارها اختلاف معنی دار آماری مشاهده نگردید ($P \geq 0.05$) (شکل ۱c). در مرحله K نیز اختلاف آماری بین نسبت R/D در بین تیمارها مشاهده می شود ($P \leq 0.05$). نتایج این مرحله بیانگر آن بوده است که بیشترین نسبت در تیمار ۷ و کمترین آن در تیمار ۲ بوده است ($P \leq 0.05$). همچنین تیمار ۲ و ۷ اختلاف معنی داری را با یکدیگر نشان دادند ($P \leq 0.05$) و بین سایر تیمارها اختلاف معنی دار آماری مشاهده نگردید ($P \geq 0.05$) (شکل ۱d).

نتایج آزمون آماری نشان می دهد که مرحله A اختلاف آماری بین نسبت R/D در بین تیمارها مشاهده می شود ($P \leq 0.05$). این نتایج بیانگر آن است که بیشترین نسبت در تیمار ۵ و کمترین آن در تیمار ۹ بوده است ($P \leq 0.05$). لازم به ذکر است که تیمار ۹ و ۵ اختلاف معنی داری را با یکدیگر نشان دادند ($P \leq 0.05$) و بین سایر تیمارها اختلاف معنی دار آماری مشاهده نگردید ($P \geq 0.05$) (شکل ۱a). مرحله D با توجه به اینکه تیمار ۶ کمترین مقدار و تیمار ۵ بیشترین مقدار نسبت R/D را داشتند ولی اختلاف آماری بین تیمارها مشاهده نگردید ($P \geq 0.05$) (شکل ۱b). در مرحله F، اختلاف آماری بین نسبت R/D در بین تیمارها مشاهده می شود ($P \leq 0.05$). نتایج این مرحله بیانگر آن بوده



شکل ۱: تغییرات نسبت RNA/DNA تیمارها در مراحل نمونه برداری. a: مرحله A (۱۰ روز پس از تفریخ لارو "حاوی کیسه زرده"). b: مرحله D (۴۵ روز پس از تفریخ لارو). c: مرحله F (۹۰ روز پس از تفریخ لارو) و d: مرحله K (۱۲۰ روز پس از تفریخ لارو)

آبرزی پروری، غذا بیش از ۶۰ درصد از هزینه‌های عملیاتی را به خود اختصاص می‌دهد و با توجه به اینکه ماهی یک جزء مهم و منبع اصلی پروتئین حیوانی از کل مصرف مواد غذایی بیش از نیمی از جمعیت جهان است، بر این اساس صنعت آبرزی پروری در سراسر جهان خیلی سریع در حال گسترش می‌باشد (Hufnagl and Temming, 2018). محققان در ابتدا برای اندازه‌گیری رشد و شرایط تغذیه‌ای در گونه‌های مختلف ماهی از شاخص‌های همچون مورفومتریک، بافت‌شناسی و بیوشیمیایی استفاده می‌کردند، ولی امروزه با اندازه‌گیری اسیدنوکلئیک لاروها از طریق نسبت RNA/DNA میزان رشد در لاروها مورد سنجش قرار می‌گیرد (Rooker and Holt, 1996). R/D از

همچنین نتایج آزمون دو طرفه ANOVA اثر متقابل بین تیمارها در زمان‌های نمونه‌برداری نشان می‌دهد که نسبت R/D در زمان‌های مختلف در بین تیمارها نسبت‌های متفاوتی وجود دارد ($P \leq 0.05$). بر همین اساس اثر متقابل بین مراحل نمونه‌برداری و تیمارها با نسبت R/D فقط در مرحله اول (A) در تیمارهای ۱، ۵ و ۷ و مرحله دوم (D) در تیمارهای ۱، ۴، ۶ و ۷ وجود داشت، اما بین سایر زمان‌ها و تیمارها با نسبت R/D اثر متقابل دیده نشد.

بحث

نرخ رشد برای مطالعه پویایی شناسی جمعیت گونه‌ها از اهمیت اساسی برخوردار است و در صنعت

نشانه‌های شاخص وضعیت رشد لارو ماهیان بوده که بدن‌بال آن با افزایش سنتز پروتئین و در نهایت با افزایش توده عضلانی بدن لاروها همراه می‌باشد.

غلظت RNA در یک بافت در پاسخ به سنتز پروتئین وابسته به رونویسی تغییر می‌کند که به طور مستقیم با فعالیت ریبوزوم و با میزان رشد (افزایش سن) ارتباط دارد و تخمینی از تعداد ریبوزوم را فراهم می‌کند و تغییرات در رژیم غذایی منجر به تغییرات در تعداد ریبوزوم می‌شود. در حالی که غلظت DNA بافت ماهی حامل اطلاعات ژنتیکی، در تغییر شرایط محیطی نسبتاً پایدار باقی می‌ماند و به عنوان شاخصی از تعداد سلول‌ها استفاده می‌شود. بنابراین به منظور تخمین و ارزیابی وضعیت رشد و فیزیولوژیک لاروها با اندازه‌گیری و تجزیه و تحلیل نسبت R/D می‌توان اطلاعات مفیدی از وضعیت لاروها و تغذیه آنها ماهیان بدست آورد (Wright and Hetzel, 1985; Foley et al., 2016). نسبت R/D به طور کیفی نشان داده می‌شود ولی به طور بالقوه منعکس کننده کمی لاروهای ماهی می‌باشد، بطوریکه نسبت R/D ثابت کرده است که یک برآورد قابل اعتماد از وضع تغذیه‌ای و رشد در لاروهای ماهیان بوده است.

نسبت R/D در لاروهای پس از جذب کیسه زرده (شروع تغذیه بیرونی) می‌تواند نشان دهنده تغییرات در نرخ رشد و شرایط تغذیه‌ای در طی یک دوره زمانی باشد. بر همین اساس Labh در سال ۲۰۱۵ با بررسی روند رشد در ماهی *Labeo rohita* با اندازه‌گیری نسبت RNA به DNA گزارش داد که محتوای RNA به سرعت با سن ماهی افزایش می‌یابد، بطوریکه متوسط مقدار RNA و DNA در تیمار شاهد از ابتدای شروع بترتیب ۴/۷۳ و ۲/۲۹ نانوگرم به میلی گرم در هفته اول

به ۹/۱۹۲ و ۳/۲۴ نانوگرم به میلی گرم در پایان هفته ۱۲ آزمایش افزایش یافت. بطوریکه Clemmesen (۱۹۸۸) همچنین Ueberschar و Clemmesen (۱۹۹۲) نسبت R/D با نمونه‌برداری از لاروهای صید شده و گرسنه اظهار نمود که با افزایش فاصله گرسنگی، لاروها با کاهش نسبت R/D مواجه هستند و پیشنهاد نمود که استفاده از نسبت R/D در شناسایی لاروهای گرسنه در محیط‌های مختلف دریایی مورد استفاده قرار گیرد.

Raae و همکاران (۱۹۸۸) تغییرات کمی در DNA، RNA و پروتئین محلول در مراحل اولیه توسعه لارو ماهی کاد (*Gadus morhua* L.) در دو محیط آزمایشگاهی و استخر آب شور در حالت تغذیه‌ای و گرسنگی بیان داشتند که در هر دو محیط تغذیه شده تولید RNA و همچنین نسبت R/D آنها بالا بوده اما پاسخ لارو در محیط استخر بیشتر و سریع‌تر بود. Rooker و Holt (۱۹۹۶) با بررسی اثر گرسنگی بیش از ۵ روز در ۳ مرحله ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز در ماهی گزارش نمود که تفاوت‌های قابل توجه‌ای از لارو تغذیه شده با لارو گرسنه در نسبت R/D مشاهده گردید و بیان نمودند که نسبت R/D در طول یک دوره گرسنگی ۵ روزه کاهش یافته و این نسبت یک کاهش نسبی با افزایش سن ماهی همراه بود و این نسبت در محیط‌های دمایی کنترل شده (ثابت) و طبیعی (دوره‌ای) بطور قابل توجهی تفاوت نداشت. نتایج تحقیق Rooker و Holt (۱۹۹۶) نشان داد که غلظت‌های RNA و DNA در طی توسعه زودرس لاروها به طور معنی داری کاهش می‌یابد، و پس از تقریباً ۴ هفته (حدود ۱۴ میلیمتر)، هر دو غلظت RNA و DNA ثابت باقی می‌ماند و این یافته‌ها نشان می‌دهد که هیپرتروفی در زمان توسعه

زودرس رخ می‌دهد و پس از یک دوره مشخص، رشد در سطح سلولی نسبتاً یکنواخت می‌شود.

Stierhoff و همکاران (۲۰۰۹) با بررسی نسبت R/D در مطالعه پاسخ رشد پس از یک دوره ۷ روزه در دو گونه از ماهیان دریایی پرداخته و پیشنهاد داد که بررسی R/D تنها ۱ روز پس از غذا دهی (۱ روز گرسنگی) انجام گیرد ولی در شرایط دمایی بالا که معمولاً می‌تواند با کاهش رشد عضله همراه باشد بهتر است از نسبت R/D کمتر استفاده گردد. بنابراین در نظر گرفتن شرایط دمایی در زمان نمونه برداری از ماهی برای تفسیر نسبت R/D مهم است. این تحقیق نیز همانند با پیشنهاد Stierhoff و همکاران (۲۰۰۹) از لاروها یک روز پس از گرسنگی و در شرایط دمایی یکسان نمونه برداری صورت گرفت.

Tong و همکاران (۲۰۱۰) با بررسی تغییرات DNA ، RNA ، پروتئین و رشد در لارو و بچه سپر ماهیان گزارش دادند که طی ۶۰ روز پرورش نسبت R/D، ۱۲ روز اول کاهش سپس به سرعت تا ۱۹ روز پس از تفریخ افزایش یافته و این ریتم تا ۳۵ روزگی در نوسان بوده و سپس به دنبال آن با کاهش نسبی همراه بود. بر همین اساس Grimm و همکاران (۲۰۱۵) نسبت R/D را بعنوان یک پاسخ از عملکرد دقیق در اوایل رشد خرچنگ خاردار گزارش نمودند و بیان داشتند که اگر رشد کلی مد نظر باشد نسبت R/D یک ابزار با ارزش در مطالعات تغذیه با خرچنگ خاردار های آب شیرین است.

مطالعات انجام شده توسط سایر محققین در خصوص برآورد نسبت R/D لاروی ماهی می‌توان به گونه *Thunnus orientalis* در اقیانوس آرام شمال غربی در لارو کمتر از ۵ میلی‌متری و در دماهای ۲۵ و

۲۸ درجه سانتی گراد این نسبت بترتیب ۳/۷۳ و ۵/۳۹ و در لاروهای بیشتر از ۵ میلی‌متر و در دماهای ۲۵ و ۲۸ درجه این نسبت بترتیب ۲/۸۳ و ۱/۲۴ (Tanaka et al., 2008)، در لاروهای *Pimephales promelas* این نسبت به طور معنی داری در ۸ روز پس از گرسنگی (محرومیت از غذا) نسبت به گروه لاروهای تغذیه شده کاهش یافته و محدوده نسبت R/D در لاروهای در حال رشد را بین ۳-۴ در بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان توسط (McLaughlin et al., Chung et al., 1993; 1995; Arndt et al., 1996) گزارش شده بود و این نسبت در مقایسه با بالغین تغذیه شد به طور ثابتی پایین‌تر از ماهی‌های جوان بودند (Weber et al., 2003). نسبت R/D در خرچنگ جوان آب شیرین (*Astacus astacus*) تغذیه شده در هفته اول ۰/۳۳ و در هفته چهارم (پایان آزمایش) به ۱/۵۲ رسید، همچنین مقدار RNA وزن تر لاروها در هفته دوم نیز از ۰/۲۷ به ۱/۶۱ نانوگرم بر میلی گرم در هفته چهارم و غلظت DNA وزن تر لاروها نیز از ۰/۵۲ هفته سوم به ۲/۱۱ نانوگرم بر میلی گرم در هفته چهارم رسید (Grimm et al., 2015)، Tillner و همکاران (۲۰۱۵) نسبت R/D کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در تغذیه لاروها با آرتمیا، نماتد و غذای خشک برای لاروهای ۸ روز پس از تفریخ را 0.65 ± 0.27 و برای لاروهای ۲۲ روز پس از تفریخ 1.96 ± 0.63 بدست آوردند و بیان نمودند که نسبت R/D به طور قابل توجهی با سرعت رشد ارتباط دارد. همچنین Hufnagl و Temming (۲۰۱۸) میزان نسبت RNA به DNA وزن خشک میگو قهوه‌ای (*Crangon crangon*) را 0.442 برآورد کردند، اشاره نمود.

نتایج حاصل از این تحقیق همسو با نتایج سایر محققین بوده بطوریکه در این بررسی با بدست آوردن

غلظت های RNA و DNA از لاروها، قبل از آغاز تغذیه بیرونی تا ۱۲۰ روزگی لاروها طی ۴ مرحله نسبت R/D حاصل گردید. متوسط غلظت RNA و غلظت DNA بدست آمده در این بررسی طی ۴ مرحله از زمان قبل از تغذیه فعال تا ۱۲۰ روزگی افزایش داشته بطوریکه محتوای آنها به ترتیب در مرحله A (۶۵۷/۸۶) و (۷۹۰/۴۳)، مرحله D (۷۳۷/۹۲ و ۱۶۷۰/۱۸)، مرحله F (۷۵۷/۳۸ و ۱۰۶۳/۴۵) و مرحله K (۷۸۹/۲۱ و ۱۰۳۱/۲۵) نانوگرم بر میکرولیتر بود. بر همین اساس متوسط نسبت R/D در طول زمان آزمایش که شاخصی از سنتز پروتئین به منظور تخمین دقیق میزان رشد و شرایط تغذیه ماهی استفاده می شود، و با توجه به اینکه غلظت RNA و DNA در این بررسی به سرعت با سن لاروهای تاسماهی ایرانی افزایش یافته بطوریکه این مقدار برای مرحله A (۰/۹۶)، مرحله D (۰/۳۸)، مرحله F (۰/۵۵) و مرحله K (۰/۶۷) نانوگرم بر میلی گرم برآورد گردید. در این تحقیق بجز مرحله A در سایر مراحل یک روند افزایشی در نسبت R/D با افزایش سن لاروها دیده می شود، و علت بالا بودن نسبت R/D در مرحله A از یک طرف بعلت همراه داشتن کیسه زرده و از طرف دیگر هموژنیزه شدن کل بدن لاروهای این مرحله می توان نسبت داد در صورتی که برای سایر مراحل، لاروها تغذیه بیرونی داشته و حدود ۵۰ میلی گرم از عضله لاروها هر مرحله هموژنیزه و مورد سنجش قرار گرفته اند. با این حال افزایش غلظت RNA با روند افزایش سطح پروتئین غذایی همراه بوده و به طور مستقیم در سنتز پروتئین نقش داشته و با رشد لاروها، افزایش RNA مشاهده می گردد، ولی غلظت DNA معمولاً پایدار بوده و نسبت R/D با توجه به روند افزایشی RNA، افزایش یافته، که نشان دهنده ظرفیت سنتز

پروتئین در هر سلول است. بر همین اساس مطابق جدول ۳ متوسط کل مراحل نمونه برداری حاصل از این تحقیق نشان داد که تیمار ۵ (F2M2) دارای بالاترین نسبت R/D (۰/۹۳) نانوگرم بر میکرولیتر نسبت به سایر تیمارهای مراحل نمونه برداری بود. همچنین پایین ترین نسبت R/D در مطالعه حاضر ۰/۲۳ در تیمار ۶ مربوط به مرحله D و بالاترین نسبت R/D در این تحقیق ۰/۸۲ در تیمار ۷ مربوط به مرحله K مشاهده گردید که نسبت R/D به بالاترین مقدار خود در مرحله K با افزایش اندازه و سن رسیده است. اندازه گیری نسبت R/D می تواند یک رویکرد خوبی در بررسی کوتاه مدت رشد لاروهای جمع آوری شده باشد (XiaoDi, et al., 2009; Zehra and Khan 2013). از طرفی نسبت R/D به تنهایی یک شاخص دقیق از فعالیت متابولیک نسبت به غلظت RNA است، زیرا اندازه سلول های بافت در نمونه ها بر روی این نسبت، تاثیر گذار نیست (Labh, 2015). بنابراین نسبت R/D در لارو تاسماهی ایرانی در این تحقیق به طور مثبت با روند رشد در ارتباط است که توسط سایر محققین همچون (Labh, 2015; Grimm et al., 2015; Zehra and Khan, 2015; Clemmesen, 1988) و غیره نشان داده شده است.

نسبت R/D نه تنها بعنوان شاخصی در وضعیت رشد موجودات می باشد بلکه از آن بعنوان یک شاخص مفید بر اثرات محدود کننده های محیطی و کیفیت محیط زیست در سنتز پروتئین موجودات استفاده می نمایند، بطوریکه در این راستا Amaral و همکاران (۲۰۰۹) بیان داشتند که نسبت R/D در گونه های مورد مطالعه هم با سطح آلودگی فصلی محیط زیست گونه ها و هم با تغییرات زیستگاهی تغییر می کند.

بطور کلی می‌توان نتیجه‌گیری نمود که غلظت RNA و DNA به سرعت با افزایش سن تاسماهی ایرانی، افزایش یافته و به دنبال آن با افزایش نسبت R/D در ماهی که در پاسخ به وضعیت تغذیه ماهی عمل می‌کند، همراه بوده که می‌توان آن را به تغییر رژیم غذایی در طول پرورش لارو نسبت داد، بنابراین اندازه‌گیری نسبت R/D می‌تواند یک رویکرد خوبی از تغذیه لاروها و بچه ماهیان حاصل از بررسی کوتاه مدت رشد آنها باشد. پیشنهاد می‌گردد که پژوهش در خصوص برآورد نسبت R/D که شاخصی از سنتر پروتئین و رشد می‌باشد به منظور تخمین دقیق میزان رشد در شرایط مختلف از جمله تغذیه‌ای، گرسنگی، دمایی و محیطی صورت گیرد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از ریاست محترم مرکز بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری دکتر شهید بهشتی جناب آقای مهندس درویشی و همکاران محترم بخش تکثیر آن مرکز، از کلیه همکاران محترم موسسه تحقیقات بین الملل ماهیان خاویاری علی‌الخصوص جناب آقای دکتر شناور، آقای دکتر معصوم زاده به دلیل هماهنگی‌های لازم و همکاری‌های صمیمانه‌شان سپاسگزاری می‌نمائیم.

منابع

۱. چکمه دوز قاسمی، ف.، بهمنش، ش.، ۱۳۹۴. تنوع ژنی و رابطه فیلوژنی دو گونه از جنس *Rutilus* در سواحل جنوبی دریای خزر بر اساس توالی یابی ژن سیتوکروم b میتوکندریایی. نشریه علمی توسعه آبی پروری، ۹(۳)، ۱۹-۲۸

۲. حلاجیان، ع.، ۱۳۹۷. بهگزینی تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) براساس صفات رشد، بررسی توارث و رابطه RNA با رشد آن در مرحله لاروی. رساله دکتری پژوهش محور موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، ۲۴۴ص
۳. شریعتی، ابوالقاسم. ۱۳۸۹. تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری، موسسه آموزش عالی علمی کاربردی جهاد کشاورزی، ۲۰۶ص
۴. شریفی، م.، نجاتخواه معنوی، پ.، چکمه دوز قاسمی، ف.، بهمنش، ش.، ۱۳۹۵. ساختار ژنتیکی و جمعیتی ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*) (*caspius*) سواحل جنوبی دریای خزر و دریاچه پشت سد ارس با استفاده از روش توالی‌یابی DNA (DNA sequencing). نشریه علمی توسعه آبی پروری، ۱۰(۴)، ۷۳-۶۳
۵. کاظمی، ر.، فیروزبخش، ف.، حلاجیان، ع. و غلامی، س. ۱۳۹۸. اثر نور بر فرآیند تکوین لوله گوارش و برخی از شاخصهای رشد لارو تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*). نشریه علمی توسعه آبی پروری، ۱۳(۴)، ۹۳-۱۰۶

6. Amaral, V., Henrique, N., Cabral, C., Paula, A.J., 2008. Implications of habitat-specific growth and physiological condition on juvenile crab population structure. *Marine and Freshwater Research*, 59: 726-734.
7. Amaral, V., Penha-Lopes, G., Paula, A.J., 2009. RNA/DNA ratio of crabs as an indicator of mangrove habitat quality. *Aquatic Conservation Marine and Freshwater Ecosystems*, 19: 56-62.
8. Buckley, L., Caldarone, E., Ong, T.L., 1999. RNA-DNA ratio and other nucleic acid-based indicators for growth and condition of marine fishes. *Hydrobiologia*, 401: 265-277

18. Rooker, J.R., Holt, G.J., Holt, S.A., 1997. Condition of larval and juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*) from estuarine nursery habitats. *Marine Biology*, 127: 387–394.
19. Stierhoff, K.L., Targett, T.E., Power, J.H., 2009. Hypoxia-induced growth limitation of juvenile fishes in an estuarine nursery: assessment of smallscale temporal dynamics using RNA: DNA. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 66:1033–1047.
20. Tanaka, Y., Gwak, W.S., Tanaka, M., Sawada, Y., Okada, T., Miyashita, S., Kumai, H., 2007. Ontogenetic changes in RNA, DNA and protein contents of laboratory-reared Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Fisheries Science*, 73: 378–384.
21. Tillner, R., Assheuer, T., Rennert, B., Trubiroha, A., Clemmesen, C., Wuertz, S., 2015. Evaluation of an improved RNA/DNA quantification method in a common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus 1758) larval feeding trial with *Artemia*, two nematodes (*Panagrellus redivivus* Linnaeus 1758, *Panagrolaimus* sp. Fuchs 1930) and dry feed. *Applied Ichthyology*, 31(3), 466–473.
22. Tong, X.H., Liu, Q.H., Xu, S.H., Li, J., Xiao, Z.Z., Ma, D.Y., 2010. Changes in RNA, DNA, protein contents and growth of turbot *Scophthalmus maximus* larvae and juveniles. *Journal of Fish Biology*, 77: 512–525.
23. Ueberschar, B., Clemmesen, C., 1992. A comparison of the nutritional condition of herring larvae as determined by two biochemical methods-tryptic enzyme activity and RNA/DNA ratio measurements. *ICES Journal of Marine Science*, 49(2): 245–249.
24. Westerman, M., Holt, G.J., 1994. RNA: DNA ratio during the critical period and early larval growth of the red drum *Sciaenops ocellatus*. *Marine Biology* (Berlin), 121: 1–9.
25. Wright, D.A., Hetzel, E.W., 1985. Use of RNA: DNA ratios as an indicator of nutritional stress in the American oyster,
9. Clemmesen, C.M., 1988. A RNA and DNA fluorescence technique to evaluate the nutritional condition of individual marine fish larvae. *Meeresforsch*, 32: 134–143.
10. Dortch, Q., Todd, L., Roberts, J.R., Clayton, Jr., Ahmed, S.I., 1983. RNA/DNA ratios and DNA concentrations as indicators of growth rate and biomass in planktonic marine organisms. *Marine Ecology-Progress Series*, 13: 61–71.
11. Foley, C.J., Bradley, D.L., Hook, T.O., 2016. A review and assessment of the potential use of RNA:DNA ratios to assess the condition of entrained fish larvae. *Ecological Indicators*, 60:346–357.
12. Grimm, C., Lehmann, K., Clemmesen, C., Brendelberger, H., 2015. RNA/DNA ratio is an early responding, accurate performance parameter in growth experiments of noble crayfish *Astacus astacus* (L.). *Aquaculture Research*, 46: 1937–1945.
13. Hufnagl, M., Temming, A., 2018. Are the RNA: DNA ratio and dry-weight-at-length suitable growth proxies for brown shrimps (*Crangon crangon*)? *Scientia Marina*, 82(1):43–54.
14. Labh, Sh.N., 2015. RNA: DNA Ratio and Growth Performance of Rohu *Labeo rohita* (Hamilton) Fed Varied Proportion of Protein Diet during Intensive Aquaculture. *International Journal of Life Sciences*, 9(6): 113–122.
15. Mohammadi, H., Khara, H., Kazemi, R., 2015. Effect of different doses of synthetic hormone LHRH-A2 on serum sex hormones, ovulation percent and egg hatching rates of Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, *Croatian Journal of Fisheries*, 73: 58–62.
16. Raae, A.J., Opstad, I., Kvenseth, P., Walther, B.Th., 1988. RNA, DNA and protein during early development in feeding and starved cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture*, 73: 247– 259.
17. Rooker, J.R., Holt G.J., 1996. Application of RNA: DNA ratios to evaluate the condition and growth of larval and juvenile Red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Marine and Freshwater Research*, 47: 283–90.

- major carp, *Catla catla* (Hamilton). Journal of the World Aquaculture Society, 44: 363–373.
28. Zehra, S., Khan, M.A., 2015. Dietary tryptophan requirement of fingerling *catla catla* (Hamilton) based on growth, protein gain, RNA/DNA ratio, haematological parameters and carcass composition. Aquaculture Nutrition, 21:690-701.
- Crassostrea virginica*. Marine Ecology Progress Series, 25:199-206.
26. XiaoDi, S., Li, L., Hua, W., Wen, G., QingShui, W., Hui, X., 2009. Study on isoleucine requirement for juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. Journal of Fisheries of China, 33(5): 813–822.
27. Zehra, S., Khan, M.A., 2013. Dietary arginine requirement of fingerling Indian